



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs): interacción proteica e inmunopatología de intestino”

Tesista: Natalia M. Bottasso Arias

Directora: Dra. Betina Corsico

Codirector: Dr. Fernando Chirido

Año: 2019

Prefacio

Este trabajo de Tesis se presenta para optar por el grado académico de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Ciencias Biológicas. El mismo fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Betina Corsico y co-dirección del Dr. Fernando Chirido. Se desarrolló en su mayor parte en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” y también en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), ambos Institutos de doble dependencia UNLP-CONICET.

Se realizaron dos pasantías en el exterior que ayudaron a profundizar los estudios realizados en

nuestro país. Estas pasantías fueron en el laboratorio dirigido por el Dr. Owen Sansom, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Escocia; y el laboratorio dirigido por la Dra. Judith Storch, Rutgers University, Nueva Jersey, EEUU.

Las investigaciones realizadas fueron financiadas con subsidios de la ANPCyT y becas de CONICET, CIC, Boehringer Ingelheim y Fulbright/Ministerio de Educación de la República Argentina.

Parte de los resultados expuestos aquí se encuentran publicados en revistas internacionales: *Mediators of Inflammation* y *American Journal of Physiology*.

Índice

Agradecimientos	6
Siglas	7
Resumen	9
Introducción	11
Intestino delgado. Descripción general.	12
Enfermedad celíaca	14
Asimilación de lípidos dietarios. FABPs	15
Polimorfismos en las FABPs	24
Regulación génica de la expresión de FABPs	25
Interacción proteína-proteína de FABPs	26
Hipótesis de trabajo	29
Objetivos	29
Materiales y métodos	30
Declaraciones de ética	31
Protocolos con muestras de pacientes	31
Protocolos con muestras de ratones	31
Pacientes y muestras	31
Determinación en suero de FABP2	32
Producción de anticuerpos policlonales de conejo anti FABP1 y FABP2	32
Genotipos murinos	33
Preparación de muestras intestinales murinas	33
Procesamientos de tejido de ratón y de biopsias humanas para inmunofluorescencia	34
PCR cuantitativa	34
Análisis estadísticos	36
Captación de BrdU y co-tinción con FABPs	36
Recuento de células proliferativas de la cripta por Inmunohistoquímica de BrdU y Ki67	37
Far Western Blot	37
Electroforesis bidimensional	37
Tinción de plata coloidal	38
Far western blot	38
Espectrometría de masas MALDI TOF	39

Co-inmunoprecipitación de FABP1 con resina de proteína A/G	40
Espectrometría de masas nano HPLC Electrospray-HCD-Orbitrap	40
Inducción de la expresión de FABP2	41
Purificación de anticuerpos con resina NHS	41
Co-inmunoprecipitación de FABP2 con resina NHS	41
Western Blot	42
Ensayo reportero de luciferasa	42
Acoplamiento y electrostática <i>in silico</i> de interacciones proteína-proteína	44
Capítulo 1. Estudio de la expresión de FABPs en Enfermedad Celíaca.	46
Liberación de FABPs ante daño del tejido	47
Incremento en los niveles de FABP2 en suero de pacientes con EC	47
Alteración en el patrón de expresión de FABPs en Enfermedad Celíaca.	49
Modificación de los niveles de transcripción de FABP1 y FABP2 en EC	52
Discusión del Capítulo 1. FABPs en Enfermedad Celíaca	55
Capítulo 2. Análisis de la expresión de FABPs de enterocito en modelos murinos: modelo con alteración funcional de la mucosa intestinal y modelos específicos de FABP1 y FABP2 <i>knock out</i>	61
Estudio de las FABPs en intestino delgado en un modelo murino con delección de Rac1	62
Alteración en el patrón de localización y expresión de FABPs	63
Modificación de la tasa de proliferación celular en ratones con eliminación de Rac1	64
Expresión de FABPs en células proliferativas	65
Localización de FABPs y análisis de la proliferación <i>in vivo</i> empleando ratones FABP1 o FABP2 <i>knock out</i>	66
Evaluación de la expresión de FABPs y actividad proliferativa en las criptas	66
Criptas normales y proliferación inalterada en ratones FABPs ko	68
Modificación en los niveles de ARNm de factores de transcripción relacionados a FABPs y algunos de sus genes downstream	69
Discusión del Capítulo 2. Modelos animales	72
Capítulo 3. Interacción proteína-proteína entre FABPs y otras proteínas	77
Análisis de la interacción FABPs-proteína en Caco-2	78
Identificación <i>in vitro</i> de proteínas interactuantes de FABPs	78
Caracterización funcional de la interacción entre FABP1 y PPARs	80
Evaluación de la expresión de genes <i>downstream</i> PPARs	81
Estudio de la activación de la expresión génica mediada por PPARs	82
Estudio <i>in silico</i> de las interacciones FABPs-proteínas	85

Discusión del Capítulo 3. Interacción proteína-proteína	88
Conclusiones	98
Bibliografía	101
Anexos	125
Anexo 1.	126
Anexo 2.	134
Anexo 3.	148

Agradecimientos

Dedico esta tesis a mis afectos. No imagino el camino recorrido sin ellos a mi lado. A los que están y a los que ya no. A Jano por apoyarme siempre. A mis padres por todo.

Agradezco a todos los que me ayudaron a crecer personal y profesionalmente a lo largo de estos años. A Betina por brindarme un lugar, formación y grandes posibilidades. A todos mis compañeros del laboratorio que me ayudaron incansablemente y me llevo muchos recuerdos de momentos compartidos con cada uno de ellos. A la gente del INIBIOLP. A Fernando por ser un guía importante en este recorrido. A la gente del IIFP con quienes pude colaborar y formarme.

Siglas

FABPs	Proteínas que unen ácidos grasos/Fatty Acid Binding Proteins
FABP1	FABP isoforma hepática/LFABP
FABP2	FABP isoforma intestinal/IFABP
ACC	Acil coA Carboxilasa
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
AG	Ácido graso
AGCL	Ácido Graso de Cadena Larga
ApoAI	Apolipoproteína AI
Aqp7	Acuaporina 7
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARP1	Proteína Reguladora de Apolipoproteína AI
BrdU	BromodesoxiUridina
CalR	Calreticulina
Cdx2	Proteína caudal homeobox 2
C-EBP	Proteína de unión potenciadora CCAAT
CKB	Creatina quinasa B
COX	Ciclo Oxigenasa
CRABP	Proteína de unión a ácido retinoico
CRBP	Proteína de unión a retinol
DG	Diglicérido
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Enfermedad Celíaca
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
FABPpm	Proteínas que unen ácidos grasos de membrana plasmática
FASN	Ácido graso sintetasa
FATP	Proteínas transportadoras de ácidos grasos
FGF15/19	Factor de crecimiento de fibroblastos 15/19
FL	Fosfolípido
FoxO1	Factor de transcripción <i>forkhead</i>
FWB	Far Western Blot
GATA	Factor nuclear GATA
GFD	Dieta de exclusión de proteínas de gluten
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HNF4	Factor Nuclear Hepático 4
HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSP60	Heat Shock Protein 60
IFN	Interferón
iLBPs	Proteínas intracelulares de unión a lípidos
ILK	Quinasa asociada a integrinas
LBD	Dominio de unión a ligando

MALDI-TOF	Desorción Laser Asistida por Matrix - Tiempo de Vuelo
ME1	Encima mágica 1
MG	Monoglicérido
NFκB	Factor Nuclear Kappa B
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PBS	Buffer Fosfato de Sodio
PCG1a	Coactivador de PPAR Gamma 1a
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxi-quinasa
PFA	Paraformaldehido
PGE	Prostaglandina
PM	Peso Molecular
PPAR	Receptores activados por proliferador de peroxisoma
PPRE	Elemento de respuesta a PPAR
PVDF	Polifloruro de Vinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Retículo Endoplásmico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RXR	Receptor X de Retinoides
SCD-1	Estearoil coA Desaturasa 1
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Srebp	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides
TBP	Proteína de Unión a TATA
TG	Triglicérido
TG2	Transglutaminasa 2
ULR	Unidades de Luz Relativas
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
WT	Cepa Salvaje/Control

Resumen

Las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) constituyen una amplia familia de proteínas pequeñas intracelulares (14-15kDa). Las mismas se expresan en distintos tejidos de manera específica, pudiendo expresarse más de una isoforma en un mismo tejido. Este es el caso de FABP1 (o LFABP, isoforma hepática) y FABP2 (o IFABP, isoforma intestinal). Ambas son expresadas en células epiteliales diferenciadas del intestino en elevadas concentraciones relativas. FABP1 se encuentra también presente en riñón e hígado (sitio donde fue descubierta). Estas FABPs han sido caracterizadas como importantes para el transporte y metabolismo de ácidos grasos (AG) provenientes de la dieta y la circulación. Unen ligandos hidrofóbicos, como los AG de cadena larga, con elevada afinidad y los transportan hacia diversos destinos subcelulares como la mitocondria, el retículo, el núcleo, para cumplir funciones en la β -oxidación, síntesis de quilomicrones, regulación de la transcripción génica, entre otros.

El intestino es el lugar de contacto con la mayor cantidad de microorganismos y es también el principal sitio de ingreso de nutrientes al organismo, favorecido por la gran superficie de contacto con el lumen intestinal brindado por las vellosidades. Las FABPs presentan su máximo nivel de expresión en el yeyuno, sitio donde se absorben los ácidos grasos. En bibliografía ya ha sido descrita la distribución normal de FABPs a lo largo del eje longitudinal del intestino, así como también la expresión en el eje cripta-vellosidad. Existen patologías del intestino delgado, llamadas enteropatías, con diverso grado de malabsorción de nutrientes, como es el caso de Enfermedad Celíaca (EC). Una patología con características autoinmunes que se desencadena ante la exposición a proteínas del gluten en individuos genéticamente susceptibles y que involucra una atrofia vellositaria, infiltración linfocitaria e hiperplasia de las criptas.

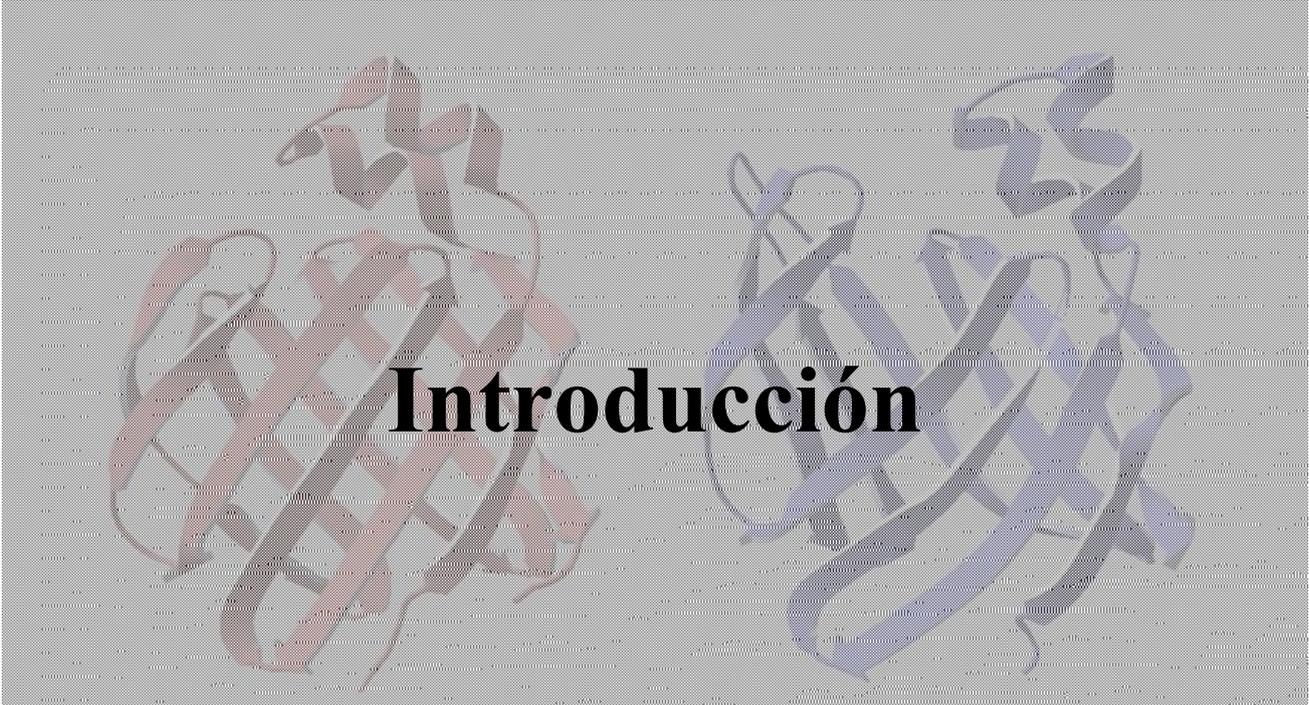
En el presente trabajo buscamos profundizar en el conocimiento de las funciones específicas que desempeñan las FABPs del enterocito desde dos aristas:

- 1) El análisis de la expresión de FABPs en un contexto de enteropatía del intestino delgado ampliamente caracterizada, como lo es EC.
- 2) El estudio de las interacciones proteína-proteína de las dos isoformas de FABPs con otras proteínas presentes en el enterocito.

Dichos trabajos fueron llevados a cabo a través de ensayos *in silico*, *in vitro*, en cultivo e *in vivo*, con muestras de pacientes y modelos animales. Como resultado encontramos una localización alterada de las FABPs en EC. Allí observamos expresión de FABPs en las criptas, hallazgo que nos llevó a considerar que estas proteínas en un contexto patológico pueden presentarse aún en células indiferenciadas y proliferativas. Esto fue confirmado en un modelo murino con alteraciones funcionales similares a EC. FABP2 se expresa en células en proliferación activa, mientras que FABP1 no. En modelos murinos FABP1 y FABP2 *knock out*, se vió que la ausencia de una de las FABPs no altera la localización ni la expresión de la isoforma remanente. Tampoco se observó alteración en la tasa de proliferación celular.

Los ensayos de interacción proteína-proteína llevados a cabo en una línea celular modelo, nos permitieron poner de manifiesto la interacción de FABP1 con Heat Shock Protein 60, Calreticulina, Creatina quinasa B, α -sinucleína, así como también tener evidencias funcionales de la interacción con los factores de transcripción de la familia de los PPARs (receptores activados por proliferador de peroxisoma). Para el caso de FABP2 observamos la interacción con PPAR γ . Estos resultados fueron complementados con análisis de acoplamiento (*docking*) molecular dirigido por análisis electrostáticos de los pares de proteínas interactuantes.

En conjunto, los resultados presentados nos permiten tener una mayor comprensión de las funciones que cumplen las FABPs a nivel intestinal y complejizan el espectro de interrelaciones moleculares que llevarían a las FABPs a formar parte de mecanismos diversos además de los estrictamente vinculados al metabolismo lipídico.



Introducción

Intestino delgado. Descripción general.

La función primaria del tracto gastrointestinal es digerir y absorber nutrientes. Para lograr esto, debe mantener una barrera entre el entorno luminal, técnicamente un espacio fuera del cuerpo y el entorno interno del cuerpo; y debe absorber y segregar selectivamente nutrientes, solutos y agua a través de la barrera. Esta barrera de separación se logra a partir de una lámina continua de células epiteliales columnares polarizadas (enterocitos). Estas barreras epiteliales son selectivas y capaces de excluir sustancias y microorganismos potencialmente nocivos. Mientras que, al mismo tiempo, son capaces de una absorción direccional y secreción de grandes volúmenes de solutos y agua.

La superficie apical de los enterocitos se extiende considerablemente gracias a la formación de microvellosidades. Cada enterocito maduro contiene alrededor de 1000 microvellosidades que, a su vez, contienen proteínas necesarias para la absorción de nutrientes y la digestión. Diferentes componentes y macromoléculas pueden atravesar el epitelio utilizando dos rutas, ya sea a través de las células o el espacio entre ellas, denominadas vías transcelular y paracelular, respectivamente. La conexión entre células individuales es sellada por una serie de uniones intercelulares, entre las que se encuentran complejos denominados uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas, siendo este último tipo la más importante para definir las características de la barrera paracelular y su selectividad (Schneeberger et al., 2018).

En el ser humano, el tiempo de migración de las células epiteliales desde la cripta a la vellosidad en el intestino delgado proximal se ha estimado en 5 a 6 días, mientras que en el íleon es de aproximadamente 3 días (Eastwood, 1977). Estas células se generan a partir de precursores que se localizan en la base de cada vellosidad, que en el tejido se observan como múltiples invaginaciones epiteliales, denominadas criptas de Lieberkuhn. La magnitud de la renovación de las células epiteliales en el intestino es notable. En promedio, cada cripta intestinal produce alrededor de 300 células nuevas por día, un número equivalente a su población en estado estacionario. Las 7000 células epiteliales (aprox.) que cubren una vellosidad localizada en la porción media del intestino se reemplazan cada aprox. 30–40 horas (Wright & Irwin, 1982). Desde hace tiempo se sabe que en las criptas reside una población de células epiteliales en proliferación vigorosa, que alimentan la auto-renovación activa del epitelio y que son de característica clonal. Estas células se encuentran dividiendo continuamente, dando lugar a los principales linajes celulares diferenciados (enterocitos, células de Paneth, células de goblet, células enteroendócrinas y otros tipos celulares especializados: células del mechón *-tuft cells-* y células M). Estas células madre se encuentran en la zona del fondo de la cripta. Las células hijas salen de esta región, pasando a través de la posición +5 (contado desde la base de la cripta, una posición

por cada diámetro celular), donde se encuentra el origen común de diferenciación. Es allí donde pierden el contacto directo con las células de Paneth, se comprometen con los distintos linajes y maduran en su recorrido ascendente hacia la punta de la vellosidad. Las primeras generaciones de “células en tránsito” (*transit amplifying*) pueden volver a caer en el nicho de las células madre para recuperar la pluripotencialidad. Por lo tanto, una población de estas células siempre está disponible como reserva que se activará en caso de daño tisular. Mientras que las células madre de la base de la cripta se dividen cada 24 horas, las “células en tránsito” requieren la mitad de tiempo para cada uno de sus 4-5 ciclos celulares. Por lo tanto, la salida de la cripta está en gran medida determinada por la actividad proliferativa de las “células en tránsito”, cuya proliferación está guiada por las mismas señales que regulan la proliferación de las células progenitoras. Cuando las “células en tránsito” son empujadas hacia la vellosidad por células recientemente formadas, las primeras experimentan un decrecimiento abrupto de la señal proliferativa (vía de Wnt), lo cual las llevará hacia su diferenciación terminal (Clevers, 2013). Una representación esquemática de este proceso puede observarse debajo en la Figura 1.

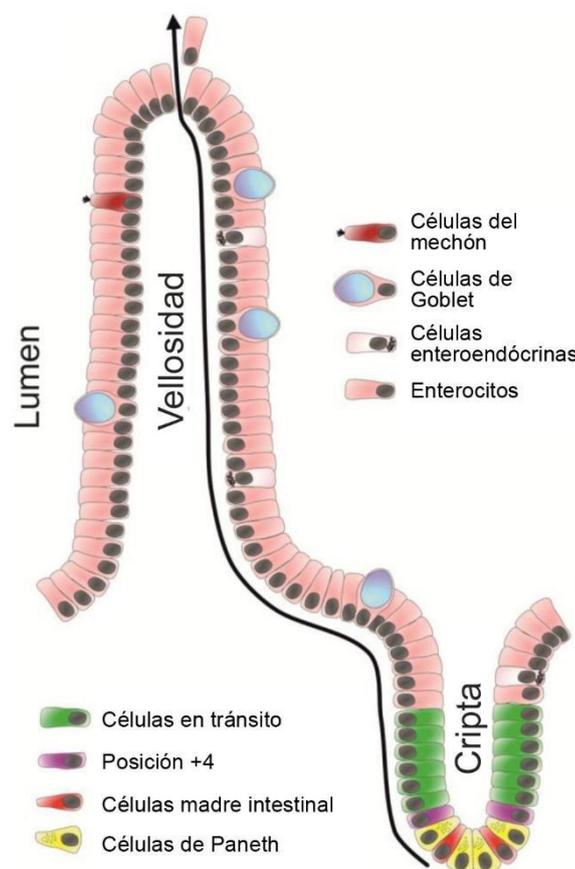


Figura 1. Diagrama de la estructura de una cripta y una vellosidad del intestino delgado donde se pueden observar los diferentes tipos celulares constituyentes. Adaptado de Williams et al. (Williams, Duckworth, Vowell, Burkitt, & Pritchard, 2016).

Enfermedad celíaca

El intestino, con una superficie de aproximadamente 200 metros cuadrados, es donde entramos en mayor contacto con el mundo exterior y a su vez, el intestino también tiene la mayor colección de células inmunes, que consiste en el 70% de todos los tejidos linfoides del cuerpo (Campbell, 2014). Este órgano es funcionalmente responsable de la absorción de nutrientes, por esta razón tiene una estructura muy particular con vellosidades con el fin de aumentar la superficie de contacto y hacer más efectivo el transporte de pequeñas moléculas. En el caso de la enfermedad celíaca (EC) esta histología se altera significativamente y las vellosidades pueden perderse completamente (Figura 2).



Figura 2. Esquema de la atrofia vellositaria característica de EC. Imagen adaptada de la página: <https://newsnetwork.mayoclinic.org>.

EC es una enteropatía crónica de base inmune con algunas características autoinmunes, con un 1% de prevalencia mundial. La EC se desencadena en individuos genéticamente susceptibles por la ingestión de un grupo de proteínas, comúnmente conocido como gluten, provenientes de trigo, cebada y centeno (Abadie et al., 2011; Meresse et al., 2012).

La EC es un trastorno poligénico y ciertos alelos de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés) son los factores genéticos más importantes implicados. La mayoría de los pacientes portan las variantes HLA-DQ2 (DQA1*05:01, DQB1*02:01), HLA-DQ8 (DQA1*03,

DQB1*03:02), y HLA-DQ2 (DQA1*02:01, DQB1*02:02) (Sollid & Jabri, 2013). El papel de las moléculas HLA se estableció claramente cuando se aislaron las células T específicas de péptidos derivados de gluten del intestino delgado de pacientes con EC. Estas células T son productoras de IFN γ y están restringidas a moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (Lundin et al., 1993; Sollid & Jabri, 2013). Aunque la EC presenta la más alta asociación con alelos de susceptibilidad HLA en comparación con otras enfermedades; estos genes solo representan el 40–50% de la susceptibilidad genética. Por lo tanto, los HLA se consideran un factor necesario, pero no suficiente, para el desarrollo de EC. En estudios genéticos, se encontraron 39 loci de factores de susceptibilidad para EC distintos de HLA (Trynka et al., 2012). En esta enfermedad concurren no sólo determinantes genéticos sino también diversos factores ambientales (Tye-din et al., 2018).

La enteropatía por EC comúnmente se limita al intestino delgado proximal donde los hallazgos histológicos característicos son: atrofia vellositaria, hiperplasia de las criptas e infiltración linfocitaria. Estos cambios histológicos causan pérdida de la función intestinal y un síndrome de malabsorción. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa están involucradas en el daño a la mucosa del intestino delgado (Abadie et al., 2011; Meresse et al., 2012).

Actualmente, el diagnóstico de EC se basa en la evaluación clínica, serología positiva de un panel de anticuerpos (anti-transglutaminasa 2, anti-péptidos deamidados de gluten, y anticuerpos anti-endomisio), y en el examen histológico de una biopsia de intestino delgado. La exclusión de proteínas de gluten de la dieta (GFD, por sus siglas en inglés) revierte los daños histológicos de la mucosa intestinal y los síntomas (Fasano & Catassi, 2012; Leonard et al., 2017). Aunque las pruebas serológicas presentan una alta eficiencia analítica, el diagnóstico de la EC todavía se basa en la evaluación histológica de biopsias intestinales. Se necesitan nuevas herramientas no invasivas para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EC.

En la actualidad no se cuenta con un modelo animal que recapitule todas las características de la patología de EC. Es por esto que se recurre a diversos modelos que estudian algunos rasgos de la patología para estudiarla desde diversas aristas y como estrategia en la búsqueda de nuevas terapias (Costes et al., 2015).

Asimilación de lípidos dietarios. FABPs

Dado que en la patología descrita anteriormente se presentan frecuentemente cuadros de malabsorción de nutrientes, consideramos de importancia la descripción sucinta de la absorción normal de ácidos grasos (AG) a nivel intestinal y, asociados a estos procesos, describir las funciones conocidas

de las proteínas transportadoras de los AG en las células. En humanos, los lípidos dietarios tienen su lugar de absorción mayoritario en el intestino delgado, más particularmente en el yeyuno, aunque dependiendo de la carga de grasas que posea la dieta, es posible que lleguen a ser absorbidos eficientemente en el íleon (Booth et al., 1961).

Los AG de cadena larga son nutrientes comunes en la dieta, una importante fuente de energía de las células y precursores para la síntesis de lípidos con funciones estructurales o de señalización celular. Los AG también regulan la expresión génica mediante factores de transcripción, incluidos los receptores activados por proliferador de peroxisoma (Peroxisome Proliferator Activated Receptors, PPARs, de sus siglas en inglés), sensores de nutrientes que controlan una variedad de genes metabólicos y FoxO1, un miembro de la familia de *forkhead* importante para la adaptación a la escasez de nutrientes. La mayoría de los tejidos, excepto el hígado y el tejido adiposo, tienen poca capacidad para la síntesis de AG *de novo* y dependen de la absorción de AG para sus necesidades, enfatizando la importancia fisiológica de la captación de AG (Su & Abumrad, 2009).

Los AG de cadena larga pueden difundir rápidamente a través de las bicapas de fosfolípidos (FL) (Simard et al., 2008), pero actualmente se cree que su captación se encuentra facilitada por una amplia variedad de proteínas integrales o asociadas a la membrana celular de mamíferos. Las proteínas transportadoras de AG (FATP, por sus siglas en inglés) presentes en la membrana plasmática y organelas, tienen actividad acil-CoA ligasa y funcionarían en el acoplamiento de la absorción de AG a la primera reacción de la utilización de los mismos (Stahl et al., 1999). Se ha descrito otra proteína relacionada a la captación de AG, la proteína de unión a AG asociada a la membrana plasmática (FABPpm) (Stremmel et al., 2001), que es idéntica a la aspartato aminotransferasa mitocondrial, revelando dos funciones diferentes para la misma proteína llevadas a cabo en distintos compartimientos. También se encuentra involucrada CD36, una proteína de membrana asociada a la absorción de AG y su oxidación. Diversos ensayos permitieron identificar la función de asimilación de AG en modelos de ratones deficientes o con sobre expresión de CD36. Particularmente, se vio que en enterocitos del intestino proximal de ratones CD36 *knock out* (ko) hay deficiencia de la captación de AG y colesterol con disminución de la secreción de quilomicrones y de la movilización de triglicéridos (TG) plasmáticos (Nassir et al., 2007; Nauli et al., 2006). Cabe destacar, que el procesamiento de los AG incorporados en el enterocito es dependiente del sitio de entrada de los mismos, es decir, membrana apical o basolateral (Storch et al., 2008; Trotter & Storch, 1991).

Además del tejido adiposo, el intestino delgado es un órgano especializado en la síntesis de TG que luego serán liberados a la circulación linfática en forma de quilomicrones. Y, si bien las proteínas

transportadoras de AG descritas anteriormente juegan un rol preponderante en la captación de los lípidos dietarios, existen otros mecanismos complementarios que regulan su tasa de absorción, como por ejemplo, la secreción de quilomicrones (Stremmel et al., 2017).

Las proteínas de unión a ácidos grasos (Fatty Acid Binding Proteins, FABPs, por sus siglas en inglés) fueron descritas por primera vez por Ockner en el año 1972 (Ockner et al., 1972). En ese entonces, se describió una proteína aislada de mucosa intestinal (y otros tejidos), de 12 kDa, capaz de unir AG de cadena larga. Su descubrimiento vino a dar respuesta a uno de los grandes cuestionamientos sobre la absorción de lípidos dietarios y su metabolismo. Esto es, dada la elevada insolubilidad de los AG y su toxicidad en el estado libre, era necesaria la presencia de proteínas que actúen como transportadores hacia distintos destinos subcelulares, funcionando como buffers citosólicos de los AG. El yeyuno, sitio de mayor absorción de AG, es coincidente con el sitio de mayor expresión de las FABPs intestinales (Levy et al., 2009).

Una vez absorbidos desde el lumen intestinal, los AG atraviesan diversos procesos desde su metabolización para obtención de energía, como su utilización para formación de lípidos complejos con fines estructurales y como moléculas señalizadoras de vital importancia en vías metabólicas, así como vías inflamatorias y transcripción génica (Harayama & Riezman, 2018).

Las FABPs son un conjunto de proteínas de 14-15 kDa que unen con diversa afinidad (dependiendo de la isoforma estudiada) una variedad de ligandos hidrofóbicos entre los que se encuentran primordialmente los AG de cadena larga, tanto saturados como insaturados, y otros ligandos como eicosanoides, grupo hemo y fosfolípidos. Son expresadas diferencialmente en diversos tejidos, pudiendo encontrarse más de una de ellas en un mismo tejido. En mamíferos la familia de las FABPs comprende 10 isoformas: LFABP, IFABP, HFABP, AFABP, EFABP, ILBP, BFABP, MFABP, TFABP, FABP12 (o FABP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 12, respectivamente) (Tabla 1). Toman sus nombres de los tejidos donde fueron descritas por primera vez aunque algunas de ellas pueden expresarse en más de un tipo celular a la vez (Smathers & Petersen, 2011). Las FABPs se encuentran agrupadas dentro de la superfamilia de las proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBPs, de sus siglas en inglés) junto con las proteínas de unión a retinol (CRBP, por sus siglas en inglés) y a ácido retinoico (CRABP, por sus siglas en inglés) (Veerkamp, 1995). Las proteínas de esta familia poseen una baja identidad de secuencia (de alrededor de un 10-30%) pero una elevada conservación de sus estructuras tridimensionales (Flower, 1993). Siendo la estructura característica un barril β conformado por 10 cadenas β antiparalelas y dos hélices α cortas que constituyen la región portal (Figura 3).

Gen	Nombre	Nombre original	Identificada en	Expresión	Ligandos naturales
fabp1	FABP1	LFABP	Hígado	Hígado, intestino, riñón, pulmón y páncreas	AGCL*, acil-CoA, MG, LisoFL, sales biliares y grupo hemo.
fabp2	FABP2	IFABP	Intestino delgado	Intestino delgado	AGCL
fabp3	FABP3	HFABP	Corazón	Músculo esquelético, corazón, cerebro, riñón, pulmón, glándulas adrenales y mamarias, testículos, ovarios y estómago	AGCL
fabp4	FABP4	AFABP ó aP2	Tejido adiposo	Tejido adiposo, macrófagos, piel y placenta	AGCL
fabp5	FABP5	EFABP ó KFABP	Piel	Piel, tejido adiposo, pulmón, cerebro, corazón, músculo esquelético, retina, intestino, testículos, y riñón	AGCL
fabp6	FABP6	IBABP ó ILBP	Intestino delgado	Ileon, ovario	Sales biliares
fabp7	FABP7	BFABP	Cerebro	Cerebro, células de la glia y retina	AGCL
fabp8	FABP8	MFABP	Células de la vaina de Mielina	Cerebro y células de Schwann, bulbo olfativo, medula espinal	AGCL
fabp9	FABP9	TFABP	Testículo	Testículo, glándula salival y mamaria	AGCL
fabp12	FABP12	-	-	Células de retinoblastoma, retina, células germinales de testículo, cortex cerebral, riñón, epidídimo	AGCL

Tabla 1. Integrantes del grupo de FABPs de mamíferos. Adaptada de (Furuhashi & Hotamisliligil, 2008; Smathers & Petersen, 2011; Storch & Corsico, 2008).

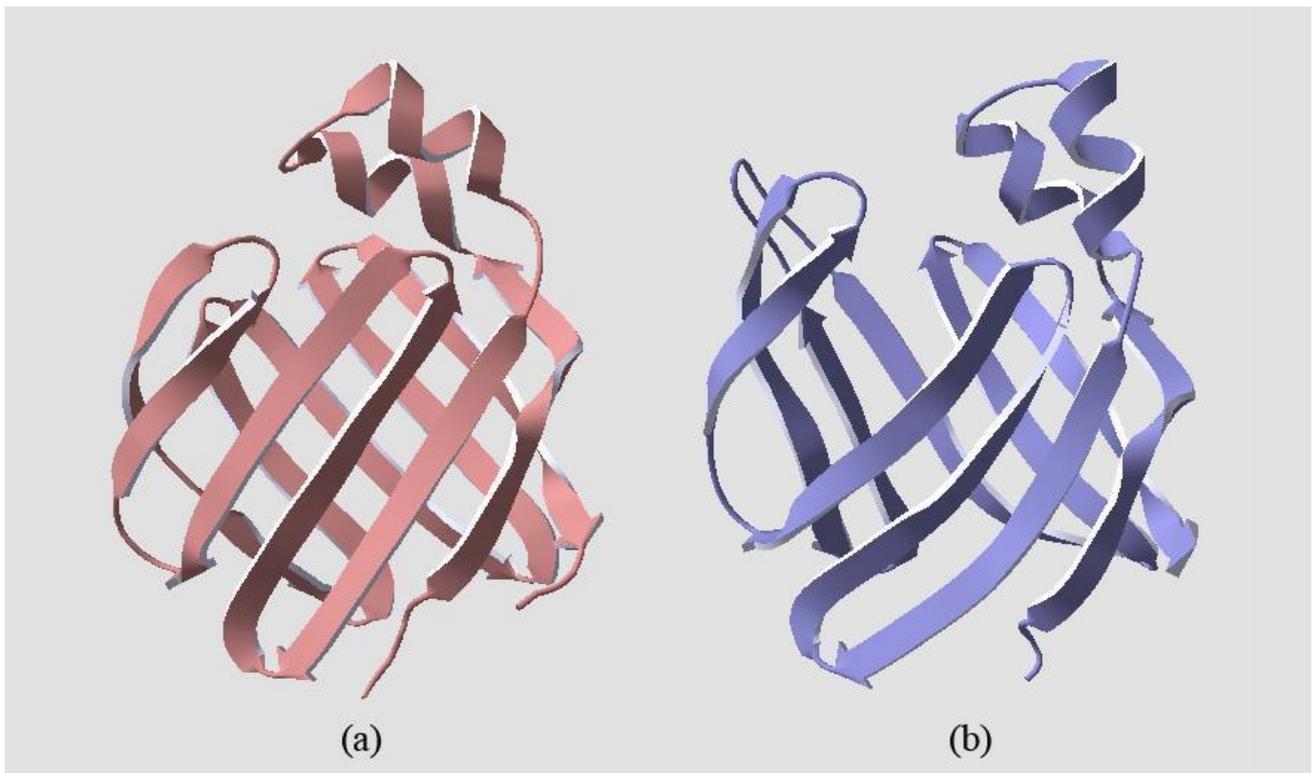


Figura 3. (a) Estructura de lazo de FABP1 obtenida del archivo PDB ID: 3stk y (b) estructura de lazo de FABP2 obtenida del archivo PDB ID: 2mo5.

Entre de las funciones que cumplen las FABPs pueden describirse: asimilación y almacenamiento de lípidos dietarios, metabolismo de lípidos, transporte intracelular de AG hacia distintos compartimentos subcelulares (mitocondria, núcleo, peroxisoma, etc.), modulación de la expresión génica, regulación de la β -oxidación de AG, secreción de lípidos a la circulación, regulación de síntesis de citoquinas proinflamatorias, modulación de la homeostasis de la glucosa, regulación de la lipólisis, y la proliferación y diferenciación celular (Storch & Corsico, 2008).

La presencia de proteínas de unión intracelular a AG sin duda aumenta la solubilidad de los mismos y, por lo tanto, puede proteger a las estructuras celulares del daño por un exceso de estas moléculas anfipáticas. De la misma manera, las FABPs generan un reservorio de AG citosólicos que mejora la disponibilidad de sustratos para las enzimas que los metabolizan. Las FABP mejoran la absorción de AG en la célula al aumentar su gradiente de concentración, debido a la reducción de la concentración de AG libre en la célula. Consistente con estos roles generales en el transporte y metabolismo de AG, el contenido de FABPs es generalmente proporcional a la tasa metabólica de AG de las células (Hauerland & Spener, 2004).

Las células epiteliales intestinales, llamadas también enterocitos, expresan abundantemente FABP1 y FABP2. Siendo el nivel de expresión de estas FABPs del orden de 1-2% del total de las proteínas

presentes en este tipo celular (Ockner et al., 1972). Más aún, los niveles de ARNm de FABP1 y FABP2 son los de mayor abundancia en el enterocito (Gordon et al., 1982). A diferencia de FABP2, que sólo es expresada en intestino, FABP1 es también expresada en hígado y riñón (Bass, 1985).

Además de FABP1 y FABP2, los enterocitos expresan FABP6. Esta proteína no une AG como FABP1 y FABP2 pero si ácidos biliares con elevada afinidad (Fujita et al., 1995). FABP1, en humanos, se encuentra expresada en concentración 40-50 veces mayor que FABP2 (Pelsers et al., 2003). Si bien todas se encuentran expresadas en el epitelio intestinal, dentro del mismo tejido existen sitios donde sus niveles son más elevados, tanto en ratón como en humano (Agellon et al., 2002; Pelsers et al., 2003).

FABP1 y FABP2 presentan sólo un 24% de identidad de secuencia, sin embargo sus elementos estructurales son casi idénticos (Chmurzyńska, 2006; Banaszak et al., 1994). FABP1 posee la mayor cavidad de unión a ligando de la familia de las iLBPs. A diferencia de otras FABPs tiene la posibilidad de unir hasta dos moléculas de AG o una molécula de otros ligandos como: hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA, prostaglandinas, xenobióticos, etc. (Atshaves et al., 2010; Thompson et al., 1999). FABP2 une principalmente AG saturados mientras que FABP1 es capaz de unir tanto AG saturados como insaturados, siendo su segundo sitio de unión menos afin por los AG insaturados que el primero (Murphy et al., 1999; Richieri et al., 1994).

A continuación, se detallan los experimentos que han permitido obtener evidencias de las funciones desempeñadas por las FABPs expresadas en el enterocito. Se tratarán de abarcar desde ensayos *in vitro*, pasando por ensayos en células en cultivo, hasta el estudio de estas proteínas en modelos animales (*in vivo*). La Figura 4 permite tener una idea gráfica de algunos de los roles descritos para estas proteínas en el epitelio intestinal.

