



Tesina de Grado presentada para la obtención del Título de Licenciatura en Bioquímica

Niveles de expresión de FABP1 y FABP2 y su distribución intracelular en el enterocito, en respuesta a la dieta en *Danio rerio*.

Lucia del Puerto
Licenciatura en Bioquímica.

Tutora: Adriana Esteves

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias, UdelAR
Montevideo, diciembre 2022

Agradecimientos

A mi tutora Adriana por darme la oportunidad para realizar este trabajo, por su dedicación, tiempo y paciencia y por compartir su conocimiento conmigo. -

A todos en el laboratorio 304, Gabriela, Cecilia, Valentina y Bruno por su apoyo y su disposición y a todos en piso 3 ala norte que colaboraron de muchas formas, respondiendo consultas, compartiendo conocimiento, espacio y tiempo. -

A la Jefatura de Abastecimientos y Suministros (Almacenes Generales) de CONAPROLE por permitirme ajustar los horarios de trabajo para poder estudiar y concurrir a la facultad. -

A mi familia por su apoyo incondicional, a mis padres en particular por ser mis grandes referentes. -

A Leonardo, quien es en gran parte responsable de que haya podido transitar este camino. -

INDICE

1. ABREVIATURAS.....	4
2. RESUMEN.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
3.1.1. Estructura y función de las FABPs	6
3.1.2. Las FABPs en el intestino.....	8
3.2. Organismo modelo – <i>Danio rerio</i>	11
4. OBJETIVOS.....	13
4.1. Objetivo General.....	13
4.2. Objetivos específicos.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1. Material biológico.....	13
5.2. Preparación de lisado intestinal de peces.....	14
5.3. Purificación de proteínas totales.....	14
5.4. Cuantificación de proteínas totales.....	15
5.5. Western Blot Cuantitativo.....	16
5.6. Microscopia electrónica de transmisión.....	16
5.6.1. Procesamiento de muestras para inmunomicroscopía electrónica de transmisión	16
5.6.2. Inmunodetección con partículas de oro coloidal. -.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1. Puesta a punto de condiciones.....	18
6.2. Variación de la expresión según dieta.....	22

6.3. Microscopía electrónica de transmisión.....	27
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

1. ABREVIATURAS

BCA: ácido bicinconínico

BSA: seroalbúmina bovina

FABPs: proteínas de unión a ácidos grasos

HRP: peroxidasa de rábano

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

IgG: inmunoglobulina tipo G

LCFA: ácido graso de cadena larga

MWM: marcador de peso molecular

PBS: solución salina isotónica con fosfato

RSB: buffer de rehidratación

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

TCA: ácido tricloroacético

WB: western blot

2. RESUMEN

Los ácidos grasos obtenidos por la dieta son absorbidos por los enterocitos en el intestino delgado siendo transportados intracelularmente por proteínas transportadoras. Entre estos transportadores de ácidos grasos se encuentran las proteínas de unión a ácidos grasos, FABPs (*fatty acid binding proteins*). Las FABPs pertenecen a una familia multigénica de 9 proteínas en mamíferos, de bajo peso molecular, muy conservadas y presentes en distintos tejidos. Se diferencian unas de otras por su distribución y por su afinidad y especificidad por sus ligandos.

En la región proximal del intestino se expresan de forma abundante FABP1 (o FABP hepática) y FABP2 (o FABP intestinal). En este trabajo, con el objetivo de determinar si estas proteínas cumplen diferentes funciones en el enterocito nos propusimos evaluar sus niveles de expresión, en respuesta a la dieta y su distribución intracelular en condiciones de alta expresión, empleando como modelo el pez cebra adulto (*Danio rerio*).

Se utilizaron tres grupos de peces: i) alimentados con yema de huevo, ii) con comida comercial (Tetramin), (en ambos grupos se sacrificaron especímenes a las 3 hs y 6 hs luego de haber sido alimentados, iii) un grupo que no recibió alimento.

Se logró analizar el nivel de expresión de la FABP2 en respuesta a la dieta por Western Blot cuantitativo, y expresados como la relación de intensidades FABP2/ β Actina. Según esta relación, se observa una tendencia de mayor expresión de FABP2 en peces alimentados con yema de huevo, con respecto a los peces alimentados con comida comercial y al grupo de peces no alimentados. Estos resultados están alineados con los resultados de aumento de expresión de *fabp2* en respuesta a la dieta en pez cebra (Esteves et al., 2016; Suárez, 2018). A pesar de ello, una vez analizadas en forma estadística, las diferencias no son significativas. No fue posible realizar los ensayos de expresión con FABP1. Se intentó además analizar la inmunolocalización a nivel subcelular de FABP1 y FABP2 en respuesta a la dieta utilizando microscopía electrónica de transmisión, pero solo se logró determinar la localización subcelular de FABP1.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. FABPs

3.1.1. Estructura y función de las FABPs

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) son miembros de la superfamilia de proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBP). Son proteínas con un peso molecular de aproximadamente 14-15 kDa que se unen preferentemente a ácidos grasos de cadena larga (LCFA; ≥ 14 carbonos) insaturados y, en menor medida, a ácidos grasos saturados (Ockner & Manning, 1974; Storch & Thumser, 2010).

Se han identificado nueve subtipos de FABPs en vertebrados, con distribución tejido específica: L-FABP (hígado), I-FABP (intestinal), H-FABP (músculo y corazón), A-FABP (adipocito), E-FABP (epidermis), Il-FABP (ileal), B-FABP (cerebro), M-FABP (mielina) y T-FABP (testículo). Aun cuando su nomenclatura especifique un tejido particular, actualmente se conoce que cada miembro de esta familia se expresa en más de un tejido. Una nomenclatura reciente asigna a cada tipo un número así la L-FABP también se nombra como FABP1, y a la I-FABP como FABP2 (Hertzel & Bernlhor, 2000). En este trabajo utilizaremos la nomenclatura numérica.

La estructura terciaria de todas las FABP es compartida: un motivo básico característico β -barril (fig.1), el mismo contiene diez cadenas β antiparalelas organizadas en dos hojas casi ortogonales, con un motivo hélice-vuelta-hélice uniendo las dos primeras cadenas β (βA y βB) (Banaszak et al., 1994; Zhang et al., 2003). Se ha descrito una región que podría actuar como portal de entrada y salida de ácidos (hélice α -II, giros βC - βD y βE - βF) (Sacchettini et al., 1989, Banaszak et al., 1994).

A pesar de una amplia variación de secuencia de la proteína (20-70%), todas comparten la estructura terciaria mencionada, así como la organización génica con 4 exones y 3 intrones estando algunos de ellos ubicados en la misma región cromosómica (Chmurzynska, 2006).

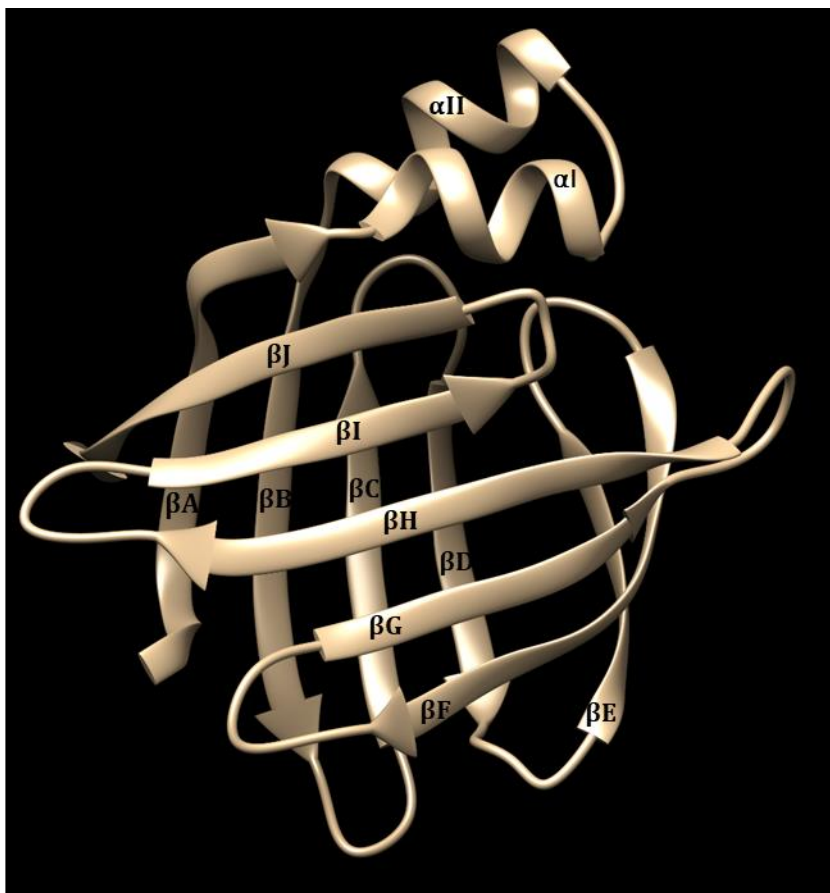


Figura 1. Estructura tridimensional de FABP2 de rata (1ifc.pdb).

Las FABPs estuvieron principalmente vinculadas al transporte de ácidos grasos hacia los distintos organelos según las necesidades de cada tejido (Gordon & Lowe, 1985). Posteriormente estudios realizados demostraron que se distinguen unas de otras, por su distribución tisular pero también por la especificidad y afinidad por los ligandos, lo que sugiere funciones específicas. Algunos miembros de la familia estarían involucrados en la modulación del crecimiento y proliferación celular, en la obtención de energía metabólica, regulación de la expresión génica e inmunidad celular (Glatz & Veerkamp, 1985; Madsen et al., 1992; Yang et al., 1994; Shimizu et al., 1997; Wang et al., 2003).

3.1.2. Las FABPs en el intestino

Las grasas obtenidas a través de la dieta son la mayor contribución de los lípidos presentes en la luz del intestino (fig.2). La hidrólisis de los lípidos por los jugos pancreáticos libera grandes cantidades de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) que son absorbidos por los enterocitos al nivel de su membrana apical (Alpers et al., 2000; Wang et al., 2013).

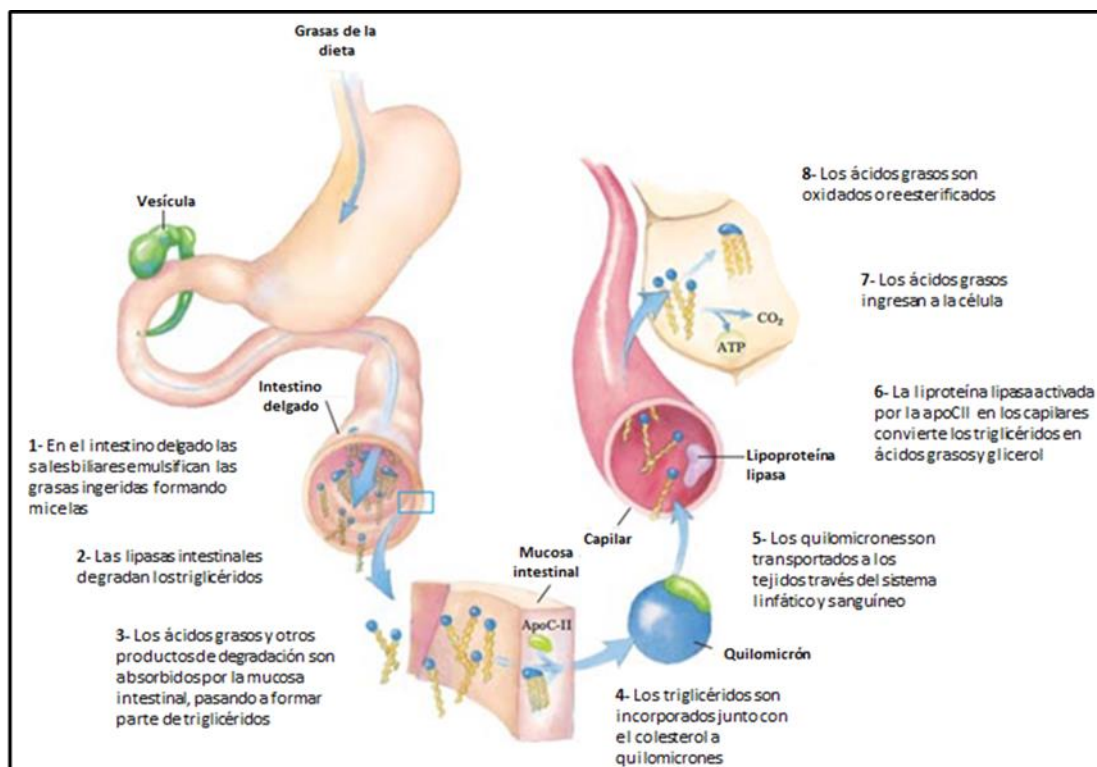


Figura 2. Proceso de digestión de lípidos en vertebrados: la digestión y absorción de los lípidos dietarios ocurre en el intestino delgado; los ácidos grasos liberados de los triacilglicéridos son empaquetados y finalmente enviados a los tejidos según los requerimientos del organismo. Tomado de Nelson. DL and Cox. MM; Lehninger Principios de Bioquímica, 4ta edición; Ed. Omega 2000.

En la región proximal del intestino, donde tiene lugar la absorción de lípidos, dos miembros de esta familia de proteínas, FABP1 y FABP2 se expresan abundantemente (Bass 1988; André et al., 2000) (Fig.3).

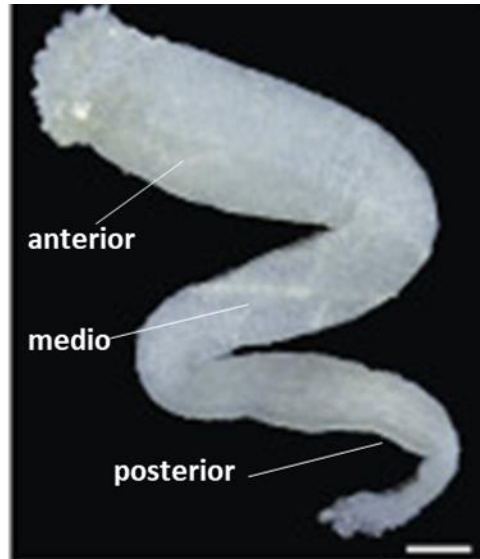


Figura 3. Intestino de pez *Danio rerio*.

Son las únicas proteínas de esta familia con alta coexpresión en el mismo tejido, lo que sugiere que ambas podrían ejercer funciones comunes y/o específicas (Niot et al., 2009; Gadjia et al., 2015). Se ha propuesto que ambas participen en el transporte intracelular de LCFA absorbidos, dirigiéndolos a los diferentes compartimentos subcelulares y/o vías metabólicas (Storch & Córscico, 2008; Montoudis et al., 2008; Lagakos et al, 2011; Huang et al., 2016)(Fig.4).

FABP1 por los ácidos grasos insaturados (Richieri et al., 1994; Lowe et al., 1987; Richieri et al, 2000).

Estudios *in vitro* sobre las dos proteínas han identificado diferencias en la estequiometría y especificidad de unión al ligando, y en los mecanismos de transferencia de LCFA a membranas lo que ha llevado a plantear que FABP1 e FABP2 tienen funciones diferentes en el enterocito. (Gadja & Storch, 2015).-

3.2 Organismo Modelo – *Danio rerio*

El pez *Danio rerio* o pez cebra es uno de los organismos modelo vertebrados de gran utilidad en genética, biología del desarrollo, neurofisiología e investigación biomédica (Grunwald & Eisen, 2002). Poseen una serie de atributos que lo hacen particularmente manejable y adecuado para la manipulación experimental. Es un pez pequeño y robusto; se puede mantener en gran número de manera fácil y económica en el laboratorio.

Se reproduce durante todo el año; las hembras pueden engendrar cada 2-3 días y un solo desove puede contener varios cientos de huevos. El tiempo de generación es corto, generalmente de 3 a 4 meses, lo que lo hace adecuado para experimentos de selección (Spence, 2006) (fig.5).

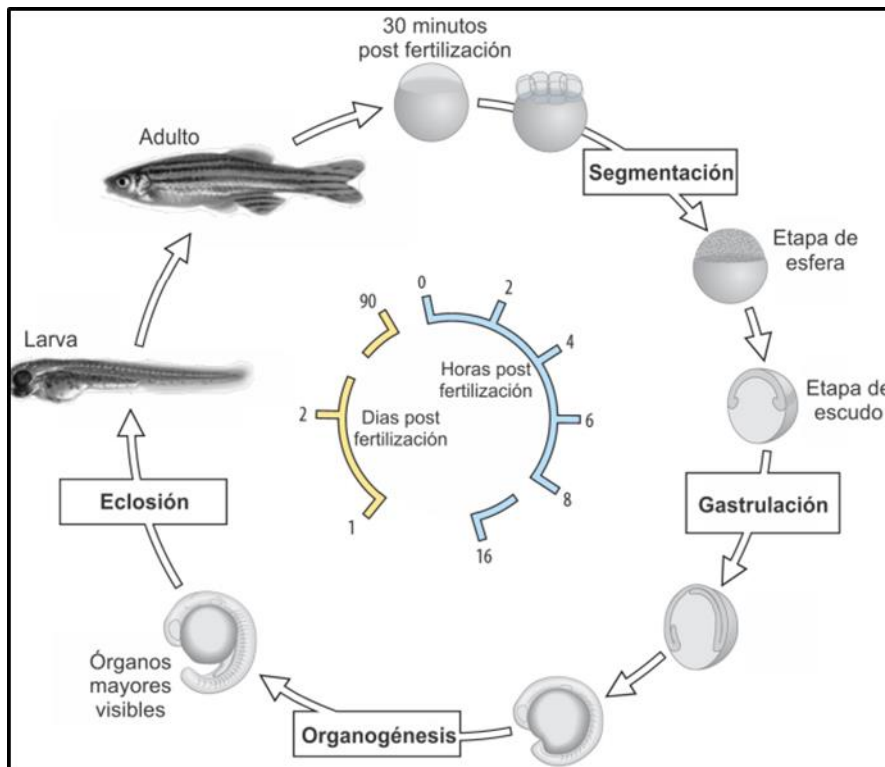


Figura 5. Ciclo de vida de *Danio rerio*.

El pez tiene un desarrollo rápido desde la fertilización hasta que tiene la capacidad de nadar a los 2 días.-

Figura tomada y adaptada de Wolper et al (2015).

Los órganos digestivos, el hígado, el intestino, el páncreas exógeno y exocrino y la vesícula biliar están presentes en el pez cebra al igual que en el humano (Stainier et al.,1995). (fig.6).-

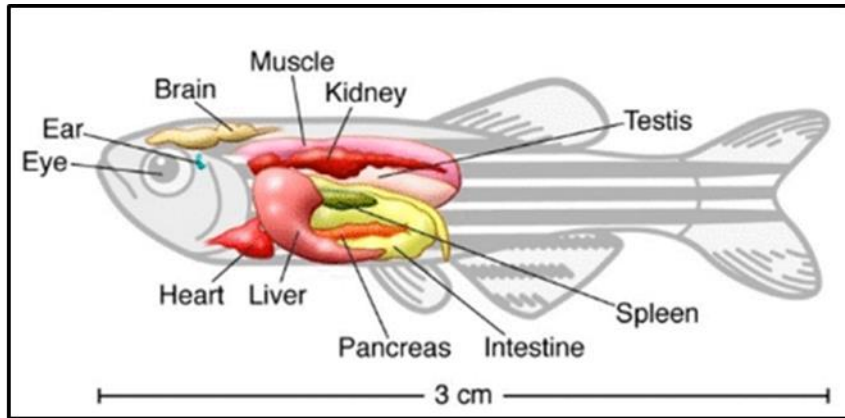


Figura 6. Morfología general de *Danio rerio* adulto. Figura tomada de Santoriello et al., (2012).