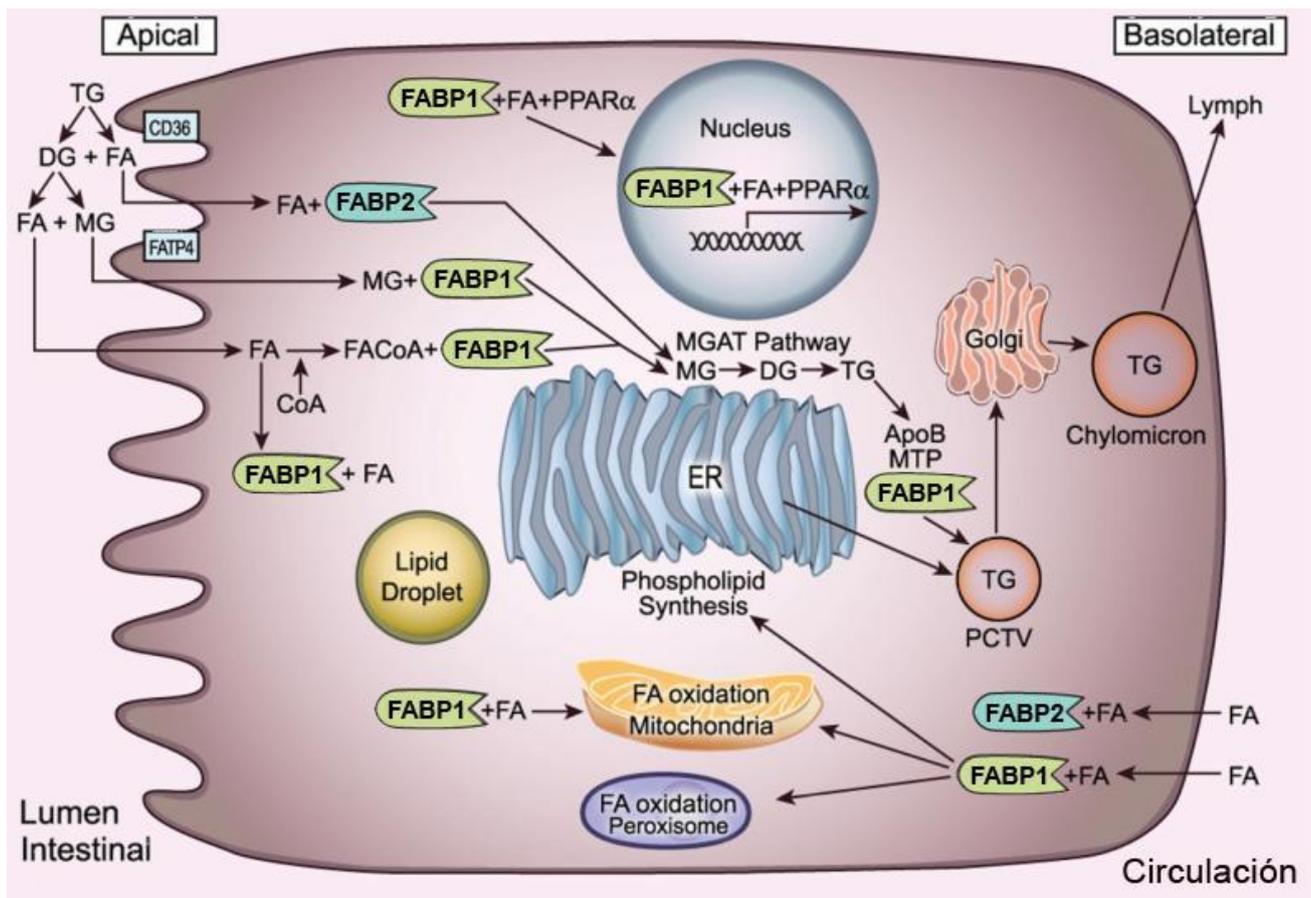


Figura 4. Diagrama de las funciones conocidas de FABP1 y FABP2 en el enterocito. Se postula que serían las primeras en recibir a los AG una vez que traspasan la membrana plasmática, ya sea desde la cara luminal o basolateral. Luego los transportan hacia distintos compartimientos subcelulares, viéndose involucradas en una amplia variedad de procesos. Figura adaptada de Gajda y Storch (2015). FA: Ácido Graso.

En ensayos *in vitro* se descubrió que existen diferentes mecanismos de transferencia de análogos de AG desde y hacia FABP1 y FABP2 utilizando membranas modelo. FABP1 presenta un mecanismo de transferencia difusional del AG en el medio acuoso, mientras que FABP2 muestra un mecanismo colisional con un fuerte componente electrostático al interactuar con la membrana (Hsu & Storch, 1996; Thumser & Storch, 2000). Ha sido demostrado que el dominio α -helicoidal de estas FABPs es el responsable de los mecanismos de transferencia de ligandos antes mencionados (Córscico et al., 2005; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008). Asimismo, ha sido demostrado que FABP2 se inserta en la membrana para liberar el ligando, con dependencia de la composición fosfolipídica de la membrana modelo utilizada (De Gerónimo et al., 2014). Estudios *in silico* mostraron que FABP1 interactuaría con membranas a través del fondo de su barril β (Zamarreño, Herrera, Córscico, & Costabel, 2012).

Los ensayos en cultivo realizados en nuestro laboratorio y los de otros autores proveen evidencia de que, en el mismo sistema celular, FABP1 y FABP2 cumplirían funciones específicas. Se enumeran a continuación dichos hallazgos:

En ensayos de nuestro laboratorio llevados a cabo en la línea Caco-2, empleando la técnica de ARNm antisentido, pudimos demostrar que la reducción de los niveles de FABP1 disminuyen la tasa de proliferación celular, la captación de AG y la secreción de TG. Así como también, se vio alteración en la asimilación de AG en distintas especies lipídicas. No observamos alteraciones en la velocidad de diferenciación celular medida por resistencia transmembrana (Rodríguez Sawicki et al., 2017).

En la línea Caco-2 con sobreexpresión de FABP2 se observó una disminución en la proliferación de la línea celular, con iguales niveles del marcador de diferenciación fosfatasa alcalina pero disminución en la actividad de sacarosa isomaltasa (Darimont et al., 2000). A su vez, se reportó una disminución en la captación de AG marcado radiactivamente, con una alteración leve en la proporción de diacilglicéridos (DG), sin alteraciones en otras especies lipídicas. La transfección de células madre embrionarias con FABP2 resultó en un aumento en la absorción de AG y su difusión intracelular. Por otro lado, la adición del ARNm de FABP2 a una línea de células epiteliales intestinales FABP2 negativa, no alteró las tasas de esterificación de AG (Hauerland & Spener, 2004).

En la línea de hepatocito normal, Hus, se sobre-expresó FABP1, observando un aumento de la angiogénesis asociado a un aumento del factor de crecimiento VEGF-A. A su vez, se vió interacción física entre VEGFR2 (receptor de VEGF) y FABP1 por inmunoprecipitación cruzada. Las células que expresan FABP1 presentan un aumento de la migración celular comparado a la línea control (Ku et al., 2016).

Utilizando la línea celular Cos-7, se observó que las FABPs 1 y 2 direccionan de manera preferencial cierto tipo de ligandos hidrofóbicos (AG y otras moléculas) hacia el núcleo (Huang et al., 2002), en un mecanismo independiente de importinas, donde pueden generar la activación transcripcional mediada por el factor nuclear PPAR α (Hughes et al., 2015). Tanto FABP1 como FABP2 carecen de señal de localización nuclear, a diferencia de FABP4, isoforma de adipocito que sí la posee.

Se ha planteado la función de FABP1 como antioxidante, protegiendo a la célula del daño causado por especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) al inactivar radicales libres mediante sus aminoácidos azufrados y por su capacidad de unión a productos de la peroxidación lipídica, así como al grupo hemo evitando así su participación en la generación de ROS (Wang et al., 2015). Sin embargo,

otros autores han visto un aumento de las ROS cuando se reducen la expresión de FABP1 en una línea celular de hepatoma, CRL-1548, ante un estrés inducido por peróxido de hidrógeno (Yan et al., 2010).

Usando un sistema de explantes intestinales, se observó que FABP1 une más AG que FABP2, independientemente del sitio de entrada. Es posible que la estequiometría de unión de FABP1, 2 AG por proteína, sea la responsable de estas observaciones. FABP2 unió mayor cantidad de AG luego de la administración apical, sugiriendo que esta proteína estaría involucrada principalmente en el transporte de AG dietarios hacia distintos compartimientos subcelulares (Alpers et al., 2000).

Utilizando fibroblastos que expresan FABP1 o FABP2, se ha reportado un aumento en la incorporación de ácido oleico en TG relativo a las células control. Las células que contenían FABP1 mostraron mayor incorporación de marca radioactiva en fosfolípidos; mientras que, las células que expresaban FABP2 mostraron mayor recuperación de marca en la fracción de lípidos neutros (Prows et al., 1995).

En una línea de hepatoma humano, HepG2, la expresión de FABP1 se vio inducida por el tratamiento con agonistas de PPAR α . En ese mismo trabajo fue reportada una disminución en la captación de AG al reducir los niveles de expresión de FABP1 mediante un ARNm antisentido (Wolfrum et al., 1999).

Diversos modelos animales *in vivo* permitieron profundizar en los efectos tisulares y sistémicos de FABP1 y FABP2. Se ha reportado que FABP1 está involucrada en el ensamblado de vesículas pre-quilomicroónicas en el retículo endoplásmico, así como también en la selección de los lípidos que formarán al quilomicroón. Sin estar presente en la partícula madura que distribuye los lípidos dietarios hacia otros tejidos (Neeli et al., 2007).

Al tratar ratas con predisposición genética a la obesidad y ratas delgadas con una dieta rica en lípidos se observaron incrementos en los niveles de FABP1 en hígado, indicando que sus niveles no son determinados genéticamente sino por los niveles de grasas dietarios (Malewiak et al., 1988). Esto se describe en más detalle en la sección de Regulación génica de la expresión de FABPs, dentro de esta Introducción.

Así mismo, ha sido reportado que FABP1 es capaz de unir monoacilglicerol (MG) tanto *in vitro* como en muestras de hígado de ratón (Lagakos et al., 2013). Siendo capaz de direccionarlos selectivamente hacia la síntesis de TG y no de FL (Gajda et al., 2013).

A lo largo de los años se han generado modelos de ratones *knock out* (ko) para FABP1 y FABP2. En algunos casos con resultados contradictorios. Para FABP1 se generaron dos modelos ko de manera independiente (Martin et al., 2003; Newberry et al., 2003). Ambos modelos mostraron defectos en la

absorción y oxidación hepática de AG y secreción de VLDL. El modelo desarrollado por Martin et al. es más proclive a la obesidad, con este modelo continuó el trabajo del laboratorio de la Dra. Storch. En cuanto a FABP2 se desarrolló un único modelo ko (Vassileva et al., 2000). En la Tabla 2 presentada a continuación enumeramos los principales hallazgos y diferencias entre los modelos (Gajda et al., 2013; 2015).

	FABP1 ko	FABP2 ko
Cepa/desarrollo del modelo	C57BL/6J / derivado del modelo de Martin et al.	C57BL/6J / Vassileva et al.
Compensación con otra isoforma de FABP	N/D	N/D
Peso corporal	↑	↓
Grasa	↑	↓
Ingesta calórica	↑	↓
Coefficiente respiratorio	↓	↑
Gasto energético	↔	↔
Actividad física	↑	↔
Secreción de TG	↔	↑
AG circulación, TG/FL	↓	↓
AG absorbidos, TG/FL	↔	↔
Oxidación de AG mucosa	↔	↓
Endocannabinoides mucosa Homeostasis energética	↑	↓

Tabla 2. Características del metabolismo lipídico de los modelos animales FABP1 y FABP2 ko. Adaptado de Gajda y Storch (2015).

Polimorfismos en las FABPs

Se ha identificado un polimorfismo de FABP1 con sustitución de alanina por treonina en la posición 94 (T94A) que se asocia con un aumento de los niveles plasmáticos de TG y AG libres (Fisher et al., 2007). Este polimorfismo haría a la proteína incapaz de activar la transcripción de genes del metabolismo lipídico mediado por PPAR α (Brouillette et al., 2004).

En el caso de FABP2, se ha descrito una sustitución de alanina por treonina en la posición 54 (A54T). Este polimorfismo presenta una mayor afinidad por la unión a AG, y en la población que la expresa se

evidencia hiperlipidemia y resistencia a la insulina (Baier et al., 1995). En un ensayo con explantes intestinales con este polimorfismo se observó un aumento de la absorción de AG y de la síntesis de TG (Levy et al., 2001).

Regulación génica de la expresión de FABPs

Las enzimas del metabolismo lipídico expresadas en el intestino poseen patrones de expresión genéticamente programados, modificables por medio del contacto celular con nutrientes dietarios (Trotter & Storch, 1993). Estudios demostraron que el desarrollo y los gradientes de expresión intestinal proximal-distal de FABPs no dependen de la presencia de lípidos lumbales o contenidos lumbales per se (Rubin et al., 1992).

En el tejido normal se ve un gradiente de expresión de FABPs con ausencia en la cripta y aumento creciente hacia la punta de la vellosidad (Levy et al., 2009). En contraste con lo descrito para el eje proximal-distal, al observar el eje cripta-vellosidad se vió que el gradiente de ARNm de FABP1 se ve alterado en segmentos no expuestos a contenidos lumbales (Gutierrez, 1995). Lo cual se ve reforzado por la distribución intracelular observada en ratas luego del ayuno (Iseki & Kondo, 1990). Es posible que las señales de la luz intestinal, como los lípidos u otros nutrientes, o alternativamente, estímulos hormonales o nerviosos, estén involucrados en la regulación de los niveles de FABPs en enterocitos. Se ha observado una expresión dependiente de los lípidos administrados a la línea celular Caco-2 (Poirier et al., 1997). Allí se sugiere que son los AG no esterificados los responsables por los efectos observados en la expresión de FABP1.

A nivel génico se sabe que el promotor de FABP1 presenta un Elemento de Respuesta a PPAR (PPRE, por sus siglas en inglés) en el promotor localizado entre los nucleótidos -66 a -75 (Simon et al., 1993), similar a lo descrito para genes involucrados en la oxidación peroxisomal de AG. Se han identificado las tres isoformas de PPAR en el intestino (α , β/δ y γ) (Braissant et al., 1996; Poirier et al., 1997). En cambio, para FABP2 no se ha encontrado un PPRE equivalente, aunque si se han descrito varias copias de una secuencia de 14 pares de bases flanqueando el gen. Dichas secuencias constituyen regiones a las que se unen los receptores de hormonas esteroideas como el factor nuclear hepático 4 (HNF-4, por sus siglas en inglés) y la proteína reguladora de apolipoproteína A-1 (ARP-1, por sus siglas en inglés, también llamada COUP-TFII) (Rottman & Gordon, 1993). Estos elementos están también presentes las regiones 5' de los genes CRBP2 y ApoAI, también expresados en la mucosa intestinal, indicando el potencial para coordinar varios genes involucrados en el procesamiento de los lípidos dietarios. El gen de FABP2, a su vez, presenta una región entre los nucleótidos -103 a +28 con

la capacidad de restringir la expresión al linaje de enterocitos, permitiendo establecer un correcto gradiente proximal-distal y expresión en el desarrollo fetal tardío. Aunque esto se ve influenciado por elementos río arriba de esa región. Secuencias de la región -1178 a -278 se encuentran involucradas en la expresión durante la adultez. Las secuencias correspondientes a la zona entre -277 y -185 reprimen la expresión distal del íleon al colon, así como también en las criptas y células de Paneth. En el gen de FABP1, así como se describe para FABP2, la región -132 a +21 es suficiente para establecer un patrón de expresión en los enterocitos de las vellosidades y un correcto gradiente proximal-distal, así como también su expresión hepática. Sin embargo, no se encontraron las secuencias necesarias para suprimir la expresión precoz en criptas (Sweetser et al., 1988). Regiones río arriba del nucleótido -132 son las responsables de suprimir la expresión en colon, ciego, y riñón. Asimismo, se describió una héptada repetida entre -186 a -133 que actúa como un supresor en diversos tipos celulares (Sanderson & Walker, 2000).

Regiones cercanas al gen de FABP2 presentan sitios consenso para la unión del factor nuclear GATA entre los nucleótidos -270 a -350. Los reguladores de transcripción GATA cumplen distintas funciones en células progenitoras y diferenciadas del epitelio intestinal. El intestino expresa las isoformas GATA 4 y 5 mayoritariamente en células epiteliales diferenciadas de la vellosidad, mientras que la isoforma 6 se expresa en células proliferativas. Utilizando una línea de fibroblastos QT6 que expresan ectópicamente las proteínas GATA4, 5, 6 y un sistema reportero de luciferasa acoplado al promotor de FABP2 se pudo detectar que GATA 4 y 5 aumentan de 5 a 9 veces los niveles de expresión de FABP2 y que el sitio -42 sería el responsable de la expresión de un 80% de los niveles basales de esta proteína (Gao et al., 1998).

Por otra parte, la expresión mediada por adenovirus de factores de transcripción en la línea celular HepG2, permitió confirmar que la expresión de FABP1 es regulada positivamente por FOXA1 y PPAR α y reprimida por C/EBP α . Identificando los sitios río arriba de la región promotora donde se unen para ejercer esta función. Además, se identificó que el factor de transcripción HNF4 α utiliza el mismo sitio de unión a ADN que C/EBP α , compitiendo con este y aumentando los niveles de expresión de FABP1 (Guzmán et al., 2013).

Interacción proteína-proteína de FABPs

Con la finalidad de obtener una mejor caracterización de las funciones llevadas a cabo por las FABPs se describen ensayos en los que se ha demostrado la interacción de FABPs con otras proteínas intracelulares. Hasta la actualidad han sido descritos varios casos de interacción de otras proteínas

con FABPs. La interacción de la FABP de corazón (FABP3) y el transportador de AG de membrana FAT/CD36 (Spitsberg et al., 1995) ha sido demostrada, sugiriendo un transporte vectorial de AG en la célula. Se ha reportado la interacción de FABP1 con el factor de transcripción PPAR α en hepatocitos (Hostetler et al., 2009), lo que sugiere que FABP1 podría traslocar al núcleo y transportar directamente sus ligandos, donde ejercerían su acción regulatoria sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos. En un ensayo más reciente, se ha descrito que la vehiculización de ligandos hacia el núcleo mediada por FABP1 y FABP2 depende de la naturaleza del ligando y de la FABP en cuestión. A su vez, cuando se encuentra en el núcleo, no todos los ligandos de estas FABPs son capaces de activar la regulación transcripcional mediada por PPAR α (Hughes et al., 2015). También ha sido descrita la interacción entre FABP de queratinocito (FABP5) y PPAR β/δ (Tan et al., 2002). La interacción entre la FABP de adipocito (FABP4) y la lipasa sensible a hormona también ha sido demostrada (Jenkins-kruchten et al., 2003). Estos estudios sugieren que FABP4 participa del mecanismo de regulación de la actividad de la lipasa encargada de la degradación de TG en el adipocito (Smith et al., 2008). También fue descrita la interacción entre FABP4 y Cgi-58, un coactivador de triglicérido lipasa del adipocito (Hofer et al., 2015). Se ha reportado la interacción de la FABP4 con JAK2, proteína quinasa involucrada en la fosforilación de receptores y activación de factores de transcripción (Thompson et al., 2009). En la línea de hepatocito normal, Hus, transfectado con FABP1, se ha probado la interacción entre esta proteína y la fracción citoplasmática de VEGFR2, factor de crecimiento vascular endotelial. Esto sugiere un rol de FABP1 en la migración celular. La isoforma de FABP1 T94A no presentó interacción con este receptor (Ku et al., 2016).

Ensayos de *screening* como el doble híbrido en levaduras (Y2H, por sus siglas en inglés) han permitido identificar proteínas interactuantes con FABP1 como por ejemplo: glucosamina-fosfato N-aciltransferasa 1 (Huttlin et al., 2017), Filamina A (Rolland et al., 2014; Sahni et al., 2016); y con FABP2 con la proteína del gradiente anterior 2 (Rolland et al., 2014).

Para documentar y describir las interacciones entre proteínas, se ha desarrollado un grupo de bases de datos que incluyen toda la información obtenida por los diferentes métodos experimentales que reúne la información publicada en la literatura científica. Algunas de estas interacciones proteína-proteína han sido evidenciadas usando el recurso en línea “STRING: functional protein association networks” (sitio web: <https://string-db.org/>) que provee una interfaz gráfica de análisis de la información bibliográfica y bases de datos (Szklarczyk et al., 2019). Sus resultados se pueden ver en la Figura 5. Aunque los mismos constituyen resultados que no fueron comprobados posteriormente en el presente trabajo de tesis.

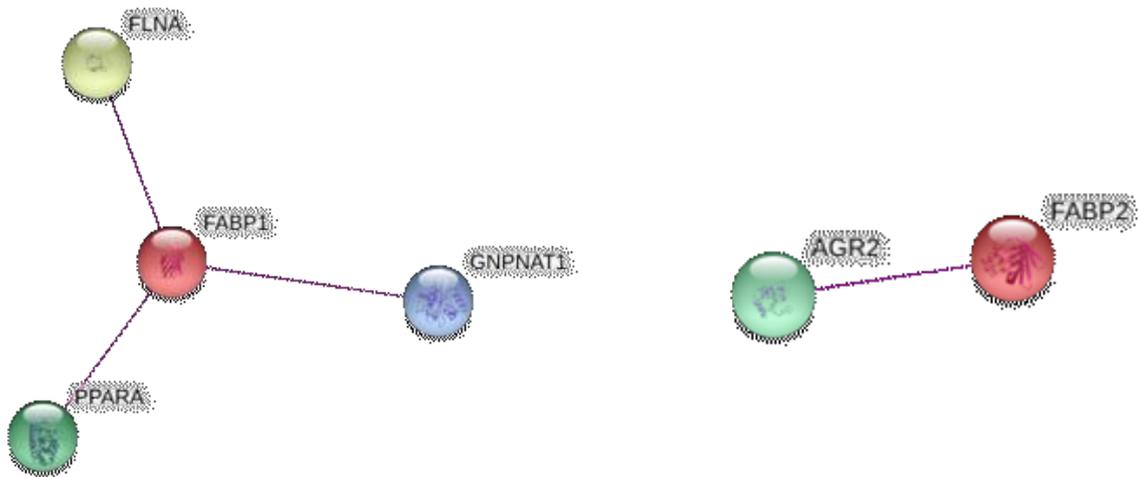


Figura 5. Imágenes obtenidas de la interfaz gráfica String que reúne resultados de bases de datos. En este caso se graficaron sólo aquellas interacciones basadas en al menos un resultado experimental.

En este contexto cabe resaltar, que sólo se ha reportado, hasta el momento, un resultado de interacción proteína-proteína con FABP2, y que el estudio *in vitro* y en cultivo de las mismas permanece prácticamente inexplorado, así como la interacción de FABP1 con proteínas específicas del enterocito.

Desde hace más de veinte años, nuestro laboratorio se dedica al estudio de la relación estructura-función de las FABPs, aportando información acerca de sus funciones específicas en la asimilación y el metabolismo de lípidos (Corsico et al., 1998, 2001, 2004, 2005, 2009; Falomir-Lockhart et al., 2006, 2011; Franchini et al., 2008; Gabrielsen et al., 2012; De Geronimo et al., 2010, 2014; Ibanez-Shimabukuro et al., 2014; Lagakos et al., 2013; Di Pietro et al., 2003; Porfido et al., 2012; Rodriguez Sawicki et al., 2014, 2017; Storch and Corsico, 2008; Wu et al., 2001; Zamarreño et al., 2012). En el presente trabajo de Tesis comenzamos a indagar en el rol que desempeñan en condiciones patológicas como la Enfermedad Celíaca (Bottasso Arias et al., 2015). Empleando ensayos *in vitro*, en células en cultivo y en muestras de pacientes y modelos de ratones ko, nuestros estudios contribuyen a aclarar el rol de las FABPs en el transporte de AG, distribución tisular en la patología de Enfermedad Celíaca y las implicancias de la ausencia de FABP1 en el modelo Caco-2 para el metabolismo lipídico y proliferación celular.

Hipótesis de trabajo

Las FABPs expresadas en el enterocito cumplen funciones adicionales a las fundamentalmente vinculadas con el transporte de lípidos.

Objetivos

Con la finalidad de evaluar estos roles diferenciales se emplearon múltiples sistemas de estudio, tanto *in silico*, *in vitro*, en cultivo e *in vivo*. Los estudios fueron llevados a cabo en células Caco-2, en modelos murinos y en muestras humanas en una condición de enteropatía del intestino proximal muy caracterizada (Enfermedad Celíaca).

Nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar la expresión de las FABPs en intestino delgado humano. Estudiar su rol en la enfermedad celíaca (EC).
- 2) Estudiar la expresión de FABPs, y genes relacionados en modelos murinos específicos y su vinculación con la proliferación celular.
- 3) Identificar y caracterizar interacciones de las FABPs intestinales con otras proteínas.

Materiales y métodos



Declaraciones de ética

Protocolos con muestras de pacientes

Biopsias duodenales y muestras de sangre se obtuvieron de pacientes pediátricos y adultos durante procedimientos de rutina para diagnosticar EC en las Unidades de gastroenterología del hospital Sor Maria Ludovica y HIGA San Martín de La Plata, Buenos Aires, Argentina, respectivamente. Pacientes o sus tutores proporcionaron un consentimiento informado por escrito para participar en este estudio. El presente estudio fue aprobado por los comités éticos del hospital Sor Maria Ludovica y HIGA San Martín de La Plata, Argentina.

Protocolos con muestras de ratones

Los procedimientos realizados en ratones *Rac1 fl/fl* y WT; *FABP1^{-/-}*, *FABP2^{-/-}* y sus respectivos WT fueron avalados por los comités de ética del Instituto Beatson en Escocia y de la Universidad de Rutgers en Nueva Jersey, EEUU. Lugares donde se llevaron a cabo los experimentos detallados a continuación.

Pacientes y muestras

Para el diagnóstico de EC se consideró la presentación clínica, el examen histológico de piezas de biopsias duodenales y el análisis serológico. Los pacientes celíacos pediátricos y adultos concurren al centro especializado (Servicio de gastroenterología del Hospital de Niños o del Hospital San Martín de La Plata). Los estudios serológicos incluyeron la determinación de anticuerpos IgG e IgA anti-transglutaminasa 2, y anticuerpos IgG e IgA anti-péptidos deamidados de gluten, y anticuerpos antiendomiso. Para los propósitos de diagnóstico, se tomaron tres piezas de biopsia de la segunda porción del duodeno que fueron evaluadas por un patólogo experto.

En conjunto, este estudio incluyó pacientes con EC que presentaron atrofia parcial o total de las vellosidades, manifestaciones clínicas clásicas, y serología positiva.

Los pacientes en dieta libre de gluten (GFD) presentaron recuperación histológica y marcadores serológicos negativos para EC. Individuos no celíacos que sufrían otros trastornos gastrointestinales, principalmente dispepsia, con serología para EC negativa y la histología duodenal normal también fueron incluidos en este estudio. El diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) está conformado por criterios clínicos, endoscópicos, e histológicos establecidos. En este estudio se incluyeron las muestras de un paciente pediátrico con colitis ulcerosa y seis de pacientes adultos: 4

con colitis ulcerosa y 2 con enfermedad de Crohn. Los pacientes con enfermedad de Crohn no tenían compromiso del íleon.

Todas las muestras de pacientes con EII fueron tomadas al momento del diagnóstico y no recibieron ningún tratamiento en el momento de la recolección de la muestra.

Se recolectaron muestras de suero de 42 controles no celíacos (16 casos pediátricos, 26 adultos), 40 pacientes EC no tratados (17 casos pediátricos, 23 adultos), 9 pacientes en dieta libre de gluten GFD (3 casos pediátricos, 6 adultos) y 7 de pacientes con EII (1 caso pediátrico, 6 adultos).

Las muestras duodenales fueron obtenidas a partir de 27 pacientes pediátricos (13 controles no celíacos, 14 pacientes EC) y 15 adultos (9 controles no celíacos, 6 pacientes EC). Las muestras para qPCR se estabilizaron usando RNeasy (Qiagen, CAT. AM7020) y se almacenaron a -80°C hasta el procesamiento para el análisis de expresión génica.

Se procedió de acuerdo a protocolos de los Comités de Ética de ambas Instituciones de Salud.

Determinación en suero de FABP2

Se determinaron los niveles de FABP2 en suero utilizando un kit de ELISA comercial (HyCult Biotech, HK406), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizaron muestras de suero de controles no celíacos, pacientes con EC sin tratar y tratados (en dieta libre de gluten), y pacientes con otras EII. Los valores están expresados como la media \pm la desviación estándar (DE) de la media.

Producción de anticuerpos policlonales de conejo anti FABP1 y FABP2

Se analizó la expresión de FABPs humanas en muestras duodenales usando anticuerpos policlonales de conejo específicos de FABP1 y FABP2 de rata. Las secuencias y estructuras de las FABPs de rata y humano se encuentran bien caracterizadas. Los 127 residuos de FABP1 y los 132 residuos de FABP2 de rata y humano tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 83% y 82%, respectivamente llevando a un alto grado de reactividad cruzada entre anticuerpos policlonales dirigidos contra estas especies (Chan et al., 1985). Las proteínas recombinantes FABP1 y FABP2 fueron producidas en las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET11d-FABP2, pET11a-FABP1 y purificadas según lo descrito en bibliografía (Corsico, Cistola, Frieden, & Storch, 1998; Hsu & Storch, 1996), realizando una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-50, Pharmacia Biotech Inc.), seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (DE-52, Whatman) y finalmente, delipidadas usando una columna Lipidex-1000 (Fisher Sci.) a 37°C . Para evaluar la pureza de las FABPs se realizó

una electroforesis SDS-PAGE seguida de tinción con azul brillante de Coomassie R250 (Thermo). Las FABPs purificadas fueron utilizadas para inmunizar conejos según el protocolo estándar (Rosenberg, 2005). La reactividad de anticuerpos policlonales de conejos inmunizados fue evaluada por Western Blotting y ELISA usando las proteínas recombinantes. El Western Blot fue desarrollado utilizando un sustrato quimioluminiscente de la HRP (Thermo, 34080).

Genotipos murinos

Rac1^{vil-Cre-ER^{T2}} Rac1^{fl/fl}, ratones creados en el laboratorio del Dr. Owen Sansom con una base mixta (50% C57BL/6J, 50% S129). La eliminación del gen Rac1 por recombinación se induce mediante una inyección de tamoxifeno intraperitoneal de 80mg/kg por día durante 4 días. La población control (WT, wild type) de este grupo es vil-cre-ER^{T2} (Myant K 2013).

FABP1 ko, FABP2 ko y WTs fueron obtenidos en el laboratorio de la Dra. Judith Storch sobre una cepa C57BL/6J (Gajda A, Storch J 2013).

Preparación de muestras intestinales murinas

Luego de la resección intestinal se procedió a lavar el intestino con PBS pH 7.4 dos veces. Las muestras de ratones Rac1 y sus respectivos controles WT se procesaron con la técnica de agrupamiento de piezas de intestino (gut bundling, de su nombre en inglés) (Figura 6 (a)). Brevemente, se toman 10 secciones longitudinales de intestino delgado consecutivas de 1 cm de largo y se colocan sobre una cinta tipo 3M con el lado adhesivo hacia arriba. Luego se pega la cinta con el otro extremo, formando una gota que contiene el conjunto de secciones que al incluirlas en parafina y generar los cortes histológicos darán segmentos transversales de intestino. Por otro lado, el intestino delgado de ratones FABP1 y FABP2 ko, junto con sus respectivos controles WT, se procesó siguiendo la técnica de arrollado (Swiss roll, de su nombre en inglés) (Figura 6 (b)). Brevemente, se tomaron secciones de intestino delgado proximal y yeyuno, se las cortó longitudinalmente y se fijaron por 5 minutos de forma extendida en PFA 4%. Luego, utilizando pinzas de bordes aserrados se tomaron desde un extremo y se enrollaron con la cara luminal hacia el interior. Finalmente, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes longitudinales de intestino.

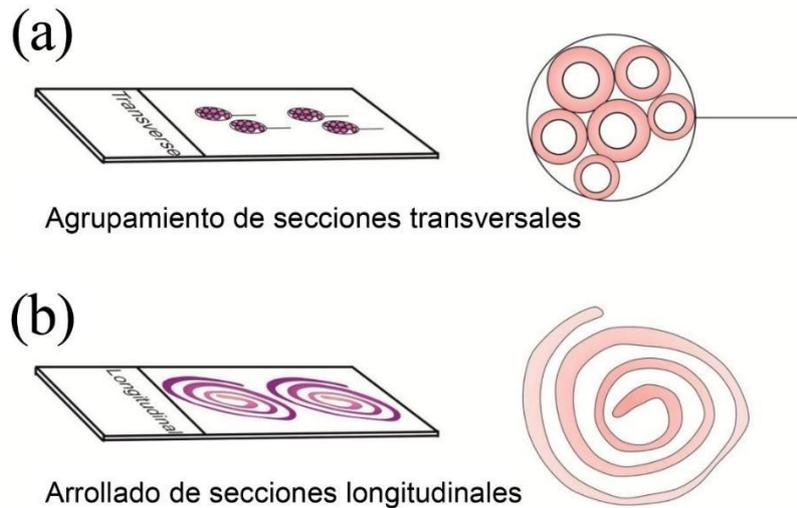


Figura 6. Diagrama de la orientación del tejido para los cortes histológicos. (a) secciones transversales mediante agrupamiento de pequeñas secciones contiguas de intestino y (b) secciones longitudinales de intestino obtenidas por arrollado. Imagen adaptada de Williams, et al. (2016).

Procesamientos de tejido de ratón y de biopsias humanas para inmunofluorescencia

Se obtuvieron secciones de intestino delgado incluido en parafina con un microtomo Leica SM 2000R. Posteriormente se rehidrataron y se utilizó una solución Citra (BioGenex, HK086-9K) para la recuperación antigénica. Las secciones se tiñeron con anticuerpos policlonales de conejo anti-FABP1 o anti-FABP2 (diluciones utilizadas: FABP1 1/200 – 1/400, FABP2 1/20 – 1/50). Luego, se incubaron con IgG anti-conejo conjugado con Alexa 488 (Life Technologies, 21206). Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio o DAPI. Se realizó un análisis de microscopía confocal fluorescente en un microscopio SP5 Leica. El análisis de inmunofluorescencia se realizó en un microscopio Nikon Eclipse E400.

PCR cuantitativa

En muestras humanas el ARN total fue obtenido de biopsias completas utilizando un kit comercial (RNA Spin Mini Kit GE Healthcare, 25-0500-72). Para la retro-transcripción se utilizó 1ug de ARN total, polimerasa MML-V y *primers* al azar (Molecular Probes Inc, Invitrogen). La PCR en tiempo real semicuantitativa fue realizada en un termociclador IQ Cycler (BioRad) utilizando Sybr green (Invitrogen, 11761-100) y *primers* específicos para los genes de interés (Tabla 3). Dichos *primers* fueron diseñados basándonos en las secuencias codificantes de los genes de FABP1, FABP2, β -actina

y Villina. Validando su especificidad por alineamiento de secuencias (Blast: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y calculando su eficiencia mediante diluciones seriadas del ADN molde. Se utilizó el método comparativo de Ct (delta Ct) para cuantificar los niveles de transcritos de FABP1 y FABP2 normalizando con β -actina o villina, alternativamente. Los valores fueron expresados como la media \pm el desvío estándar (DE) de la media.

Gen blanco	Primer 1	Primer 2
FABP2	AGCACTTGGAAGGTAGACCG	CCCCTGAGTTCAGTCCGTC
FABP1	AGCTCTATTGCCACCATGAGTTTCT	AACTGAACCACTGTCTTGACTTTCTC
β -actina	ATGGGTCAGAAGTCCTATGTG	CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC
Villina	CTACACCACACAGATGGATGACTTC	GACATCTCTACCTCTCCAGCTACCA

Tabla 3. Primers utilizados para PCR cuantitativa de muestras de intestino humano. Expresados en sentido 5' a 3'. Primer 1 o Fw y Primer 2 o Rv.

El ARN total de muestras de intestino de ratón WT, FABP1 ko y FABP2 ko fue obtenido de manera análoga a la descrita anteriormente, así como también su retro-transcripción a ADNc. Como gen de normalización se utilizó la proteína de unión a TATA (TBP, de sus siglas en inglés). Se utilizó el método comparativo de Ct para cuantificar los niveles de transcritos de genes relacionados con metabolismo lipídico y factores de transcripción que se listan en la Tabla 4. Los primers fueron obtenidos de la base de datos de primers de Harvard (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Los valores se analizaron con la media \pm el desvío estándar (DE) de la media y se expresaron en los ratones ko como las veces de cambio en función del valor tomado por el grupo control (WT).

Gen blanco	Primer 1	Primer 2
Hnf4a	ATGCGACTCTCTAAAACCCTTG	ACCTTCAGATGGGGACGTGT
Apoa1	CTTGGCACGTATGGCAGCA	CCAGAAGTCCCGAGTCAATGG
Ilk	GCTCTGCGGTGGTTGAAATG	CACGGTGTCCATGACTAGCTG
Pck1	CTGCATAACGGTCTGGACTTC	GCCTTCCACGAACCTCCTCAC
Aqp7	AATATGGTGCAGAGTTTCTGG	AACCCAAGTTGACACCGAGAT
Rxra	ATGGACACCAAACATTTCTGC	CCAGTGGAGAGCCGATTCC
Gata4	TCAACCGGCCCTCATTAAG	GTGGTGGTAGTCTGGCAGT

Cdx2	CAAGGACGTGAGCATGTATCC	GTAACCACCGTAGTCCGGGTA
Srebp1	TGACCCGGCTATTCCGTGA	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
Srebp2	GCAGCAACGGGACCATTCT	CCCCATGACTAAGTCCTTCAACT
C/EBPa	GCGGGAACGCAACAACATC	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC
Fgf15	ATGGCGAGAAAGTGGAACGG	GGACCAGCGGAGTACAGGT
Pgc1a	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	GTCGCTACACCACTTCAATCC
TBP	CAAACCCAGAATTGTTCTCCTT	ATGTGGTCTTCCTGAATCCCT

Tabla 4. Primers utilizados para PCR cuantitativa de muestras de intestino murino. Expresados en sentido 5' a 3'. Primer 1 o Fw y Primer 2 o Rv.

Análisis estadísticos

Se analizaron la normalidad de las poblaciones de datos (Shapiro Wilk) y la homogeneidad de las varianzas (Bartlett) antes de tomar una decisión en cuanto al test estadístico a aplicar. En los casos en que las distribuciones fueron normales y las varianzas homogéneas se aplicó el análisis T-test. En los casos en los que no se cumplió con la normalidad de las distribuciones y/o la homogeneidad de las varianzas, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante Mann-Whitney-Wilcoxon. Se utilizó el programa de análisis R (R Core Team, 2017).

Captación de BrdU y co-tinción con FABPs

Se inyectaron 200uL de BromodesoxiUridina (BrdU BD, 550891) por vía intraperitoneal en ratones WT, Rac1, FABP1 y FABP2 ko. Luego de dos horas se procedió a obtener el intestino el cual se procesó como se describió anteriormente. Se obtuvieron cortes histológicos a los cuales se realizó una co-tinción con anti BrdU (BD, 347580, dilución utilizada: 1/400) en conjunto con anti FABP1 o FABP2 (dilución utilizada: 1/1000). Luego se incubaron con anti-ratón conjugado con Alexa 633 y anti conejo conjugado con Alexa 488 (Invitrogen, dilución utilizada: 1/250). Las muestras fueron montadas y se dejaron hasta el día siguiente a 4°C en oscuridad antes de observarlas. Para las muestras de ratones con eliminación de Rac1 y WT se tomaron imágenes en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 y las muestras de ratones FABP1 y FABP2 ko en un microscopio confocal Leica SP6. Al menos se evaluaron 3 ratones de cada genotipo.

Recuento de células proliferativas de la cripta por Inmunohistoquímica de BrdU y Ki67

Se cortaron secciones de intestino murino incluido en parafina. Luego de la rehidratación y recuperación antigénica, se incubaron con anti BrdU (BD, 347580, dilución utilizada: 1/400) o anti Ki67 (Thermo, RM-9106-S). Posteriormente, se trataron con anti-ratón o anti-conejo conjugado con HRP (Dako, K4003, dilución utilizada: 1/200), respectivamente y se visualizó el color con un sustrato cromogénico DAB (Dako, K3468). Finalmente, se utilizó hematoxilina para dar una tinción celular general y se montaron las muestras para su visualización en un microscopio óptico. Se evaluaron 50 criptas adyacentes contabilizando el número de células BrdU o Ki67 positivas sobre el total de células presentes en la cripta. Al menos 3 ratones fueron estudiados para cada genotipo.

Far Western Blot

Electroforesis bidimensional

Técnica de Far Western Blot modificada de aportes bibliográficos (Burgess, Terrance, & Pietz, 2000; Sato, Kameya, Arai, Ishii, & Igarashi, 2011), combinado con electroforesis bidimensional (2D) y proteómica de Caco-2 descritas en bibliografía (Lasserre, Joubert-caron, Caron, & Hardouin, 2010; Lenaerts, Bouwman, Lamers, Renes, & Mariman, 2007).

Se obtuvo un homogenato de las células Caco-2 a través de la utilización de un kit comercial Grinding kit (GE) con agregado de inhibidor de proteasas (Thermo). Una vez se disrumpieron las células, se centrifugó y colectó el sobrenadante. Se procedió a la cuantificación de proteínas utilizando el Quant kit (GE) con un patrón de albúmina sérica bovina y se alicuotaron en viales conteniendo 100ug de proteínas totales cada uno. Se realizó un acondicionamiento de las muestras con mediante el 2D Clean up kit (GE) con una posterior resuspensión de la misma en un volumen de solución de extracción que se sembró en la tira de pH de la 1ª dimensión (GE). Estas tiras cuentan con un gradiente de pH de 3 a 10. Este procedimiento se realizó por duplicado. Las tiras se dejaron hidratar durante la noche. Al día siguiente, se colocan las muestras en el equipo IPG-Phor II para correr la 1ª Dimensión que separará las proteínas por pI. Se seleccionaron las condiciones de corrida en el programa controlador de acuerdo con la longitud de las tiras (7cm), rango de pH (3-10) y número de tiras (2).