La morfología de los enterocitos y su composición, así como la conformación celular de los órganos digestivos es similar a la de los mamíferos. Las patologías del pez cebra muestran a menudo trastornos similares a los de las enfermedades humanas, haciendo de éste un sistema excepcional para estudiar enfermedades hepatobiliares, gastrointestinales y pancreáticas (Zhao & Pack, 2017; Ho et al., 2019).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar los niveles de expresión de FABP1 y FABP2 y su distribución intracelular en el enterocito, en respuesta a la dieta, en *Danio rerio*.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la expresión de FABP1 y FABP2 en el intestino anterior de pez cebra adulto mediante Western Blot en diferentes condiciones de alimentación.
- Estudiar la localización subcelular de FABP1 y FABP2 en intestino anterior de pez cebra mediante microscopia electrónica de transmisión en diferentes condiciones de alimentación.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material biológico

Se utilizaron peces cebra adultos proporcionados por el Instituto Pasteur de Montevideo. Los peces se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (28 °C), pH, concentración salina y bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 hs, alimentados con alimento comercial "Tetramin" una vez al día, siempre en el mismo horario.

5.2 Preparación de lisado intestinal de peces

Los peces se mantuvieron 24 hs sin comer de modo de sincronizarlos y luego un grupo fue alimentado con yema de huevo, otro grupo con alimento comercial (Tetramin), y un tercer

grupo no fue alimentado. Los peces fueron sedados con Eugenol y sacrificados a las 3 hs y 6 hs de haber sido alimentados.

Los intestinos (intestino anterior) (ver anexo) fueron disecados e inmediatamente homogeneizados en buffer de lisis (descripción en anexo) mediante lisis mecánica con homogeneizador para eppendorf (Pellet pestle, Sigma). Luego de la lisis se realizó centrifugación a 14000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, se descartó pellet, y el sobrenadante de cada muestra se conservó a -20 °C.-

5.3 Extracción de proteínas totales

Con el fin de extraer las proteínas totales de cada muestra se reutilizaron diferentes métodos

- Extracción usando el “ReadyPrep2-D Kit” (BioRad). Se tomaron 50 µl de cada muestra, se llevaron a 100 µl con PBS y se purificó siguiendo las instrucciones del fabricante. El pellet resultante se resuspendió en 50 µl de buffer de rehidratación (ver anexo).
- Extracción por precipitación con TCA y acetona. Se tomaron 50 µl de cada muestra, se llevaron a 100 µl con PBS y se purificó siguiendo el protocolo proporcionado por el Centro de Genómica y Proteómica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM) (ver anexo); el pellet resultante se resuspendió en 50 µl de buffer de rehidratación (ver anexo).
- Extracción por precipitación con metanol. Se tomaron 50 µl de cada muestra, se llevaron a 100 µl con PBS y se purificó siguiendo el protocolo proporcionado por el Centro de Genómica y Proteómica, Facultad de Farmacia, UCM (ver anexo), el pellet resultante se resuspendió en 50 µl de buffer de rehidratación (ver anexo).

5.4 Cuantificación de proteínas totales

Para determinar la concentración proteica en cada muestra, se utilizaron diferentes métodos de cuantificación.

➤ **Reactivo de Bradford**

En placa de 96 pocillos se depositaron 10 µl de muestra en diluciones, 1/10, 1/20 y 1/50, etc, se agregaron 330 µl de reactivo de Bradford (ver anexo). Luego de transcurrido el tiempo necesario para el desarrollo del color, se midió la absorbancia a 595 nm. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y dilución. Se realizó curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) utilizada como estándar.

➤ **Método de Ácido Bicinconínico**

Se cuantificaron las muestras utilizando el kit “Pierce BCA Protein Assay Kit”, siguiendo las indicaciones del fabricante. En placa de 96 pocillos se cargaron 25 µl de cada muestra en diferentes diluciones, 1/10, 1/20 y 1/50, se agregaron 200 µl de reactivo de trabajo (WR) del kit, se incubó la placa 30 minutos a 37 °C y se midió absorbancia a 562 nm. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y dilución. Se realizó curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de BSA (Sigma).

➤ **Determinación por NanoDrop**

La concentración total de proteínas de las muestras también se determinó en NanoDrop (Thermo Fisher), tomándose micro volúmenes de cada muestra (2 µl), midiendo absorbancia a 280 nm, realizándose las mediciones por triplicado.

5.5. Western blot cuantitativo

En cada una de las instancias las muestras se sembraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE). Las proteínas separadas por electroforesis fueron luego

transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) en cuba BioRad, durante 90 minutos a 400 mA, en buffer de transferencia (ver anexo). La membrana se dejó toda la noche a 4 °C, en solución de bloqueo (ver anexo). Se utilizaron los siguientes anticuerpos según correspondiera: α -FABP2 monoclonal (OT12C4 - Invitrogen), en dilución 1/2000; α -Actina monoclonal (ACTN05- Invitrogen) en dilución 1/300 y 1/400; α FAPB1 generado en conejo por el grupo de investigación, en una dilución 1/2000; α -IgG de ratón (Invitrogen) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), en una dilución de 1/2000 y α -IgG de conejo acoplado a HRP (Invitrogen) en una dilución de 1/2000.

Las señales se revelaron por quimioluminiscencia utilizando el kit “Pierce™, ECL Western Blotting Substrate” (Invitrogen Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y visualizadas en G-box (Syngene) normalizando la intensidad luminosa con la intensidad de la banda de actina.

Se analizaron las imágenes, con paquete de procesamiento de imágenes Image J2 (Fiji), determinando la intensidad de las bandas y calculando posteriormente el cociente de las intensidades de las bandas de FABP y de β Actina (proteína/ β Actina). Se utilizó el programa Past 4.05 (<https://past.en.lo4d.com/>) para el análisis estadístico.

5.6. Microscopía electrónica

5.6.1 Procesamiento de muestras para inmunomicroscopía electrónica de transmisión

Realizamos inmunodetecciones sobre cortes de intestino anterior *Danio rerio* adulto de peces no alimentados y alimentados con yema, sacrificados a las 3 horas de alimentados. Se fijaron fragmentos de intestino anterior en glutaraldehído al 1 % y formaldehído al 4 % en PBS 0,1 M, pH 7,4, durante 12 hs cambiando la solución tres veces. Después de lavar en el mismo tampón, las muestras se incluyeron en la resina LR White (Sigma-Aldrich).

5.6.2 Inmunodetección con partículas de oro coloidal

Las secciones ultrafinas (70 nm) se trataron sucesivamente con glicina 0,02 M PBS, bloqueado con BSA al 1 % durante 5 min, tratado con cada anticuerpo primario diluido en PBS conteniendo 1 % BSA durante 1 h, lavando con PBS, para luego incubar con el anticuerpo secundario correspondiente en PBS conteniendo 1 % de BSA durante 1 h. Todas las muestras se incubaron por flotación sobre una gota de 30 µl de solución a 25 °C, en cámara húmeda. Utilizamos según correspondiera, anticuerpos primarios α FAPB1 generado por el grupo de investigación en conejo en una dilución 1/100; α -FABP2 monoclonal (OT12C4 - Invitrogen), en una dilución 1/50 y como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Sigma Aldrich G7525) y anti IgG de conejo (Inmu-Mark Gold LM Grade Probes—ICN Biomedicals Ltd) conjugados a partículas de oro coloidal de 5 nm de diámetro en dilución de 1/50. Como control de la técnica se utilizó PBS sustituyendo los anticuerpos.

Los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 5 % por 5 min. y se examinaron bajo un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión de Facultad de Ciencias. La captura de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Hamamatsu C 4742-95-10 MR, acoplada al MET. El registro se realizó en el programa AMT-Advantage y el procesamiento en el programa Photo Impact 4.2.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Puesta a punto de condiciones para Western blot

Como primer paso para la puesta a punto de las condiciones de trabajo, analizamos por Western blot (WB) la expresión de FABP2 en lisado de intestinos de grupos de 3 peces adultos alimentados con comida comercial, yema de huevo, y no alimentados, sacrificados a las 3hs de alimentados.

Se realizó un primer WB, una vez completada la transferencia se incubó con anticuerpo α -FABP2 monoclonal (OT12C4 - Invitrogen) en una dilución de 1/2000, y como anticuerpo secundario anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a HRP (Invitrogen) en una dilución de 1/2000. Se sembraron en cada carril 4 µl de lisado de cada una de las condiciones (fig.7).

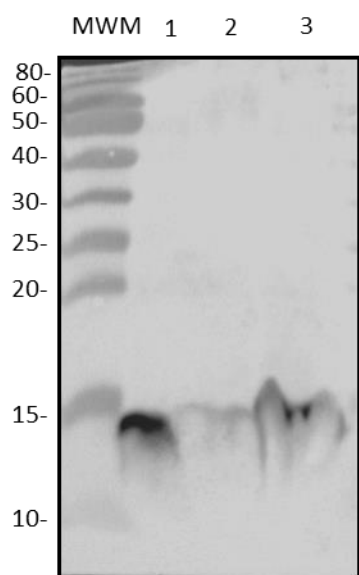


Figura 7. Análisis por WB de la expresión de FABP2 en lisado de intestino de pez cebra adulto. Lisado de intestinos de peces alimentados con: 1-yema de huevo, 2 - comida comercial, 3- control no alimentado, incubados con α FABP2 . Anticuerpo secundario α IgG de ratón -HRP. MWM: marcador de peso molecular Invitrogen Novex 10-20% SDS-PAGE gel.

En vista de la distorsión de las bandas observadas en este primer resultado, probablemente debido a la presencia de lípidos, se procedió a extraer las proteínas de cada grupo utilizando para ello el kit Ready Prep 2-D Cleanup (BioRad) y dosificar los extractos mediante kit BCA (Pierce). Para continuar con la puesta a punto trabajamos sólo con la muestra de los peces alimentados con yema de huevo (tabla 1).

Si bien en un principio utilizamos como método de cuantificación de proteínas totales, el método de Reactivo de Bradford, constatamos desvíos en la relación proteína total/factor de dilución de las muestras, por lo cual resolvimos utilizar el método por BCA de Kit Pierce que no mostró ese comportamiento.

Tabla 1. Dosificación de lisados de intestinos de peces alimentados con yema de huevo sacrificados a las 3 horas post alimentación.

Intestinos de:	Concentración (mg/ml)
Peces alimentados con yema de huevo	5,82

El paso siguiente en la puesta a punto fue nuevamente determinar la dilución a utilizar de los anticuerpos anti Actina y anti FABP2 utilizando ahora la muestra purificada.