Luego se procedió con la 2ª Dimensión consistente en separar las proteínas ahora por peso molecular. Se emplearon 2 geles SDS-PAGE de 12.5% Acrilamida/Bis-acrilamida de 1mm de espesor, en los que

se formaron dos calles: una de 7 cm de ancho para contener la tira de la 1ª Dimensión y otra calle de menor volumen para incorporar el marcador de peso molecular (Low Molecular Weight, GE, para posterior tinción con plata coloidal o Rainbow, GE, para posterior FWB). Antes de sembrar las tiras, las mismas se equilibraron por 15min en una solución de SDS y DTT (como agente reductor).

Se colocó una tira en cada gel con el extremo marcado como (+) hacia el marcador de peso molecular. Se sella la parte superior de la calle con una solución de agarosa, azul de bromofenol, SDS y DTT. Condiciones de corrida de la 2ª Dimensión: 160v por 1 hora y 15 minutos.

Una vez finalizada la corrida electroforética, uno de los geles se coloreó con una tinción de plata coloidal y al otro se lo transfirió a una membrana de PVDF para proseguir con el Far western blot.

Tinción de plata coloidal

Se fijaron las proteínas en una solución Metanol:Ác. acético:Agua (50:12:38) con 25uL de formol 37% cada 50mL durante la noche. Se lavó el gel con etanol 50% seguido de tiosulfito de sodio 0.02%. Luego de tres lavados con agua, se incubó con nitrato de plata 0.2% con 37.5uL de formol cada 50mL por 20 minutos. Se realizaron lavados con agua y se revelaron las bandas con 25mL de carbonato de sodio 6%, conteniendo 625uL de tiosulfito de sodio 0.02% y 12.5uL de formol 37%. Se procedió a lavar con agua y se detuvo el revelado con una solución metanol:ác. acético:agua (50:12:38) por 10 min. Se lavó 30 min con metanol 30%.

Far western blot

Se transfirieron las proteínas del duplicado del gel bidimensional siguiendo el protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970). Luego se procedió al bloqueo con PBS 0.05% Tween por 2 horas con agitación, seguido de PBS 0.05% Tween, 1% Albúmina por el mismo tiempo. Luego se incubó la membrana en Buffer sonda: PBS 3% Albúmina, 10% Suero fetal bovino, por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Posteriormente, se incubó la membrana con 10ug de proteína recombinante purificada (FABP1 o FABP2) cada 10 mL del buffer sonda por 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

Se hicieron lavados y luego se continuó como un western blot tradicional, incubando con el anticuerpo primario anti FABP1 o anti FABP2: 1/5000 PBS 0.05% Tween, 1% Albúmina, 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP dilución 1/10000 en PBS 0.05% Tween 1% Albúmina. Revelado con el reactivo quimioluminiscente Super signal west pico (Thermo).

Se adquirieron las imágenes tanto del gel teñido con plata como de la membrana PVDF con un equipo Image Quant 350 (GE). Se superpusieron las imágenes y se marcaron aquellos puntos de coincidencia entre el gel y la membrana. Aquellos con mayor intensidad fueron enviados a analizar por espectrometría de masas.

Se realizaron controles evitando el paso de incubación con proteína purificada, incubando la membrana transferida con anti FABP1 o FABP2 para descartar que existieran uniones inespecíficas de los anticuerpos con las proteínas de las células Caco-2.

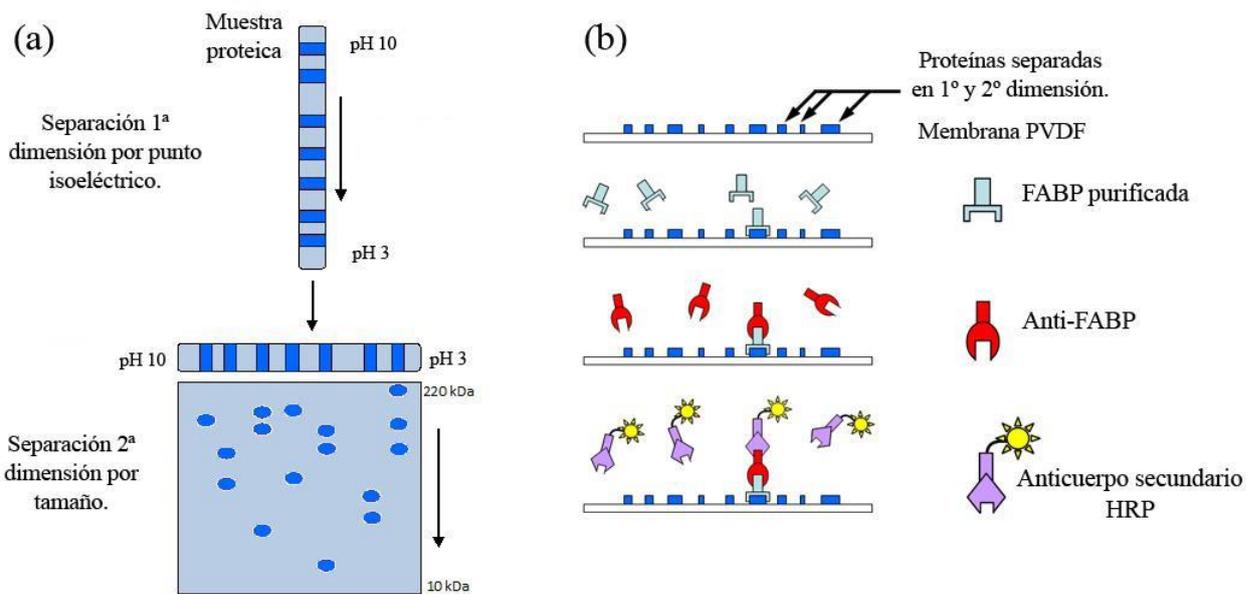


Figura 7. Esquema representativo de la técnica de Far Western Blot. (a) Electroforesis bidimensional separando las proteínas, primero, en un isoelectroenfoco y, después, mediante un SDS-PAGE. (b) transferencia del gel a una membrana para proceder con incubación con proteína purificada e incubación con anticuerpo específico para esa proteína y con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Revelado con reactivo quimioluminiscente.

Espectrometría de masas MALDI TOF

Los puntos de coincidencia entre el Far western blot y el gel bidimensional se cortaron del gel y se enviaron a analizar por MALDI TOF al Lanais ProEM, FFyB, UBA.

Como controles se procesaron una banda de gel correspondiente a BSA y un blanco. Se digirieron "in gel" utilizando tripsina como enzima proteolítica, empleándose 20 ul de una solución de tripsina de 25 ng/ul. El extractivo de cada una de las muestras se sometió a análisis en el espectrómetro de Masas 4800 MALDI TOF TOF plus de ABI. Los datos se obtuvieron primeramente en modo reflectrón y posteriormente se realizó la fragmentación, obteniéndose los espectros MS/MS, de las señales más

importantes. Se aplicó el programa Mascot PMF para el estudio de los digeridos completos y el programa Mascot MSMS para el análisis de la fragmentación. Bases de datos utilizadas “nr/swissprot” del servidor público de MASCOT (www.matriscience)

Co-inmunoprecipitación de FABP1 con resina de proteína A/G

Se utilizó el kit comercial Pierce Crosslink IP kit (Thermo N° cat 26147). Brevemente, se precipitaron 2mL de suero de conejo anti-FABP1 con sulfato de amonio al 40% agitando por 2 horas a 4°C, luego se centrifugó y se prosiguió con el precipitado. Al cual se lo lavó y cambió de buffer con filtro Millipore corte 50 kDa, resuspendiendo el antisuero en 500uL de buffer PBS. Se siguieron las instrucciones del fabricante para obtener las IgG anti FABP1 inmovilizadas a la resina. Luego se incubó con 1mg del homogenato Caco-2, preclarificado con resina de agarosa, como indica el fabricante. Se lavó y eluyó para luego realizar un western blot que confirmara la presencia de la proteína FABP1 en el eluato. Se realizó un control de isotipo contra una proteína no relacionada (anticuerpo de conejo dirigido contra la proteína p44 del parásito D. renale). Se sembraron 50uL de cada eluato en una calle de un gel de acrilamida-bis acrilamida 15%, cada uno y una calle con un patrón de peso molecular (Low Molecular Weight, GE). El gel se tiñó con Coomassie coloidal G-250 (BioRad). Se identificaron 5 regiones: <20 kDa, 20-25 kDa, 25-45 kDa, 45-55 kDa, >55 kDa. Las mismas fueron cortadas y analizadas por separado por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas nano HPLC Electrospray-HCD-Orbitrap

El eluato del paso anterior y el eluato de un control de isotipo se enviaron a analizar al servicio de Espectrometría de masas del CEQUIBIEM, Cs. Exactas y Naturales, UBA.

Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56 grados y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg) durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo. Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y vueltas a resuspender con 10 ul de Ácido Fórmico 0,1%.

Se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que nos permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa Proteome Discoverer. Para seleccionar las proteínas interactuantes se tomó como criterio aquellas proteínas que se encuentran representadas por más de un péptido.

Inducción de la expresión de FABP2

Nos basamos en lo reportado en bibliografía para lograr una expresión endógena de FABP2 (Christian Darimont & Gradoux, 1998), sin necesidad de recurrir a una transfección de la línea celular. Para lograr la expresión de FABP2 en la línea celular Caco-2, se realizó un recubrimiento de las superficies de la placa de cultivo de 60mm con colágeno (Collagen I, Rat tail, A10483-01), 50ug/mL 0,02M ác. acético por 1 hora a 37°C. Luego se lavaron dos veces las superficies de las placas con PBS estéril y se dejaron secar durante 30 min en la cabina de bioseguridad bajo el flujo de aire. Se sembraron 400000 células y se las siguió cultivando por 15 días, tripsinizando y cambiando las células de placa cada 3 días. Se comparó este procedimiento con el logrado creciendo las células sobre transwell de 0,4um de poro por 15 días, que constituye el protocolo establecido para diferenciación de Caco-2 que genera inducción de FABP2. Se analizó la expresión de FABP2 por western blot.

Purificación de anticuerpos con resina NHS

Con la finalidad de eliminar anticuerpos inespecíficos contenidos en el antisuero generado en conejo (ver Producción de anticuerpos policlonales de conejo anti FABP1 y FABP2) se realizó primero una precipitación de 2mL de las proteínas del suero con sulfato de amonio al 40% por 2 horas a 4°C con agitación para disminuir principalmente la gran cantidad de albúmina sérica presente, luego el precipitado se resuspendió en buffer Tris-HCl 10mM pH 7.4 y se realizó el desalado con TrisHCl 10mM pH 7.4 en un filtro de corte 50kDa (Millipore UFC505008). Se inmovilizó FABP2 purificada en buffer carbonato pH 9 a una columna armada con N-hidroxisuccinimida (Pierce NHS-Activated Dry, 26196) siguiendo las instrucciones del fabricante. A la columna se la incubó con el anti suero (precipitado y desalado como se describió antes) por 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Luego de lavados con TrisHCl pH 7.4 con distinta fuerza iónica, se eluyó el anticuerpo retenido con Glicina pH 2.5 y se colectaron aquellas fracciones con pH cercano a 3. Se juntaron, se neutralizaron con TrisHCl pH 8.5 y se concentraron utilizando un filtro de corte 50kDa (Millipore UFC505008). Se hizo un SDS-PAGE y un western blot para controlar la presencia y función del anticuerpo purificado.

Co-inmunoprecipitación de FABP2 con resina NHS

Utilizando una resina de N-hidroxisuccinimida se inmovilizó el anticuerpo purificado de FABP2 (obtenido como se detalló en el inciso previo). Esta resina reacciona con aminas libres de lisinas y aminos terminales de las proteínas. Para la inmovilización se utilizaron las fracciones concentradas del paso anterior conteniendo el anticuerpo purificado en buffer carbonato pH 9. Se incubó con la resina

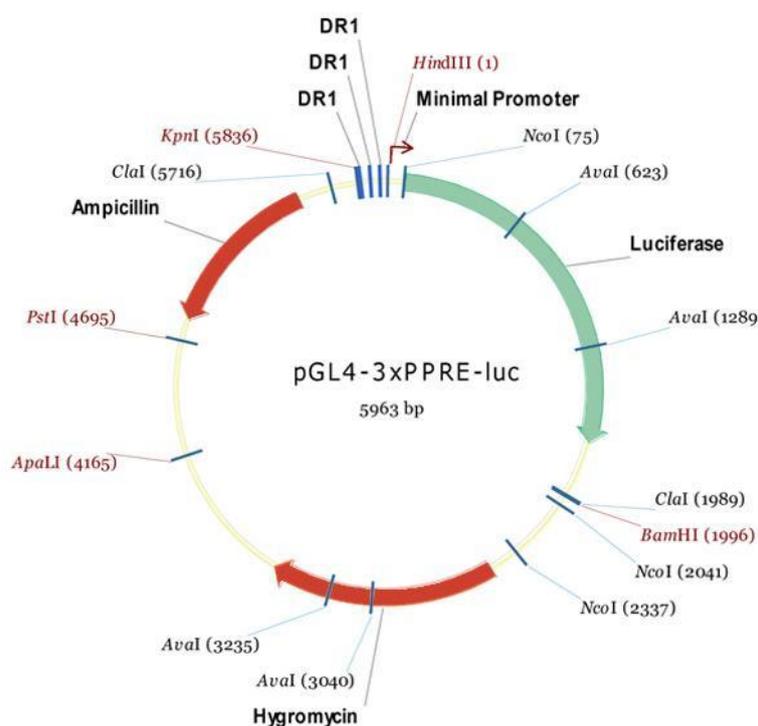
NHS durante la noche. Al día siguiente se lavó e incubó con un 1 mg de homogenato pre-clarificado de Caco-2 (sobrenadante de centrifugación a 10000 rpm, 10 min). Se realizaron lavados con TrisHCl pH 7.4 y se eluyeron aquellas proteínas unidas al anticuerpo (FABP2 y sus posibles proteínas interactuantes) con glicina a pH 2.5. Se colectaron las fracciones cercanas a pH 3, se neutralizaron con TrisHCl pH 8.5 y se concentraron en un filtro de corte 10 kDa (Millipore UFC901008). Se realizó un western blot donde se sembró el eluato concentrado y el homogenato de Caco-2 pre-clarificado que se sembró en la columna.

Western Blot

Para las diversas determinaciones realizadas por Western blot este fue llevado a cabo por transferencia de proteínas separadas por electroforesis SDS-PAGE a una membrana de PVDF. Bloqueo con PBS-Tween, 5% leche, lavados e incubación con anticuerpos primarios específicos: policlonal anti-FABP1 1/10000, policlonal anti-FABP2 1/5000, policlonal anti-PPAR γ 1/250 (SCBT), monoclonal anti-SCD1 1/250 (SCBT), monoclonal anti-ME1 1/1000, monoclonal anti-SREBP1 1/1000 (Abcam), monoclonal anti-SREBP2 1/1000 (Abcam), anti- β -actina 1/10000 (Sigma), anti-Vinculina 1/1000 (Sigma). Anticuerpos secundarios HRP: Anti-IgG ratón 1/5000 (Sigma), Anti-IgG conejo 1/5000 (Sigma). Se utilizó para el revelado un sustrato quimioluminiscente comercial (Supersignal West Pico, Thermo).

Ensayo reportero de luciferasa

Para este ensayo fueron utilizadas las líneas estables derivadas de Caco-2: Caco-2 con expresión disminuida de FABP1 (asFABP1) y como control la línea transfectada con un vector pcDNA3.1 vacío (descrito en la Tesis de la Dra. Luciana Rodriguez Sawicki <http://hdl.handle.net/10915/46728>). Se transfectaron estas dos líneas celulares con el plásmido pGL4-3xPPRE-Luc obsequio del Dr. Bennet que contiene 3 repeticiones del elemento de respuesta a PPAR ubicado río arriba de la secuencia del gen de acil coA-oxidasa. Debajo se puede ver en la Figura 8 un mapa del mismo.



5'_TCGTATGGTACCGTCGACAGGGGACCAGGACAAAGGTCA^{AGG}CGTTCGGGAGTCGACGTGACAGGG
 GACCAGGACAAAGGTCA^{AGG}CGTTCGGGAGTCGACGTGACAGGGGACCAGGACAAAGGTCA^{AGG}CGTTCGG
 GAGTCGACAAGCTTTTATTT_3'

Figura 8. Mapa del plásmido pGL4-3xPPRE-Luc obsequiado por el Dr. Bennet. El vector se basa en pGL4.26-luc (Promega), que contiene un promotor mínimo aguas arriba de luciferasa de luciérnaga. El constructo PPRE a continuación que contiene 3 secuencias PPRE DR1 (resaltadas en amarillo) se basó en la publicación de Forman, et al. (Cell 83: 803-812, 1995). Esas repeticiones de PPRE DR1 se encuentran flanqueadas por sitios de corte para KpnI (resaltado en azul) y HindIII (resaltado en verde). Se encuentran insertas río arriba del promotor mínimo que controla la expresión de la luciferasa. El plásmido confiere resistencia a Ampicilina en procariotas y para Higromicina en eucariotas.

Para normalizar la señal de luciferasa se co-transfectaron las células con el plásmido pTK-Renilla en una relación molar 10:1 (pGL4-3xPPRE-Luc:pTK-Renilla). Se sembraron 100000 células Caco-2 por pocillo en una placa de 24 pocillos. A las 24 horas se cambió el medio y a las 48 horas se transfectaron siguiendo las indicaciones para esta línea celular del manual de Lipofectamina LTX (Invitrogen). A las 6 horas se cambió el medio para remover la Lipofectamina y a las 24 horas post-transfección se agregó el medio correspondiente con Vehículo, Ácido Oleico, Pioglitazona, Rosiglitazona o Fenofibrato. Las células fueron incubadas con estos tratamientos por 24 horas. Luego se levantaron las células por tripsinización, se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS. Se resuspendieron en 50 uL de PBS y se colocaron en un pocillo de una placa de paredes laterales e inferiores blancas de

96-wells (Nunc MaxiSorp F). Se utilizó el kit de detección Dual Glo (Promega) ajustando los volúmenes de trabajo a 50 uL de cada reactivo colocando cada muestra en un pocillo de la placa de 96-wells. Se midió la señal de luminiscencia en un lector de placas DTX 800 (BD). Se realizaron los ensayos de toxicidad para probar que las concentraciones elegidas de DMSO y drogas probadas tuvieran al menos un 80% de viabilidad celular medido por cristal violeta, colorante cuya concentración se correlaciona con el número celular. Se muestra la citotoxicidad a diversas concentraciones en el Anexo 3.

Acoplamiento y electrostática *in silico* de interacciones proteína-proteína (colaboración Prof. Dr. Marcelo Costabel, Dr. Fernando Zamarreño, UNS)

Las estructuras tridimensionales de partida que fueron utilizadas son los archivos .pdb cuyos PDB ID se detallan a continuación, obtenidos del “Protein Data Bank” (rcsb.org):

holo-FABP1: 3skt

FABP2: 1kzw (apo-FABP2) y 2mo5 (holo-FABP2)

apo-LBD-PPAR γ : 2qmv

apo-Calreticulina: 3pow

apo-CKB: 3dre

El *docking* (acoplamiento) molecular es el modelado de la estructura del complejo (proteína-proteína, en este caso) basado en la estructura tridimensional conocida de sus constituyentes. El programa HADDOCK (High Ambiguity Driven biomolecular DOCKing) utilizado para calcular estos complejos, realiza 3 pasos sucesivos:

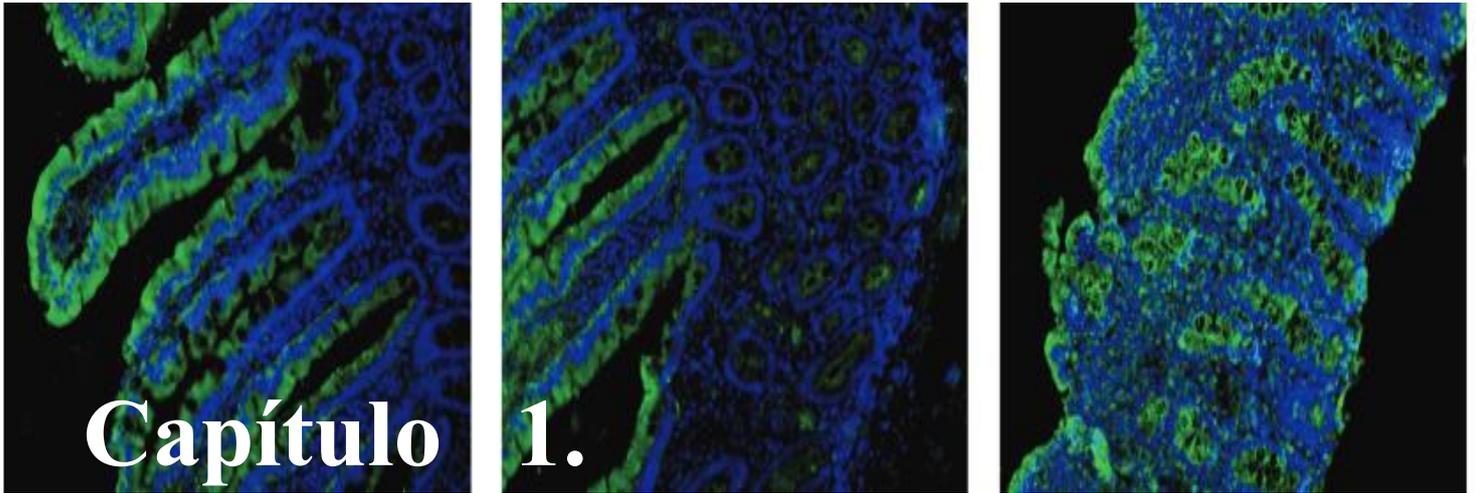
- Minimización de energía de cuerpo rígido.
- Refinamiento semiflexible en el espacio de ángulo de torsión.
- Refinamiento final en solvente explícito.

La flexibilidad le permite considerar ciertos movimientos conformacionales de las proteínas en el complejo. La selección de los modelos finales se basa en una suma ponderada de los términos de electrostática, desolvatación y energía de van der Waals, junto con la contribución energética de las restricciones utilizadas para impulsar el acoplamiento.

Electrostática de la interacción por APBS: Se generaron archivos .pqr de la proteína 1 en distintas posiciones con respecto a la proteína 2. Dichos archivos se utilizaron como entrada para el programa Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS). Se calcula la energía de los archivos .pqr de proteínas en las posiciones sugeridas por HADDOCK. Para cada posición, se calcula el valor de energía electrostática del sistema para cada proteína sola y el sistema formado por ambas. La diferencia entre la energía del sistema del conjunto menos la energía de los sistemas aislados cuando toma valores inferiores a cero, indican posiciones de baja energía y presuntamente favorables para la interacción (Zamarreño et al., 2012).

La covarianza evolutiva, obtenida por el programa ConSurf, no arrojó resultados significativos dado que las FABPs son muy conservadas evolutivamente y por lo tanto no se pudieron restringir posiciones altamente conservadas que pudieran sugerir residuos con alta probabilidad de interacción.

En todos los casos se muestran los resultados con los mejores *scores*.



Estudio de la expresión de FABPs en Enfermedad Celíaca.

Se evaluó la concentración sérica de FABP2 como indicador del daño intestinal y su utilidad como biomarcador de EC. Para esto, se determinaron cuáles son los niveles en suero de FABP2 en una población local de pacientes celíacos al momento del diagnóstico y bajo dieta libre de gluten vs. grupos control. Posteriormente, se analizó la localización de FABPs en el intestino delgado por inmunofluorescencia en biopsias duodenales para confirmar lo descrito en la literatura acerca de su distribución y para determinar la presencia de un patrón de localización alterado en EC. Se realizaron mediciones de los niveles de expresión del ARNm de FABPs en biopsias intestinales con el fin de detectar diferencias entre pacientes celíacos vs. controles.

Liberación de FABPs ante daño del tejido

Al evaluar a las FABPs como marcador clínico de lesión tisular, debemos tener en cuenta que, después del daño celular, las proteínas pequeñas, como las FABPs, difunden más rápidamente que las proteínas grandes a través del espacio intersticial pasando por las hendiduras endoteliales al espacio vascular. Diversos trabajos han vinculado a la liberación de FABPs como posibles biomarcadores de patologías presentes en el tejido donde son expresadas (Pelsers et al., 2005).

Debido al daño de los enterocitos que se produce en la enteropatía por EC, FABP1 y FABP2 se liberan en la sangre periférica. Como consecuencia, los niveles de FABP1 y FABP2 se encontraron significativamente elevados en la circulación en pacientes con EC no tratados en comparación con los controles no celíacos (Adriaanse et al., 2013; Derikx et al., 2009; Not et al., 2011; Vreugdenhil et al., 2011).

Incremento en los niveles de FABP2 en suero de pacientes con EC

Debido a esto decidimos analizar como punto de partida los niveles en suero de FABP2 en una población local. La concentración de FABP2 en muestras de suero fue determinada por un *kit* cuantitativo comercial de ELISA. Pacientes con Enfermedad Celíaca (EC) no tratados presentaron niveles significativamente más altos de FABP2 en suero en comparación con pacientes celíacos en dieta libre de gluten, controles no-celíacos, o pacientes con otras enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Dado que no había diferencias entre las muestras de las poblaciones pediátricas y adultas, los resultados obtenidos de ambas poblaciones fueron representados juntos. No se encontraron diferencias entre los controles no celíacos, pacientes en tratamiento y pacientes con EII (Figura 9).

La evaluación de la concentración de FABP2 en muestras séricas mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con EC al momento del diagnóstico (valor medio 2898,89 pg/mL, rango 616,83 – 7295,95 pg/mL), controles no celíacos (valor medio 1356,49 pg/mL, rango 256.51 – 3433.33 pg/mL), pacientes con EC en dieta libre de gluten (media valor 1766,84 pg/mL, rango 391.42 – 3955.88 pg/mL), y pacientes con EII (valor medio 744,92 pg/mL, rango 165,89 – 1558,2 pg/mL).

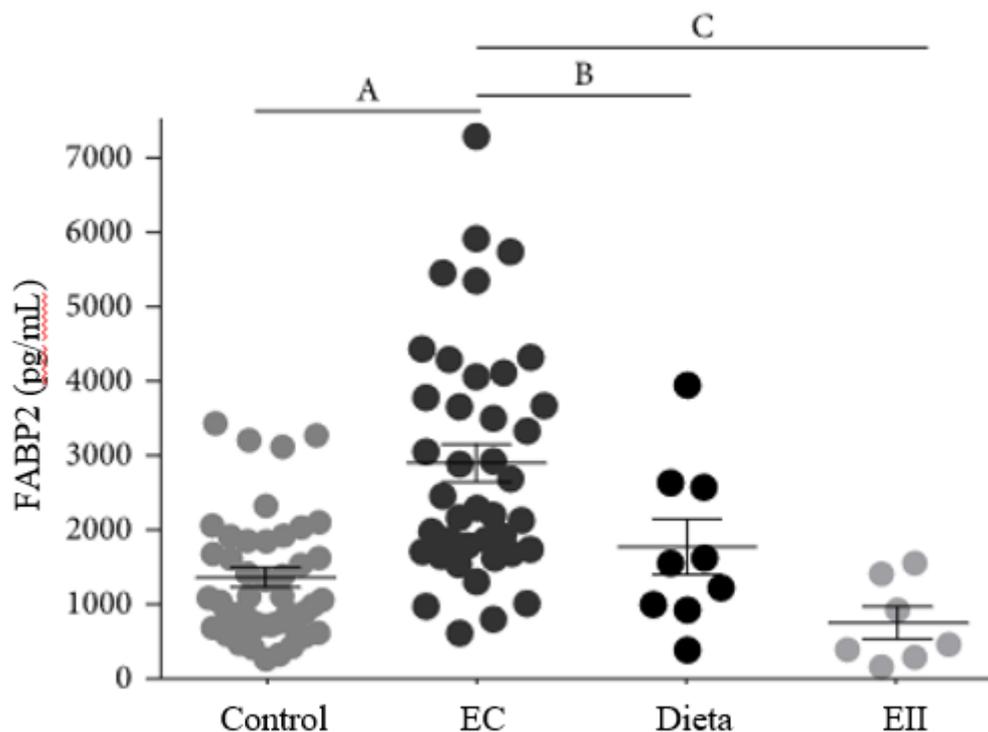


Figura 9. Análisis de los niveles de FABP2 en suero de pacientes pediátricos y adultos. Control: personas sanas, EC: pacientes con Enfermedad celíaca al momento del diagnóstico, Dieta: pacientes con EC en dieta libre de gluten (GFD), EII: pacientes con Enfermedades Inflammatorias Intestinales (Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa). Media \pm desviación estándar. Análisis estadístico utilizado Mann-Whitney test. (A) $p < 0.0001$; (B) $p < 0.0002$; (C) $p < 0.0264$.

Debido a que FABP1 también se expresa en otros tejidos como el hígado y el riñón, se decidió estudiar sólo la presencia de FABP2 en suero. No se podría descartar la concomitancia de un origen intestinal de la proteína con la liberación desde otros tejidos por co-ocurrencia de diversas patologías no asociadas. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de FABP1 en suero en el diagnóstico temprano de la nefropatía diabética (Kamijo-Ikemori et al., 2013; Nielsen et al., 2010), la predicción del establecimiento de insuficiencia renal aguda (IRA) (Siew et al., 2013), monitoreo y análisis del efecto de su tratamiento (Nielsen et al., 2012), y como predictor temprano del establecimiento de IRA post cirugía cardiovascular (Katagiri et al., 2012).

Los niveles séricos de FABP2 pueden servir para discriminar a los pacientes con EC de los controles no celíacos según lo descrito en literatura (Adriaanse et al., 2013; Derikx et al., 2009; Not et al., 2011; Vreugdenhil et al., 2011).

Niveles similares de FABP2 sérica fueron observados en pacientes en tratamiento y controles, sugiriendo que FABP2 puede también ser un biomarcador para el seguimiento de la respuesta al

tratamiento. Notablemente, la concentración de FABP2 en muestras de suero de pacientes con EII fue similar a los valores observados en los controles no celíacos. Estos resultados sugieren que el aumento de la concentración de FABP2 en el suero es un marcador específico de EC debido a su expresión limitada al intestino delgado proximal donde se observa el daño.

Alteración en el patrón de expresión de FABPs en Enfermedad Celíaca.

Dado que no se encontraron estudios que muestren la localización de las FABPs en intestino, nos interesó determinar el patrón de expresión de FABP1 y FABP2 en duodeno humano. Estos estudios se realizaron por microscopía de inmunofluorescencia. Por esto, se generaron anticuerpos policlonales de conejo inoculando proteínas de rata recombinantes (FABP1 o FABP2). Se realizó un western blot que mostró que cada uno de los anticuerpos policlonales producidos en nuestro laboratorio reacciona específicamente con la proteína utilizada como antígeno. Dado que no se observó reactividad cruzada entre ellos (Figura 10), estos anticuerpos son de utilidad para detectar en forma diferencial FABP1 y FABP2. Esta reactividad contra las FABPs humanas se obtuvo dada la elevada identidad de secuencia con las FABPs de rata usadas como inmunógeno: 83% para FABP1 y 82% para FABP2.

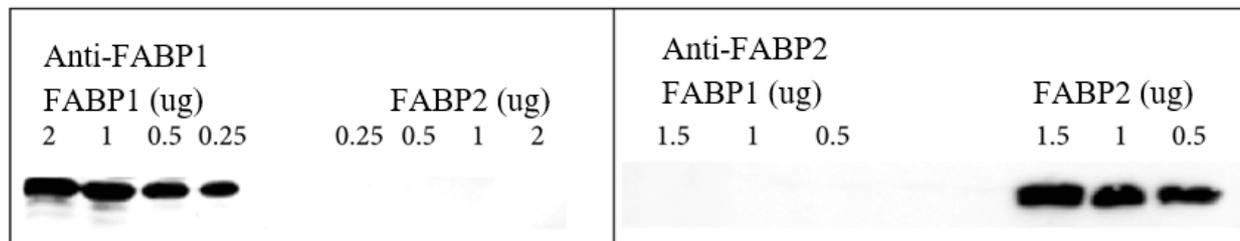


Figura 10. Evaluación de la reactividad de anticuerpos policlonales de conejo anti-FABP 1 y anti FABP2. Western blot utilizando FABP1 o FABP2 recombinante purificada.

Habiendo demostrado por Western blot la reactividad diferencial de cada anticuerpo policlonal, evaluamos la reactividad de los sueros de conejo frente a cortes de tejido duodenal de biopsias. Para esto, en secciones duodenales de pacientes con enteropatía y controles sanos se analizó la reactividad de suero de conejos no inmunizados (Figura 11).

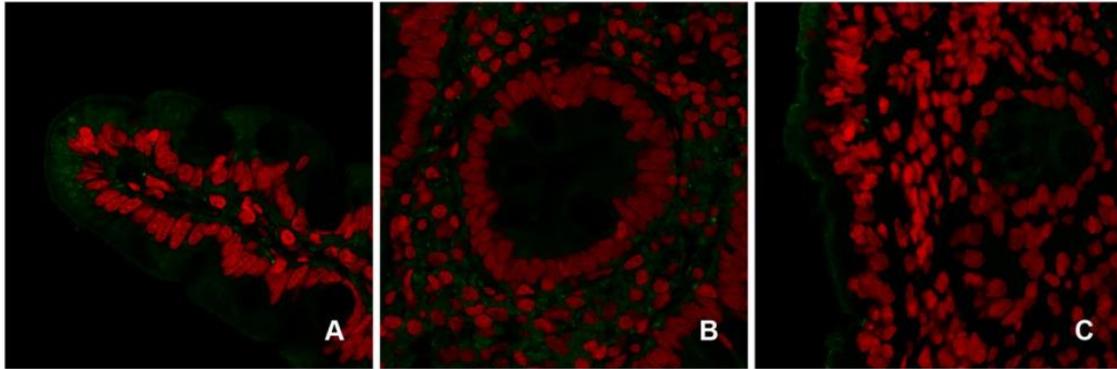


Figura 11. Control de isotipo para los experimentos de inmunofluorescencia. (a) vellosidad en tejido normal, (b) cripta / *lamina propria* en tejido normal y (c) EC.

La expresión de FABP1 se analizó en secciones de biopsias duodenales de población control y pacientes con EC al diagnóstico empleando los anticuerpos específicos anti-FABP1 y anti-FABP2. El análisis por inmunofluorescencia indirecta demostró que, en tejido sano, FABP1 se expresa abundantemente en enterocitos de las vellosidades, pero no en epitelio de las criptas (Figuras 12 (a) y 12 (b)). En muestras duodenales de pacientes celíacos, FABP1 se observó en enterocitos y notablemente también en las criptas (Figura 12 (c)). La expresión de FABP1 fue más intensa en las criptas más cercanas al epitelio desvaneciéndose hacia la muscular de la mucosa. Hallazgos similares fueron observados por microscopía confocal (Figuras 12 (d) y 12 (e)). Se observó que los enterocitos diferenciados muestran una distribución citoplásmica homogénea FABP1 en el epitelio de los tejidos tanto de controles no celíacos como pacientes con EC. En enteropatías severas, FABP1 también se observó en las criptas más cercanas al epitelio (Figuras 12 (c) y 12 (f)).

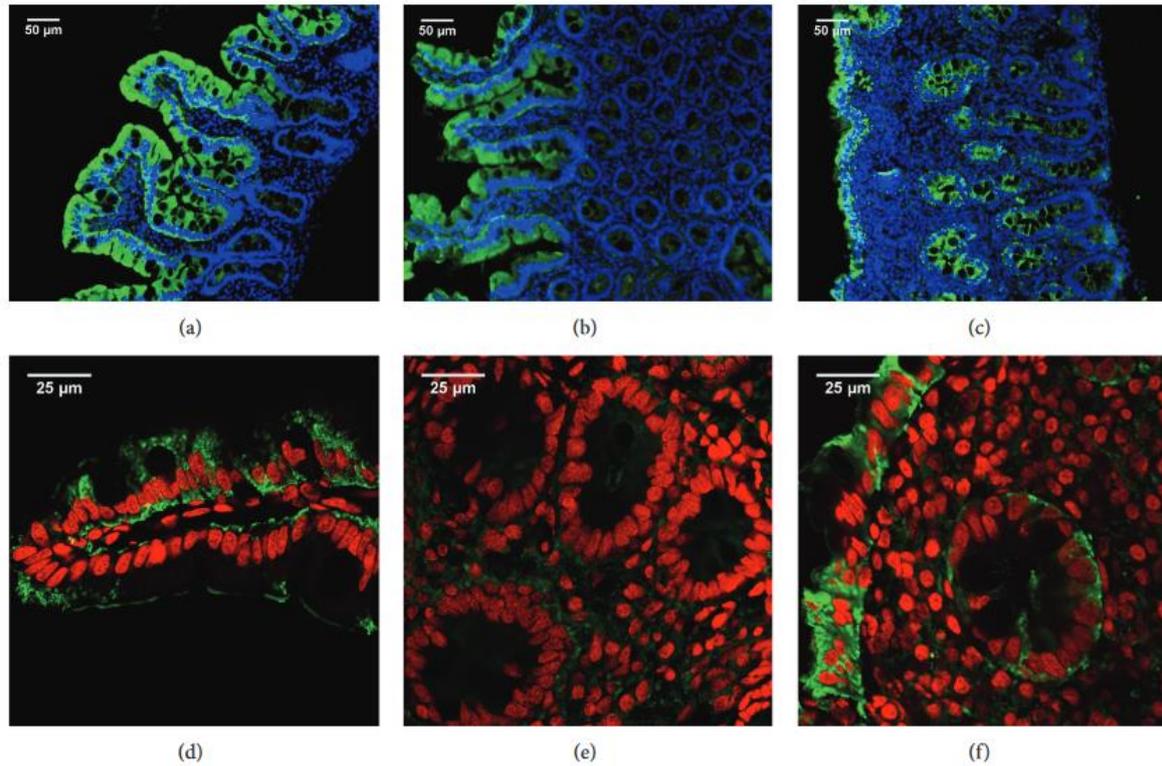


Figura 12. Expresión de FABP1 en intestino delgado humano. Panel superior: inmunofluorescencia indirecta observada en microscopio de epifluorescencia. Panel inferior: observada por microscopía confocal. FABP1 en verde, núcleos arriba en azul, abajo en rojo. Imágenes (a), (b), (d) y (e), corresponden a tejido sano. Imágenes (c) y (f) corresponden a tejido de pacientes con EC al momento del diagnóstico.

El análisis de la expresión FABP2 por inmunofluorescencia indirecta mostró una marca brillante en enterocitos, pero también una tinción tenue en algunas criptas intestinales de los controles no celíacos (Figuras 13 (a) y 13 (b)). En pacientes con EC al diagnóstico, se vio que los enterocitos, el epitelio remanente y las criptas se tiñeron fuertemente (Figura 13 (c)). El análisis por microscopía confocal mostró una expresión homogénea para FABP2 en los enterocitos de intestino delgado sano (Figuras 13 (d) y 13 (e)). La expresión FABP2 fue confirmada también por esta microscopía en enterocitos del epitelio dañado, así como en las criptas de estos pacientes (Figura 13 (f)).