Se realizó un WB, una vez completada la transferencia se dividió la membrana y se incubó una parte con anticuerpo α -Actina monoclonal (ACTN05- Invitrogen) en una dilución de 1/400 y la otra parte con anticuerpo α -FABP2 monoclonal (OT12C4 - Invitrogen) en una dilución de 1/2000) y como anticuerpo secundario para ambas anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a HRP (Invitrogen) en una dilución de 1/2000. En la figura 5 se visualiza una

banda mayor a 40 kDa, que asumimos es de Actina (PM 42 kDa), y una banda un poco menor a los 15 kDa que asumimos se trata de FABP2 (PM 15,06 kDa) (fig. 8).

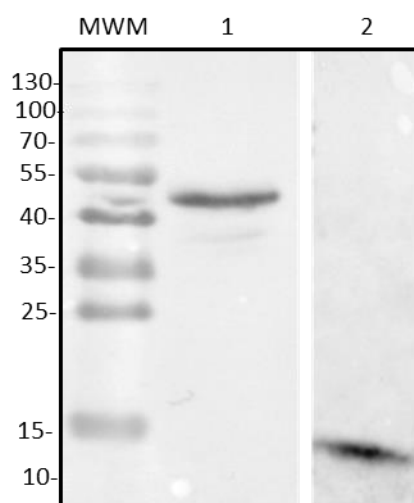


Figura 8. Análisis por WB de la expresión de FABP2 y Actina a partir de extracto de proteína totales. Lisado de intestinos de peces alimentados con yema de huevo incubados con 1: α Actina ; 2: α FAPB2. Anticuerpo secundario α IgG de ratón –HRP. MWM: marcador de peso molecular Thermo Fisher 10-180 kDa. Se sembraron 41 μ g de extracto de proteínas totales en cada carril.

Como paso siguiente en la puesta a punto, para determinar si era posible utilizar los dos anticuerpos primarios α Actina y α FABP2 simultáneamente sobre la membrana, se realizó un WB en las mismas condiciones que el anterior, donde se sembraron en cada carril 41 μ g de extracto de proteínas totales de intestino de peces alimentados con yema (fig. 9).

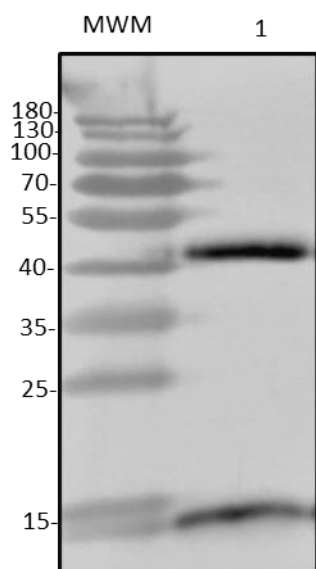
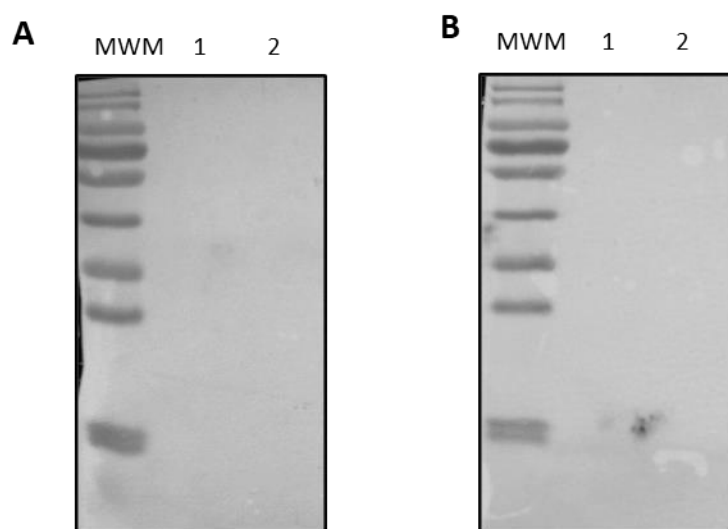


Figura 9. Análisis por WB de la expresión de FABP2 y Actina a partir de extracto de proteína totales. Lisado de intestinos de peces alimentados con yema de huevo incubados simultáneamente con: α Actina y α FAPB2. Anticuerpo secundario α IgG de ratón –HRP. MWM: marcador de peso molecular Thermo Fisher 10-180 kDa.

En la figura se visualiza la banda mayor a 40 kDa, que asumimos es de Actina, y una banda un poco menor a los 15 kDa que asumimos se trata de FABP2, lo que demuestra que es posible utilizar los dos anticuerpos primarios simultáneamente.

En el siguiente paso, para comprobar si hay reacción cruzada entre los Anticuerpos α FABP2 y α FABP1, se realizó WB, donde se analizaron las proteínas recombinantes FABP1 y FABP2 de *Danio rerio* purificadas en trabajos anteriores del equipo de investigación. Una vez completada la transferencia se dividió a membrana y se hibridó la parte de la membrana con carriles sembrados con FABP2 con anticuerpo α FAPB1, en una dilución 1/2000 y anticuerpo secundario en una dilución de 1/2000 (fig. 10A) y la otra parte con carriles sembrados con FABP1 con el anticuerpo α FAPB2 en una dilución de 1/2000 y anticuerpo secundario en una dilución de 1/2000 (fig.10B).

No se visualizan bandas correspondientes a FABP1 y FABP2, por lo que asumimos que los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada.



Figuras 10. Determinación por WB de reacción cruzada entre α FABP1 y α FABP2 A) FABP2 purificada diluida 1/50 (1) y 1/100 (2) incubada con α FAPB1 ; B) FABP1 purificada diluida 1/50 (1) y 1/100 (2) incubada con α FAPB2.: Anticuerpo secundario α IgG de ratón –HRP. MWM: marcador de peso molecular Termo Fisher 10-180 kDa.

Una tercera parte de la membrana con carriles con FABP1 y FABP2 se hibridó con los dos anticuerpos primarios juntos sobre la misma membrana, repitiendo esta modalidad con los anticuerpos secundarios (fig.11). Todos los anticuerpos se usaron en las diluciones ya ensayadas Se visualizan bandas por debajo de 15 kDa que asumimos correspondientes a FABP1 y FABP2, la banda de FABP1 se ubica por debajo de la banda FABP2, esto es coherente dado que FABP1 tiene menor peso molecular que FABP2. (13992,81 Da y 15060,08 Da respectivamente)

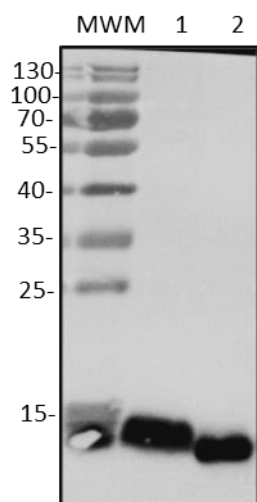


Figura 11. Análisis por WB de la expresión de FABP1 y FABP2 purificadas. 1: FABP1 purificada diluída 1/50 2: FABP2 purificada diluída 1/50. incubadas simultáneamente con α FABP1 y α FABP2. Anticuerpo secundario α IgG de ratón –HRP. MWM: marcador de peso molecular Termo Fisher 10-180 kDa

No se observa interferencia entre los anticuerpos.

6.2. Variación de la expresión según dieta.

Para observar posibles variaciones en la expresión de FABP2 según las condiciones dietarias: inanición, tipo de comida y el tiempo de sacrificio luego de la alimentación: se utilizaron lisados de intestino anterior de peces adultos alimentados con yema de huevo, alimentados con comida comercial (Tetramin), sacrificados a las 3 y 6hs de alimentados y peces que no recibieron alimento. Se emplearon 3 peces por grupo en todos los ensayos. Se realizó extracción de proteínas totales mediante kit Ready Prep 2-D Cleanup (BioRad) y se dosificaron los extractos mediante kit BCA (Pierce) (Tabla 2).

Debido a la interrupción del trabajo por la pandemia de Covid-19, utilizamos muestras obtenidas en diferentes oportunidades, siempre conservadas a -20 °C y extraídas en las condiciones previamente indicadas.

Tabla 2. Dosificación de extractos de proteínas totales obtenidos a partir de intestinos de peces sometidos a distintas dietas y sacrificados diferentes tiempos post alimentación.

Intestinos de:	Concentración (mg/ml)
Peces no alimentados por 24hs (2020)	12,22
Peces alimentados con Tetramin, sacrificados a las 3hs (2020)	5,42
Peces alimentados con Tetramin, sacrificados a las 6hs (2020)	10,41
Peces alimentados con yema de huevo, sacrificados a las 3hs (2019)	3,67
Peces alimentados con yema de huevo, sacrificados a las 6hs (2019)	5,61

Como puede observarse, hay una diferencia notoria entre la concentración de los lisados obtenidos en 2019 y 2020. Lo mismo se observa entre los peces alimentados con Tetramin sacrificados a diferentes tiempos luego de la ingesta. Como los ensayos por WB incluyen una proteína de referencia consideramos continuar con las muestras ya obtenidas. Por otro lado, nos propusimos siempre sacrificar el menor número de peces.

Se realizó una electroforesis en las mismas condiciones que en ensayos anteriores, para transferir a membrana de nitrocelulosa y realizar WB. Se sembró en cada carril 41 μ g de proteína de cada muestra, tomando como referencia la cantidad de proteína cargada en ensayos anteriores que presentó bandas en Actina y FABP2 (figs. 6-7). Se emplearon los anticuerpos primario y secundario en las mismas condiciones que en los ensayos anteriores (fig. 12).

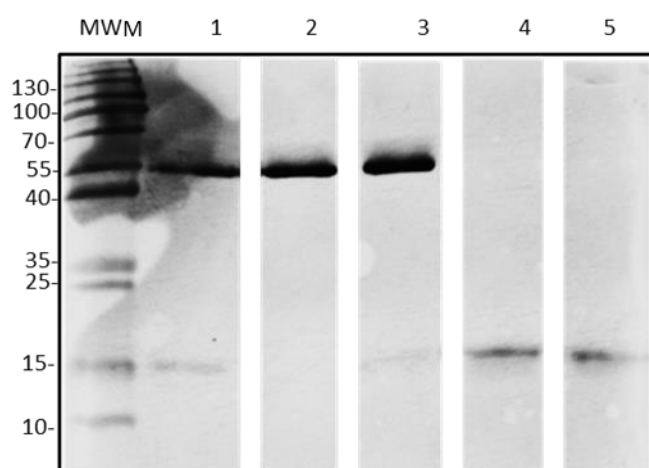


Figura 12. Análisis por WB de la expresión de FABP2 de extractos de proteínas totales obtenidos a partir de intestinos de peces sometidos a distintas dietas.

1: No alimentados; 2-3: Alimentados con Tetramin, y sacrificados a las 3hs (2), y 6hs (3); 4-5 Alimentados con yema de huevo y sacrificados a las 3hs (4) y 6hs (5). Cada carril contiene 41 μ g de proteína. MWM: marcador de peso molecular Termo Fisher 10-180 kDa

Como puede observarse en la figura, la señal de actina no se observa en las muestras de peces alimentados con yema de huevo a diferencia de lo observado anteriormente (figs. 6 y

7). Tampoco se observa la banda de FABP2 en las muestras de peces alimentados con alimento comercial, por lo que no pudo obtenerse una conclusión sobre efecto del tipo de dieta en la expresión de la proteína. Además, resulta inesperado a que en la muestra de los peces no alimentados se observe una banda tenue correspondiente a la proteína FABP2 y no en los que recibieron alimento comercial.

Por otro lado, en tanto se utilizó igual cantidad de proteína total que en ensayos anteriores, la intensidad de la banda de actina en los tres primeros carriles llama la atención, por lo que no descartamos un defecto en la incubación. Mencionamos, además, que las muestras de los peces alimentados con alimento comercial fueron obtenidas en 2020 mientras que las muestras de peces que fueron alimentados con yema de huevo son de 2019. Este hecho nos lleva a pensar que puede haber una inestabilidad en la actina debido al largo tiempo a -20 °C.

Para determinar una concentración adecuada de proteína de modo que se visualicen la banda de actina y de la FABP2 simultáneamente en la muestra de yema de huevo, sin quedar saturadas, repetimos el WB con cantidades crecientes de muestra (fig.13). Se emplearon las mismas condiciones de revelado que en ensayos anteriores.

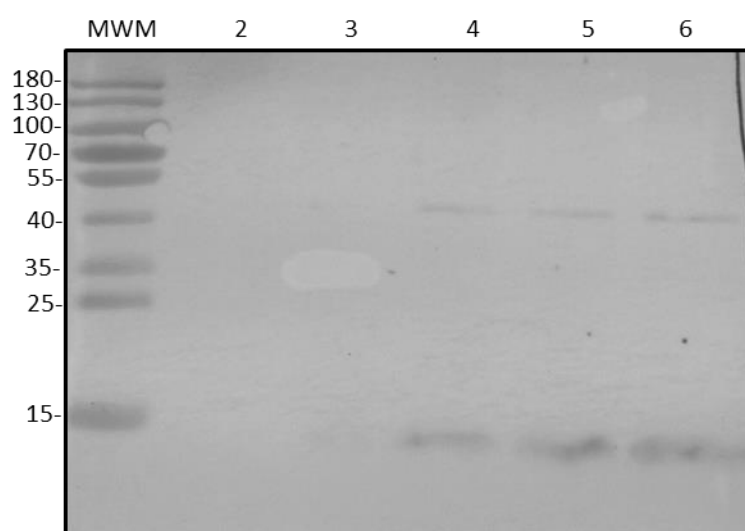


Figura 13. Optimización de condiciones para la detección de Actina y FABP2.

Western blot de extracto de proteínas totales obtenidos a partir de intestinos de peces alimentados con yema de huevo, sacrificados a las 3 horas de ser alimentados. 2.: 17 µg; 3: 23 µg; 4: 29 µg; 5: 41 µg; 6: 58 µg Anticuerpo primario: α FABP2 y α actina; anticuerpo secundario α IgG de ratón -HRP. MWM: marcador de masa molecular Thermo Fisher 10-180 kDa.

Se visualizan bandas de intensidad creciente a partir del carril de 29 µg (carril 4) de muestra, por lo que tomamos como referencia para próximos WB, la cantidad de proteína del carril 5.

Estos ensayos se hicieron un año después que los primeros WB realizados (figs 8-13) con las muestras procesadas en aquel entonces, por lo que asumimos que hubo degradación en la muestra de los peces alimentados con yema de huevo, alteración en la estabilidad de los anticuerpos o aún algún error en la transferencia o el revelado de la membrana. Por la razón ya expuesta, se retoma el trabajo en octubre de 2021, extrayendo nuevas muestras de peces alimentados de igual forma que en los ensayos anteriores y sacrificados a las 3hs de haber

recibido el alimento, realizando extracción de proteínas totales mediante método TCA/Acetona (ver anexo), dosificando con kit BCA (Pierce) (tabla 3) y finalmente realizando WB. Dado los resultados anteriores, resolvimos no considerar las muestras de peces sacrificados a las 6hs hasta tanto no tener resuelto el problema de las intensidades de las bandas.

Tabla 3. Dosificación de extracto de proteínas totales obtenidas a partir de intestinos de peces sometidos a distintas dietas.

Intestinos de:	Concentración (mg/ml)
Peces no alimentados por 24hs	2,76
Peces alimentados con Tetramin, sacrificados a las 3hs	0,99
Peces alimentados con yema de huevo, sacrificados a las 3hs	1,28

Repetimos el WB con estas las nuevas muestras empleando los mismos anticuerpos que en los ensayos previos variando sólo la concentración del anticuerpo α Actina a una dilución de 1/300 (menor que en ensayos anteriores). Se sembraron 41 μ g por carril.

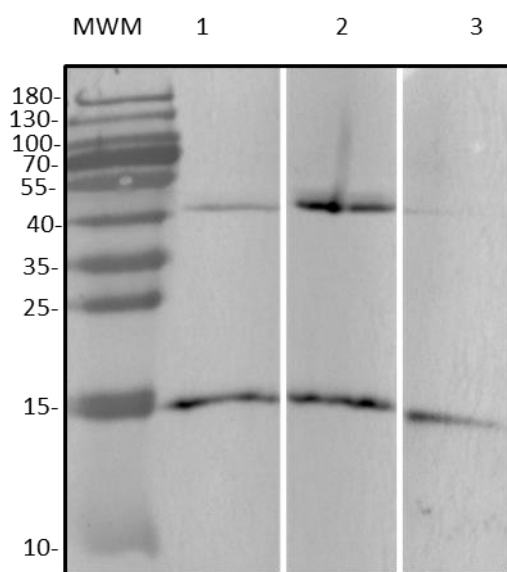


Figura 14. Optimización de condiciones para la detección de Actina y FABP2. Western blot de extracto de proteínas totales obtenidas a partir de intestinos de peces alimentados con diferentes dietas: 1- Tetramin 41 μ g; 2:Yema de huevo, 41 μ g, 3: No alimentados, 41 μ g. . MWM: marcador de peso molecular Termo Fisher 10-180 kDa.

Se observan bandas correspondientes a Actina (muy tenue en carril peces sin comer) y bandas correspondientes a FABP2 para las tres muestras de distintas condiciones dietarias. Lamentablemente, en el carril 3 las señales son muy tenues, creemos que por problemas en la transferencia o revelado.

Los resultados obtenidos nos llevan a considerar que las muestras deben permanecer lo menos posible a -20 °C, dada la posible degradación de proteínas que presentan las muestras.

Dado el tiempo transcurrido desde el inicio de este trabajo y el objetivo que persigue la Licenciatura con respecto a esta etapa de la carrera, consideramos que no correspondía volver a sacrificar peces, para acortar el tiempo entre el sacrificio, la extracción y el análisis, descartando por el mismo el análisis de la expresión de FABP1.

Si bien se mostraron imágenes representativas de los WB, durante el transcurso de este trabajo hemos realizado muchos más, seleccionándose de un total de 30 WB, aquellos en los que se visualizaban simultáneamente bandas correspondientes a Actina y FABP2 para las tres condiciones dietarias, de peces sacrificados a las 3 hs luego de recibir el alimento. (Tabla 4) (imágenes en anexo). Se analizaron las imágenes con paquete de procesamiento de imágenes Image J2 (Fiji), determinando intensidad de las bandas y se realizó cálculo posterior de relación a la intensidad de FABP2/ β Actina. La figura 12 muestra en forma gráfica estos resultados.

Tabla 4. Relación FABP2/ β Actina para las diferentes condiciones dietarias a las 3 horas de alimentación

Relación FABP2/β Actina				
	Fecha WB	YEMA	TETRAMIN	Sin comer
1	12/11/2020	2,08	0,07	0,18
2	07/10/2021	1,00	0,84	0,99
3	20/10/2021	2,44	1,29	2,33
4	25/01/2022	1,78	1,39	2,46
5	10/03/2022	4,80	2,04	0,91
6	01/06/2022	2,18	0,81	2,04