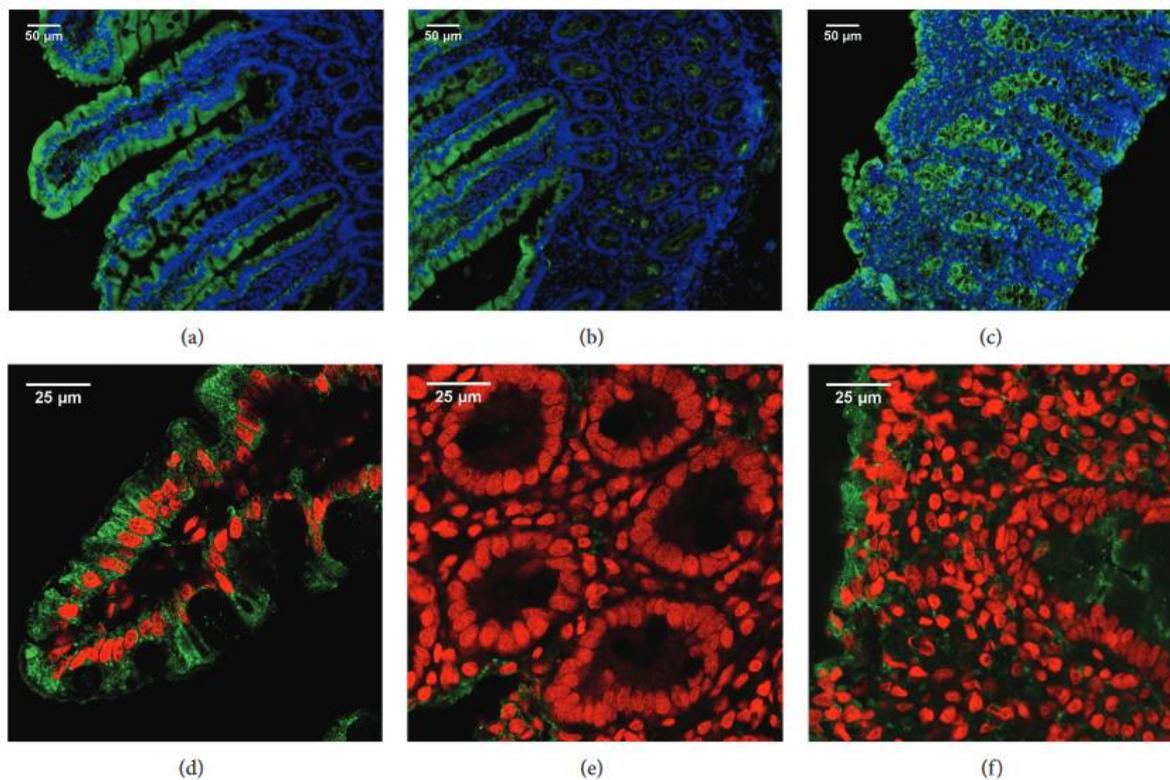


Figura 13. Expresión de FABP2 en intestino delgado humano. Panel superior inmunofluorescencia indirecta observada en microscopio de epifluorescencia. Panel inferior: observada por microscopía confocal. FABP2 en verde, núcleos arriba en azul, abajo en rojo. Imágenes (a), (b), (d) y (e), corresponden a tejido sano. Imágenes (c) y (f) corresponden a tejido de pacientes con EC al momento del diagnóstico.

Modificación de los niveles de transcripción de FABP1 y FABP2 en EC

Dado los cambios observados en la expresión de FABPs por inmunofluorescencia, decidimos evaluar si existían cambios en los niveles de ARNm. Para esto se evaluaron los niveles de ARNm de FABP1 y FABP2 en tejido duodenal por PCR cuantitativa (qPCR) usando beta actina como gen *housekeeping*. En controles no celíacos, se observaron niveles mayores de ambas FABPs en la población adulta comparado con la población pediátrica (Figura 14).

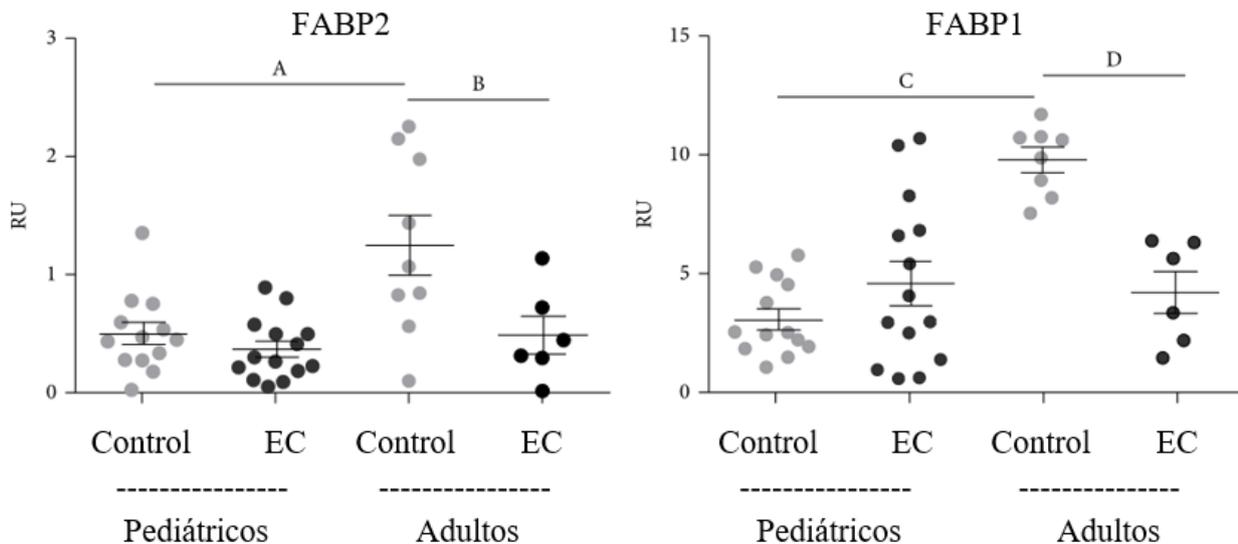


Figura 14. Nivel de ARNm de FABP1 y FABP2 en biopsias duodenales evaluado mediante qPCR utilizando β -actina como gen housekeeping. Media \pm desviación estándar. Análisis estadístico utilizado Mann-Whitney test. (A) $p=0.0047$; (B) $p=0.0423$; (C, D) $p<0.0001$.

Los niveles de ARNm de FABP1 fueron mayores que los de FABP2. Sorprendentemente, en la población de adultos la expresión de FABP1 y FABP2 fue menor en pacientes con EC en comparación con controles no celíacos. Esta diferencia no se observó en la población pediátrica. El patrón de expresión de FABPs, observado previamente por estudios de inmunofluorescencia, sugiere una síntesis intensa en enterocitos completamente diferenciados situados en las vellosidades. En la enteropatía severa, estas FABPs también se expresan en los enterocitos de la cripta. Sin embargo, se observa una reducción en los niveles de ARNm de ambas FABPs en los tejidos de pacientes con EC. El intestino delgado en pacientes con EC no tratados muestra cambios histológicos relevantes, particularmente pérdida de epitelio y la ampliación de la *lámina propia*. Estos cambios se traducen en una reducción en la relación entre el número de células epiteliales versus células de la *lámina propia*. Para estimar esta variación, centramos nuestra atención en la expresión en enterocitos diferenciados de las vellosidades. Es por esto que consideramos que la utilización de villina como gen *housekeeping* permite una mejor evaluación de cambios en los niveles de ARNm de las proteínas específicamente expresadas en los enterocitos (Robine et al., 1985). Como se esperaba, el daño histológico severo se observó acompañado de cambios en los niveles de ARNm de villina comparados con beta-actina. Los niveles de ARNm de villina se observaron reducidos en enteropatía severa en comparación con el tejido sano (Figura 15 (a)).

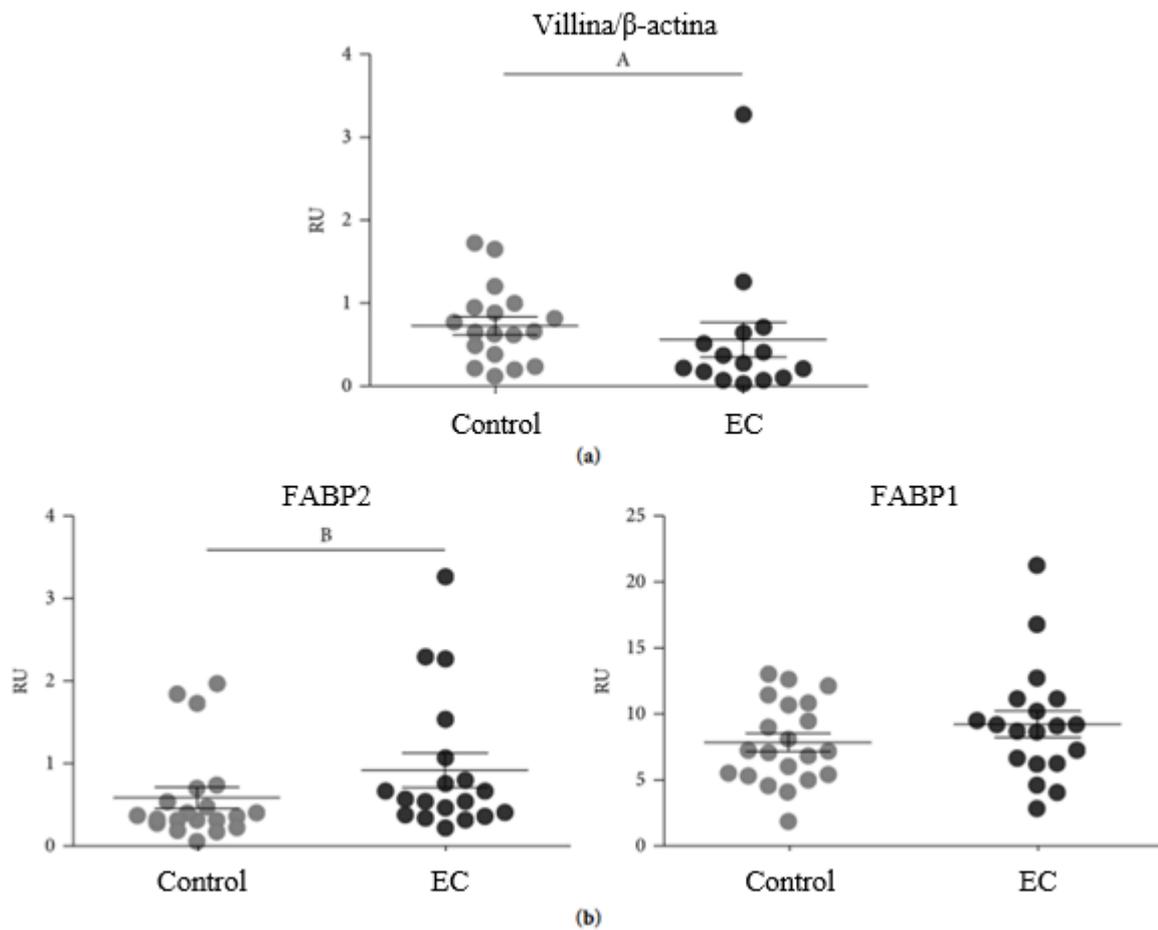


Figura 15. (a) Nivel de ARNm de Villina vs. β -actina como gen housekeeping. (b) Nivel de ARNm de FABP1 y FABP2 en biopsias duodenales evaluado mediante qPCR utilizando villina como gen de normalización. Los pacientes pediátricos y adultos se agruparon dado que no había diferencias de distribución entre las poblaciones. Control: pacientes sanos. EC: pacientes con Enfermedad Celíaca al momento del diagnóstico. Media \pm desviación estándar. Análisis estadístico utilizado Mann-Whitney test. (A) $p = 0.0374$; (B) $p = 0.0294$.

Por lo tanto, decidimos usar villina como *gen housekeeping* para reevaluar los cambios en la expresión de FABPs en muestras duodenales. Encontramos que los niveles de ARNm de ambos FABPs eran más altos en muestras con enteropatía severa comparado con el tejido sano, aunque sólo se observó una diferencia significativa para FABP2. Globalmente, los niveles de ARNm de FABP1 fueron más altos que los de FABP2 como describimos anteriormente (Figura 15 (b)). En conjunto, estos resultados indican que en EC la expresión de las FABPs se ve aumentada dentro de los enterocitos (significativamente para FABP2) aunque sus niveles de ARNm son más bajos cuando se evalúa toda la muestra intestinal debido a la reducción de la relación enterocitos a células de la *lamina propria*.

Discusión
del Capítulo 1.
FABPs en Enfermedad Celíaca

En enfermedad celíaca, los hallazgos histológicos abarcan desde un aumento de los linfocitos intraepiteliales y una reducción en la relación entre la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta, hasta una atrofia vellositaria total. Aún se desconoce en detalle el mecanismo de daño a la mucosa (Meresse et al., 2012; Sollid & Jabri, 2013).

El diagnóstico definitivo se establece mediante la evaluación clínica, serológica y histológica de piezas duodenales obtenidas por endoscopia. Sin embargo, la discordancia entre la serología y la histología puede llevar a errores en el diagnóstico (Abrams, Diamond, Rotterdam, & Green, 2004; Barada et al., 2014). También, se refieren hallazgos inespecíficos asociados a cambios menores en la histología. Esto lleva a que un gran número de casos en gastroenterología que a pesar de iniciar un protocolo diagnóstico no llegan finalmente a un criterio definitivo sobre su condición clínica (Kelly, Bai, Liu, & Leffler, 2015; Mohamed et al., 2008; Rostom, Murray, & Kagnoff, 2006).

Como ensayo complementario al diagnóstico se utiliza la genotipificación de HLA para detectar la presencia de los alelos de susceptibilidad HLA clase II (HLA-DQ2/DQ8). Esta determinación posee un alto valor predictivo negativo y es útil como criterio de exclusión. Sin embargo, el alto costo de la técnica reduce su uso en la práctica clínica rutinaria. Para evaluar la integridad de la mucosa se han utilizado marcadores de permeabilidad intestinal (Bjarnason et al., 1994; Cox, Lewis, & Oper, 1999). Sin embargo, estas pruebas son inespecíficas ya que existen diversas condiciones que pueden alterar la permeabilidad intestinal. Se necesitan nuevos ensayos que permitan la identificación de alteraciones de la permeabilidad en la mucosa intestinal (Sabatino, Lenti, & Corazza, 2014).

Por lo tanto, la evaluación no invasiva de biomarcadores que detecten específicamente EC constituye un objetivo esencial con la finalidad de detectar la EC, complementar la información cuando el diagnóstico es controversial y establecer el tratamiento. Estudios recientes han propuesto a CXCL10 y Reg3 α como marcadores en sangre periférica que se vinculan con actividad inflamatoria en la mucosa de intestino delgado y que los hacen potenciales candidatos como biomarcadores de EC (Bondar et al., 2014; Marafini et al., 2014).

Como se ha descrito anteriormente, las FABPs se encuentran asociadas a la unión y vehiculización de AG de cadena larga absorbidos desde el lumen intestinal hacia distintos destinos celulares que abarcan desde la β -oxidación mitocondrial, síntesis de quilomicrones, regulación de la expresión génica en el núcleo, entre otros (Gajda AM, 2015). De estas posibles funciones, se deriva que las FABPs puedan desempeñar roles importantes en desórdenes malabsortivos como EC.

La medición en suero de proteínas expresadas en el citosol de los enterocitos (FABP1 y FABP2) ha demostrado ser útil para estimar el daño celular (Pelsers et al., 2005). FABP2 ha sido propuesto como marcador de diferenciación para indicar la maduración intestinal en neonatos prematuros (Reisinger et al., 2014).

El recambio de enterocitos ocurre fundamentalmente en la punta de la vellosidad. Es así que en patologías como en EC, en la que ocurre un aumento de la tasa de muerte de enterocitos, los niveles elevados de FABP2 en suero pueden correlacionar con una mayor tasa de destrucción celular.

Vreugdenhil et al. (Vreugdenhil et al., 2011) propusieron que los niveles aumentados de FABP2 presente en el suero podrían constituir un marcador temprano del daño de los enterocitos, y que podría tener utilidad para la detección de EC. Como mencionábamos antes, los enterocitos presentes en las vellosidades también expresan FABP1, pero esta proteína se encuentra presente en otros tejidos, pudiendo indicar daño en otras patologías (Cakir, Toker, Ataseven, Demir, & Polat, 2017; Koçak, Akbal, Köklü, & Adam, 2015; Naruse et al., 2018). Por lo cual FABP2 constituye un marcador específico de daño en el tejido intestinal (Derikx et al., 2009).

Se ha observado que la concentración de FABP2 en muestras de suero de pacientes con EC correlaciona tanto con los niveles de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa 2 como con la gravedad de la atrofia vellositaria al momento del diagnóstico (Adriaanse et al., 2013; Not et al., 2011; Vreugdenhil et al., 2011). Además, la determinación de FABP2 puede constituir una ventaja por sobre la medición de anti-TG2, dado que la vida media de FABP2 es menor y puede reflejar cambios rápidos a nivel de la mucosa intestinal. Los niveles de FABP2 disminuyen hasta su normalización en pacientes con EC luego del tratamiento por un año con la dieta libre de gluten (GFD, por sus siglas en inglés), independientemente de los niveles iniciales de anticuerpos y FABP2. Sin embargo, todos los estudios mencionados previamente reportaron el uso de valores de corte distintos para los niveles plasmáticos de FABP2. Por lo tanto, con la finalidad de usar en la clínica la determinación sérica de FABP2, se requieren estudios que involucren un gran número de pacientes y procedimientos validados.

De manera similar a lo reportado, en este trabajo observamos mayores concentraciones de FABP2 en sueros de pacientes con EC al momento del diagnóstico comparado con muestras de pacientes en GFD o controles sanos. Por lo tanto, el análisis de una población local replicó reportes previos y demostró que la concentración de FABP2 en suero puede ser utilizada como una determinación no invasiva que ayude al diagnóstico y permita el seguimiento del tratamiento (GFD). Nuestro ensayo permitió, a su vez, identificar un aumento significativo en los niveles de FABP2 en la población de pacientes con EC comparado con pacientes con otras EII, mostrando la potencialidad de usar la determinación en suero

de FABP2 para discriminar entre EC y otras EII. Con esta finalidad, es necesario evaluar un número mayor de casos.

También, se ha sugerido la utilización de FABP2 circulante como marcador específico de daño en los enterocitos del intestino delgado en casos de colitis ulcerosa con presencia de ileitis, un proceso inflamatorio extendido en el intestino delgado distal (Wiercinska-drapalo, Jaroszewicz, Siwak, Pogorzelska, & Prokopowicz, 2008). Además, se ha propuesto el análisis de los niveles urinarios de FABP2 como marcador predictivo de la colitis necrotizante. La detección en orina de FABP2 puede ser útil en el diagnóstico de esta enfermedad ya que anticipa una progresión rápida de la patología (Gregory et al., 2014). Se ha propuesto la determinación sérica de FABP2 como marcador temprano de esta misma patología en neonatos prematuros (Abdel-haie, Behiry, Abd, Ahmad, & Assar, 2017).

En concordancia con reportes previos (Levy et al., 2009), al evaluar la expresión de las FABPs en el tejido, nosotros observamos que tanto FABP1 como FABP2 se encuentran expresadas en los enterocitos presentes en el intestino delgado de individuos sanos. Sin embargo, detectamos ciertas diferencias en el patrón de expresión. Mientras que en el trabajo de Levy et al. describen expresión de FABP1 y FABP2 en las criptas del yeyuno, el presente trabajo no muestra presencia de FABP1 en esa localización del duodeno y una muy leve expresión en el caso de FABP2. Esto puede deberse a diferencias en la técnica de inmunofluorescencia utilizada, la calidad de las imágenes obtenidas y al segmento de intestino analizado en cada trabajo.

Por primera vez, en presencia de enteropatía severa, detectamos un cambio importante en el patrón de expresión de ambas FABPs. De forma remarcable, detectamos una expresión intensa en las criptas, ausente en epitelio sano. En el caso de FABP1, las criptas más cercanas al epitelio remanente fueron las que revelaron mayor intensidad de expresión. Mientras que FABP2 mostró una expresión intensa en todo el epitelio en células pertenecientes a las criptas hipertróficas. Este es un hallazgo característico de tejidos que muestran una enteropatía severa en pacientes con EC al momento del diagnóstico. El aumento en la expresión de FABPs en enterocitos presumiblemente más inmaduros de la cripta, puede reflejar una aceleración en el desarrollo de estas células o una desdiferenciación de enterocitos *en tránsito*, descritos anteriormente (Tetteh et al., 2016).

Luego evaluamos los niveles de expresión de ARNm de FABP1 y FABP2 en el intestino delgado de pacientes, usando β -actina como gen de normalización. En muestras de pacientes adultos control, se encontró una mayor expresión de ambas FABPs que en muestras pediátricas control (Figura 14). Levy et al. (2009) habían estudiado la expresión de ambas FABPs por western blot, sin encontrar diferencias

en el nivel de proteínas entre muestras de yeyuno de niños y adultos. Sin embargo, en ese estudio, no se realizó un análisis cuantitativo.

De manera sorprendente, el análisis de muestras de pacientes adultos con EC al momento del diagnóstico, mostró una reducción significativa en los niveles de ARNm de FABP1 y FABP2 comparado con muestras de pacientes sanos. Por otro lado, las muestras de pacientes pediátricos no mostraron diferencias para ninguna de las proteínas estudiadas entre muestras de tejido sano y enfermo (Figura 14).

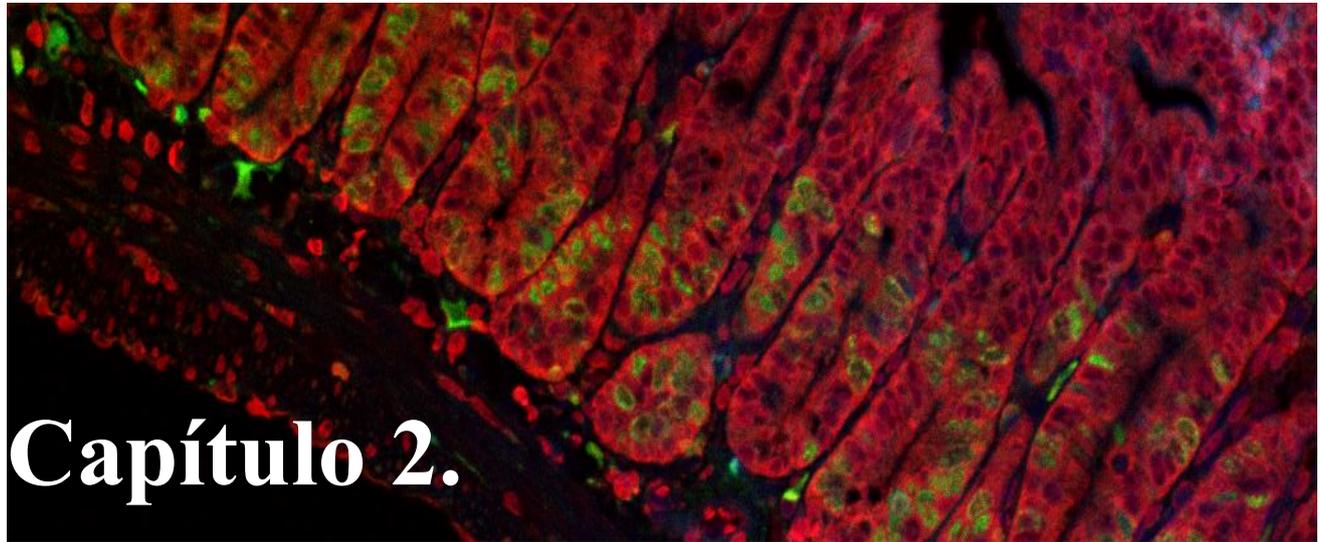
Los resultados de qPCR mostrados en este trabajo son expresados como una relación entre el transcrito de interés y el gen de normalización. Entonces, la reducción de los niveles de ARNm de FABP1 y FABP2 observada en los pacientes adultos con EC es potencialmente debida a los cambios histológicos presentes en el intestino con EC. El tejido sano contiene una gran superficie de células epiteliales con una *lamina propria* limitada. Mientras que, en la enteropatía severa es lo opuesto, una superficie epitelial reducida y una *lamina propria* engrosada.

Consecuentemente, nos propusimos evaluar si los cambios observados en los niveles de ARNm se debían a estos cambios histológicos utilizando villina como gen de normalización. La especificidad de villina en el enterocito es tal, que su promotor ha sido utilizado para lograr la expresión transgénica de diversas proteínas limitadas al enterocito (Madison et al., 2002). La pérdida de epitelio en las muestras duodenales de pacientes con EC está acompañada de una reducción relativa en la expresión de villina. Al analizar los niveles de expresión de FABP1 y FABP2 referidos a villina, observamos un aumento en los niveles de ambas FABPs en pacientes con EC comparado a controles sanos (siendo estadísticamente significativo sólo para FABP2) (Figura 15 (b)). Esto sugiere una regulación positiva de la expresión de FABPs en los enterocitos, como ha sido descrito para FABP1 en el daño por isquemia renal (Yamamoto, Noiri, Ono, Doi, & Negishi, 2007). Aunque los niveles de ARNm de FABPs mostraron un aumento en enterocitos (referido a villina), considerando el tejido completo, disminuyó (referido a β -actina). En concordancia con estos resultados, en ensayos de proteómica cuantitativa, ha sido reportado que los niveles de FABP1 y FABP2 están disminuidos en intestino de pacientes con EC comparado a controles, relativo a vinculina (Simula et al., 2010).

Considerando los múltiples roles biológicos que desempeñan las FABPs en la mucosa intestinal, la disminución de la expresión de estas proteínas puede tener efectos patológicos. Uno de esos posibles mecanismos sería a través de la vía de PPARs. El cual, como se describió anteriormente, es un factor de transcripción activado por ligandos lipídicos. A través de la regulación génica, este logra jugar múltiples roles en el metabolismo, la respuesta inmune, la proliferación y diferenciación celular

(Ahmadian et al., 2013). Particularmente, PPAR γ desempeña funciones biológicas relevantes en la mucosa intestinal, donde también contribuye a efectos anti-inflamatorios y regulatorios (Mohapatra et al., 2010). En un modelo de hepatocitos, se ha descrito la co-localización en el núcleo y la interacción proteína-proteína de FABP1 con PPAR α y PPAR γ , mediando su activación (Hostetler et al., 2009; C Wolfrum, Borrmann, Borchers, & Spener, 2001).

Tomando esto en consideración, podríamos hipotetizar que FABP1 y FABP2 modulan las funciones de PPARs en los enterocitos. Y que, por lo tanto, cambios en la expresión de FABPs pueden afectar la activación de PPARs y viceversa, cambios en la activación de las diversas isoformas de PPARs modulan la expresión de las FABPs (como se describió en la regulación de la expresión génica de FABPs en la sección Introducción). Esta hipótesis es concordante con nuestros resultados de interacción proteína-proteína que se discuten debajo. De forma interesante, en pacientes con EC no sólo se vió una disminución del nivel de expresión de FABPs sino que también ha sido reportada una disminución en los niveles de PPARs y otros genes regulados por éste en los enterocitos de los pacientes (Simula et al., 2010). Esto podría explicar algunas de las alteraciones de las vías de señalización observadas en EC. Teniendo en consideración las diferencias detectadas en los ratones ko para FABPs intestinales en cuanto al metabolismo lipídico (Gajda et al., 2013), es posible especular que haya también cambios en el metabolismo lipídico en esta patología.



Capítulo 2.

Análisis de la expresión de FABPs de enterocito en modelos murinos: modelo con alteración funcional de la mucosa intestinal y modelos específicos de FABP1 y FABP2 *knock out*

Los ensayos llevados a cabo en el Capítulo 1 fueron complementados con análisis de la expresión de FABPs en modelos de ratones *knock out* para FABP1 o FABP2 y con eliminación de la expresión de Rac-1, con alteraciones funcionales de la mucosa similares a EC.

Estudio de las FABPs en intestino delgado en un modelo murino con delección de Rac1

Se encontró que el animal con eliminación inducida de la expresión de Rac-1 podría proveer un modelo con alteraciones histológicas semejantes a EC (Myant, Cammareri, et al., 2013). Rac-1 es una proteína clave en la proliferación y migración celular; activación del factor nuclear NF- κ B y β -catenina; y la polimerización de los filamentos de actina (Hodge & Ridley, 2016). En otros modelos celulares ha sido descrito la interacción entre transglutaminasa 2 (TG2), (la presencia de su auto-anticuerpo es selectiva de EC) y Rac-1, indicando que la misma sería responsable del aumento de especies reactivas del oxígeno, inducción de ciclooxigenasa 2 (COX-2) y generación de prostaglandina E2 (PGE-2) (Kim et al., 2010). Además, se ha descrito que TG2 regula los niveles de Rac-1 activo y la reorganización del citoesqueleto a través de la inhibición directa de Bcr (una proteína encargada de inactivar Rac-1) (Yi et al., 2009).

La delección de Rac1 inhibe la hiperproliferación y expansión de criptas luego de la pérdida de Apc (supresor tumoral). Rac1 es una GTPasa clave en proliferación celular, apoptosis, migración e invasión. El laboratorio del Dr. Sansom desarrolló este modelo Rac1 flox Vil-cre donde se induce la eliminación tejido específica de Rac1 por inyección con tamoxifeno, el cual provoca la pérdida del gen Rac1 en enterocitos por recombinación.

Aunque este modelo se había usado con el objetivo de realizar estudios en cáncer de colon, no se había analizado la histología de intestino delgado. Las primeras observaciones mostraron alteraciones de la histología intestinal con semejanzas a las encontradas en la enteropatía en EC (Figura 16). Por lo tanto, decidimos utilizar este modelo animal para estudiar la localización de FABPs en un contexto intestinal alterado. Se analizaron ratones al día 5 y 6 post delección dado que son los que presentaban mayor daño (Figura 16 (b)), comparado al ratón WT (Figura 16 (a)), sin llegar al compromiso tisular y sistémico alcanzado en días posteriores.

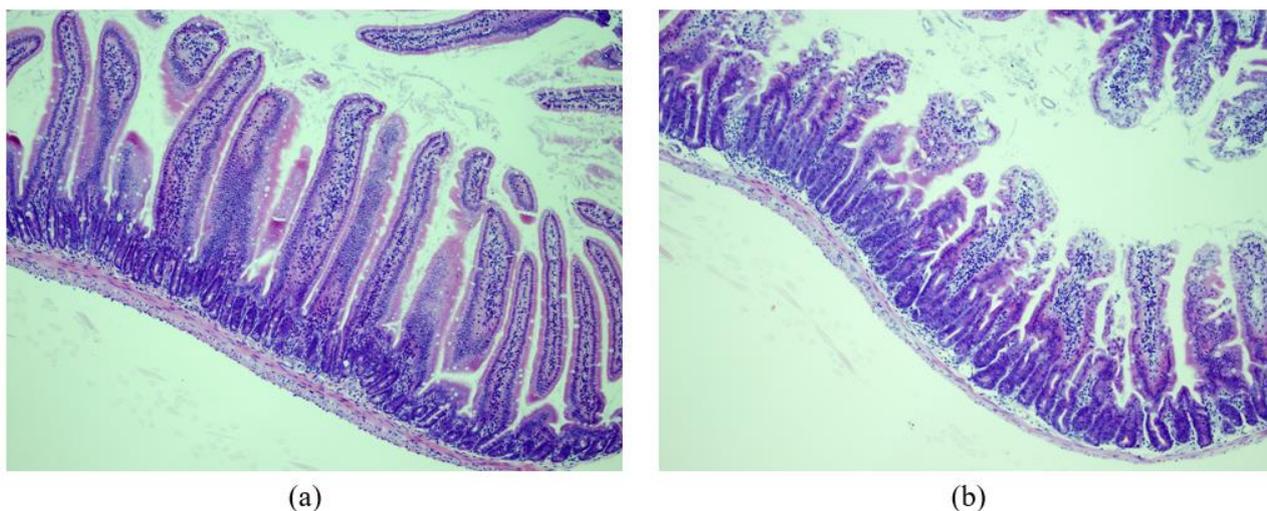


Figura 16. Análisis de la histología de ratones sin Rac-1 por Hematoxilina & Eosina de cortes histológicos de intestino delgado de ratón (a) WT: cepa salvaje, (b) al día 5 o 6 posterior a la eliminación de Rac1.

Alteración en el patrón de localización y expresión de FABPs

Para la evaluación de la expresión de FABPs se tomaron cortes de intestino delgado de ratón WT y ratones al día 5 y día 6 post-delección de Rac1. Se realizaron inmunofluorescencias utilizando los mismos anticuerpos policlonales anti-FABPs previamente caracterizados. Se analizaron las imágenes obtenidas en un microscopio confocal de fluorescencia (Figuras 17 y 18). En ratones WT se observó que tanto FABP1 como FABP2 se ubican en los enterocitos de las vellosidades, sin expresión en las células epiteliales de las criptas (Figuras 17 (a) y 18 (a), respectivamente). Mientras que los ratones al día 5 y 6 post-delección de Rac1 presentan expresión en el epitelio remanente y expresión en la parte superior de las criptas para FABP1 (Figura 17 (b) y 17 (c)) y en todas las células de la cripta para FABP2 (Figura 18 (b) y (c)).

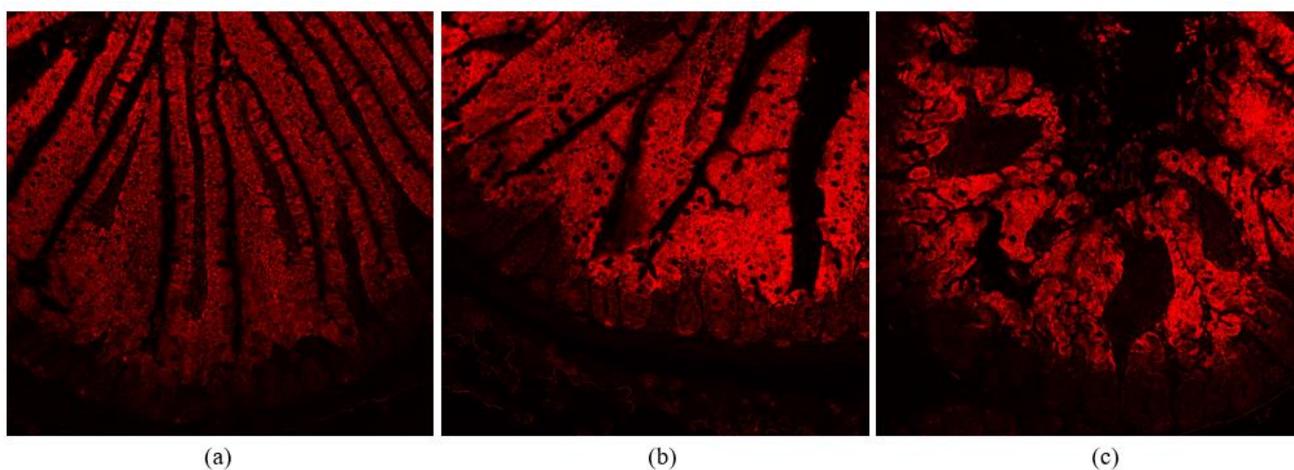


Figura 17. Localización de FABP1 (rojo) por inmunofluorescencia de cortes histológicos de intestino delgado de ratón (a) WT: cepa salvaje, (b) al día 5 o (c) 6 posterior a la eliminación de Rac1.

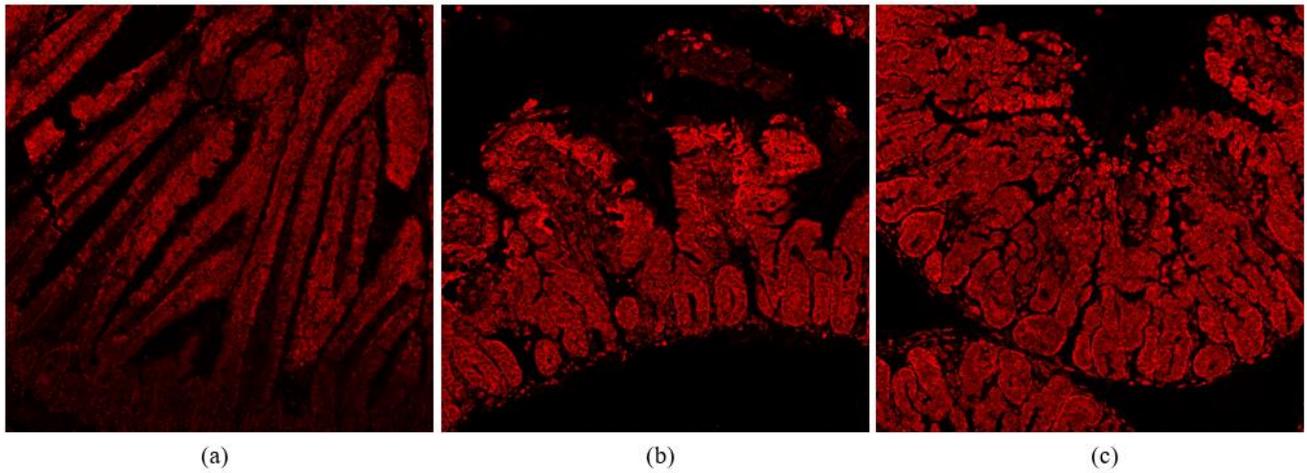
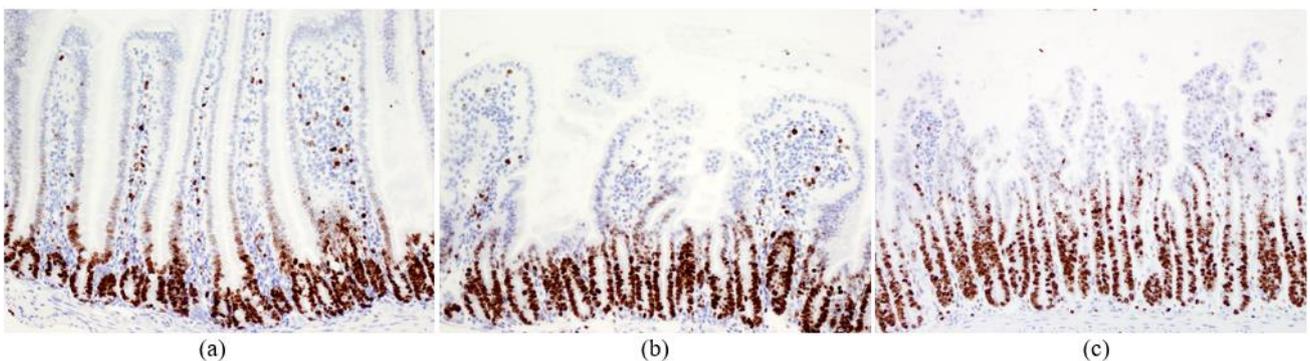


Figura 18. Localización de FABP2 (rojo) por inmunofluorescencia de cortes histológicos de intestino delgado de ratón (a) WT: cepa salvaje, (b) al día 5 o (c) 6 posterior a la eliminación de Rac1.

Modificación de la tasa de proliferación celular en ratones con eliminación de Rac1

Nos interesó evaluar si estos cambios en expresión podrían vincularse con una diferente actividad proliferativa. Dado que estudios mediante la marcación con Ki67, mostraron incremento de la proliferación celular en las criptas de intestino delgado de pacientes con EC al diagnóstico (Shalimar, Vishnubhatla, Siddhartha Datta, Subrat, & Govind, 2013), decidimos analizar la expresión de Ki67 en secciones de intestino delgado de animales del modelo en estudio (Figura 19). Esta proteína es un marcador de proliferación, que varía su localización y abundancia de acuerdo a la fase del ciclo celular. Su expresión es máxima en la fase G2/M del ciclo celular, aunque también se encuentra presente en las fases G1 y S, con ausencia en G0 (Sales Gil & Vagnarelli, 2018). En G0 se encuentran los enterocitos diferenciados. Tanto al día 5 como al día 6 post-delección de Rac1 se observó un incremento en el número total de células Ki67+ por cripta comparado con el grupo control. Siendo aún mayor en ratones al día 6 comparado al día 5 post eliminación de Rac1 (Figura 19 (d)).



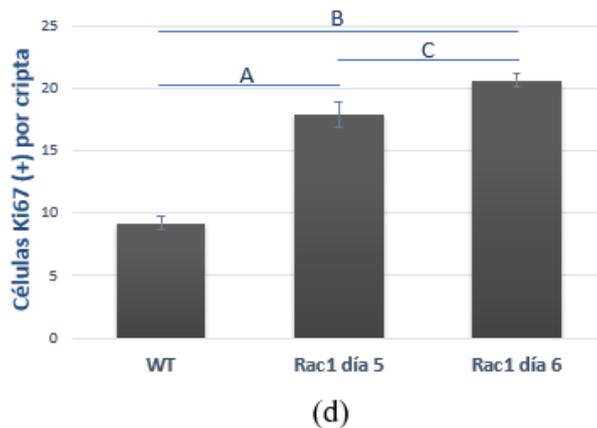


Figura 19. Estudio de la proliferación por marcación de Ki67 por IHC de cortes histológicos de intestino delgado de ratón (a) WT: cepa salvaje, (b) al día 5 o (c) 6 posterior a la eliminación de Rac1. (d) Recuento de las células Ki67 (+) por el total de células en la cripta. Análisis estadístico utilizado T- test. (A) $p=0,0002$, (B) $p<0,0001$, (C) $p=0,0144$. T test, $n=3$, 30 criptas por cada ratón.