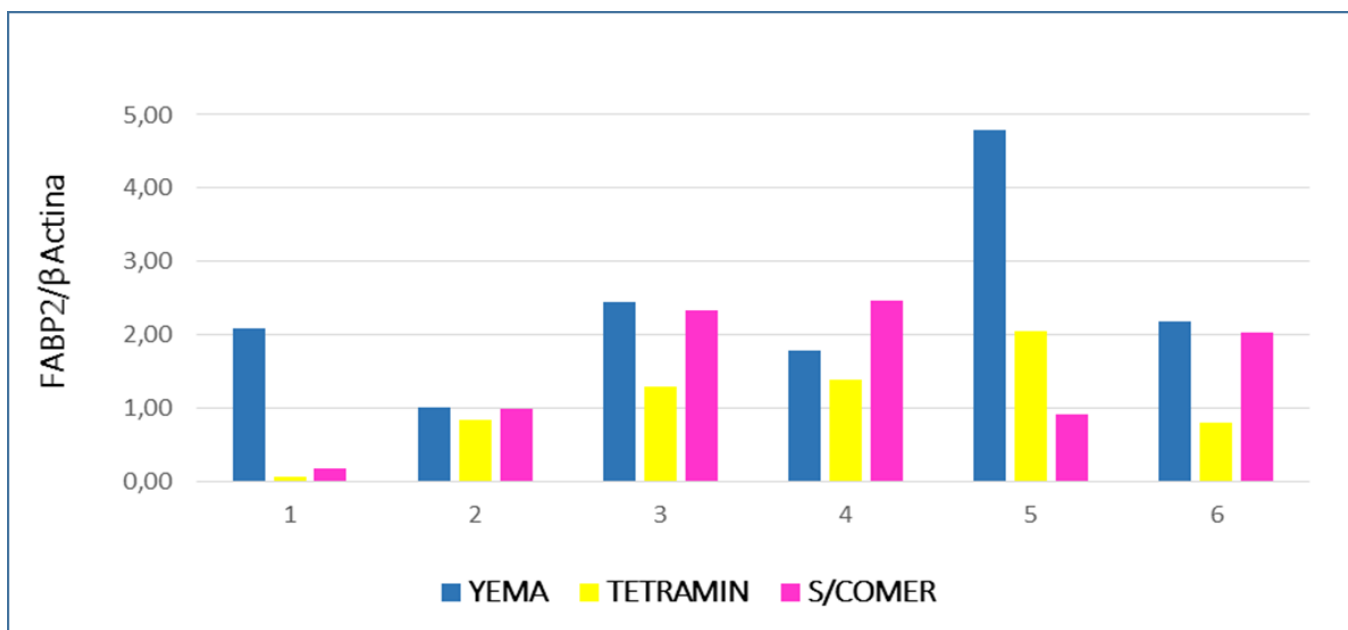


Figura 15. Relación FABP2/β Actina para las diferentes condiciones dietarias.
Representación gráfica de los datos mostrados en la tabla 4.

Los datos muestran una tendencia de mayor expresión de FABP2 en peces alimentados con yema, con respecto a los peces alimentados con comida comercial (Tetramin) y el grupo de peces no alimentados. Este resultado es similar al obtenido por el grupo de investigación (Suárez, 2018).

Esto nos indica que la proteína varía sus niveles de expresión en respuesta al contenido lipídico de la dieta, reafirmando la importancia de la FABP2 en el transporte de intracelular de ácidos grasos en el intestino.

Para confirmar si estas diferencias son significativas realizamos el test estadístico correspondiente utilizando el software Past. 4.05. Se realizó test de normalidad (ver anexo) determinándose que los datos eran normales ($p > 0,05$) y de homocedasticidad por Levene determinando que hay homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$), por lo que se empleó el test paramétrico ANOVA Kruskal Wallis para determinar si la expresión de FABP2 en respuesta las distintas dietas tienen diferencias estadísticamente significativas. Dicho test determinó que no hay diferencias significativas.

En suma, si bien el test de ANOVA muestra que no hay diferencias estadísticas significativas consideramos que este resultado debe confirmarse mediante nuevos ensayos tomando como base la experiencia de este trabajo.

6.3. Microscopía electrónica de transmisión

Para determinar a nivel subcelular las diferencias entre la localización de cada proteína en estudio de acuerdo a la condición dietaria analizamos por inmunomicroscopía electrónica de transmisión secciones de intestino anterior de peces adultos, alimentados con yema de huevo sacrificados a las 3 hs de ser alimentados, y de no alimentados. La figura 10 muestra las imágenes obtenidas de los intestinos de peces no alimentados. Como puede observarse hay señal de la proteína FABP1 tanto en las microvellosidades como en el citoplasma y en menor proporción en el núcleo. Experimentos *in vitro* con explantes de intestino de rata mostraron que en peces que no han recibido alimento por 24 horas, la señal tanto de FABP2 como FABP1 es abundante a nivel de las microvellosidades, disminuyendo luego de recibir el alimento (Alpers et al., 2000). Cuando analizamos en estas mismas muestras la respuesta frente a Fabp2 observamos muy poca señal, a diferencia de lo esperado de acuerdo a nuestros resultados y reportes previos de la bibliografía. En este caso, sería oportuno repetir el ensayo con mayor concentración de anticuerpo primario y secundario. Lamentablemente no se obtuvo señal en las secciones de los peces alimentados por lo que, al considerar que no es el resultado esperado de acuerdo a la bibliografía y los propios resultados obtenidos por Western blot, los descartamos. Atribuimos el resultado a una mala conservación de esta muestra.

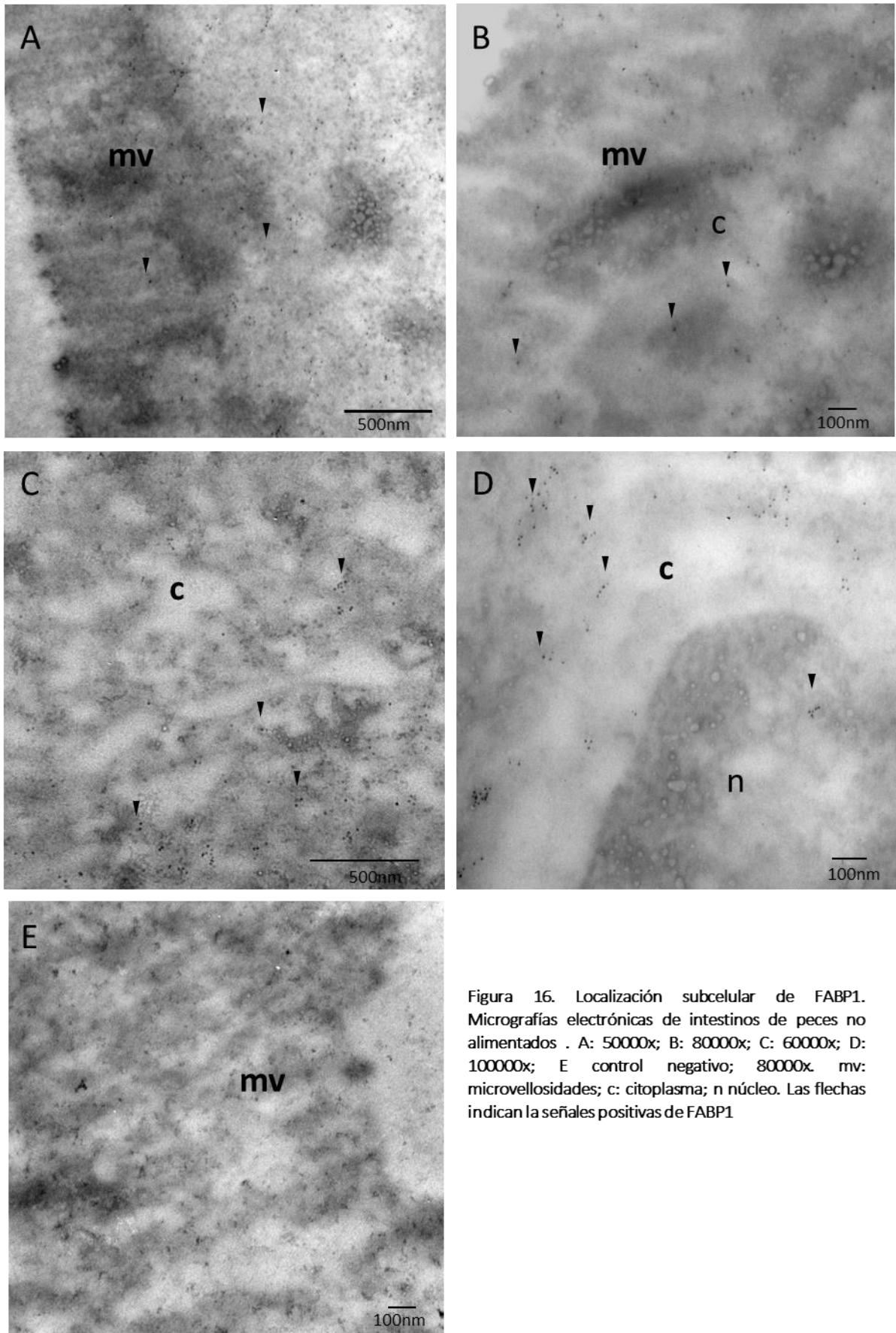


Figura 16. Localización subcelular de FABP1. Micrografías electrónicas de intestinos de peces no alimentados . A: 50000x; B: 80000x; C: 60000x; D: 100000x; E control negativo; 80000x. mv: microvellosidades; c: citoplasma; n núcleo. Las flechas indican la señales positivas de FABP1

CONSIDERACIONES

Este trabajo comenzó a fines de 2019 y debido a la pandemia de Covid 19 debimos interrumpirlo en varias ocasiones durante el 2020 y 2021, haciendo imposible la continuidad del mismo. Si bien durante estos periodos de inactividad, las muestras se mantuvieron a -20°C , observamos que la señal de actina disminuía y en algunos casos desaparecía en relación a WB realizados anteriormente con las mismas muestras y en iguales condiciones. Esto nos hace pensar que la actina puede haber sufrido degradación/precipitación en estas muestras, bien por el transcurso de tiempo entre que se procesaron y se utilizaron y/o por las condiciones de trabajo (composición de buffer, kit de precipitación, etc).

Tomando en cuenta estos resultados consideramos que los ensayos deberían repetirse en un futuro de forma continua, minimizando los tiempos entre sacrificio de peces, procesamiento de las muestras y las mediciones, probar conservar las muestras a -80°C , utilizar otra proteína housekeeping (Tubulina o GAPDH) en lugar Actina dado que la misma puede no ser confiable como control de carga para WB (Dittmer et al, 2006; Chen et al, 2015), utilizar complementariamente otros métodos de detección de proteínas como Tinción con Ponceau o utilizar otros métodos de normalización de señal en WB como Stain-free (Yadav et al 2018).

A lo largo de este trabajo se realizaron unos 30 WB que insumieron muchas horas de dedicación, y muchos insumos, sin embargo, sólo una porción de los ensayos arrojó resultados informativos y reproducibles, frente a esto definimos no medir los niveles de expresión FABP1 en respuesta a la dieta, pero sí observar por microscopía electrónica de transmisión su distribución subcelular en peces no alimentados. De todas formas, consideramos que esta experiencia ha sido muy formativa.

7. Bibliografía

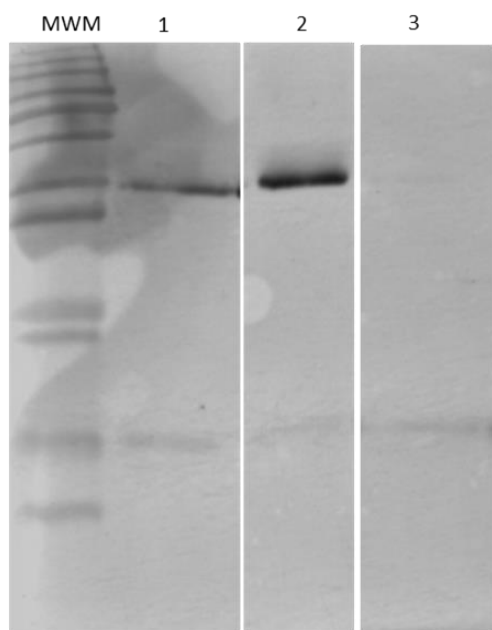
- Agellon, L.B., Toth, M.J., Thompson, A.B.R. (2002). Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem.* 239, 79-82.
- Alpers, D.H., Bass N.M., Engle M.J., DeSchryver-Kecsckemeti K., (2000). Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1483, 352-362.
- André, M., Ando, S., Ballagny, C., Durliat, M., Poupard, G., Briancon, C., Babin, P. J. (2000). Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 249-252.
- Bass, N. M. (1988). The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Aspects of Structure, Regulation, and Function. *I. Rev. of Cytol.* 111: 143-184.
- Banaszak, L., Winter N., Xu Z., Bernlohr D.A., Cowan S., Jones T.A. (1994). Lipid binding proteins a family of fatty-acid and retinoid transport proteins. *Adv. Protein Chem.* 45, 89-151.
- Chen, W., Xu W.M., (2015). β -Actin as a loading control: Less than 2 μ g of total protein should be loaded. *Electrophoresis.* 36, 2046-2049.
- Chmurzynska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Functions, structure and polymorphism. *J. App. Genet.* 47, 39-48.
- Dittmer, A., Dittmer J., (2006). β -Actin is not reliable loading control in Western Blot analysis. *Electrophoresis.* 27, 2844-2855.
- Esteves, A., Knoll-Gellida, A., Canclini, L., Silvarrey, M.C., André, M., Babin, P.J. (2016). Fatty acid binding proteins have the potential to channel fatty acid into enterocyte nuclei. *J. Lipid. Res.* 57, 219-232.
- Gadja, A. M., Storch, J. (2015). Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver and intestinal FABPs in the Intestine. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 93, 9-16.
- Glatz, J.F.C., Veerkamp J.H., (1985). Intracellular fatty acid binding proteins. *Int. J. Biochem.* 17, 13-22.
- Gordon, J.I., Lowe J.B. (1985). Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. *Chem. Phys. Lipids.* 38, 137-158.
- Grunwald, D. G., Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* 3, 719-724.
- Hertzel, A.V., Bernlohr D.A. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 175-180.
- Ho, S.C., Keenan J.I., Day, A.S. (2019). The role of gastrointestinal -related fatty acid binding proteins as biomarkers in gastrointestinal diseases. *Dig Dis Sci.* 65, 376-390.
- Huang, H., McIntosh, A. L., Martin, G. G., Landroc, D., Chun, S., Landroc, K. K., Schroeder†, F. (2016). FABP1: A novel hepatic endocannabinoid and cannabinoid binding protein. *Biochemistry.* 55, 5243-5255

- Lagakos, W. S., Gajda, A. M., Agellon, L., Bina, B., Choi, V., Mandap, B., et al. (2011). Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300,803-814.
- Lowe, J.B., Sacchettini J.C., Laposata M., McQuillan J.J., Gordon J.I. (1987). Expression of rat intestinal fatty acid binding protein in *Escherichia coli*. Purification and comparison of ligand binding characteristic with that of *Escherichia coli*-derived rat fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 262, 5931-5937.
- Madsen, P., Rasmussen H.H., Leffers H., Honore B., Celis J.E., (1992). Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid binding protein (PA-FABP) that is highly upregulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid binding proteins. *J. Invest. Dermatol.* 99, 299-305.
- Montoudis, A., Seidman, E., Boudreau, F., Beaulieu, J.-F., Menard, D., Elchebly, M., et al. (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion β -oxidation and cholesterol uptake. *J. Lipid Res.* 49, 961-972.
- Niot, I., Poirie, H., Trang Tran, T., Besnard, P. (2009). Intestinal absorption of long-chain fatty acids: Evidence and uncertainties. *Prog. Lipid Res.* 48, 101-115.
- Ockner, R., Manning, J. A. (1974). Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest.* 54, 326-38.
- Richieri, G.V., Ogata R.T., Kleinfeld A.M. (1994). Equilibrium constants for the binding of fatty acid binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J. Biol. Chem.* 269, 23918-23930.
- Richieri, G.V. Ogata R.T., Zimmerman A.W., Veerkamp J.H., Kleinfeld A.M. (2000). Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry.* 39, 7197-71204.
- Sacchettini, J.C., Gordon J.I., Banaszak L.J. (1989). Crystal structure of rat intestinal fatty-acid binding protein. Refinement and analysis of *Escherichia coli*-derived protein with bound palmitate. *J. Mol. Biol.* 121,327-329.
- Sacchettini, J.C., Hauff S.M., Van Camp S.L., Cistola D.P., Gordon J.I. (1990). Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J Biol Chem.* 265, 19199-19207.
- Santoriello, C., Zong L.I., (2012). HCooked! Modeling human disease in zebrafish. *J. Clin.Invest.* 122, 2337-2343.
- Shimizu, F., Watanabe T.K., Shinomiya H., Nakamura Y., Fujiwara T., (1997). Isolation and expression of cDNA for human brain fatty acid binding protein (B-FABP). *Biochem. Acta.* 1354, 24-28.
- Spence, R. (2006). The behaviour and ecology of the zebrafish. (Tesis de Grado) Department of Biology University of Leicester .
- Stainier, D.Y., Weinstein, B.M., Detrich, H.W.3rd., Zon, L.I., Fishman, M.C. (1995). *Cloche*, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development.* 121, 3141-3150.

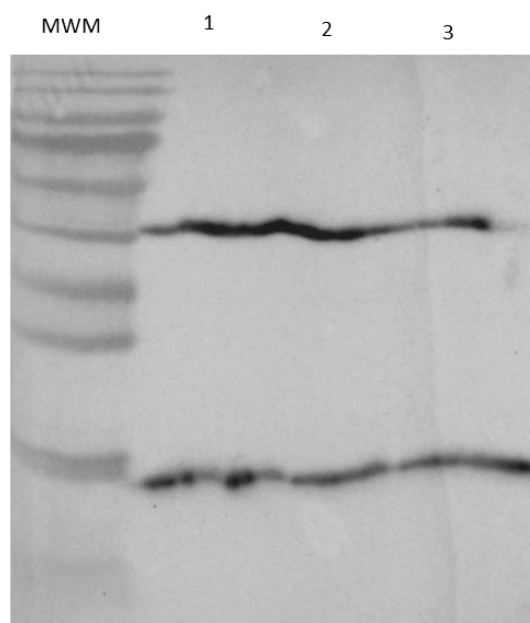
- Storch, J., Corsico, B. (2008). The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid–Binding Proteins. *Annual Review of Nutrition*. 28, 18.1 -18.23.
- Storch, J., Thumser, A. E. (2010). Tissue-specific functionality in the fabp (fatty acid-binding protein) family. *J. Biol. Chem.* 285, 32679-32683.
- Suárez, M. (2018). Rol de la proteína intestinal de unión de ácidos grasos en el núcleo del enterocito. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Udelar.
- Suárez, M., Canclini, L., Esteves, A. (2020). Identification of a non-classical three dimensional nuclear localization signal in the intestinal fatty acid binding protein. *Plos One*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242312> N
- Wang, M., Liu Y.E., Goldberg I.D., Shi Y.E., (2003). Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid binding protein MRG. *J Biol. Chem.* 278, 47319-47325.
- Wang, M., Liu Y.E., Portincasa P., Wang DQ-H. (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 1203-1211.
- Wolpert, L., Tickle C., (2011). *Principles of Development*. Oxford University Press, Incorporated.
- Yang, Y., Spitzer E., Kenney N., Zschiesche W., Li M., Kromminga A., Muller T., Spener F., Lezius A., Veerkamp J.H., et al.(1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J Cell Biol.* 127, 1097-1109.
- Yavad, G., Ning L., (2014). Trends in Protein Separation and Analysis - the Advance of Stain-Free Technology - Bioradiations - Bulletin 6915 Ver A , sep 9 2014.
- Zhang, F., Lucke C., Baier L.J., Sacchettini J.C., Hamilton J.A., (2003). Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein with a naturally-occurring single amino acid substitution (A54T) that is associated with altered lipid metabolism. *Biochemistry*. 42,7339-7347.
- Zhao, X., Pack, M. (2017). Modeling intestinal disorder using zebrafish. *Methods Cell. Biol.* 138, 241-270.