Expresión de FABPs en células proliferativas

Finalmente, para extender los estudios sobre células en proliferación se realizó un ensayo *in vivo* de proliferación celular por captación del análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU). BrdU es incorporado solamente en células que estén replicando su ADN (fase S del ciclo celular) en el tiempo del ensayo (en este caso 2 horas). Como resultado del mismo, se observó que BrdU es captado únicamente por células epiteliales de la cripta. En ratones WT ninguna de las dos FABPs estudiadas colocaliza en la misma célula con BrdU (Figuras 20 (a) y 21 (a)). En ratones sin Rac1, FABP1 se expresa en la parte superior de las criptas pero son células donde no se incorporó BrdU (Figura 20 (b)); en cambio, FABP2 se expresa en todas las células de la cripta, incluso en células que incorporaron BrdU (Figura 21 (b)).

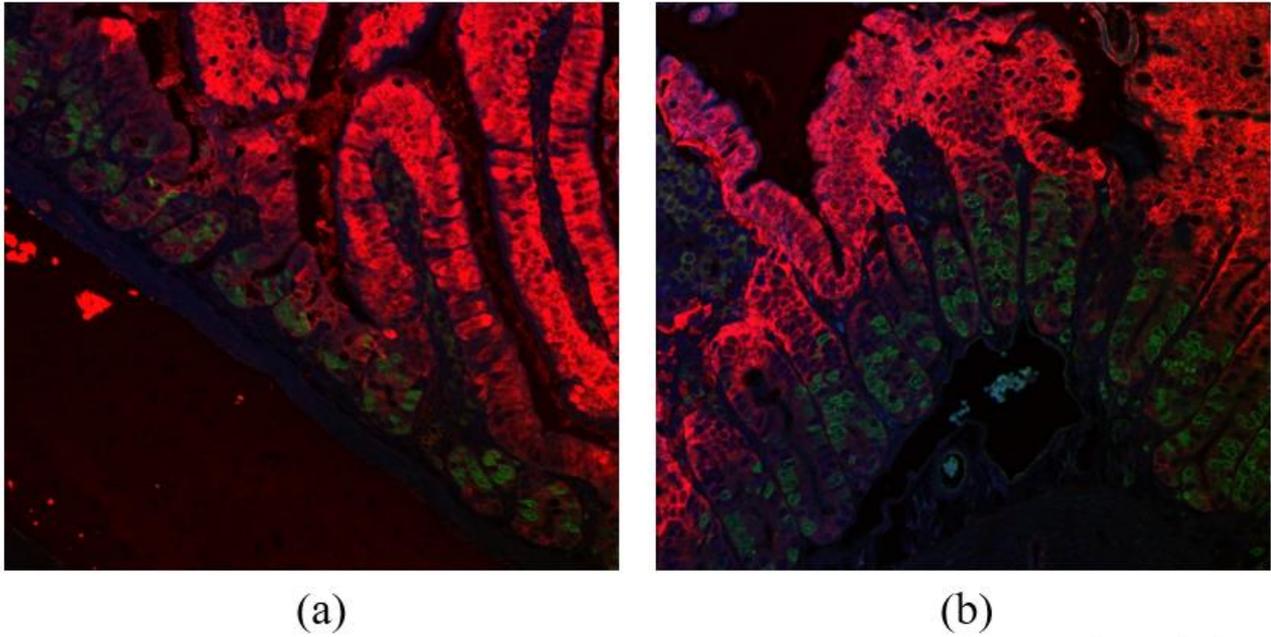


Figura 20. Estudio de la proliferación por captación del análogo de timidina, BrdU (en verde) y co-tinción para FABP1 (en rojo). (a) Control WT y (b) eliminación de Rac1 al día 5. Microscopía confocal.

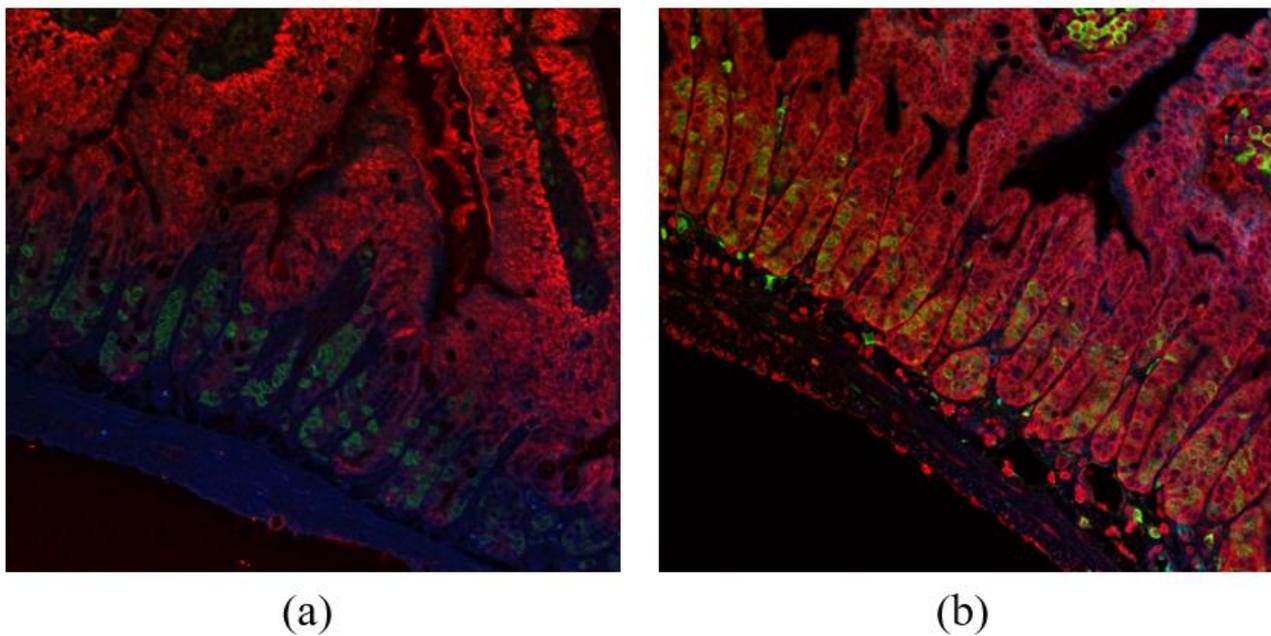


Figura 21. Estudio de la proliferación por captación de BrdU (en verde) y co-tinción para FABP2 (en rojo). (a) Control WT y (b) eliminación de Rac1 al día 5. Microscopía confocal.

Localización de FABPs y análisis de la proliferación *in vivo* empleando ratones FABP1 o FABP2 *knock out*

Evaluación de la expresión de FABPs y actividad proliferativa en las criptas

Para estudiar el rol de las FABP en el compartimiento proliferativo de las criptas realicé una estadia en el laboratorio de la Dra. Judith Storch donde disponen de modelos animales FABP1 o FABP2 *knock out* (ko). Empleando secciones de intestino delgado proximal de estos ratones, se realizaron estudios por inmunofluorescencia que permitieron observar la localización de las FABPs en enterocito ante la ausencia de una de ellas. En cortes histológicos de intestino delgado de ratones WT se observó que ambas FABPs se ubican en los enterocitos de las vellosidades, sin presencia de las mismas en las criptas (Figuras 22 (a) y 23 (a)). La localización de la FABP remanente no se ve alterada en ratones FABP1 o FABP2 ko (Figuras 22 (b) y 23 (b)).

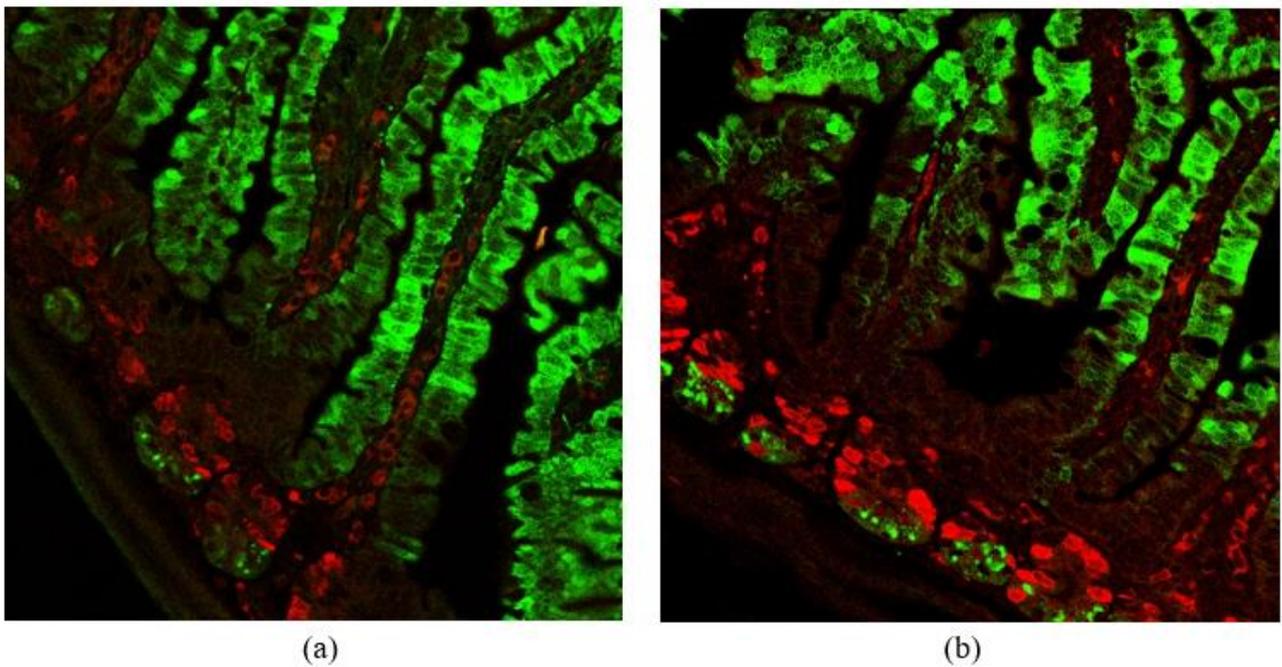


Figura 22. Evaluación de la proliferación por incorporación del análogo de timidina, BrdU (en rojo) y co-tinción de FABP1 (en verde) en ratones WT y FABP2 ko. (a) Control WT incubada con anti FABP1. (b) FABP2 ko incubada con anti-FABP1. Microscopía confocal de fluorescencia.

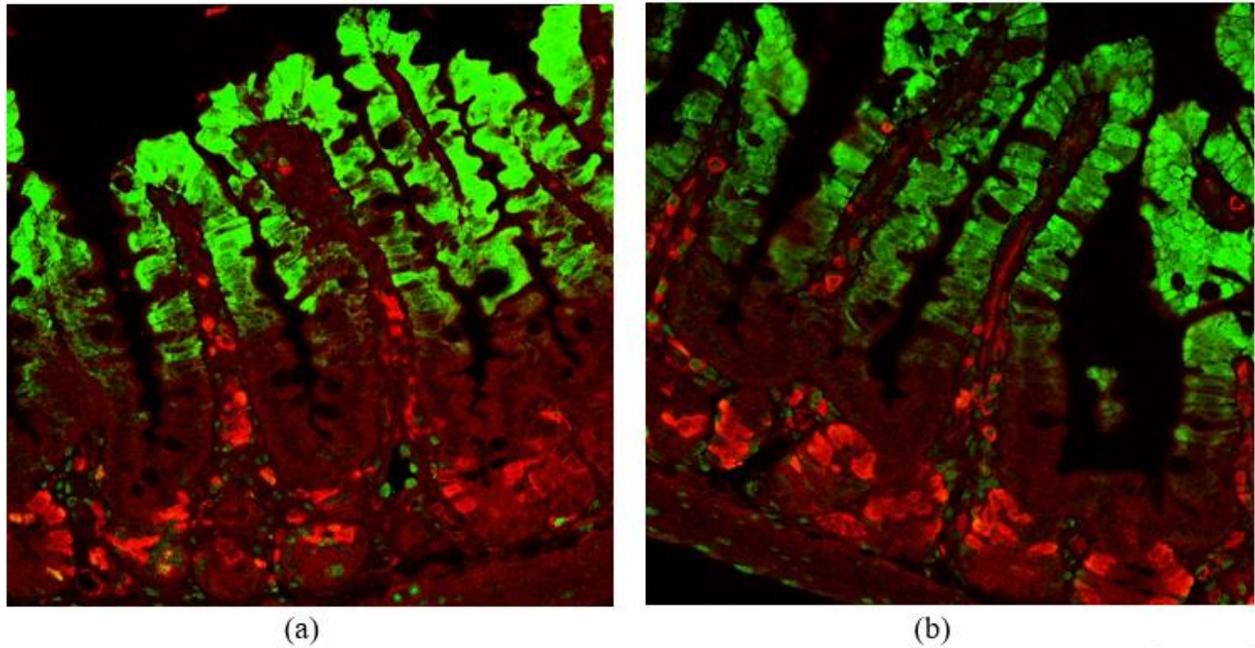


Figura 23. Evaluación de la proliferación por incorporación del análogo de timidina, BrdU (en rojo) y co-tinción de FABP2 (en verde) en ratones WT y FABP1 ko. (a) Control WT incubada con anti-FABP2, (b) FABP1 ko incubada con anti-FABP2. Microscopía confocal de fluorescencia.

Mediante el ensayo por incorporación de BrdU (ver inciso anterior), se observó que las células epiteliales en activa proliferación se encuentran en la cripta y las células que captan BrdU no expresan FABPs, tanto en ratones WT como FABP1 o FABP2 ko (Figuras 22 y 23).

Criptas normales y proliferación inalterada en ratones FABPs ko

Considerando los resultados obtenidos en secciones de duodeno de pacientes con EC al diagnóstico y lo observado en el modelo murino, decidimos analizar si la ausencia de las FABPs generaba una alteración en la proliferación celular. Para proceder al recuento de células proliferativas se realizó inmunohistoquímica (IHC) para detectar BrdU incorporado (Figura 24).

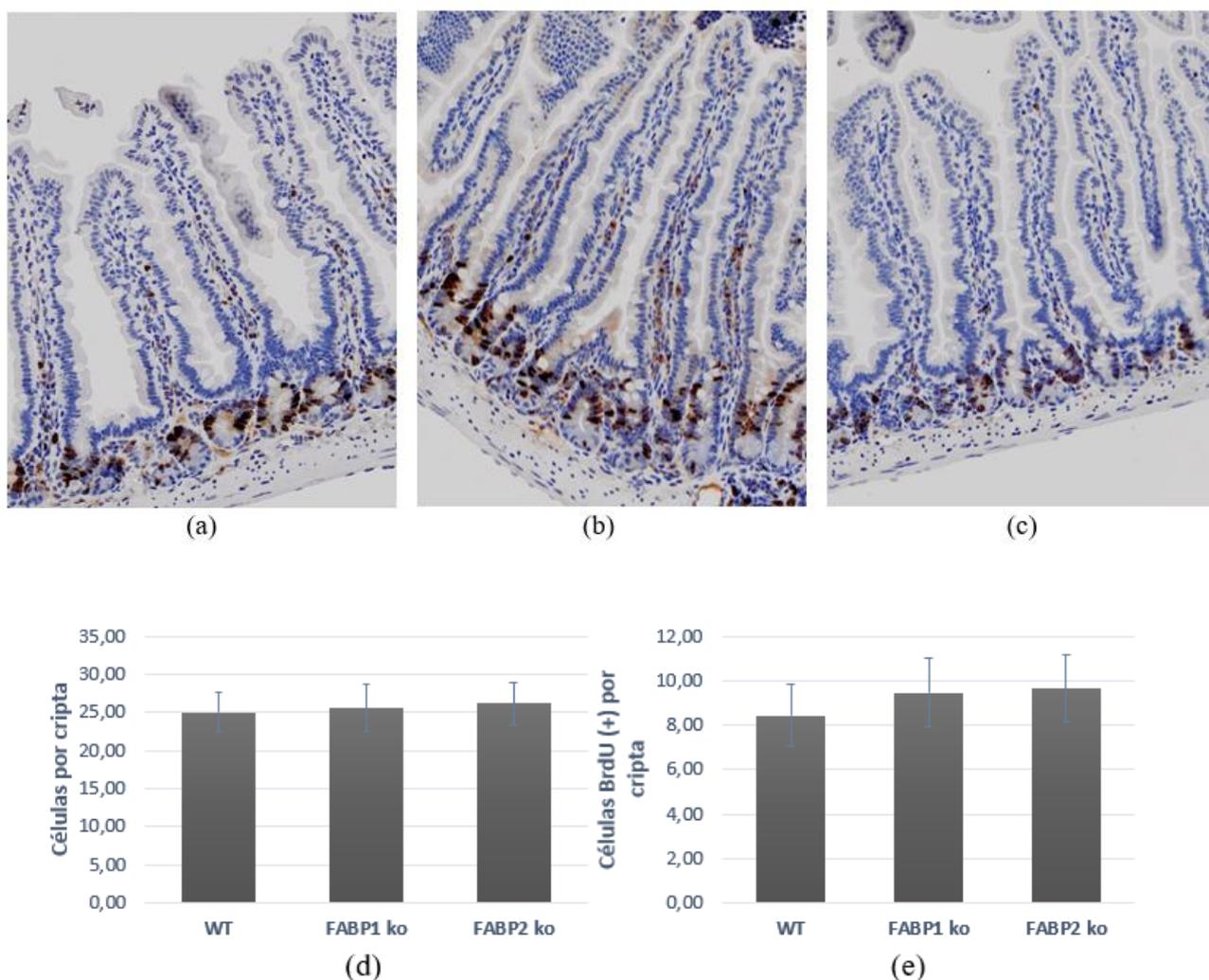


Figura 24. Recuento de células proliferativas por IHC del BrdU incorporado. Imágenes ilustrativas de la captación de BrdU en ratones (a) control WT, (b) FABP1 ko, (c) FABP2 ko. Recuento del (d) número de células totales por cripta y (e) número de células que incorporaron BrdU por cripta. n=3 por genotipo, se evaluaron 50 criptas por cada muestra de ratón.

Al comparar el recuento para ratones WT y FABP1 o FABP2 ko, no se vió alteración del número de células por cripta (Figura 24 (d)) y tampoco se registró cambio en el número de células que incorporaron BrdU, presentes en estas criptas (Figura 24 (e)).

Modificación en los niveles de ARNm de factores de transcripción relacionados a FABPs y algunos de sus genes downstream

Se analizaron por qPCR los niveles de ARNm de ciertos factores de transcripción y algunos genes regulados por estos. Tomamos en consideración lo discutido sobre regulación génica de la expresión de FABPs y lo que se conoce al momento sobre las funciones de estas FABPs. Se muestran en la Tabla 5 los resultados de estos ensayos.

Factor de transcripción	Gen regulado	FABP1 ko	FABP2 ko	Nota
PPAR α		1.4x		*
	<i>ApoA1</i>	6.8x	2x	
PPAR β/δ				*
	<i>ILK</i>	1.7x		
PPAR γ				*
	<i>PEPCK</i>	6.5x	3x	
	<i>Aqp7</i>		2x	
PGC1a		0.7x #	0.6x	
RxR α		1.6x	1.3x	
GATA4				
C/EBP α				
Cdx2				
HNF4 γ				
HNF4 α			0.6x	*
	<i>PEPCK</i>	6.5x	3x	
Srebp1		2.2x	1.4x	
Srebp2				
FGF15		0.4x	1.7x #	

Tabla 5. Niveles de ARNm de factores de transcripción y algunos de sus genes regulados evaluados por qPCR. nx: veces de cambio respecto a WT. Rojo: Aumentado, Verde: Disminuido, Rosa: Sin cambios. p<0.05 salvo en los casos indicados con (#) que no es estadísticamente significativo. * Resultados previos pertenecientes al laboratorio de la Dra. Storch.

Dentro de los factores de transcripción se estudiaron: receptores asociados a la proliferación de peroxisomas (isoformas: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ), la otra proteína involucrada en la dimerización funcional de PPARs, el receptor x de retinoides (RxR α), el co-activador de PPAR γ 1a (PGC1a), proteína de unión a GATA (GATA4), la proteína de unión potenciadora CCAAT (C/EBP α), la proteína caudal homeobox 2 (Cdx2), factor nuclear 4 de hepatocitos (isoformas HNF4 α y HNF4 γ), la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (isoformas Srebp1 y Srebp2).

Se observó un incremento en los niveles de RxR α y Srebp1 tanto en ratones FABP1 como FABP2 ko. No se observaron cambios en los niveles de Srebp2. Se vió una disminución en PGC1a en FABP2 ko. En resultados previos obtenidos en el laboratorio de la Dra. Storch, se había observado un aumento de PPAR α en FABP1 ko, sin cambios para los otros PPARs (β/δ , γ) (Gajda et al., 2013).

Los genes regulados (*downstreams*) seleccionados fueron: Apolipoproteína A1 (ApoA1, de PPAR α), quinasa asociada a integrinas (ILK, de PPAR β/δ), acuaporina 7 (Aqp7, de PPAR γ) y fosfo-enol

piruvato carboxi-quinasa (PEPCK, de PPAR γ y HNF4 α). De los *downstreams* analizados se observó un aumento marcado en PEPCK y ApoA1 tanto en FABP1 como FABP2 ko. También se vieron aumentos en ILK para FABP1 ko y Aqp7 para FABP2 ko.

El factor de crecimiento de fibroblastos 15 (FGF15, homólogo a FGF19 de humanos) vinculado a la homeostasis energética, se vió disminuido en FABP1 ko. Con una tendencia hacia el aumento en FABP2 ko.

En el caso de Srebp1 y Srebp2 se analizaron los niveles de expresión mediante western blot utilizando homogenato completo de intestino de ratón FABP1 ko y WT. Se observó en estos ratones que el aumento de Srebp1 a nivel de ARNm se ve acompañado de un aumento proporcional en el nivel de Srebp1 maduro. Mientras que Srebp2 no cambia. Se utilizó β -actina como control de carga (Figura 25). No se pudo detectar el precursor de Srebp1 o Srebp2, tal vez, por un defecto de la transferencia o del anticuerpo utilizado.

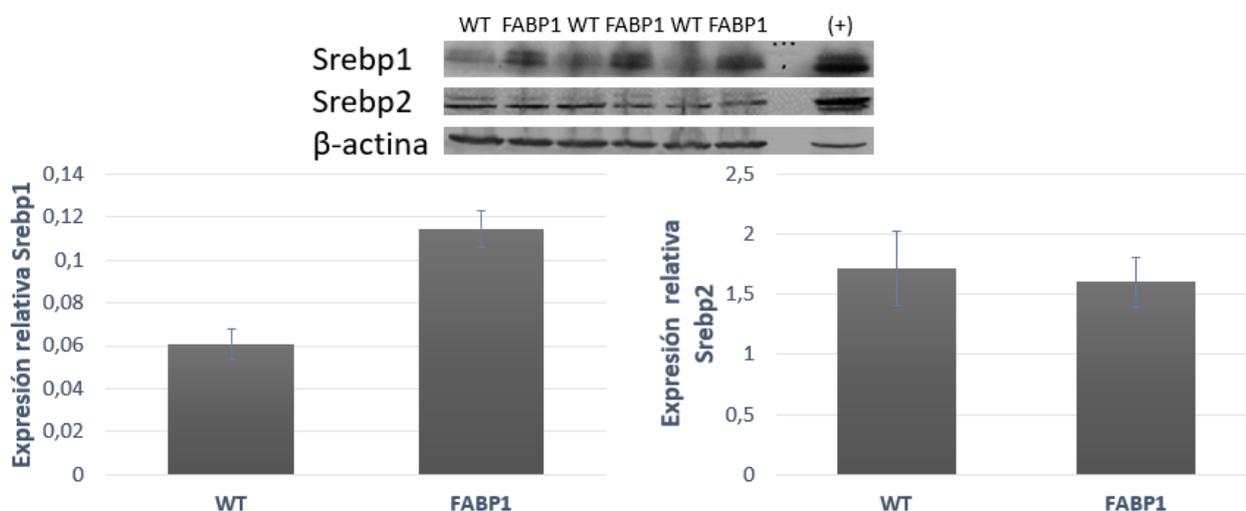


Figura 25. Niveles de expresión de Srebp 1 y Srebp2 en intestino murino por western blot (arriba). Cuantificación por densitometría de bandas del western blot (debajo). (+) Homogenato de hígado de ratón WT como control positivo. β -actina como control de carga.

**Discusión
del Capítulo 2.
Modelos animales**

Dado que no se cuenta en la actualidad con un modelo animal de Enfermedad celíaca que reproduzca las características de esta patología, recurrimos a un modelo con eliminación de Rac-1, con semejanzas con la histología intestinal característica de EC. Rac-1 ha sido vinculado con la proliferación celular en intestino (Myant, Scopelliti, et al., 2013). El silenciamiento de Rac-1 en células de carcinoma de colon ha mostrado inhibición de la proliferación, aumento de la apoptosis y arresto del ciclo celular (Y. S. Huang, Jie, Zhang, Zou, & Weng, 2018). Sin embargo, en nuestros estudios empleando ratones con eliminación aguda de la expresión de Rac-1, observamos un aumento en el número de células proliferativas en las criptas, evidenciado por un mayor recuento de células Ki67 (+) por inmunohistoquímica, semejante a lo observado en pacientes con EC comparado con personas sanas (Shalimar et al., 2013).

Al emplear ratones con expresión de Rac-1 eliminada, vimos en la localización de FABPs por inmunofluorescencia, importantes semejanzas con lo observado en EC. Hay una extensión de la expresión de FABPs hacia células de la cripta, llegando en el caso de FABP2 hasta la base de la misma, cercano a la muscular de la mucosa. De manera sorprendente, al realizar la co-tinción de FABPs con el análogo de timidina (BrdU), observamos que en el caso de FABP1 si bien se detecta presencia de esta proteína en la parte superior de las criptas proliferativas, la expresión ocurre en células que no se encuentran en activa proliferación en ratones con Rac-1 eliminado. En el caso de FABP2, fue diferente, observamos por primera vez la expresión de FABP2 tanto en células de la vellosidad como en células de la cripta en proliferación activa. Es, tal vez, un indicio de una alteración del programa de diferenciación celular o una alteración en la tasa de recambio celular secundaria a la eliminación de Rac-1. Esto también es indicativo de una regulación transcripcional diferente para ambos genes (ver introducción) y de funciones específicas para cada una de estas FABPs.

De acuerdo con los resultados descriptos y nuestra observación previa de disminución de la proliferación en células con FABP1 disminuida (Rodriguez Sawicki et al., 2017), una de las hipótesis planteadas fue que la alteración de la localización de las FABPs pudiera tener injerencia en la tasa de proliferación observada. Con este fin, empleamos ratones FABP1 o FABP2 *knock out*, donde observamos la captación de BrdU y vimos que no hay aumento del número de células proliferativas por cripta ni del número total de células en cada una de ellas. Además, analizamos si estos modelos murinos presentaban una alteración de la localización de la FABP remanente, sin detectar cambios del patrón de expresión respecto de ratones WT. Concluimos que la modificación en la expresión de las FABPs no sería causal de la alteración morfológica observada sino una perturbación consecuente al proceso patológico presentado en EC y recapitulado en algunos aspectos por los ratones sin Rac-1.

En el trabajo de Tetteh et al. (2016) se describen modelos murinos donde la eliminación de la población de células madre intestinales del nicho de la cripta genera una desdiferenciación de las “células en tránsito” (previamente descritas), y que estas conllevan la expresión de FABP1 y FABP2 en la nueva población de la cripta, donde antes se encontraban ausentes (FABP1) o con expresión baja (FABP2). De acuerdo con esta observación y nuestros resultados mostrados aquí, hipotetizamos que un fenómeno similar podría ocurrir en EC y ratones sin Rac-1. Se ha descrito que en pacientes con EC existe un aumento de la población de células en tránsito, sin un aumento significativo de las células madre (Senger et al., 2015). Siguiendo nuestra hipótesis actual, resta comprobar si el origen de esas células en la cripta expandida es una desdiferenciación de las “células en tránsito” que estén repoblando un nicho de células madre perdido. Para esto el patrón de localización alterado de las FABPs constituye un importante indicio.

Así como en otros tejidos ha sido descrita la regulación transcripcional de PPAR α , PPAR γ y FABPs por distintos factores de transcripción (Lee & Ge, 2014; Pineda Torra, Jamshidi, Flavell, Fruchart, & Staels, 2002), quisimos evaluar los niveles de expresión de esos factores de transcripción y algunos de los genes regulados por estos en los ratones ko para FABP1 y FABP2. Las alteraciones encontradas en algunos de estos factores de transcripción y sus genes regulados son indicativos de alteraciones metabólicas más allá de las funciones previamente descritas para las FABPs y podrían implicar un rol de estas proteínas en la regulación de la expresión génica.

En los ensayos realizados sobre muestras de intestino de ratones ko de FABP1 o FABP2 se observaron alteraciones a nivel de ARNm de diversos genes. La decisión de analizar la expresión de estos genes se basó fundamentalmente en las observaciones previamente realizadas en el modelo Caco-2 con expresión disminuida de FABP1, los resultados de interacción proteína-proteína y datos bibliográficos que vinculan la expresión de FABPs con diversos factores de transcripción (mencionados en la sección introductoria o dentro de la presente discusión). Entre estos factores de transcripción observamos incremento en los niveles de ARNm de: RXR α , Cdx2, Srebp1 (sin cambios en Srebp2); y disminución del coactivador 1 α de PPAR γ (PGC1 α , por sus siglas en inglés). PGC1 α es una proteína que regula la expresión de genes a través de su asociación con ciertos receptores nucleares: PPARs/RXR, FOXO1, HNF-4, entre otros, con diversas implicancias para la regulación de la oxidación de AG y la gluconeogénesis (Finck & Kelly, 2006). En intestino se ha visto una elevada expresión de este coactivador, donde cumpliría funciones importantes para la inducción de apoptosis en los enterocitos maduros al regular la respiración y biogénesis mitocondrial, con aumento de especies reactivas del oxígeno (D’Errico et al., 2011).

De cierta manera, la evaluación de la alteración de la actividad de los factores de transcripción podría no estar vinculada con una alteración directa de sus niveles de expresión debido a que son, en su mayoría, factores nucleares activados por ligando. Es por este motivo que decidimos evaluar también algunos de los genes regulados por estos factores nucleares. En este sentido, encontramos un incremento en los niveles de fosfoenol-piruvato carboxi-quinasa (PEPCK, por sus siglas en inglés), apolipoproteína AI (ApoAI), quinasa unida a integrinas (ILK, por sus siglas en inglés), acuaporina 7 (Aqp7). Así como también, vimos una disminución en el factor de crecimiento de fibroblastos 15/19 (FGF15/19, isoforma 15 murina con homología en la isoforma 19 humana).

Analizamos PEPCK dado que su expresión se encuentra regulada por PPAR γ , Srebp1 y HNF-4, entre otros (Croniger et al., 2002). PEPCK es una enzima de la vía gluconeogénica, principalmente expresada en hígado y riñón. Aunque también se encuentra presente en otros tejidos donde cumpliría funciones en la esterificación de AG, metabolismo de aminoácidos y en la función del ciclo de Krebs. En bibliografía esto se observa respaldado por análisis en ratones PEPCK ko a nivel intestinal, donde la glucemia no se vió afectada pero se evidenció una disminución de los niveles de triglicéridos secretados, una absorción ineficiente de los lípidos de la dieta, alteración de los perfiles de aminoácidos e ineficiente catabolismo de la glutamina (Potts et al., 2018). En pacientes con EC se reportó una disminución de PEPCK, en estos pacientes también había sido detectada una disminución en los niveles de FABPs (Simula et al., 2010). Esto va en contraposición con lo que muestran nuestros resultados por qPCR en ratones FABPs ko, dado que observamos un aumento de PEPCK.

El ARNm de ApoAI también se observó incrementado en ambos modelos de FABPs ko en una magnitud similar a PEPCK. ApoAI es una apolipoproteína presente en lipoproteínas plasmáticas como HDL y quilomicrones, y es producida principalmente por el hígado y el intestino delgado, donde se expresa diferencialmente en enterocitos absortivos de la vellosidad (Gassler et al., 2006). Esta expresión se encuentra conservada en células Caco-2 (Reisher, Hughesti, Ordovast, Schaefer, & Feinstein, 1993). Se encuentra bajo el control transcripcional tanto de PPARs-RXRs, como de ARP-1 y HNF-4 (Mooradian, Haas, & Wong, 2004). Esta proteína también fue encontrada en las gotas lipídicas citosólicas de enterocitos murinos, junto con FABP1 y FABP2 (D'Aquila et al., 2015).

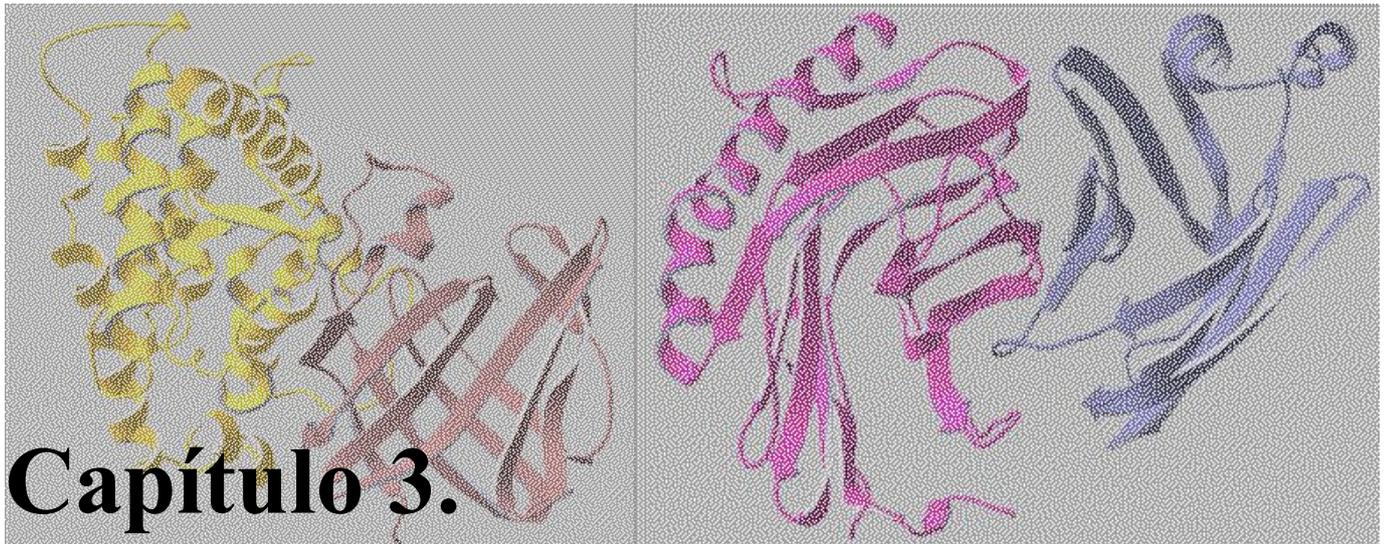
ILK se localiza típicamente en complejos de adhesión de la célula a la matriz extracelular. Aunque cumple funciones de quinasa de Ser/Thr al unirse a integrinas, también actúa como proteína de andamiaje mediando la unión de integrinas al citoesqueleto de actina. En el intestino delgado ha sido asociada a la cara basolateral de los enterocitos de la cripta, disminuyendo su expresión al acercarse a la vellosidad. Esto presentó un correlato en las células Caco-2 en vías de diferenciación (Gagné et al.,

2010). En ese mismo trabajo se mostró como ILK es responsable por la migración y proliferación celular al observar que la eliminación de esta proteína impide que se deposite fibronectina en la matriz extracelular.

Aqp7 es una proteína transmembrana altamente expresada en el epitelio intestinal, principalmente en la cara basolateral de los enterocitos de la vellosidad. Esta isoforma es considerada una porina que permite el pasaje de agua y glicerol, interviniendo en el metabolismo de este último (Zhu, Chen, & Jiang, 2016). En tejido adiposo ha sido descrita su regulación a través de PPARs, lo cual impactaría en la acumulación de TG intracelulares (Iena & Lebeck, 2018).

FGF15/19 es sintetizado por el enterocito y tiene funciones endócrinas. Presenta asociación con el balance energético a nivel de SNC (Marcelin et al., 2014). En el estado alimentado, contribuye con insulina para inhibir la gluconeogénesis en el hígado y funciona como un represor de Srebp1, inhibiendo la síntesis de novo de AG y promoviendo la oxidación de los mismos (Cicione, Degirolamo, & Moschetta, 2012).

En la mayoría de los casos, en ausencia de FABPs esperábamos una disminución de los niveles de ARNm de genes downstream PPARs y otros factores de transcripción vinculados a las FABPs, sin embargo, para varias de las proteínas estudiadas observamos un aumento. Es una excepción el caso de Srebp1. Su aumento era de cierto modo esperable dado que es el receptor nuclear icónico para la regulación de la síntesis de novo de AG. En ausencia de FABPs, la captación de AG se ve disminuida, así como la secreción de los mismos por la cara basolateral (Rodriguez Sawicki et al., 2017) y sería lógico esperar un incremento compensatorio de la síntesis de este tipo de moléculas lipídicas. El incremento de Aqp7 puede estar tal vez asociado con un aumento del requerimiento de glicerol que permita una mayor síntesis de AG. La disminución de FGF15/19 sería acorde a esta hipótesis. Algo más esquivada sería la interpretación del aumento de ILK debido a la carencia de información que la vincule directamente a FABPs, sin embargo al estar expresada preferencialmente en los enterocitos de la cripta, podría tener algún tipo de vinculación con una alteración en la diferenciación celular.



Interacción proteína-proteína entre FABPs y otras proteínas

En la búsqueda por una mejor caracterización de las funciones llevadas a cabo por las FABPs se plantearon estudios de interacción proteína-proteína. Poco se sabe sobre las interacciones proteína-FABPs en las células epiteliales intestinales. Es probable que FABP1 y FABP2 puedan interactuar con un grupo de proteínas blanco distinto, permitiendo así cumplir sus funciones específicas en el enterocito, cuyos actores podrían ser distintos a los de las vías clásicas de transporte de lípidos. Se plantearon una serie de estudios de interacción proteína-proteína *in vitro*, a modo de screening, que nos permitió identificar un conjunto de proteínas interactuantes y confeccionar una lista de proteínas candidatas. Se complementaron dichos estudios con ensayos específicos confirmatorios, tanto *in silico* como en células en cultivo.

Análisis de la interacción FABPs-proteína en Caco-2

En este trabajo de Tesis se emplearon células Caco-2 que son ampliamente usadas como modelo de células epiteliales del intestino, debido a su similitud fenotípica con los enterocitos cuando se encuentran diferenciadas, tanto morfológicas como en marcadores bioquímicos. Las células Caco-2 expresan mayor cantidad de FABP1 que FABP2, como sucede en los enterocitos humanos normales (Levy et al., 2009). Particularmente la expresión de FABP2 puede ser regulada por factores nutricionales así como por componentes de la matriz extracelular (Darimont et al., 1998; Dubé et al., 2001). Sin embargo, las células Caco-2 tienen algunas características distintas a los enterocitos normales. Por un lado sintetizan principalmente Apolipoproteína B100 (Apo B100), en lugar de Apo B48, expresan bajos niveles de Monoacilglicerol-Acil-Transferasa (MGAT) y menor cantidad de FABP2 que los enterocitos normales (Darimont et al., 1998; Reisher et al., 1993; Sweetser et al., 1987; Trotter & Storch, 1993). A pesar de estas diferencias, las células Caco-2 son el modelo celular más usado y mejor caracterizado en cuanto a la absorción, el metabolismo y el transporte de nutrientes en epitelio intestinal (Ho & Storch, 2001; Sambuy et al., 2005). Debido a características propias de esta línea celular se ha concluido que el nivel de confluencia del cultivo de las mismas es crucial para determinar la calidad del cultivo y características adoptadas por el mismo, como las proteínas expresadas, el ritmo del ciclo celular y la expresión de marcadores de diferenciación (Natoli et al., 2011).

El modelo de células Caco-2 ha sido caracterizado no sólo al nivel del metabolismo lipídico sino también su proteoma, mediante la técnica de geles de proteínas uni- y bi-dimensionales acoplados a espectrometría de masas (Lasserre et al., 2010; Lenaerts et al., 2007). En la caracterización del proteoma de las gotas lipídicas citosólicas se ha descrito la presencia de FABP1 y FABP2 (D'Aquila et al., 2015).