ANEXOS

WB tabla 4. Análisis por WB de expresión de FABP2 y Actina en extracto de proteínas totales para diferentes condiciones de alimentación



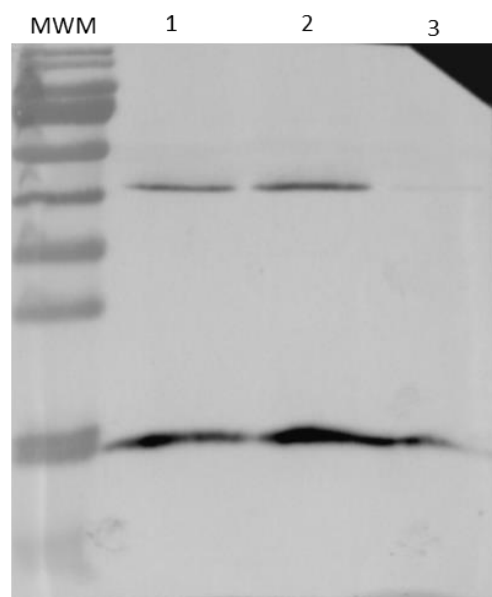
WB 12/11/2020 – 1 sin comer; 2-Tetramin; 3-yema



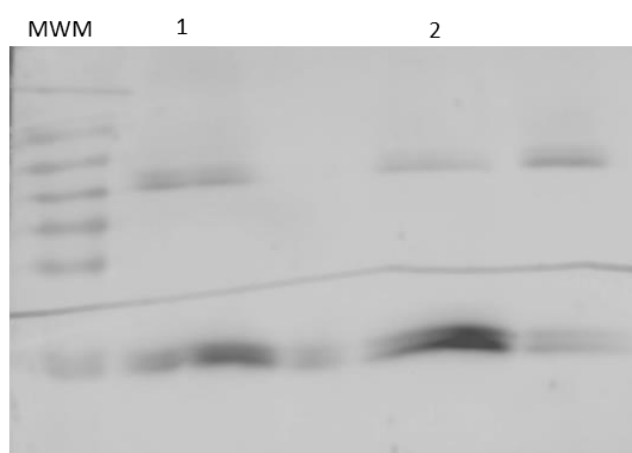
WB 07/10/2021 – 1 yema; 2-Tetramin; 3-sin comer



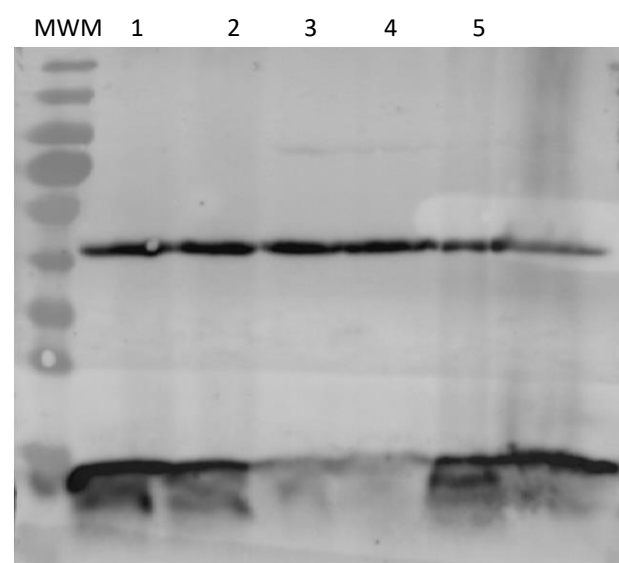
WB 20/10/2021 – 1 yema; 2-Tetramin; 3-sin comer



WB 25/01/2022 – 1 yema; 2-Tetramin; 3-sin comer



WB 10/03/2022 – 1 yema; 2-Tetramin; 3-sin comer



WB 01/06/2022 – 1,2 sin comer; 3,4-Tetramin; 5,6 yema

Soluciones y protocolos mencionados en Materiales y Métodos.

Buffer de lisis

Tris HCl 1 M - pH 7,6	- 250 µl
NaCl 5 M	- 100 µl
Tritón x 100	- 25 µl
PMSF	- 100 µl
H ₂ O	- 5ml

Buffer de rehidratación RSB

Urea	- 0,96 gr
CHAPS	- 0,04 gr
DTT	- 15,4 mg
H ₂ O	- 2 ml

Buffer de muestra 4X

Tris HCl 0,5 M pH 6,9	- 0,125 gr
SDS	- 4 %
Glicerol	- 20 %
β-mercaptoetanol	- 10 %
Azul de bromophenol	- pizca

Buffer de electroforesis pH 8,6

Tris base	- 6 gr
Glicina	- 28,8 gr
SDS 10%	- 10 ml
H ₂ O csp	-1000 ml

Buffer de transferencia

Tris base	- 3,02 gr
Glicina	- 14,42 gr
Etanol	- 200 ml
H ₂ O csp	-1000 ml

Solución de Bloqueo

Leche en polvo	- 5 %
Glicina	- 2 %
Se disuelve en TBST con calor	

TBST

Tris 10mM - pH 8

NaCl 150 mM

Tween 20 0,1 %

Acrilamida- bis acrilamida (30:08%)

Acrilamida - 15 gr

Bisacrilamida - 400 mg

H₂O csp - 50 ml

Buffer Tris pH 8,8

Tris base - 18,15 gr

H₂O csp - 100 ml

Ajustar pH a 8,8 con HCl 1N

Buffer Tris pH 6,8

Tris base - 12,1 gr

H₂O csp - 200 ml

Ajustar pH a 6,8 con HCl 1N

Gel de poliacrilamida al 15 %

Gel separador 0,75 mm

Agua destilada - 0,89 ml

Bis-acrilamida 30:08 - 2 ml

Buffer Tris pH 8,8 - 1,12 ml

SDS 10% - 40 µl

TEMED - 2 µl

APS 10% - 20 µl

Gel stacking 0,75 mm

Agua destilada - 1,84 ml,

Bis-acrilamida 30:08 - 0,42 ml

Buffer Tris pH 6,8 - 0,63 ml

SDS 10% - 25 µl

TEMED - 2,5 µl

APS 10% - 12,5 µl

Precipitación de proteínas totales

Protocolo precipitación TCA/Acetona

TCA 50 %

Acetona -20 °C

Buffer de re suspensión

- Añadir TCA a la muestra a precipitar, de forma que se quede al 10 %
- Vortex
- Incubar 30 minutos a 4 °C (o 15 min a -20 °C)
- Centrifugar al máximo a 4 °C durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante
- Resuspender el precipitado en 20 µl H₂O MiliQ
- Añadir 1 ml de Acetona (-20 °C). Disgregar al máximo el pellet
- Incubar ON a -20 °C
- Centrifugar al máximo a 4 °C durante 10 minutos – Retirar sobrenadante
- Resuspender en la solución adecuada

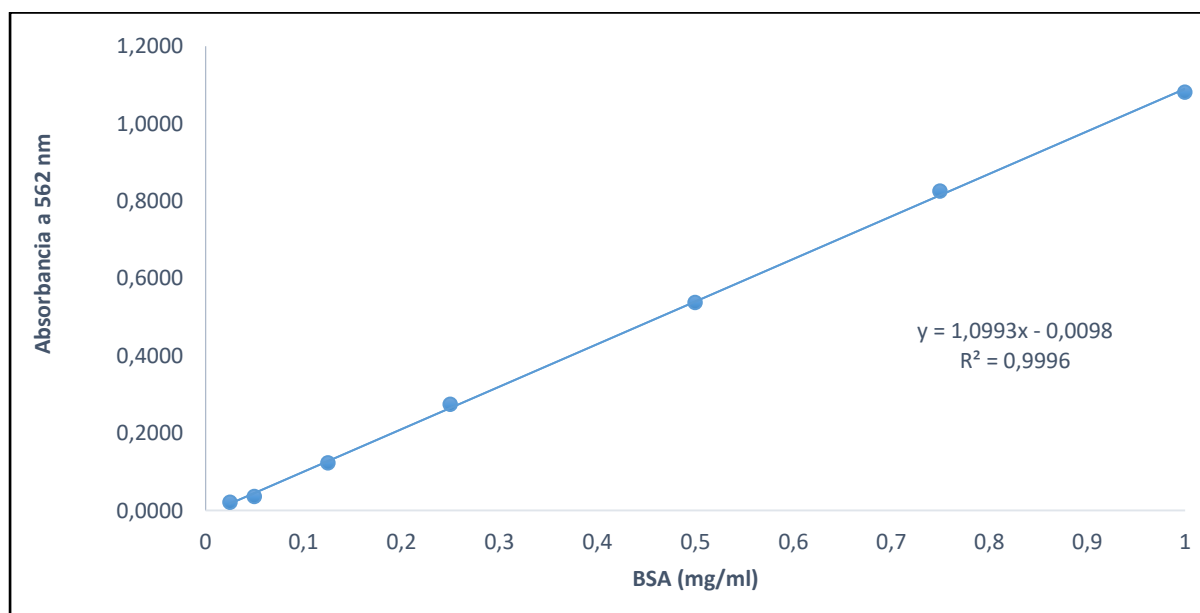
Protocolo precipitación Metanol/Cloroformo

- Añadir 3 partes e MeOH a muestra – Vortex
- Añadir 1 parte de cloroformo – Vortex
- Añadir 3 partes de H₂O-LC – Vortex
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos a 4 °C
- Quitar el sobrenadante sin tocar el velo que separan ambas fases
- Añadir 3 partes de MeOH
- Vortex para destruir bien el velo y que se precipiten las proteínas
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
- Retirar sobrenadante, nos quedamos con el pellet, dejar secar al aire para evaporar el MeOH

Reactivo de Bradford

- | | |
|----------------------------|----------|
| - Coomassie Brilliant Blue | - 100 mg |
| - Etanol | - 50 ml |
| -Acido fosforico al 85% | - 100 ml |
| H ₂ O csp | -1000 ml |
| Se filtra | |

Método de Ácido Bicinconínico - Curva de calibración estándar



Análisis de la varianza Test ANOVA Kruskal Wallis

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	5,38191	2	2,69096	2,745	0,09643
Within groups:	14,7059	15	0,980396	Permutation p (n=99999)	
Total:	20,0878	17	0,08361		
Components of variance (only for random effects):					
Var(group):	0,285093	Var(error):	0,980396	ICC:	0,225283
omega2:	0,1624				
Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same): 0,595				
Levene's test, from medians	p (same): 0,7042				
Welch F test in the case of unequal variances: F=2,34, df=9,392, p=0,1497					

Protocolo de incubación de cortes para MET

Todas las incubaciones se realizan sobre gotas de 30 μ l, a TA en cámara húmeda. -

Soluciones:

Glicina 0,02 M en PBS

BSA 1% en PBS

Las soluciones se filtran (0,22 μ m).

Los anticuerpos se diluyen en BSA 1 % en PBS.

Se realizan las siguientes incubaciones:

Glicina 4 x 10 min

PBS - 1 x 5 min

BSA - 60 min

PBS - 3 x 5 min

Anticuerpo primario - 60 min

PBS - 4 x 5 min

Anticuerpo secundario - 60 min

PBS - 4 x 5 min