Empleando esta línea modelo se aplicaron diversas técnicas que permitieron dar con un conjunto de proteínas interactuantes con FABP1 o FABP2.

Identificación *in vitro* de proteínas interactuantes de FABPs

En una primera aproximación se empleó la técnica Far Western Blot (FWB, Materiales y métodos). Por la superposición de las imágenes del gel teñido para proteínas totales y el blotting donde se revela la interacción de cada FABP (por separado) con una proteína del homogenato, se identificaron y enviaron a analizar por espectrometría de masas MALDI TOF, los puntos del gel que se encuentran

indicados en rojo (Figura 26 (a)). El resultado permitió identificar a las proteínas Heat Shock Protein 60 (HSP60) y Calreticulina, como interactuantes con FABP1. Se presenta en el Anexo 1 el informe técnico del análisis por espectrometría de masas. Si bien hay una serie de puntos (marcados en verde) que sería importante analizar (Figura 26), no se enviaron por no cumplir con la cantidad mínima de proteína detectable con este equipamiento. En la parte inferior del FWB para FABP1 se vieron 3 puntos que se encuentran también presentes en el control negativo. Esto sería un indicio de que podría tratarse de 3 isoformas de FABP1 con distinto pI, posiblemente por diferentes grados de fosforilación, ya que el PM aparentemente no se ve modificado. El gel y blotting correspondiente a FABP2 no pudieron ser analizados (Figura 26 (b)), pero al comparar posición e intensidad con la Figura 26 (a), se infiere que HSP60 también interactuaría con FABP2, no así Calreticulina, que no aparece en el *blotting*. Esta observación no fue confirmada por espectrometría de masas.

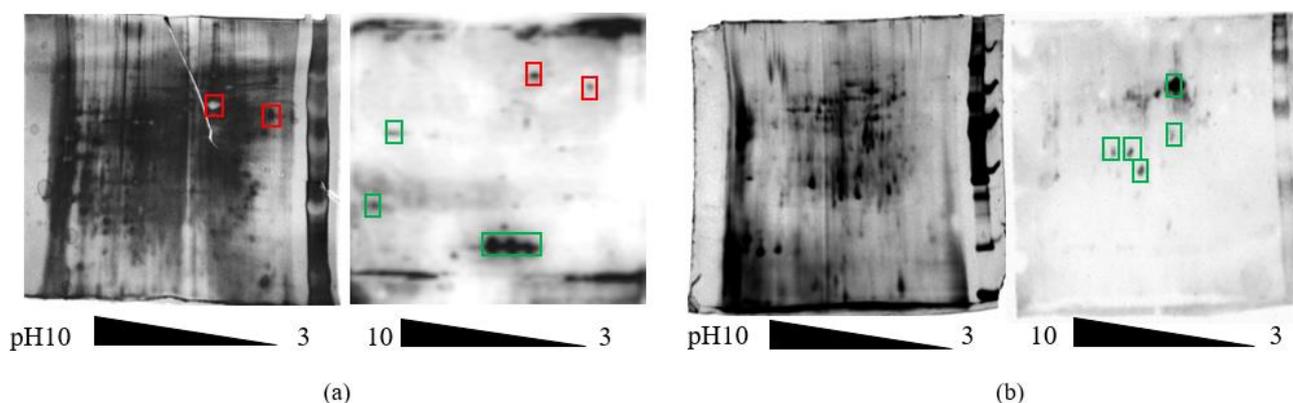
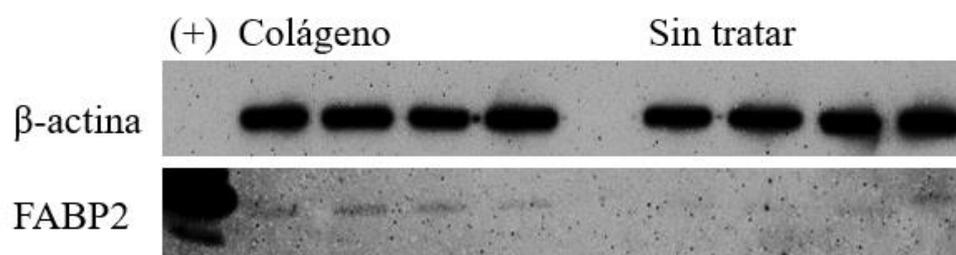


Figura 26. Interacción proteína-proteína de FABPs con proteínas presentes en el homogenato de Caco-2 evaluado por FWB. En (a) y (b) del lado izquierdo se observa un gel bidimensional del homogenato de Caco-2 teñido con plata coloidal. A la derecha se observa el revelado del FWB para (a) FABP1 y (b) FABP2. En recuadros rojos se muestran los puntos seleccionados por superposición del gel con el FWB correspondiente que se enviaron a analizar por espectrometría de masas. En verde se muestran los puntos que marcarían interacción pero que por cantidad de proteínas en el gel no pudieron ser analizados.

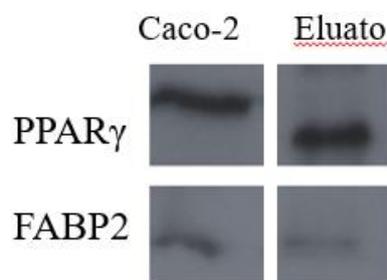
Para obtener más información sobre las proteínas interactuantes de FABP1, se utilizó la técnica de Co-immunoprecipitación con resina de proteína A/G. Se le unió a esta columna anti-FABP1 precipitado con sulfato de amonio (ver Materiales y Métodos). Se sembró en la columna un homogenato total de células Caco-2 pre-clarificado según instrucciones del fabricante (Thermo). El eluato se analizó por western blot para confirmar la presencia de FABP1 (ver Anexo 2) y se envió a analizar por espectrometría de masas nano HPLC Electrospray-HCD-Orbitrap. Se consideraron como resultados positivos aquellas proteínas representadas al menos por dos péptidos diferentes. Se obtuvo como

resultado la interacción de FABP1 con Creatina quinasa B y Alfa sinucleína. Se presentan en el Anexo 2 los resultados completos y el informe técnico.

Las células Caco-2 en condiciones de cultivo normal no expresan FABP2. Para lograr la expresión se cultivaron en superficie de colágeno (Darimont 1998), llegando a una expresión de FABP2 similar en superficie de colágeno o transwell (donde adquiere características de enterocito diferenciado) (Figura 27 (a)). Se realizó una Co-inmunoprecipitación con resina NHS inmovilizando anti IFABP purificado (ver Materiales y Métodos). En el eluato se detectó por western blot a PPAR γ como proteína interactuante (Figura 27 (b)).



(a)



(b)

Figura 27 (a) Expresión de FABP2 en células Caco-2 crecidas sobre colágeno vs. superficie sin tratar, (+) control con FABP2 purificada. (b) Interacción de FABP2 con PPAR γ identificado por western blot posterior a la CoIP con anti FABP2.

Caracterización funcional de la interacción entre FABP1 y PPARs

Para comprobar la hipótesis de la posible relación funcional de FABPs con PPARs se empleó la línea celular Caco-2 con expresión disminuida de FABP1 previamente generada en nuestro laboratorio (Rodríguez Sawicki et al., 2017). Se trabajó con una línea celular clonal con expresión disminuida de FABP1 y una línea celular control transfectada con el vector vacío (Figura 28).

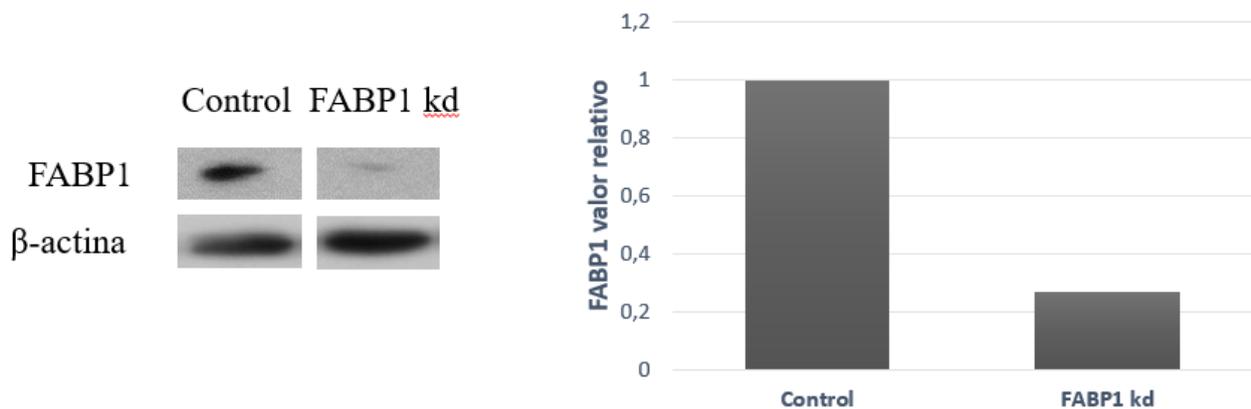


Figura 28. Control de la disminución de la expresión de FABP1 en la línea celular Caco-2 FABP1 kd vs línea control.

Estas células Caco-2 con menor expresión de FABP1 presentan una reducción concomitante en los niveles de PPAR γ comparado a una línea Caco-2 control (Figura 29).

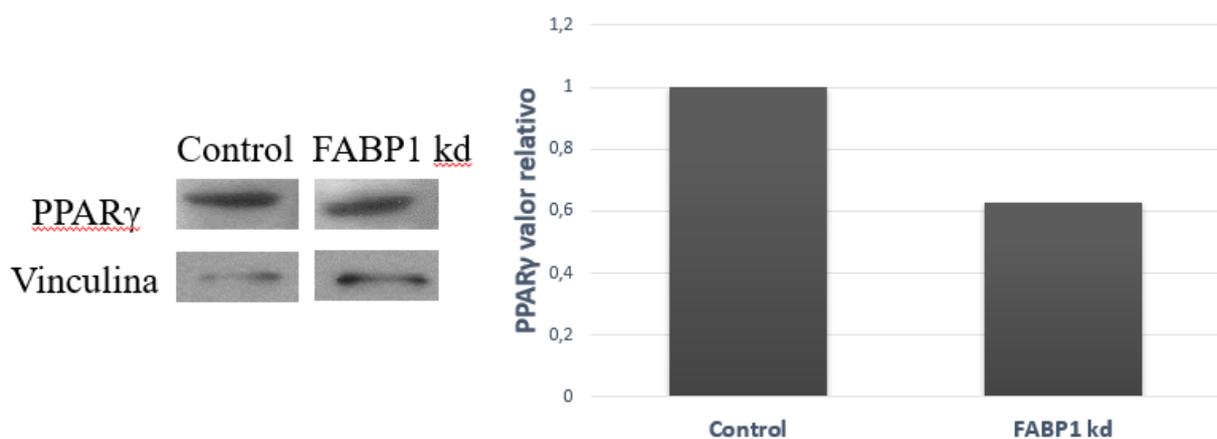


Figura 29. Expresión de PPAR γ disminuida, concomitante en las células FABP1 kd. Ensayo realizado por duplicado.

Evaluación de la expresión de genes *downstream* PPARs

En las líneas celulares descritas arriba se evaluaron por western blot los niveles de expresión de dos proteínas *downstream* PPARs: enzima málica citosólica (ME-1, de sus siglas en inglés) y esteroil CoA desaturasa 1 (SCD-1, de sus siglas en inglés). Se encontraron ambas disminuidas en células con menor expresión de FABP1 comparado con la línea celular control (Figura 30).

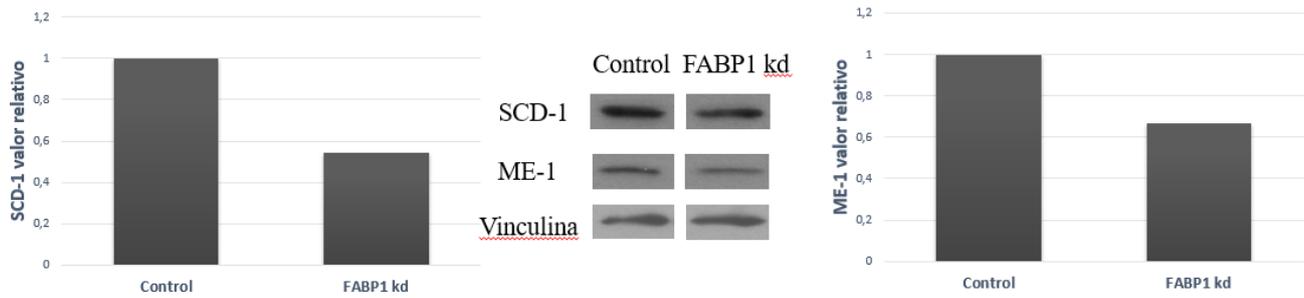


Figura 30. Disminución en la expresión de proteínas reguladas por los factores de transcripción PPAR α y PPAR γ en la línea FABP1 kd vs control. Ensayo realizado por duplicado.

Estudio de la activación de la expresión génica mediada por PPARs

Este análisis fue llevado a cabo mediante un ensayo reportero de luciferasa. Se realizó una segunda transfección de ambas líneas celulares con un vector que contiene tres repeticiones de una secuencia de un elemento de respuesta a PPAR del gen de Acil CoA-oxidasa y de un vector de normalización de la señal lumínica (pTK-renilla), tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se describen los tratamientos realizados y sus concentraciones debajo en la Tabla 6.

Concentración (µM)	Vehículo DMSO 0.4%/ 0.5% BSA/ DMEM	Pioglitazona	Rosiglitazona	Fenofibrato	OA
0.01	-	-	-	-	-
0.1	-	✓	✓	-	-
1	-	✓	✓	✓	✓
10	-	✓	✓	✓	✓
100	-	-	-	✓	✓

Tabla 6. Concentraciones de Agonistas y OA (ácido oleico) para los tratamientos realizados en los ensayos de activación de la expresión génica.

Con el objetivo de probar la funcionalidad del sistema reportero se incubaron las células control con distintos ligandos indicados en bibliografía como agonistas y antagonistas específicos de PPARs, se siguió la señal lumínica al incubar a las células con el sustrato. Se tomaron como concentraciones de respuesta máxima a aquellas que dieran un aumento en las Unidades de Luz Relativas (ULR) y tuvieron una citotoxicidad menor/igual al 20% (Anexo 3).

Utilizando dos agonistas de PPAR γ : Rosiglitazona y Pioglitazona se detecta un aumento de la señal a concentraciones de 0,1 y 1 uM, respectivamente (Figura 31).

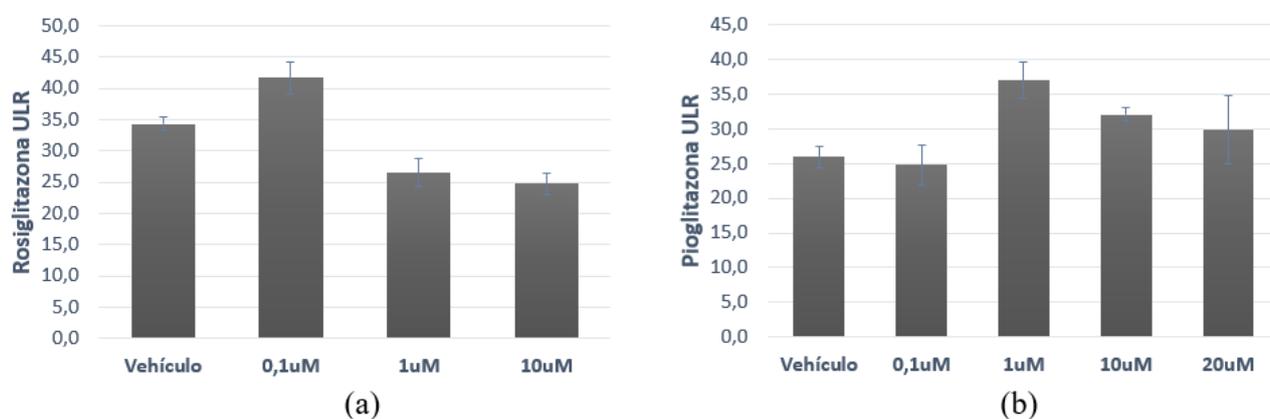


Figura 31. Dosis respuesta de dos agonistas de PPAR γ : (a) Rosiglitazona y (b) Pioglitazona. ULR: Unidades de Luz Relativas. Las señales se encuentran relativizadas a renilla. n=3.

El antagonista de PPAR γ GW9662 no disminuye la señal en el rango de concentraciones estudiado (no mostrado). Fenofibrato, un agonista de PPAR α , muestra un aumento de la señal a 10uM (Figura 32).

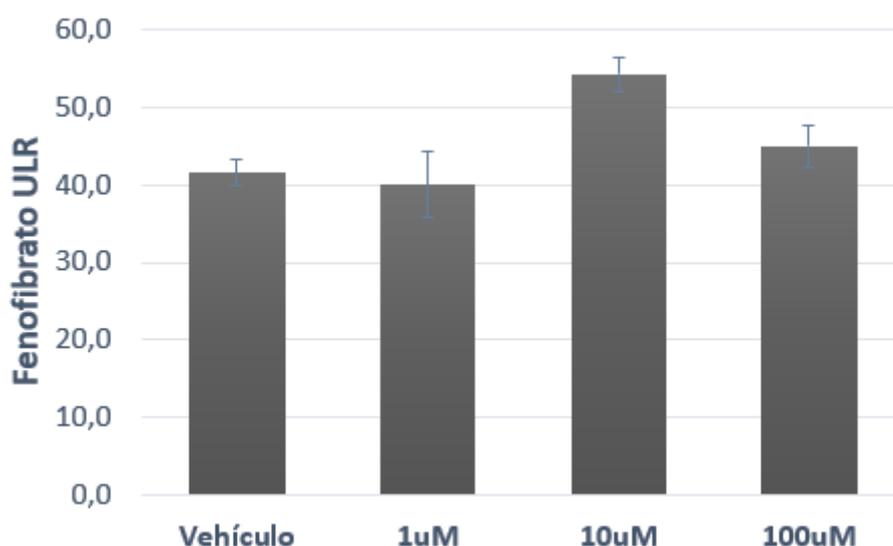


Figura 32. Dosis respuesta de Fenofibrato, agonista de PPAR α . ULR: Unidades de Luz Relativas. Las señales se encuentran relativizadas a renilla. n=3.

Cabe destacar que el sistema modelo propuesto utiliza los niveles endógenos en las Caco-2 de FABP1 y PPARs como potenciales agentes involucrados en el ensayo reportero. Además, al no contar con agonistas o antagonistas específicos absolutos de estas proteínas la prueba del sistema no da resultados categóricos.

Considerando esto, se procedió a medir el efecto de un ligando natural de FABPs como el ácido oleico. Se observó que este ácido graso aumenta la señal lumínica en células control, con un máximo a 100uM de ácido oleico administrado (Figura 33). Dicho efecto fue observado a 24 horas del agregado del ácido graso, mientras que, de forma preliminar, a las 6 horas no se vió incremento en la señal.

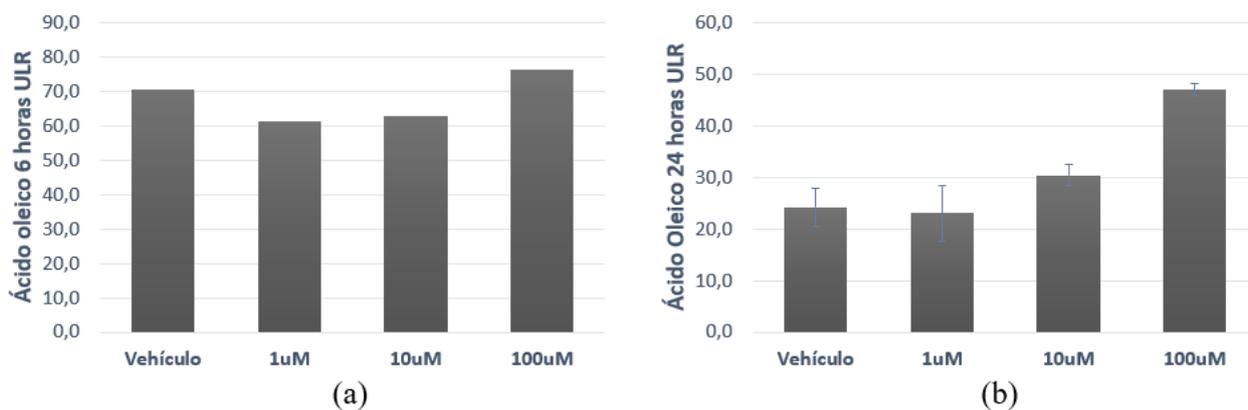


Figura 33. Dosis respuesta de Ácido Oleico a (a) 6 horas o (b) 12 horas de incubación. ULR: Unidades de Luz Relativas. Las señales se encuentran relativizadas a renilla. (a) n=2 y (b) n=3.

De forma destacable, cuando se aplica ácido oleico 100uM por 24 horas a las células con expresión de FABP1 disminuida se ve que la señal lumínica no aumenta (Figura 34).

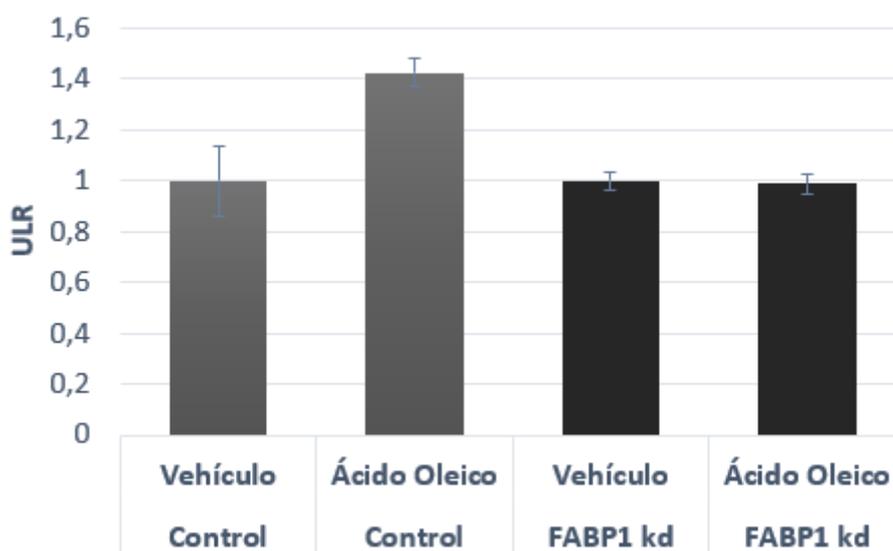


Figura 34. Efecto de un ligando natural de las FABPs y PPARs (ácido oleico) sobre la activación de la expresión génica mediada por PPARs en línea FABP1 kd comparado a línea control. n=3.

Estudio *in silico* de las interacciones FABPs-proteínas

Como parte de una colaboración que el laboratorio mantiene con el Prof. Marcelo Costabel (Director del grupo de biofísica del Depto de Física de la UNS), y el Dr. Fernando Zamarreño (perteneciente al mismo grupo), se evaluaron mediante cálculos electrostáticos y de *docking* molecular las interacciones de FABPs con las proteínas interactuantes descritas en apartados anteriores. Para FABP1 en su forma

unida a ligando (holo) con HSP60 y α -sinucleína (no se obtuvieron resultados), CKB (Figura 35) y Calreticulina (Figura 36).



Figura 35. Interacción de holo FABP1 con CKB: (a) docking in silico y (b) cálculo de la electrostática del sistema.

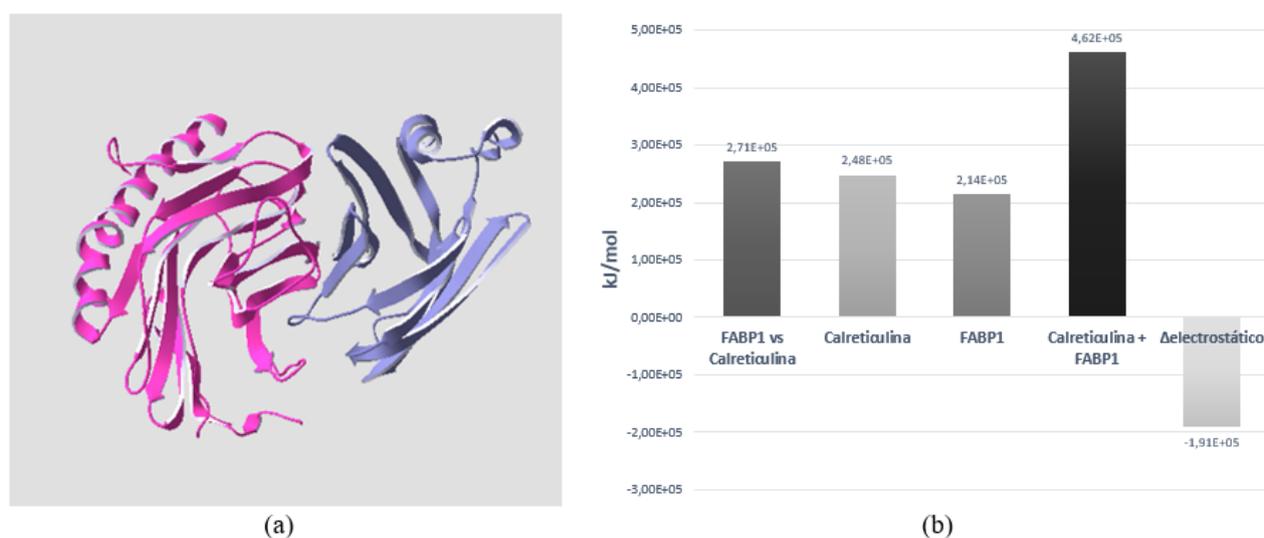


Figura 36. Interacción de holo FABP1 con Calreticulina (dominio N): (a) docking in silico y (b) cálculo de la electrostática del sistema.

Teniendo en cuenta que las FABPs direccionan sus ligandos a PPARs (Tan et al., 2002) consideramos importante caracterizar la interacción de estas proteínas tanto en presencia (holo) como ausencia (apo) de ligando natural. En el caso de FABP2, se ensayó la electrostática y *docking* molecular con LBD-PPAR γ (dominio de unión a ligando de PPAR). Se probó tanto apo (Figura 37) como holo (Figura 38) FABP2, sin distinciones a nivel electrostático pero observándose diferencias en la orientación espacial relativa de FABP2 a LBD-PPAR γ . Cuando FABP2 se encuentra unida a ligando, la cara de la

orientación involucra a la región portal con una aparente pérdida de estructura tridimensional en una de las hélices. Cuando la FABP se encuentra despojada del ligando, la cara orientada es opuesta y no se evidencian cambios estructurales relevantes. Este análisis se realizó en base a la bibliografía que indica que la interacción entre FABPs y PPARs es ligando-específica (Hughes et al., 2015).

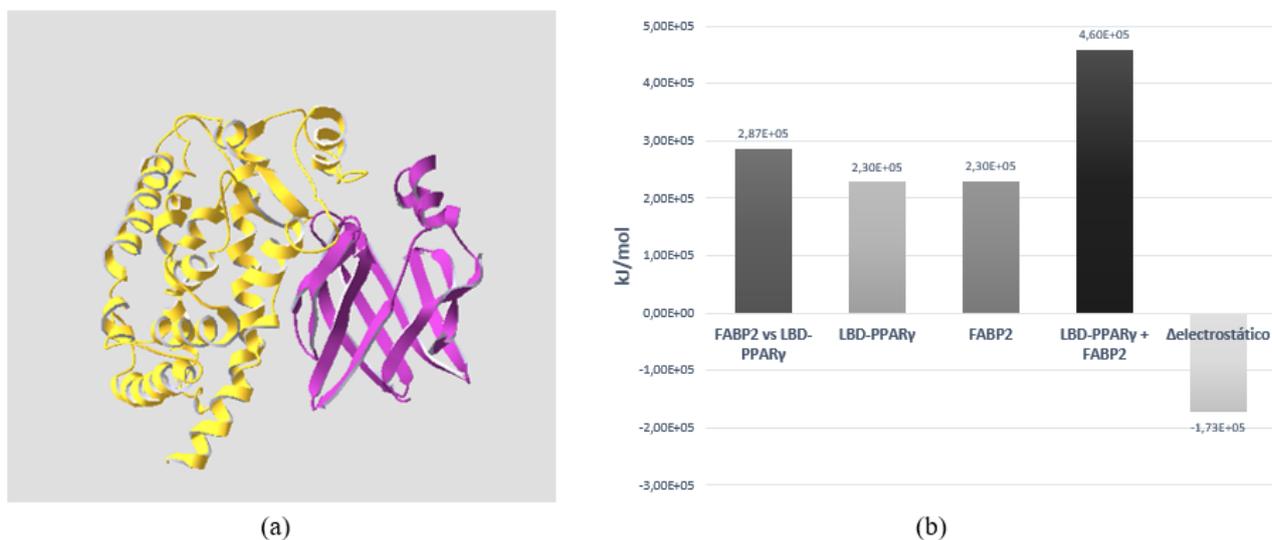


Figura 37. Interacción de apo FABP2 con LBD-PPAR γ (dominio de unión a ligando de PPAR): (a) docking in silico y (b) cálculo de la electrostática del sistema.

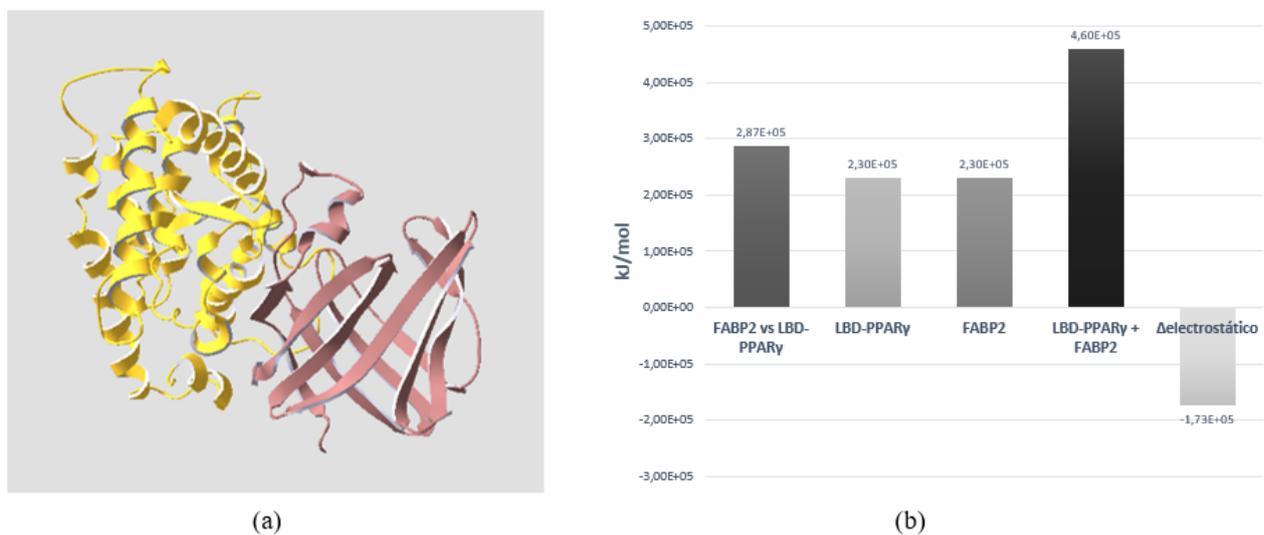


Figura 38. Interacción de holo FABP2 con LBD-PPAR γ (dominio de unión a ligando de PPAR): (a) docking in silico y (b) cálculo de la electrostática del sistema.

Discusión
del
Capítulo 3.
Interacción proteína-proteína

Uno de los resultados obtenidos a partir del Far western blot fue la identificación de HSP60 como proteína interactuante de FABP1 en el homogenato de células Caco-2. HSP60 es una chaperona molecular que asiste en el plegamiento de proteínas tanto en células procariotas (donde es conocida como GroEL) como eucariotas. En mitocondria, HSP60 es considerada una chaperona esencial para la importación de proteínas a la matriz mitocondrial (Bukau & Horwich, 1998; Jindal, Dudani, Singh, Harley, & Gupta, 1989). Las isoformas citosólica y mitocondrial de HSP60 tienen también un papel preponderante tanto en vías pro-apoptóticas como de supervivencia (Chandra, Choy, & Tang, 2007). La actividad pro-apoptótica sería efectuada a través de la escisión y activación de pro-caspasa 3, en una vía independiente de Fas-FasL (miembros de la familia del factor de necrosis tumoral), con pérdida del potencial transmembrana mitocondrial (Samali, Cai, Zhivotovsky, & Jones, 1999; Xanthoudakis et al., 1999). La vía de supervivencia sería a través de la interacción con la proteína antiapoptótica survivina y la retención de p53 inhibiendo su función (Ghosh, Dohi, Kang, & Altieri, 2008). Estos constituyen mecanismos de importancia en la carcinogénesis. También se ha encontrado que HSP60 juega un papel importante en la vía de señalización mediada por los receptores de hormonas esteroideas, regulando su actividad al intervenir en un complejo citosólico formado por este receptor con otras chaperonas (Cano, Lavery, & Bevan, 2013). Además, HSP60 es capaz de interactuar con β -catenina, aumentando el potencial metastásico tumoral (Tsai et al., 2009). De la misma forma, se han descrito roles para HSP60 en el medio extracelular, estos implicarían la activación de la microglía para la liberación de citoquinas proinflamatorias mediado por su interacción con el receptor LOX-1 (Zhang et al., 2012). Así como también se ha descrito un efecto similar en adipocitos (Gülden et al., 2009). En una línea celular de glioblastoma, a la que se le eliminó HSP60, mostró una disminución de la proliferación celular y un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que llevó a un incremento en la actividad de AMPK, una disminución en las principales proteínas asociadas a la síntesis de AG (ACC y FASN) y menores niveles de fosfolípidos (Tang et al., 2016). A nivel intestinal, se ha visto inducción de HSP60 en pacientes con EII (Rath et al., 2012). En ratones con eliminación específica de la expresión de HSP60 en células epiteliales intestinales, se vió una pérdida en la pluripotencialidad de las células de la cripta y una disminución en la capacidad proliferativa tanto de las células pluripotenciales como de las “células en tránsito”, que fue recuperada luego por señales de moléculas de la familia de Wnt generando criptas hiperproliferativas y regeneración tisular (Berger et al., 2016). Simulando un contexto de EC, se trataron células Caco-2 con anti-TG2, autoanticuerpo característico de EC. Los investigadores observaron un aumento de los niveles de fosforilación de HSP60 y otras proteínas. Esto podría tener efecto en la respuesta a proteínas mal plegadas, en la que HSP60 se encuentra involucrada (Paoletta et al., 2013). A continuación se puede ver un esquema de la relación funcional conocida de HSP60 obtenido de una base de datos en internet (String) (Figura 39).

inhibidor (Massaeli, Jalali, Viswanathan, & Mesaeli, 2014). Existe evidencia que permite asociar la disminución en los niveles de calreticulina con mal pronóstico en cáncer de colon. En este contexto, se ha identificado a numerosos adenomas y adenocarcinomas altamente metastásicos con disminución de las moléculas HLA clase I en superficie y con niveles elevados de un microARN específico, miR-27a, el cual se une al gen de calreticulina inhibiendo su expresión. Siendo calreticulina una proteína clave en el mecanismo de exposición de la molécula HLA antes mencionada (Colangelo et al., 2016). En enfermedad celíaca, se ha descrito a calreticulina como un antígeno con reactividad de anticuerpos presentes en el suero de pacientes al diagnóstico (Krupičková et al., 1999). También se ha evidenciado la presencia de auto-anticuerpos IgA anti-calreticulina en el suero de pacientes con EC refractaria (pacientes que dejan de responder al tratamiento de dieta libre de gluten) (Sánchez et al., 2008). En modelos animales de EII, se describió cómo un inhibidor de calreticulina suprime la interacción entre calreticulina y α -integrina, esto modula la adhesión de linfocitos T y neutrófilos a los enterocitos, los cuales disminuyen los niveles de expresión de genes pro-inflamatorios (Ohkuro et al., 2018). En cuanto al metabolismo lipídico, se ha descubierto que ratones ko para calreticulina presentan hiperlipidemia (Guo et al., 2002). Los niveles de colesterol presentes en la membrana del RE son los que disparan la escisión de proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP, por sus siglas en inglés) a través de la proteína SCAP y su traslocación al núcleo donde ejercen sus funciones como factores de transcripción regulando genes del metabolismo lipídico asociados a la síntesis de AG y colesterol. De acuerdo con esta observación, en un modelo de *C. elegans* se describió que, así como en ratones, el knockeo de calreticulina reduce los niveles de Ca^{+2} en el RE, esto altera la distribución intracelular de colesterol lo cual resulta en un aumento de la activación de SREBP1 y SREBP2 (W. A. Wang et al., 2017). A continuación se puede ver un esquema de la relación funcional conocida de Calreticulina obtenido de una base de datos en internet (String) (Figura 40).

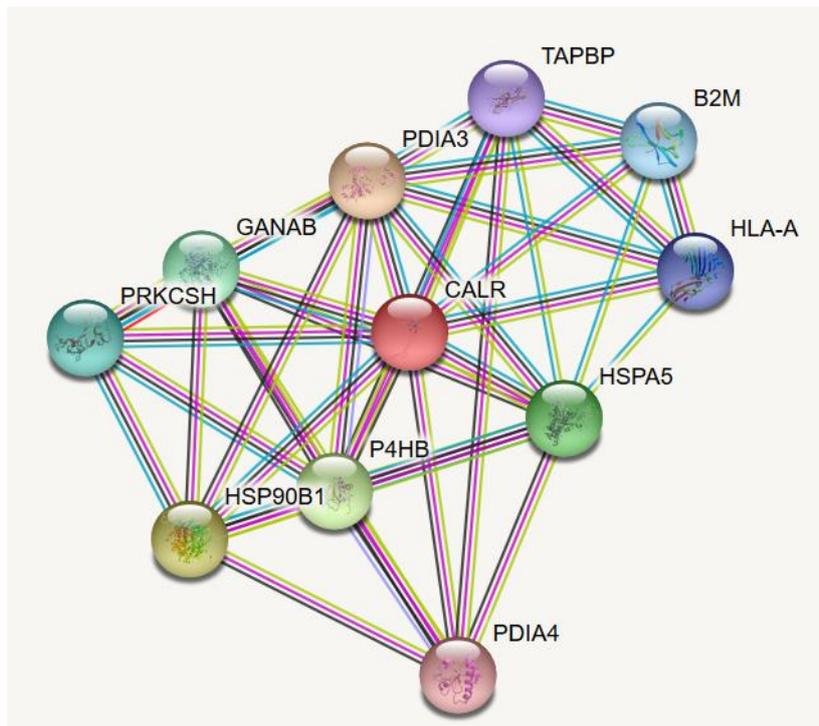


Figura 40. Red de asociación funcional de proteínas para Calreticulina (sinónimo de CALR, círculo rojo). <https://string-db.org/>

En la co-inmunoprecipitación de FABP1 se encontró interacción con creatina quinasa B (CKB, por sus siglas en inglés). Es una isoforma que primero fue descrita en cerebro y se encuentra expresada en tejidos distintos del tejido muscular. La creatina juega un papel esencial en la homeostasis energética celular, particularmente en tejidos con demandas energéticas elevadas y dinámicas como el cerebro, el músculo estriado y el intestino. La creatina quinasa facilita el direccionamiento entre sitios de generación y consumo de ATP, a través de uniones fosfato de energía elevada en la forma de creatina fosforilada (Kitzenberg, Colgan, & Glover, 2016). Ha sido descrita la presencia de CKB en gotas lipídicas citosólicas obtenidas de la línea Caco-2, así como había sido descrito para calreticulina (Bouchoux et al., 2011). En gotas lipídicas citosólicas obtenidas de enterocitos de ratón, se describió la presencia de FABP1 y FABP2, junto con otras proteínas asociadas al metabolismo lipídico (D'Aquila et al., 2015). En un modelo de hepatocitos ha sido descrita la necesidad de la expresión de FABP1 para que puedan formarse las gotas lipídicas citosólicas (Lin et al., 2018). A nivel intestinal se ha descrito un rol importante de CKB en condiciones de hipoxia e inflamación, no sólo implicando a células epiteliales sino también al metabolismo de la creatina en células inmunes para mantener la homeostasis energética. Particularmente, en los enterocitos se encuentra a CKB en el borde en cepillo junto con miosina II. Lo cual confiere un microambiente energético para la función ATPasa asociada a la tensión y contracción de los filamentos de actina. Estas proteínas están también presentes en las

uniones adherentes. La inhibición química de CKB ha demostrado disrumpir la integridad de la barrera intestinal. También se ha encontrado que el gen de CKB contiene un elemento de respuesta al factor de transcripción regulado por hipoxia (HIF-1) en su región promotora (Glover, Bowers, Saeedi, Ehrentaut, & Campbell, 2013). En pacientes con EII y carcinoma de colon se han encontrado menores niveles de CKB y disminución en los niveles de ATP (Kitzenberg et al., 2016). A continuación se puede ver un esquema de la relación funcional conocida de CKB obtenido de una base de datos en internet (String) (Figura 41).

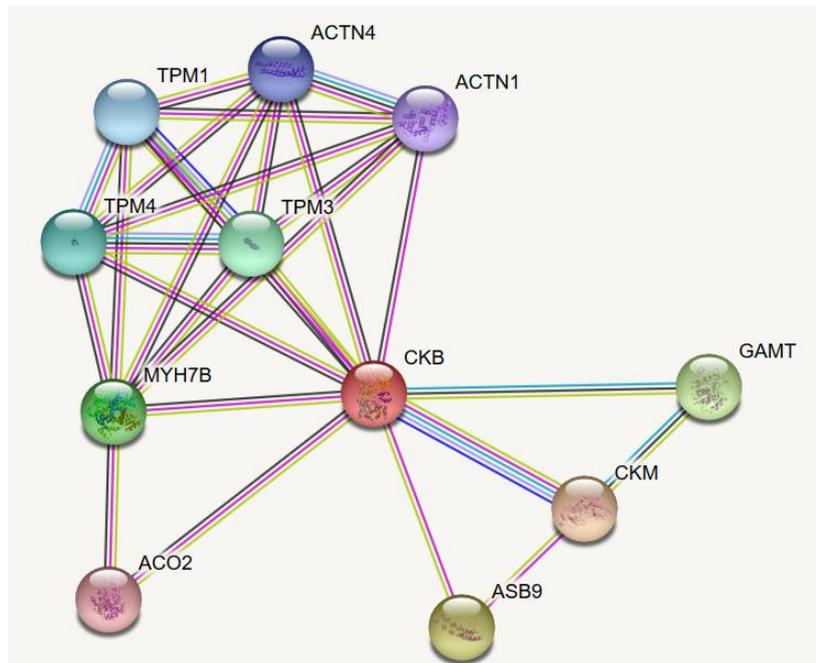


Figura 41. Red de asociación funcional de proteínas para Creatina quinasa B (sinónimo de CKB, círculo rojo). <https://string-db.org/>

En cuanto a α -sinucleína, es poco lo que se sabe respecto a las funciones específicas de la forma intracelular. Se sabe que su interacción con lípidos (AG, esteroides y esfingolípidos) es importante para su función biológica pero que dependiendo de la naturaleza química del lípido con el que interactúa y su proporción esta interacción puede llevar a la agregación (Galvagnion, 2017). En cuanto a las FABPs se la ha vinculado a FABP3 (isoforma muscular o cardíaca), al interactuar promueve la oligomerización de la α -sinucleína, indicativo de un desorden neurodegenerativo (Shioda et al., 2014). A continuación, se puede ver un esquema de la relación funcional conocida de α -sinucleína obtenido de una base de datos en internet (String) (Figura 41).

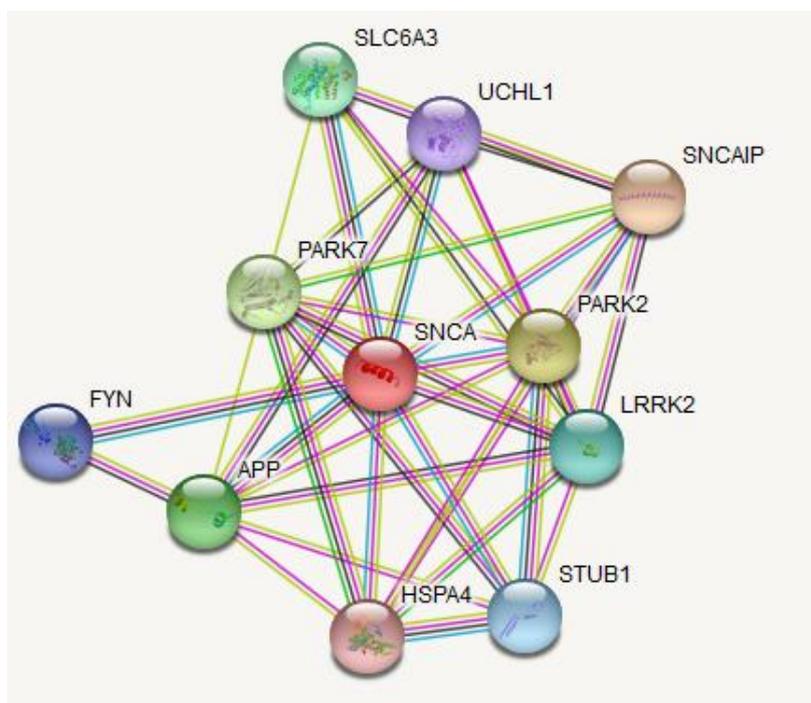


Figura 42. Red de asociación funcional de proteínas para α -sinucleína (sinónimo de SNCA, círculo rojo). <https://string-db.org/>

Teniendo en cuenta que, por un lado, no existen hasta la actualidad antecedentes en la bibliografía que nos permitan vincular las funciones de FABPs con estas proteínas y, por otra parte, dada la cantidad de diversas funciones con las que están relacionadas, es necesario profundizar en las investigaciones que permitan proponer mecanismos de los cuales podrían formar parte estas proteínas en su interacción con FABPs.

En la co-inmunoprecipitación de FABP2 se encontró la presencia de PPAR γ en el eluato. PPAR γ es un factor de transcripción nuclear, que, una vez unido a sus ligandos hidrofóbicos, controla la expresión de múltiples genes vinculados al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, metabolismo lipídico y adipogénesis (Ahmadian et al., 2013). Este resultado se encuentra en línea con lo evidenciado en la línea de enterocito humano normal, HIEC-6, con sobre-expresión de FABP2, donde se mostró un aumento en los niveles de ARNm de PPAR α y PPAR γ , aumento de la oxidación de AG, incremento de la expresión y actividad de HMGCoA reductasa y disminución de los transportadores intestinales de colesterol (Montoudis et al., 2008). Asimismo, vimos que en el ensayo reportero de luciferasa utilizando el elemento de respuesta a PPAR (PPRE), la expresión de FABP1 es necesaria para la activación de este factor de transcripción, usando como ligando natural el ácido oleico. En trabajos de otros autores llevados a cabo en células Caco-2, se encontró que el AG poli-insaturado, ácido docosahexanoico, es responsable por la activación de PPAR α , aumentando los niveles de FABP1 y la oxidación de AG y, disminuyendo la secreción basolateral de triglicéridos (Kimura et al., 2013). La

expresión de FABP1 se encuentra regulada por PPAR α en hígado (Yan et al., 2010). Por otra parte, nuestros estudios empleando la línea Caco-2 con expresión disminuida de FABP1 mostraron una disminución de los niveles de PPAR γ y de dos de los genes regulados por este factor de transcripción: enzima málica (ME-1) y esteroil CoA desaturasa (SCD-1), también regulados por PPAR α . Estos resultados preliminares serían indicativos de una regulación cruzada entre PPAR γ y FABP1. La regulación de la expresión de ME-1 y SCD-1 por PPARs se encuentra descrita en bibliografía (Ijpenberg, Jeannin, Wahli, & Desvergne, 1997; Ntambi, 1995). Bien es de destacar que SCD-1 no sólo se encuentra regulada por este factor de transcripción, sino que también juega un papel preponderante en su expresión el factor SREBP1, existiendo una relación entre ambos factores de transcripción en respuesta a insulina (Hebbachi, Knight, Wiggins, Patel, & Gibbons, 2008). Así es como en ratones ko para FABP1 y FABP2 encontramos un aumento en los niveles de SREBP1 y no de SREBP2 a nivel de ARNm (y de proteína para el ko de FABP1). SREBP-1 activa y uno de sus genes regulados, la sintasa de AG (FASN), se han observado incrementados en carcinomas de colon (Li, Mahmoud, Han, Ripple, & Pizer, 2000). Esto se ve respaldado por un ensayo en el que emplearon un modelo murino de esta patología observando también aumentos a nivel de ARNm en: Acetil CoA Carboxilasa (ACC), FASN y SCD-1 (Dharmarajan et al., 2013). Los autores, adicionalmente eliminaron FABP1 en este modelo, observando una reducción en la proliferación y diferenciación celular, así como también en los niveles de proteína de PPAR α , desapareciendo los cambios en ACC, FASN y SCD-1. Asimismo, se ha descrito una disminución de los niveles de expresión de FABP1 y PPAR γ en otro tipo de carcinoma de colon (Wood, Gill, Brodsky, & Lu, 2017). Los autores proponen que la inhibición de PPAR γ mediada por IFN γ , en un contexto de elevada respuesta inmune, conduciría a la disminución de la transcripción de FABP1. A continuación se pueden ver dos esquemas de las relaciones funcionales conocidas para PPAR α y PPAR γ obtenidos de una base de datos en internet (String) (Figura 43).

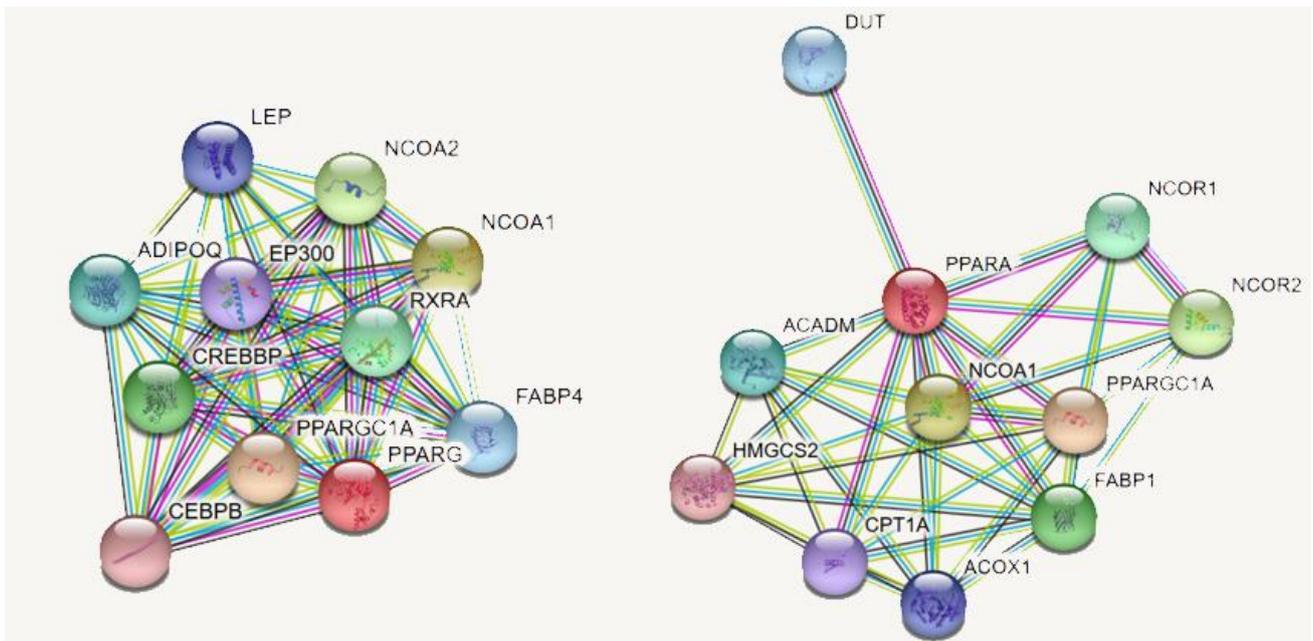


Figura 42. Red de asociación funcional de proteínas para PPAR α (sinónimo de PPARA) y PPAR γ (sinónimo de PPARG). Círculo rojo indica la proteína central al esquema: PPARA o PPARG. <https://string-db.org/>

Si bien las distintas isoformas de PPARs tienen un patrón distintivo de reconocimiento molecular de sus ligandos hidrofóbicos (Xu et al., 1999), diversos agonistas y antagonistas no son tan selectivos para cada isoforma como se considera comúnmente. Algunos ligandos que funcionan como antagonistas de una isoforma, a determinadas concentraciones pueden ejercer un efecto agonista parcial sobre otra isoforma (Seimandi et al., 2005). Existe la posibilidad que en los ensayos realizados con diversos agonistas sobre la línea Caco-2 con expresión transitoria de PPRE-Luciferasa se hayan presentado este tipo de comportamientos. Por otra parte, los niveles basales y endógenos de las FABPs y PPARs pueden condicionar la magnitud del cambio observado tanto con ligandos artificiales (fenofibrato y las diversas tiazolidindionas empleadas) como naturales (ácido oleico). Si bien nuestros resultados preliminares implicarían un rol de PPAR γ en la interacción con FABPs, no se puede descartar que PPAR α cumpla una función similar en este sistema (Bünger et al., 2007). Células hepáticas expresando el polimorfismo de FABP1 T94A mostraron una disminución en los niveles de ARNm de PPAR α y algunos de los genes regulados por este, entre ellos la misma FABP1, respecto a la FABP1 normal (H. Huang et al., 2014).

El modelado *in silico* de las interacciones de FABPs-proteínas nos permitieron tener una confirmación por electrostática y *docking* molecular de la interacción de FABP1 con calreticulina (su dominio N globular, citosólico) y CKB y de FABP2 con el LBD-PPAR γ . En este último caso pudimos evidenciar que la forma de interacción entre ellas varía si la proteína se encuentra en su forma Apo u Holo. Se presenta un cambio conformacional relevante en la estructura de la región “portal” de FABP2 cuando

la misma posee unido un ligando. Estos resultados deberán ser confirmados por diversas metodologías como RMN involucrando mutaciones puntuales, entre otras.

Una hipótesis posible podría plantear que cuando la proteína está unida a su ligando, podría presentar un cambio conformacional que genera que la proteína se oriente a hacia el PPAR a través de la región portal, una región ampliamente descrita como partícipe de la transferencia de ligandos.



Conclusiones

Este trabajo de tesis comenzó en el año 2013, para ese momento hacía 6 años que concurría como pasante en el laboratorio de la Dra. Betina Corsico en el INIBIOLP. Al cual asistí de manera ininterrumpida durante todos mis años como estudiante de la Facultad de Cs. Exactas. Como parte de las prácticas especiales de la Lic. en Bioquímica comencé con los estudios de expresión de FABPs en Enfermedad Celíaca en colaboración con el Dr. Fernando Chirido en el IIFP. Allí empezamos a observar que las FABPs de intestino estaban aumentadas en el suero de pacientes con EC y pensamos en indagar en algo que nadie había observado antes, la localización de FABPs en una enteropatía. Esta observación nos sorprendió, al ver que se encontraban presentes en lugares como las células de la cripta. Encontrarlas allí significaba un “cambio de paradigma” para las FABPs de enterocito. Es decir, encontramos a las FABPs en células que son presumiblemente más inmaduras. En el año 2013 comencé con los estudios de interacción FABPs-proteína. En ellos comencé a familiarizarme con la vasta cantidad de técnicas *in vitro* y en cultivo desarrolladas en este trabajo. En particular el far western blot nos permitió encontrar las primeras proteínas candidatas a interactuar con las FABPs: HSP60 y Calreticulina. Las primeras no fueron las esperadas, en principio su vinculación al metabolismo lipídico no se encuentra caracterizada, por lo cual siguen representando al día de hoy un desafío. En el 2014 me inscribí formalmente en el Doctorado de la Facultad de Cs. Exactas, Área Cs. Biológicas, y obtuve una beca del CONICET. Ese mismo año pude exponer por primera vez mi trabajo en un congreso internacional y también realicé una estadía en el laboratorio del Dr. Owen Sansom, The Beatson Institute en Glasgow, Escocia. Fue en ese lugar donde pude trabajar con el modelo murino con eliminación de Rac que presentó alteraciones funcionales similares a EC. En esa instancia, pudimos confirmar que en un contexto de daño, el intestino presenta una alteración en la localización de las FABPs, un aumento de la proliferación y tamaño de las criptas y que una de las FABPs se expresa en células en proliferación activa.

Luego continuamos recabando mayor cantidad de datos para la interacción proteína-proteína de las FABPs. Descubrimos, mediante co-inmunoprecipitación, la interacción de FABP2 con PPAR γ . Este hallazgo, guiado por datos bibliográficos que ya vinculaban a las FABPs con PPARs en otros tejidos, nos dio un puntapié sobre el que desarrollaríamos luego los estudios de caracterización funcional de la interacción entre FABPs y PPARs. Asimismo, a través de los ensayos de coimmunoprecipitación de FABP1 descubrimos la interacción con CKB y α -sinucleína. Nuevamente nos encontrábamos con proteínas inesperadas pero que nos ampliaron la visión sobre el mundo intrincado e interconectado en el que actúan las FABPs. Dichas interacciones pudieron ser confirmadas y analizadas por docking molecular y cálculos de electrostática llevados a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcelo Costabel y el Dr. Fernando Zamarreño.

En el año 2018 tuve la posibilidad de realizar una estadía de investigación en el laboratorio de la Dra. Judith Storch, Rutgers University en Nueva Jersey, EEUU. Su laboratorio cuenta con una amplia experiencia en el estudio de las FABPs y particularmente, me permitió comprobar algunas de nuestras hipótesis en los modelos *knock out* específicos con los que trabajan. Allí pude analizar si la ausencia de alguna de las FABPs llevaba a una expresión alterada de la FABP remanente. Es decir, por ejemplo, si no se encuentra presente FABP1, FABP2 podría modificar su patrón de localización y viceversa. Pudimos comprobar, entonces, que las FABPs no alteran su localización en ausencia de una de ellas. También pudimos analizar si la ausencia de alguna de las dos FABPs lleva a una modificación en la proliferación celular de las células de la cripta. Tampoco encontramos que los ratones ko para las FABPs tuvieran una alteración en la proliferación.

Estos modelos murinos nos permitieron evidenciar cómo la ausencia de alguna de las FABPs condiciona la expresión de ciertos factores de transcripción y algunos de los genes regulados por ellos. En este caso, vimos que hay alteraciones en factores de transcripción claves para la regulación de enzimas del metabolismo lipídico y también descubrimos alteraciones en genes que indicarían funciones novedosas y diferentes a las previamente descritas.

En conjunto los resultados de interacción proteína-proteína junto con la evaluación de diversos factores de transcripción nucleares nos permiten hipotetizar que estas FABPs presentes en el enterocito cumplirían funciones que se encuentran asociadas no sólo al impacto metabólico del direccionamiento de los lípidos dietarios para almacenamiento, secreción y obtención de energía sino también dejan entrever una vasta interrelación con otras proteínas. Estas interacciones no estarían vinculadas de manera clásica con el metabolismo lipídico e incrementan, en gran medida, las implicancias que estas FABPs tienen para la homeostasis celular y en el tejido donde son expresadas.

De lo observado en pacientes con EC y en el modelo animal con semejanzas histológicas con esta patología, podemos decir que los cambios en la expresión de las FABPs también tendrían una influencia en la respuesta inmune, que junto con los indicios de interacción proteína-proteína antes mencionados, podría contribuir al mecanismo patológico del daño observado en EC. Pudiendo ser las FABPs indicativas de una alteración en el programa de diferenciación celular normal de los enterocitos.

Los resultados presentados junto con el análisis de los mismos en la sección de discusión respectiva nos permiten establecer una interconexión entre aquellas proteínas estudiadas por técnicas de interacción proteína-proteínas con aquellas proteínas con roles previamente descritos en la patología de EC.

Bibliografía

- Abadie, V., Sollid, L. M., Barreiro, L. B., & Jabri, B. (2011). Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, *29*, 493–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-040210-092915>
- Abdel-haie, O. M., Behiry, E. G., Abd, E. R., Ahmad, E. S., & Assar, E. H. (2017). Predictive and diagnostic value of serum intestinal fatty acid binding protein in neonatal necrotizing enterocolitis (case series). *Annals of Medicine and Surgery*, *21*, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.05.010>
- Abrams, J. A., Diamond, B., Rotterdam, H., & Green, P. H. R. (2004). Seronegative Celiac Disease : Increased Prevalence with Lesser Degrees of Villous Atrophy, *49*(4), 546–550.
- Adriaanse, M. P. M., Tack, G. J., Passos, V. L., Damoiseaux, J. G. M. C., Schreurs, M. W. J., & Wijck, K. Van. (2013). Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *37*, 482–490. <https://doi.org/10.1111/apt.12194>
- Afshar, N., Black, B. E., & Paschal, B. M. (2005). Retrotranslocation of the Chaperone Calreticulin from the Endoplasmic Reticulum Lumen to the Cytosol, *25*(20), 8844–8853. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.8844>
- Agellon, L. B., Toth, M. J., & Thomson, A. B. R. (2002). Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *239*(1–2), 79–82. <https://doi.org/10.1023/A:1020520521025>
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism : the good , the bad and the future. *Nature Medicine*, *19*(5), 557–566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Alpers, D. H., Bass, N. M., Engle, M. J., & Deschryver-Kecskemeti, K. (2000). Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1483*(3), 352–362. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00200-0)
- Atshaves BP, Martin GG, Hostetler HA, McIntosh AL, Kier AB, S. F. (2010). *Liver Fatty Acid Binding Protein and Obesity. Jurnal PWK Unisba* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.01.005>.Liver

- Baier, L. J., Sacchettini, J. C., Knowler, W. C., Eads, J., Paolisso, G., Tataranni, P. A., ... Prochazka, M. (1995). An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *95*(3), 1281–1287. <https://doi.org/10.1172/JCI117778>
- Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z., Bernlohr, D. A., Cowan, S., & Jones, A. T. (1994). Lipid-Binding Proteins: A family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Advances in Protein Chemistry*, *45*, 89–151.
- Barada, K., Habib, R. H., Malli, A., Hashash, J. G., Halawi, H., Maasri, K., ... Barada, K. (2014). Prediction of celiac disease at endoscopy, 110–119.
- Bass, N. (1985). FUNCTION AND REGULATION OF HEPATIC AND INTESTINAL FATTY ACID BINDING PROTEINS. *Chemistry and Physics of Lipids*, *38*, 95–114.
- Berger, E., Rath, E., Yuan, D., Waldschmitt, N., Khaloian, S., Allgäuer, M., ... Haller, D. (2016). Mitochondrial function controls intestinal epithelial stemness and proliferation. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13171>
- Bjarnason, I., Maxton, D., Reynolds, A. P., Catt, S., Peters, T. J., & Menzies, I. S. (1994). Comparison of Four Markers of Intestinal Permeability in Control Subjects and Patients with Coeliac Disease.
- Bondar, C., Araya, R. E., Guzman, L., Rua, E. C., Chopita, N., & Chirido, F. G. (2014). Role of CXCR3 / CXCL10 Axis in Immune Cell Recruitment into the Small Intestine in Celiac Disease, *9*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089068>
- Booth, CC, Alldis, D, and Read, A. (1961). Site of Fat. *Gut*, *2*, 168–174.
- Bottasso Arias, N., García, M., Bondar, C., Guzman, L., Redondo, A., Chopita, N., ... Chirido, F. G. (2015). Expression Pattern of Fatty Acid Binding Proteins in Celiac Disease Enteropathy. *Mediators of Inflammation*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/738563>
- Bouchoux, J., Beilstein, F., Pauquai, T., Guerrero, I. C., Chateau, D., Ly, N., ... Demignot, S. (2011). The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biology of the Cell*, *103*(11), 499–517. <https://doi.org/10.1042/BC20110024>
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, W. W. (1996). Differential expression of peroxisome

proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, *137*, 354–366.

Brouillette, C., Bossé, Y., Pérusse, L., Gaudet, D., & Vohl, M. C. (2004). Effect of liver fatty acid binding protein (FABP) T94A missense mutation on plasma lipoprotein responsiveness to treatment with fenofibrate. *Journal of Human Genetics*, *49*(8), 424–432.
<https://doi.org/10.1007/s10038-004-0171-2>

Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines, *92*, 351–366.

Bünger, M., Bosch, H. M. Van Den, Meijde, J. Van Der, Kersten, S., Hooiveld, G. J. E. J., & Mu, M. (2007). Genome-wide analysis of PPAR α activation in murine small intestine. *Physiol Genomics*, *30*, 192–204. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00198.2006>.

Burgess, R., Terrance, M., & Pietz, B. C. (2000). Mapping Protein-Protein Interaction Domains Using Ordered Fragment Ladder Far-Western Analysis of Hexahistidine-Tagged Fusion Proteins. *Methods in Enzymology*, *328*, 141–157.

Burns, K., Duggan, B., Atkinson, E., Famulski, K., Nemer, M., Bleackley, R., & Michalak, M. (1994). Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*, *367*, 476–480.

Cakir, O. O., Toker, A., Ataseven, H., Demir, A., & Polat, H. (2017). The Importance of Liver-Fatty Acid Binding Protein in Diagnosis of Liver Damage in Patients with Acute Hepatitis, 17–21.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24958.9621>

Campbell, A. W. (2014). Autoimmunity and the gut. *Autoimmune Diseases*, *2014*.
<https://doi.org/10.1155/2014/152428>

Cano, L. Q., Lavery, D. N., & Bevan, C. L. (2013). Molecular and Cellular Endocrinology Mini-review : Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*, (February). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.01.023>

Chan, L., Wei, C., Li, W., Yang, C., Ratner, P., Pownall, H., ... Smith, L. C. (1985). Human Liver Fatty Acid Binding Protein cDNA and Amino Acid Sequence, *260*(29), 2629–2632.

Chandra, D., Choy, G., & Tang, D. (2007). Cytosolic Accumulation of HSP60 during Apoptosis with or without Apparent Mitochondrial Release. *J Biol Chem*, *282*(43), 31289–31301.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M702777200>

Chmurzyńska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *Journal of Applied Genetics*, 47(1), 39–48.

<https://doi.org/10.1007/BF03194597>

Cicione, C., Degirolamo, C., & Moschetta, A. (2012). REVIEW Emerging Role of Fibroblast Growth Factors 15/19 and 21 as Metabolic Integrators in the Liver.

<https://doi.org/10.1002/hep.25929>

Clevers, H. (2013). XThe intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274–284.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>

Colangelo, T., Polcaro, G., Ziccardi, P., Pucci, B., Muccillo, L., Galgani, M., ... Colantuoni, V. (2016). Proteomic screening identifies calreticulin as a MIR-27a direct target repressing MHC class I cell surface exposure in colorectal cancer. *Cell Death and Disease*, 7(2), e2120-11.

<https://doi.org/10.1038/cddis.2016.28>

Corsico, B., Cistola, D., Frieden, C., & Storch, J. (1998). The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(October), 12174–12178.

Córsico, B., Franchini, G. R., Hsu, K.-T., & Storch, J. (2005). Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal of Lipid Research*, 46(8), 1765–1772.

<https://doi.org/10.1194/jlr.M500140-JLR200>

Córsico, B., Liou, H. L., & Storch, J. (2004). The α -Helical Domain of Liver Fatty Acid Binding Protein Is Responsible for the Diffusion-Mediated Transfer of Fatty Acids to Phospholipid Membranes.

Biochemistry, 43(12), 3600–3607. <https://doi.org/10.1021/bi0357356>

Costes, M. M., Fellow, P., & Cerf-bensussan, N. (2015). The role of animal models in unravelling therapeutic targets in coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29,

437–450. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.007>

Cox, M. A., Lewis, K. O., & Oper, B. T. C. O. (1999). Measurement of Small Intestinal Permeability Markers , Lactulose , and Mannitol in Serum Results in Celiac Disease, 44(2), 402–406.

Croniger, C. M., Chakravarty, K., Olswang, Y., Cassuto, H., Reshef, L., & Hanson, R. W. (2002). Mini-Series : Modern Metabolic Concepts, 353–362.

- D'Aquila, T., Sirohi, D., Grabowski, J. M., Hedrick, V. E., Paul, L. N., Greenberg, A. S., ... Buhman, K. K. (2015). Characterization of the proteome of cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes after a dietary fat challenge. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126823>
- D'Errico, I., Salvatore, L., Murzilli, S., Lo Sasso, G., Latorre, D., Martelli, N., ... Moschetta, A. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1- (PGC1) is a metabolic regulator of intestinal epithelial cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(16), 6603–6608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016354108>
- Darimont, C, Gradoux, N., Persohn, E., Cumin, F., & De Pover, a. (2000). Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research*, *41*(1), 84–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627505>
- Darimont, Christian, & Gradoux, N. (1998). Differential Regulation of Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins in Human Intestinal Cell line (Caco-2): Role of Collagen, *447*, 441–447.
- De Gerónimo, E., Rodriguez Sawicki, L., Bottasso Arias, N., Franchini, G. R., Zamarreño, F., Costabel, M. D., ... Falomir Lockhart, L. J. (2014). IFABP portal region insertion during membrane interaction depends on phospholipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1841*(1), 141–150.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.011>
- Derikx, J., Vreugdenhil, A., Van den Neucker, A., Grootjans, J., van Bijnen, A., & Al., E. (2009). A Pilot Study on the Noninvasive Evaluation of Intestinal Damage in Celiac Disease Using I-FABP and L-FABP. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *43*(8), 727–733.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31819194b0>
- Dharmarajan, S., Newberry, E. P., Montenegro, G., Nalbantoglu, I., Jr, W. F., Kennedy, S., & Davidson, N. O. (2013). Liver fatty acid binding protein (L-Fabp) modifies intestinal fatty acid composition and adenoma formation in ApcMin/+ mice, *6*(10), 1026–1037.
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0120.Liver>
- Dubé, N., Delvin, E., Yotov, W., Garofalo, C., Bendayan, M., Veerkamp, J. H., ... Ht, C. (2001). Modulation of Intestinal and Liver Fatty Acid-Binding Proteins in Caco-2 Cells by Lipids , Hormones and Cytokines. *Journal of Cellular Biochemistry*, *81*, 613–620.

- Eastwood, G. L. (1977). Gastrointestinal Epithelial Renewal. *Gastroenterology*, 72(5), 962–975.
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(77\)80221-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(77)80221-7)
- Fasano, A., & Catassi, C. (2012). Celiac Disease, 2419–2426.
<https://doi.org/10.1056/NEJMcp1113994>
- Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). Review series PGC-1 coactivators : inducible regulators of energy metabolism in health and disease, 116(3), 615–622.
<https://doi.org/10.1172/JCI27794.PGC-1>
- Fisher, E., Weikert, C., Klapper, M., Lindner, I., Möhlig, M., Spranger, J., ... Döring, F. (2007). L-FABP T94A is associated with fasting triglycerides and LDL-cholesterol in women. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.03.002>
- Flower, D. R. (1993). Structural relationship of streptavidin to the calycin protein superfamily. *FEBS Letters*, 333(1–2), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80382-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80382-5)
- Franchini, G., Storch, J., & Corsico, B. (2008). THE INTEGRITY OF THE α -HELICAL DOMAIN OF INTESTINAL FATTY ACID BINDING PROTEIN IS ESSENTIAL FOR THE COLLISION-MEDIATED TRANSFER OF FATTY ACIDS TO PHOSPHOLIPID MEMBRANES. *Biochim Biophys Acta*, 1781(4), 192–199.
<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.01.005>.THE
- Fujita M, Fujii H, Kanda T, Sato E, Hatakeyama K, O. T. (1995). Molecular cloning , expression , and characterization of a human intestinal 15-kDa protein, 413.
- Furuhashi, M., & Hotamisligil, G. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.*, 7(6). <https://doi.org/10.1038/nrd2589>.Fatty
- Gagné, D., Groulx, J. F., Benoit, Y. D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P. H., & Beaulieu, J. F. (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 387–400.
<https://doi.org/10.1002/jcp.21963>
- Gajda, A. M., Zhou, Y. X., Agellon, L. B., Fried, S. K., Kodukula, S., Fortson, W., ... Storch, J. (2013). Direct Comparison of Mice Null for Liver or Intestinal Fatty Acid-binding Proteins Reveals Highly Divergent Phenotypic Responses to High Fat Feeding *, 288(42), 30330–30344.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.501676>

- Gajda AM, S. J. (2015). Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine, *93*, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.01.002>.The
- Galvagnion, C. (2017). The Role of Lipids Interacting with Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson ' s Disease. *Journal of Parkinson ' s Disease*, *7*, 433–450.
<https://doi.org/10.3233/JPD-171103>
- Gao, X., Sedgwick, T., Shi, Y. B., & Evans, T. (1998). Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(5), 2901–2911.
<https://doi.org/10.1128/MCB.18.5.2901>
- Gassler, N., Newrzella, D., Bohm, C., Lyer, S., Li, L., Sorgenfrei, O., ... Gretz, N. (2006). Molecular characterisation of non-absorptive and absorptive enterocytes in human small intestine. *Gut*, *55*, 1084–1089. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073262>
- Ghosh, J. C., Dohi, T., Kang, B. H., & Altieri, D. C. (2008). Hsp60 Regulation of Tumor Cell Apoptosis *, *283*(8), 5188–5194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705904200>
- Glover, L. E., Bowers, B. E., Saeedi, B., Ehrentraut, S. F., & Campbell, E. L. (2013). Control of creatine metabolism by HIF is an endogenous mechanism of barrier regulation in colitis, *110*(49), 1–6. [https://doi.org/10.1073/pnas.1302840110/-](https://doi.org/10.1073/pnas.1302840110/-/DCSupplemental)
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302840110
- Gordon, J. I., Smith, D. P., Strauss, A. W., & Alpers, D. H. (1982). Cloning of a Complementary Deoxyribonucleic Acid Encoding a Portion of Rat Intestinal Preapolipoprotein AIV Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, *21*(22), 5424–5431. <https://doi.org/10.1021/bi00265a007>
- Gregory, K. E., Winston, A. B., Yamamoto, H. S., Dawood, H. Y., Fashemi, T., Fichorova, R. N., & Marter, J. Van. (2014). Elevated Urinary iFABP Predicts Necrotizing Enterocolitis within Seven Days Prior to Clinical Onset. *J Pediatr*, *164*(6), 1486–1488.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.01.057>.Elevated
- Gülden, E., Märker, T., Kriebel, J., Kolb-bachofen, V., Burkart, V., & Habich, C. (2009). Heat shock protein 60 : Evidence for receptor-mediated induction of proinflammatory mediators during adipocyte differentiation. *FEBS Letters*, *583*(17), 2877–2881.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.049>

- Guo, L., Nakamura, K., Lynch, J., Opas, M., Olson, E. N., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2002). Cardiac-specific Expression of Calcineurin Reverses Embryonic Lethality in Calreticulin-deficient Mouse *, 277(52), 50776–50779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209900200>
- Gutierrez, E. D. (1995). Ontogenic regulation of spatial differentiation in the axis of normal and isografted small intestine. *American Physiological Society*, 500–511.
- Guzmán, C., Benet, M., Pisonero-Vaquero, S., Moya, M., García-Mediavilla, M. V., Martínez-Chantar, M. L., ... Jover, R. (2013). The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; And repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(4), 803–818. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.12.014>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(5), 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Hauerland, N. H., & Spener, F. (2004). Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Progress in Lipid Research*, 43(4), 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.05.001>
- Hebbachi, A. M., Knight, B. L., Wiggins, D., Patel, D. D., & Gibbons, G. F. (2008). Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Deficiency Abolishes the Response of Lipogenic Gene Expression to Re-feeding RESTORATION OF THE NORMAL RESPONSE BY ACTIVATION OF LIVER X RECEPTOR α *, 283(8), 4866–4876. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709471200>
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and Out of the ER : Protein Folding , Quality Control , Degradation , and Related Human Diseases. *Physiol Rev*, 87, 1377–1408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2006>.
- Ho, S., & Storch, J. (2001). Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281, 1106–1117.
- Hodge, R. G., & Ridley, A. J. (2016). Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(8), 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>
- Hofer, P., Boeszoermyeni, A., Jaeger, D., Feiler, U., Arthanari, H., Mayer, N., ... Preiss-Landl, K.

(2015). Fatty acid-binding proteins interact with comparative gene identification-58 linking lipolysis with lipid ligand shuttling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), 18438–18453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628958>

Hostetler, H. A., McIntosh, A. L., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Payne, H. R., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR α in cultured primary hepatocytes, 50, 1663–1675. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900058-JLR200>

Hsu, K. T., & Storch, J. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13317–13323. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13317>

Huang, H., McIntosh, A. L., Martin, G. G., Landrock, K. K., Landrock, D., Gupta, S., ... Schroeder, F. (2014). Structural and functional interaction of fatty acids with human liver fatty acid-binding protein (L-FABP) T94A variant. *FEBS Journal*, 281(9), 2266–2283. <https://doi.org/10.1111/febs.12780>

Huang, H., Starodub, O., McIntosh, A., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2002). Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29139–29151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202923200>

Huang, Y. S., Jie, N., Zhang, Y., Zou, K. J., & Weng, Y. (2018). shRNA - induced silencing of Ras - related C3 botulinum toxin substrate 1 inhibits the proliferation of colon cancer cells through upregulation of BAD and downregulation of cyclin D1, 1397–1408. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3345>

Hughes, M. L. R., Liu, B., Halls, M. L., Wagstaff, K. M., Patil, R., Velkov, T., ... Porter, C. J. H. (2015). Fatty acid-binding proteins 1 and 2 differentially modulate the activation of peroxisome proliferator-activated receptor α in a ligand-selective manner. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 13895–13906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605998>

Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Colby, G., ... Wade, J. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655), 505–509. <https://doi.org/10.1038/nature22366>.Architecture

Iena, F. M., & Lebeck, J. (2018). Implications of Aquaglyceroporin 7 in Energy Metabolism.

<https://doi.org/10.3390/ijms19010154>

- Li, C. M. M., & Tso, P. (2001). *Intestinal Lipid Metabolism*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1195-3>
- Ijpenberg, A., Jeannin, E., Wahli, W., & Desvergne, B. (1997). Polarity and Specific Sequence Requirements of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR)/Retinoid X Receptor Heterodimer Binding to DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 20108–20117. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.20108>
- Iseki, S., & Kondo, H. (1990). Light Microscopic Localization of Hepatic Fatty Acid Binding Protein mRNA in Jejunal Epithelia of Rats Using In Situ Hybridization , Autoradiographic Techniques '. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38, 111–115.
- Jenkins-kruchten, A. E., Bennaars-eiden, A., Ross, J. R., Shen, W., Kraemer, F. B., & Bernlohr, D. A. (2003). Fatty Acid-binding Protein-Hormone-sensitive Lipase Interaction, 278(48), 47636–47643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307680200>
- Jindal, S., Dudani, A. K., Singh, B., Harley, C. B., & Gupta, R. S. (1989). Primary Structure of a Human Mitochondrial Protein Homologous to the Bacterial and Plant Chaperonins and to the 65-Kilodalton Mycobacterial Antigen, 9(5), 2279–2283.
- Kelly, C., Bai, J., Liu, E., & Leffler, D. (2015). Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 148(6), 1175–1186. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.044>.Advances
- Kim, Y., Eom, S., Kim, K., Lee, Y., Choe, J., Hee, J., ... Jeoung, D. (2010). Transglutaminase II interacts with rac1 , regulates production of reactive oxygen species , expression of snail , secretion of Th2 cytokines and mediates in vitro and in vivo allergic inflammation, 47, 1010–1022. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.11.017>
- Kimura, R., Takahashi, N., Lin, S., Goto, T., Murota, K., Nakata, R., ... Kawada, T. (2013). DHA attenuates postprandial hyperlipidemia via activating PPAR α in intestinal epithelial cells. *Journal of Lipid Research*, 54(12), 3258–3268. <https://doi.org/10.1194/jlr.M034942>
- Kitzenberg, D., Colgan, S. P., & Glover, L. E. (2016). Creatine kinase in ischemic and inflammatory disorders. *Clinical and Translational Medicine*, 5(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0114-5>

- Koçak, E., Akbal, E., Köklü, S., & Adam, G. (2015). Evaluation of serum L-FABP levels in patients with acute pancreatitis, *21*(1), 39–43. <https://doi.org/10.5505/tjtes.2015.49879>
- Krupičková, S., Tučková, L., Flegelová, Z., Michalak, M., Walters, J. R. F., Whelan, A., ... Tlaskalová-Hogenová, H. (1999). Identification of common epitopes on gliadin, enterocytes, and calreticulin recognized by antigliadin antibodies of patients with coeliac disease. *Gut*, *44*(2), 168–173. <https://doi.org/10.1136/gut.44.2.168>
- Ku, C.-Y., Liu, Y.-H., Lin, H.-Y., Lu, S.-C., & Lin, J.-Y. (2016). Liver fatty acid-binding protein (L-FABP) promotes cellular angiogenesis and migration in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *7*(14), 18229–18246. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7571>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *227*, 680–685.
- Lagakos, W. S., Guan, X., Ho, S. Y., Sawicki, L. R., Corsico, B., Kodukula, S., ... Storch, J. (2013). Liver fatty acid-binding protein binds monoacylglycerol in vitro and in mouse liver cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(27), 19805–19815. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473579>
- Lasserre, J., Joubert-caron, R., Caron, M., & Hardouin, J. (2010). Organellar Protein Complexes of Caco-2 Human Cells Analyzed by Two-Dimensional Blue Native / SDS-PAGE and Mass Spectrometry research articles, 5093–5107.
- Lee, J. E., & Ge, K. (2014). Transcriptional and epigenetic regulation of PPAR γ expression during adipogenesis. *Cell and Bioscience*, *4*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-29>
- Lenaerts, K., Bouwman, F. G., Lamers, W. H., Renes, J., & Mariman, E. C. (2007). Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium, *14*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-91>
- Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C., & Fasano, A. (2017). Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity A Review, *318*(7), 647–656. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.9730>
- Levy, E., Ménard, D., Delvin, E., Montoudis, A., Beaulieu, J. F., Mailhot, G., ... Bendayan, M. (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochemistry and Cell Biology*, *132*(3), 351–367. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0608-y>

- Levy, E., Ménard, D., Delvin, E., Stan, S., Mitchell, G., Lambert, M., ... Seidman, E. (2001). The Polymorphism at Codon 54 of the FABP2 Gene Increases Fat Absorption in Human Intestinal Explants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39679–39684.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105713200>
- Li, J. N., Mahmoud, M. A., Han, W. F., Ripple, M., & Pizer, E. S. (2000). Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Participates in the Regulation of Fatty Acid Synthase Expression in Colorectal Neoplasia, *165*, 159–165. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5054>
- Lin, J., Zheng, S., Attie, A. D., Keller, M. P., Bernlohr, D. A., Blaner, W. S., ... Chen, A. (2018). Perilipin 5 and liver fatty acid binding protein function to restore quiescence in mouse hepatic stellate cells. *Journal of Lipid Research*, 59(3), 416–428. <https://doi.org/10.1194/jlr.M077487>
- Lu, Y., Weng, W., & Lee, H. (2015). Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology, *2015*.
<https://doi.org/10.1155/2015/526524>
- Lundin, B. K. E. A., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T. S., Fausa, O., ... Sollid, L. M. (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ(a1*0501,b1*0201) Restricted T Cells Isolated from the Small Intestinal Mucosa of Celiac Disease Patients, *178*, 187–196.
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., & Gumucio, D. L. (2002). cis Elements of the Villin Gene Control Expression in Restricted Domains of the Vertical (Crypt) and Horizontal (Duodenum , Cecum) Axes of the Intestine *, *277*(36), 33275–33283.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204935200>
- Malewiak, M. I., Bass, N. M., Griglio, S., & Ockner, R. K. (1988). Influence of genetic obesity and of fat-feeding on hepatic FABP concentration and activity. *International Journal of Obesity*, 12(6), 543—546. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/3235271>
- Marafini, I., Di Sabatino, A., Zorzi, F., Monteleone, I., Sedda, S., Cupi, M. L., ... Biancheri, P. (2014). Serum regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of mucosal enteropathies. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 40, 974–981. <https://doi.org/10.1111/apt.12920>
- Marcelin, G., Jo, Y., Li, X., Schwartz, G. J., Zhang, Y., Dun, N. J., ... Lyu, R. (2014). Central action of FGF19 reduces hypothalamic AGRP / NPY neuron activity and improves glucose metabolism, *3*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.002>
- Massaeli, H., Jalali, S., Viswanathan, D., & Mesaeli, N. (2014). Loss of calreticulin function

decreases NF κ B activity by stabilizing I κ B protein. *BBA - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2385–2393. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.06.017>

Meresse, B., Malamut, G., & Cerf-bensussan, N. (2012). Review Celiac Disease : An Immunological Jigsaw. *Immunity*, 36(6), 907–919. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.006>

Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K., ... Michalak, M. (1999). Calreticulin Is Essential for Cardiac Development, 144(5), 857–868.

Mohamed, B., Feighery, C., Coates, C., O'Shea, U., Delaney, D., O'Briain, S., ... Abuzakouk, M. (2008). The Absence of a Mucosal Lesion on Standard Histological Examination Does Not Exclude Diagnosis of Celiac Disease. *Dig Dis Sci*, 53, 52–61. <https://doi.org/10.1007/s10620-007-9821-5>

Mohapatra, S. K., Guri, A. J., Climent, M., Vives, C., Carbo, A., Horne, W. T., & Bassaganya-riera, J. (2010). Immunoregulatory Actions of Epithelial Cell PPAR α at the Colonic Mucosa of Mice with Experimental Inflammatory Bowel Disease, 5(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010215>

Montoudis, A., Seidman, E., Boudreau, F., Beaulieu, J.-F., Menard, D., Elchebly, M., ... Levy, E. (2008). Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion β -oxidation and cholesterol uptake. *Journal of Lipid Research*, 49(5), 961–972. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700363-JLR200>

Mooradian, A. D., Haas, M. J., & Wong, N. C. W. (2004). Expression in Diabetes, 53(5), 513–520.

Murphy, E. J., Edmondson, R. D., Russell, D. H., Colles, S., & Schroeder, F. (1999). Isolation and characterization of two distinct forms of liver fatty acid binding protein from the rat. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(3), 413–425. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00150-7)

Myant, K. B., Cammareri, P., McGhee, E. J., Ridgway, R. A., Huels, D. J., Cordero, J. B., ... Sansom, O. J. (2013). ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell*, 12(6), 761–773. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.006>

Myant, K. B., Scopelliti, A., Haque, S., Vidal, M., Sansom, O. J., & Cordero, J. B. (2013). Rac1 drives intestinal stem cell proliferation and regeneration, 2973–2977.

- Naruse, H., Ishii, J., Takahashi, H., Kitagawa, F., Nishimura, H., Kawai, H., ... Ozaki, Y. (2018). Predicting acute kidney injury using urinary liver-type fatty-acid binding protein and serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients treated at medical cardiac intensive care units, 1–10.
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R. W., & Abumrad, N. A. (2007). CD36 Is Important for Fatty Acid and Cholesterol Uptake by the Proximal but Not Distal Intestine *, 282(27), 19493–19501. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703330200>
- Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agostino, I., D'Onofrio, M., Brandi, R., Arisi, I., ... Felsani, A. (2011). Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *Journal of Cellular Physiology*, 226(6), 1531–1543. <https://doi.org/10.1002/jcp.22487>
- Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo C, et al. (2006). CD36 Is Important for Chylomicron Formation and Secretion and May Mediate Cholesterol Uptake in the Proximal Intestine. *Gastroenterology*, 131(4), 1197–1207.
- Neeli, I., Siddiqi, S. A., Siddiqi, S., Mahan, J., Lagakos, W. S., Binas, B., ... Mansbach, C. M. (2007). Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 17974–17984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610765200>
- Not, T., Ziberna, F., Vatta, S., Quaglia, S., Martelossi, S., Villanacci, V., ... Ventura, A. (2011). Cryptic genetic gluten intolerance revealed by intestinal antitransglutaminase antibodies and response to gluten-free diet. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.232900>
- Ntambi, J. M. (1995). The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Progress in Lipid Research*, 34(2), 139–150.
- Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, H. W. (1972). A Binding Protein for Fatty Acids in Cytosol of Intestinal Mucosa, Liver, Myocardium, and Other Tissues. *Review of Religious Research*, 41(1967), 65–79. <https://doi.org/10.2307/3512427>
- Ohkuro, M., Kim, J. D., Kuboi, Y., Hayashi, Y., Mizukami, H., Kobayashi-Kuramochi, H., ... Fukamizu, A. (2018). Calreticulin and integrin alpha dissociation induces anti-inflammatory programming in animal models of inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04420-4>

- Paolella, G., Caputo, I., Marabotti, A., Lepretti, M., Salzano, A. M., Scaloni, A., ... Esposito, C. (2013). Celiac anti-type 2 transglutaminase antibodies induce phosphoproteome modification in intestinal epithelial caco-2 cells. *PLoS ONE*, *8*(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084403>
- Pelsters, M. M. A. L., Hermens, W. T., & Glatz, J. F. C. (2005). Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury, *352*, 15–35. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.09.001>
- Pelsters, M. M. A. L., Namiot, Z., Kisielewski, W., Namiot, A., Januszkiewicz, M., Hermens, W. T., & Glatz, J. F. C. (2003). Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clinical Biochemistry*, *36*(7), 529–535.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00096-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00096-1)
- Pineda Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D., Fruchart, J., & Staels, B. (2002). Characterization of the Human PPAR α Promoter: Identification of a Functional Nuclear Receptor Response Element. *Molecular Endocrinology*, *16*(5), 1013–1028.
- Poirier H, Niot I, Degrace P, Monnot M, Bernard A, B. P. (1997). Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *Am J Physiol*, *273*, 289–295.
- Potts, A., Uchida, A., Deja, S., Berglund, E. D., Kucejova, B., Joao, A., ... Burgess, S. C. (2018). No Title, *1*(214).
- Prows, D. R., Murphy, E. J., & Schroeder, F. (1995). Intestinal and liver fatty acid binding proteins differentially affect fatty acid uptake and esterification in L-cells. *Lipids*, *30*(10), 907–910.
<https://doi.org/10.1007/BF02537481>
- Rath, E., Berger, E., Messlik, A., Nunes, T., Liu, B., Kim, S., ... Heller, D. (2012). Induction of dsRNA-activated protein kinase links mitochondrial unfolded protein response to the pathogenesis of intestinal inflammation. *Gut*, *61*(9), 1269–1278. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300767.Induction>
- Reisher, S. R., Hughesti, T. E., Ordovast, J. M., Schaefert, E. J., & Feinstein, S. I. (1993). Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2, *90*(June), 5757–5761.
- Reisinger, K., Elst, M., Derikx, J., Nikkels, P., de Vries, B., Adriaanse, M., ... Wolfs, T. (2014). Intestinal fatty acid-binding protein: a possible marker for gut maturation. *Pediatric Research*,

76(3), 261–268. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.89>

- Richieri, G. V., Ogata, R. T., & Kleinfeld, A. M. (1994). Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *Journal of Biological Chemistry*, 269(39), 23918–23930.
- Robine, S., Huet, C., Moll, R., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E., Zweibaum, A., & Louvard, D. (1985). Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(December), 8488–8492.
- Rodriguez Sawicki, L., Bottasso Arias, N. M., Scaglia, N., Falomir Lockhart, L. J., Franchini, G. R., Storch, J., & Córscico, B. (2017). FABP1 knockdown in human enterocytes impairs proliferation and alters lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(12), 1587–1594. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.006>
- Rolland, T., Tasan, M., Benoit, C., & Al., E. (2014). A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*, 159(5), 1212–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.050.A>
- Rosenberg, I. (2005). *Protein Analysis and Purification*. Birkhauser.
- Rostom, A., Murray, J. A., & Kagnoff, M. (2006). American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 131, 1981–2002. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.004>
- Rottman, J. N., & Gordon, J. I. (1993). Comparison of the Patterns of Expression of Rat Intestinal Fatty Acid Binding Protein / Human Growth Hormone Fusion Genes in Cultured Intestinal Epithelial Cell Lines and in the Gut Epithelium of Transgenic Mice *, 268(16), 11994–12002.
- Rubin, D. C., Swietlickis, E., Rothqt, A., & Tll, I. G. (1992). Use of Fetal Intestinal Isografts from Normal and Transgenic Mice to Study the Programming of Positional Information Along the Duodenal-to-Colonic Axis *, 267, 15122–15133.
- Sabatino, A. Di, Lenti, M. V., & Corazza, G. R. (2014). Malabsorption and malabsorption tests : Do they still matter? *Digestive and Liver Disease*, 46(5), 389–390. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.01.163>
- Sahni, N., Yi, S., Taipale, M., Bass, J. I. F., Yang, F., Peng, J., ... Walhout, A. J. M. (2016). Widespread Macromolecular Interaction Perturbations in Human Genetic Disorders. *Cell*, 161(3), 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.013>. Widespread

- Sales Gil, R., & Vagnarelli, P. (2018). Ki-67 : More Hidden behind a ‘ Classic Proliferation Marker .’ *Trends in Biochemical Sciences*, *1486*, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.004>
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., & Jones, D. P. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3 , Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells, *18*(8), 2040–2048.
- Sambuy, Y., Angelis, I. De, Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier : in £ uence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, 1–26.
- Sánchez, D., Palová-Jelínková, L., Felsberg, J., Šimšová, M., Pekáriková, A., Pecharová, B., ... Tučková, L. (2008). Anti-calreticulin immunoglobulin A (IgA) antibodies in refractory coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *153*(3), 351–359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03701.x>
- Sanderson IR, & Walker WA. (2000). *Development of the gastrointestinal tract*.
- Sato, Y., Kameya, M., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2011). Detecting weak protein – protein interactions by modified far-western blotting. *JBIOSC*, *112*(3), 304–307. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.05.011>
- Schneeberger, K., Roth, S., Nieuwenhuis, E. E. S., & Middendorp, S. (2018). Intestinal epithelial cell polarity defects in disease: lessons from microvillus inclusion disease. *Disease Models & Mechanisms*, *11*(2), dmm031088. <https://doi.org/10.1109/TNS.1982.4335914>
- Seimandi, M., Lemaire, G., Pillon, A., Perrin, A., Carlván, I., Voegel, J. J., ... Balaguer, P. (2005). Differential responses of PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical Biochemistry*, *344*(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.06.010>
- Senger, S., Sapone, A., Fiorentino, M. R., Mazzarella, G., Lauwers, G. Y., & Fasano, A. (2015). Celiac Disease Histopathology Recapitulates Hedgehog Downregulation , Consistent with Wound Healing Processes Activation, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144634>
- Shalimar, Vishnubhatla, S., Siddhartha Datta, G., Subrat, K., & Govind, K. (2013). Mechanism of Villous Atrophy in Celiac Disease. *Arch Pathol Lab Med*, *137*, 1262–1269. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0354-OA>

- Shioda, N., Yabuki, Y., Kobayashi, Y., Onozato, M., Owada, Y., & Fukunaga, K. (2014). FABP3 Protein Promotes α -Synuclein Oligomerization Associated with 1-Methyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced, *289*(27), 18957–18965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527341>
- Simard, J. R., Pillai, B. K., & Hamilton, J. A. (2008). Fatty Acid Flip-Flop in a Model Membrane Is Faster Than Desorption into the Aqueous Phase, 9081–9089.
- Simon, T. C., Roth, K. A., & Gordon, J. I. (1993). Use of transgenic mice to map cisacting elements in the liver fatty acid-binding protein gene (*Fabp1*) that regulate its cell lineage-specific, differentiation-dependent, and spatial patterns of expression in the gut epithelium and in the liver acinus. *J Biol Chem*, *268*, 18345–18358.
- Simula, M. P., Cannizzaro, R., Canzonieri, V., Pavan, A., Maiero, S., Toffoli, G., & Re, V. De. (2010). PPAR Signaling Pathway and Cancer-Related Proteins Are Involved in Celiac Disease-Associated Tissue Damage. *Mol Med*, *16*(5–6), 199–209. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00173>
- Smathers, R. L., & Petersen, D. R. (2011). Human Genomics_2011_5_170.pdf, *5*(3), 170–191.
- Smith, A. J., Sanders, M. A., Juhlmann, B. E., Hertzog, A. V., & Bernlohr, D. A. (2008). Mapping of the Hormone-sensitive Lipase Binding Site on the Adipocyte Fatty Acid-binding Protein (AFABP) IDENTIFICATION OF THE CHARGE QUARTET ON THE AFABP / aP2 HELIX-TURN-HELIX, *283*(48), 33536–33543. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806732200>
- Sollid, L. M., & Jabri, B. (2013). Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*, *13*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nri3407>.Triggers
- Spitsberg, V. L., Matitashvili, E., & Gorewit, R. C. (1995). Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland, *878*, 872–878.
- Stahl, A., Hirsch, D. J., Gimeno, R. E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, N., ... Lodish, H. F. (1999). Identification of the Major Intestinal Fatty Acid Transport Protein, *4*, 299–308.
- Storch, J., & Corsico, B. (2008). The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid-Binding Proteins. *Annual Review of Nutrition*, *28*(1), 73–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093710>
- Storch, J., Zhou, Y. X., & Lagakos, W. S. (2008). Metabolism of apical versus basolateral sn -2-

monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine, *49*.

<https://doi.org/10.1194/jlr.M800116-JLR200>

Stremmel, W., Pohl, J., Ring, A., & Herrmann, T. (2001). A New Concept of Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Long-Chain Fatty Acids, *36*(9), 981–989.

<https://doi.org/10.1007/s11745-001-0809-2>

Stremmel, W., Sta, S., Wannho, A., & Pathil, A. (2017). The overall fatty acid absorption controlled by basolateral chylomicron excretion under regulation of p-JNK1, *1862*(June), 917–928.

<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.05.013>

Su X and Abumrad NA. (2009). Cellular Fatty Acid Uptake: A Pathway Under Construction. *Trends Endocrinol Metab.*, *20*(2), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.001>. Cellular

Sweetser, D. A., Hautt, S. M., Hoppe, P. C., Birkenmeier, E. H., Gordon, J. I., Zechner, R., & Breslow, J. (1988). Transgenic mice containing intestinal fatty acid-binding protein-human growth hormone fusion genes exhibit correct regional and cell-specific expression of the reporter gene in their small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(24), 9611–9615. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9611>

Sweetser, D., Birkenmeier, H., Klisak, I. J., Zollman, S., & Gordonavh, I. (1987). The Human and Rodent Intestinal Fatty Acid Binding Protein Genes, *262*(33), 16060–16071.

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-cepas, J., ... Mering, C. Von. (2019). STRING v11 : protein – protein association networks with increased coverage , supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *47*(November 2018), 607–613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Tan, N.-S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., ... Noy, N. (2002). Selective Cooperation between Fatty Acid Binding Proteins and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Regulating Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(14), 5114–5127. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.17.6318.2002>

Tang, H., Li, J., Liu, X., Wang, G., Luo, M., & Deng, H. (2016). Down-regulation of HSP60 Suppresses the Proliferation of Glioblastoma Cells via the ROS / AMPK / mTOR Pathway. *Nature Publishing Group*, (February), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep28388>

Team, R. core. (2017). R: A language and environment for statistical computing. Retrieved from

<http://www.r-project.org/>

- Tetteh, P. W., Basak, O., Henner, F., Es, J. H. Van, Oudenaarden, V., Clevers, H., ... Begthel, H. (2016). Replacement of Lost Lgr5- Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Article Replacement of Lost Lgr5- Positive Stem Cells through Plasticity of Their Enterocyte-Lineage Daughters. *Stem Cell*, *18*(2), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.001>
- Thompson, B. R., Mazurkiewicz-mun, A. M., Suttles, J., Carter-su, C., & Bernlohr, D. A. (2009). Interaction of Adipocyte Fatty Acid-binding Protein (AFABP) and JAK2, *284*(20), 13473–13480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900075200>
- Thompson, J., Ory, J., Reese-Wagoner, A., & Banaszak, L. (1999). The liver fatty acid binding protein--comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Molecular Cell Biochemistry*, *February*(192), 9–16.
- Thumser, A. E. A., & Storch, J. (2000). Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *Journal of Lipid Research*, *41*(4), 647–656. Retrieved from <http://www.jlr.org/content/41/4/647.abstract>
- Trotter, P. J., & Storch, J. (1991). Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *Journal of Lipid Research*, *32*, 293–304.
- Trotter, P. J., & Storchq, J. (1993). Fatty Acid Esterification during Differentiation of the Human Intestinal Cell Line Caco-2 ", *268*(14).
- Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Castillejo, G., Concha, E. G. De, & Almeida, R. C. De. (2012). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *43*(12), 1193–1201. <https://doi.org/10.1038/ng.998>.Dense
- Tsai, Y., Yang, M., Huang, C., Chang, S., Chen, P., Liu, C., ... Wu, K. (2009). Interaction between HSP60 and b -catenin promotes metastasis, *30*(6), 1049–1057. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp087>
- Tye-din, J. A., Galipeau, H. J., & Agardh, D. (2018). Celiac Disease : A Review of Current Concepts in Pathogenesis , Prevention , and Novel Therapies, *6*(November), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00350>

- Vassileva, G., Huwyler, L., Poirier, K., Agellon, L. B., & Toth, M. J. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB*, *14*, 2040–2046.
- Veerkamp, J. H., Maatman, R. G. H. J., & Fabp, D. E. (1995). Pergamon THEIR ACID-BINDING AND PROTEINS : STRUCTURE GENES Lipid-binding , -transfer or -exchange proteins are present in intra- and extracellular fluids of all organisms . They play a role in the transport or targeting of lipids in the cell or in the pla, *34(I)*, 17–52.
- Vreugdenhil, A., Wolters, V., Adriaanse, M., Van den Neucker, A., van Bijnen, A., & et al. (2011). Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children, *46*, 1435–1441. <https://doi.org/10.3109/00365521.2011.627447>
- Wang, G., Bonkovsky, H. L., de Lemos, A., & Burczynski, F. J. (2015). Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *Journal of Lipid Research*, *56(12)*, 2238–2247. <https://doi.org/10.1194/jlr.R056705>
- Wang, W. A., Liu, W. X., Durnaoglu, S., Lee, S. K., Lian, J., Lehner, R., ... Michalak, M. (2017). Loss of Calreticulin Uncovers a Critical Role for Calcium in Regulating Cellular Lipid Homeostasis. *Scientific Reports*, *7(1)*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05734-x>
- Wiercinska-drapalo, A., Jaroszewicz, J., Siwak, E., Pogorzelska, J., & Prokopowicz, D. (2008). Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis, *147*, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.12.002>
- Williams, J. M., Duckworth, C. A., Vowell, K., Burkitt, M. D., & Pritchard, D. M. (2016). Intestinal Preparation Techniques for Histological Analysis in the Mouse, *6(June)*, 148–168. <https://doi.org/10.1002/cpmo.2>
- Wolfrum, C, Borrmann, C. M., Borchers, T., & Spener, F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98(5)*, 2323–2328. <https://doi.org/10.1073/pnas.051619898>
- Wolfrum, Christian, Buhlmann, C., Rolf, B., Borchers, T., & Spener, F. (1999). Variation of liver-type fatty acid binding protein content in the human hepatoma cell line HepG2 by peroxisome proliferators and antisense RNA affects the rate of fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1437(2)*, 194–201. <https://doi.org/10.1016/S1388->

1981(99)00008-6

- Wood, S. M., Gill, A. J., Brodsky, A. S., & Lu, S. (2017). Fatty acid binding protein 1 is preferentially lost in microsatellite instable colorectal carcinomas and is immune modulated via the interferon γ pathway. *Mod Pathol*, *30*(1), 123–133.
<https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.170>.Fatty
- Wright, N. A., & Irwin, M. (1982). The kinetics of villus cell populations in the mouse small intestine I. Normal villi : the steady state requirement, 595–609.
- Xanthoudakis, S., Roy, S., Rasper, D., Hennessey, T., Aubin, Y., Cassady, R., ... Nicholson, D. W. (1999). Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis, *18*(8), 2049–2056.
- Xu, H., Lambert, M., Montana, V., Parks, D., Blanchard, S., Brown, P., ... Milburn, M. (1999). Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator–Activated Receptors. *Molecular Cell*, *3*, 397–403. <https://doi.org/10.1007/s00044-008-9102-7>
- Yamamoto, T., Noiri, E., Ono, Y., Doi, K., & Negishi, K. (2007). Renal L-Type Fatty Acid – Binding Protein in Acute Ischemic Injury, 2894–2902.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2007010097>
- Yan, J., Gong, Y., Wang, G., Gong, Y., & Burczynski, F. J. (2010). Regulation of liver fatty acid binding protein expression by clofibrate in hepatoma cells, *967*, 957–967.
<https://doi.org/10.1139/O10-151>
- Yi, S.-J., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2009). Transglutaminase 2 Regulates the GTPase-activating Activity of Bcr *, *284*(51), 35645–35651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062240>
- Zamarreño, F., Herrera, F. E., Córscico, B., & Costabel, M. D. (2012). Similar structures but different mechanisms: Prediction of FABPs-membrane interaction by electrostatic calculation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1818*(7), 1691–1697.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.03.003>
- Zhang, D., Sun, L., Zhu, H., Wang, L., Wu, W., Xie, J., & Gu, J. (2012). Neurochemistry International Microglial LOX-1 reacts with extracellular HSP60 to bridge neuroinflammation and neurotoxicity. *Neurochemistry International*, *61*(7), 1021–1035.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.07.019>

Zhu, C., Chen, Z., & Jiang, Z. (2016). Expression, distribution and role of aquaporin water channels in human and animal stomach and intestines. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091399>

A Sci-hub: por permitirme leer cuando no era de acceso abierto.

Anexos

Anexo 1.

LANAIS- PROEM

Muestras: **Bandas gel 1 y 2. Celulas CACO-2**

Muestra 120

Tratamiento de la muestra:

Se procesa todo el material de cada una de las bandas del gel provistas por el usuario. Como controles se procesan una banda de gel correspondiente a BSA y un blanco. Se digieren “in gel” utilizando tripsina como enzima proteolítica, empleándose 20 ul de una solución de tripsina de 25 ng/ul.

El extractivo de cada una de las muestras se somete a análisis en el espectrómetro de Masas 4800 MALDI TOF TOF *plus* de ABI.

Los datos se obtienen primeramente en modo reflectrón y de ser necesario posteriormente se realiza la fragmentación, obteniéndose los espectros MS/MS, de las señales más importantes.

Se aplica el programa Mascot PMF para el estudio de los digeridos completos y el programa Mascot MSMS para el análisis de la fragmentación.

Bases de datos utilizadas “nr/swissprot” del servidor público de MASCOT ([www.matrixscience](http://www.matrixscience.com)).

Resultados MASCOT

MUESTRA	PROTEINA IDENTIFICADA
1	60 kDa heat shock protein (Homo sapiens) – CH60_HUMAN
2	Calreticulin (Homo sapiens) 48 kDa – CALR_HUMAN

“Muestra 1”

El estudio de las masas del espectro obtenido en modo reflectrón permite identificar la proteína “**60 kDa heat shock protein**” de *Homo sapiens* - . Por otro lado el análisis de los resultados de la fragmentación MSMS de las señales más importantes permite confirmar dicha identificación.

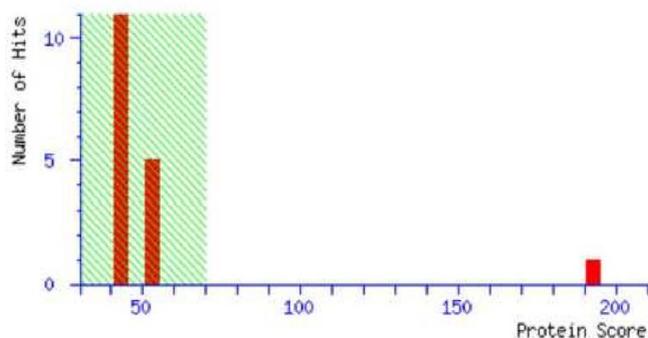
Resultado MASCOT PMF

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : SL
Email : slinskens@yahoo.com
Search title : Project: Lanais, Spot Set: Lanais\Noviembre 2013, Label: C2, Spot Id: 98597,
MS data file : \\Ak297\Documents\Datos\M120\pmf_C2_138332779001.txt
Database : SwissProt 2013_10 (541561 sequences; 192480382 residues)
Timestamp : 1 Nov 2013 at 17:46:05 GMT
Top Score : 193 for **CH60_HUMAN**, 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
Significance threshold $p <$ Max. number of hits
Preferred taxonomy

1. [CH60_HUMAN](#) **Mass:** 61016 **Score:** 193 **Expect:** 2.7e-14 **Matches:** 19
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2

COBERTURA

Protein sequence coverage: 46%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MLRLPTVFRQ MRPVSRVLAP HLTRAYAKDV KFGADARALM LQGVDLLADA
51 VAVTMGPKGR TVIIEQSWGSPK.V PKVTKDGVTV AKSIDLKDKY KNIGAKLVQD
101 VANNTNEEAGDGTTTATVLA RSIAKEGFEK ISKGANPVEI RRGVMLAVDA
151 VIAELKKQSK PVTTPBEIAQ VATISANGDK EIGNIISDAM KKVGRKGVIT
201 VKDGKTLNDE LEIEGMKPD RGYISPYFIN TSKGQKCEFQ DAYVLLSEKK
251 ISSIQSIVPA LEIANAHRKP LVIIAEDVDG EALSTLVLNR LKVGLQVVAV
301 KAPGFGDNRK NQLKDMAIAT GGAVFGEEGL TLNLEDVQPH DLGKVGEVIV
351 TKDDAMLLKG KGDKAQIEKR IQEIIQLDV TTSEYEKEKL NERLAKLSDG
401 VAVLKVGGTS DVEVNEKKDR VTDALNATRA AVEEGIVLGG GCALLRCIPA
451 LDSLTPANED QKIGIEIIKR TLKIPAMTIA KNAGVEGSLI VEKIMQSSSE
501 VGYDAMAGDF VNMVEKGIID PTKVVRTALL DAAGVASLLT TAEVVVTEIP
551 KEEKDPGMGA MGGMGGGMGG GMF

```

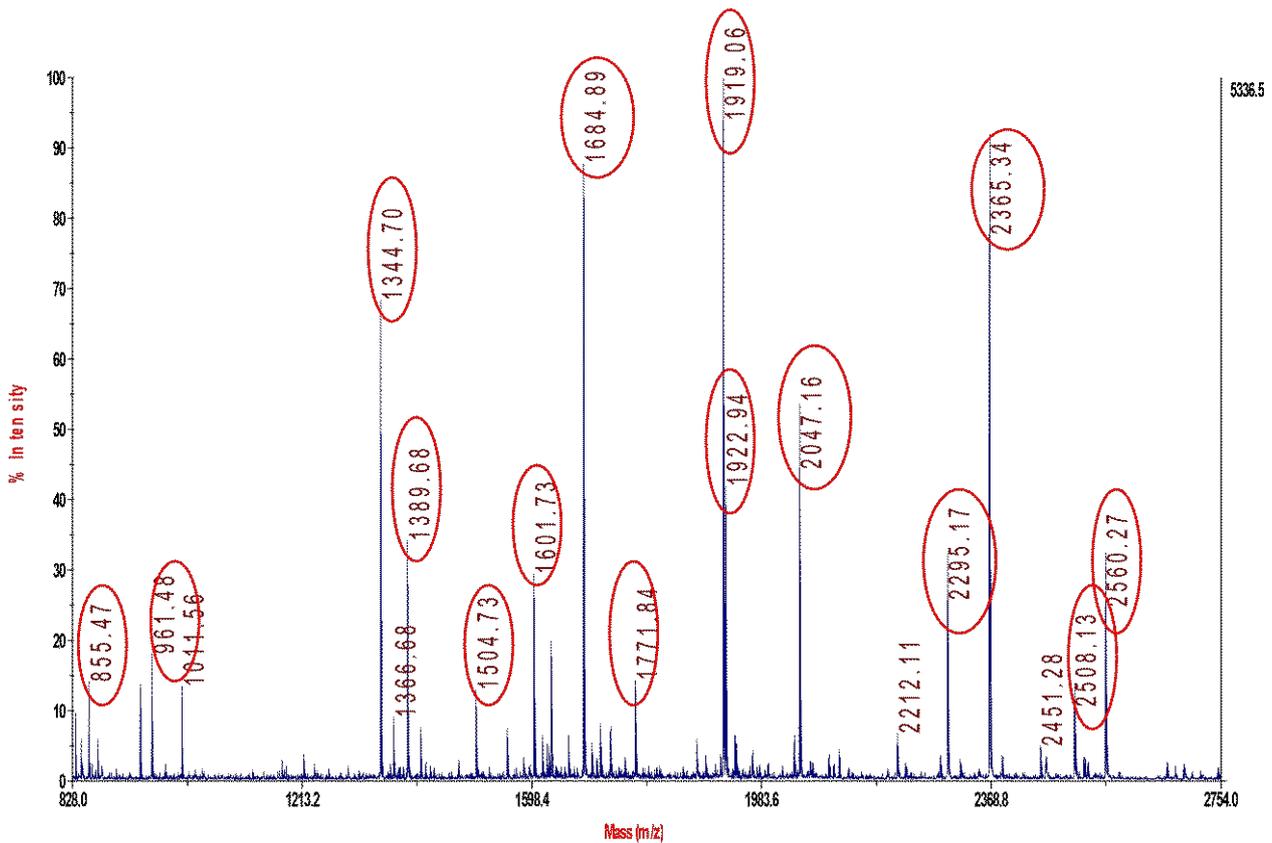
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
61 - 72	1344.6956	1343.6883	1343.7085	-15.0	0	R.TVIIEQSWGSPK.V
97 - 121	2560.2720	2559.2647	2559.2413	9.17	0	K.LVQDVANNTNEEAGDGT TTATVLA.R.S
134 - 141	855.4698	854.4625	854.4610	1.77	0	K.GANPVEI R.R
181 - 195	1630.8898	1629.8825	1629.8872	-2.86	2	K.EIGNIISDAM KKVGR.K
206 - 218	1504.7311	1503.7238	1503.7490	-16.8	0	K.TLNDELEIEG MK.F
206 - 221	1922.9390	1921.9317	1921.9455	-7.17	1	K.TLNDELEIEG MK FDR .G
206 - 221	1938.9329	1937.9256	1937.9404	-7.63	1	K.TLNDELEIEG MK FDR .G + Oxidation (M)
222 - 233	1389.6792	1388.6719	1388.6976	-18.5	0	R.GYISPYFIN TSK.G
237 - 249	1601.7313	1600.7240	1600.7443	-12.7	0	K.CEPQDAYVLLSEK .K + Carbamidomethyl (C)
250 - 268	2047.1578	2046.1505	2046.1585	-3.91	1	K.KISSIQSIVPA LEIANHR.K
251 - 268	1919.0540	1918.0467	1918.0636	-8.78	0	K.ISSIQSIVPA LEIANHR.K
269 - 290	2365.3408	2364.3335	2364.3264	3.01	0	R.KPLVIIAEDVDGEALSTLVLNR .L
302 - 310	961.4825	960.4752	960.4777	-2.62	1	K.APGFGDNRK .N
315 - 344	3097.5940	3096.5867	3096.5074	25.6	0	K.DMAIATGGAVFGEGLTLNLEDVQPHDLGK .V
371 - 389	2295.1638	2294.1565	2294.1529	1.58	1	R.IQEIIQLDVT TTSEYEKEK.L
430 - 446	1684.8856	1683.8783	1683.8978	-11.6	0	R.AAVEEGIVLGGG CALLR.C + Carbamidomethyl (C)
447 - 462	1771.8365	1770.8292	1770.8458	-9.36	0	R.CIPALDSLTPANEDQK .I + Carbamidomethyl (C)
463 - 470	941.6091	940.6019	940.6069	-5.38	1	K.IGIEI IKR.T
494 - 516	2508.1235	2507.1162	2507.1018	5.74	0	K.IMQSSSEVGYDAMAGDFVNMVEK .G

ANALISIS MSMS

1. [CH60 HUMAN](#) Mass: 61016 Score: 480 Matches: 5(5) Sequences: 5(5)
 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
✓ 5	1344.6956	1343.6883	1343.7085	-0.0202	0	97	9.5e-07	1	U	R.TVIEQSWGSPK.V
✓ 11	1684.8856	1683.8783	1683.8978	-0.0195	0	86	9.1e-06	1	U	R.AAVEGIVLGGGCALLR.C + Carbamidomethyl (C)
✓ 14	1919.0540	1918.0467	1918.0636	-0.0168	0	94	1.5e-06	1	U	K.ISSIQSIVPALEIANAHR.K
✓ 18	2047.1578	2046.1505	2046.1585	-0.0080	1	99	4.3e-07	1	U	K.KISSIQSIVPALEIANAHR.K
✓ 22	2365.3408	2364.3335	2364.3264	0.0071	0	104	1.2e-07	1		R.KPLVIAEDVDGEALSTLVLNR.L

4700 Reflector Spec #1[BP = 1920.1, 5336]



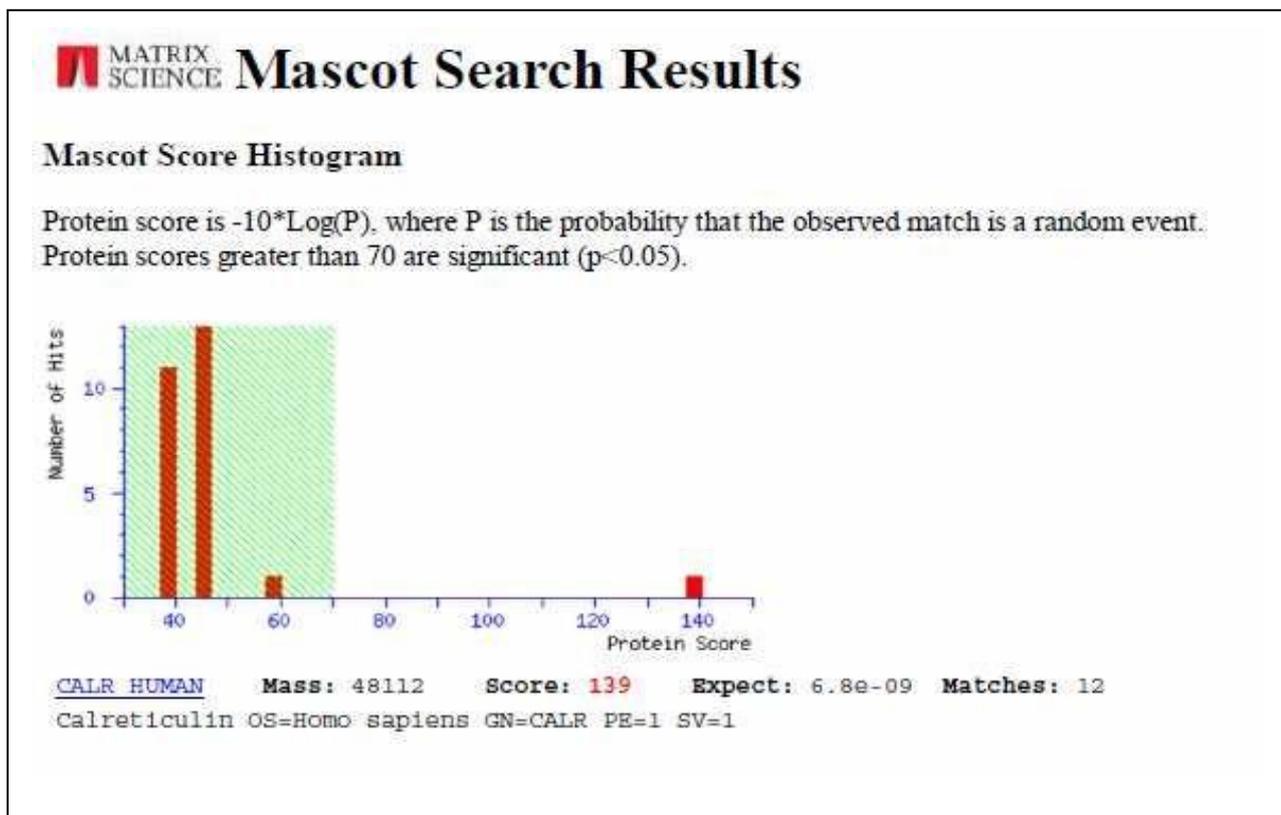
Espectro MS del digerido triptico de la muestra 1 En circulo las señales correspondientes a 60 kDa Heat Shock protein

[Empty box for additional notes or data]

“Muestra 2”

El estudio de las masas del espectro obtenido en modo reflectrón permite identificar la proteína “**Calreticulin**” de *Homo sapiens*. Por otro lado el análisis de los resultados de la fragmentación MSMS de las señales más importantes permite confirmar dicha identificación.

Resultado MASCOT PMF



COBERTURA

Protein sequence coverage: 44%

Matched peptides shown in **bold red**.

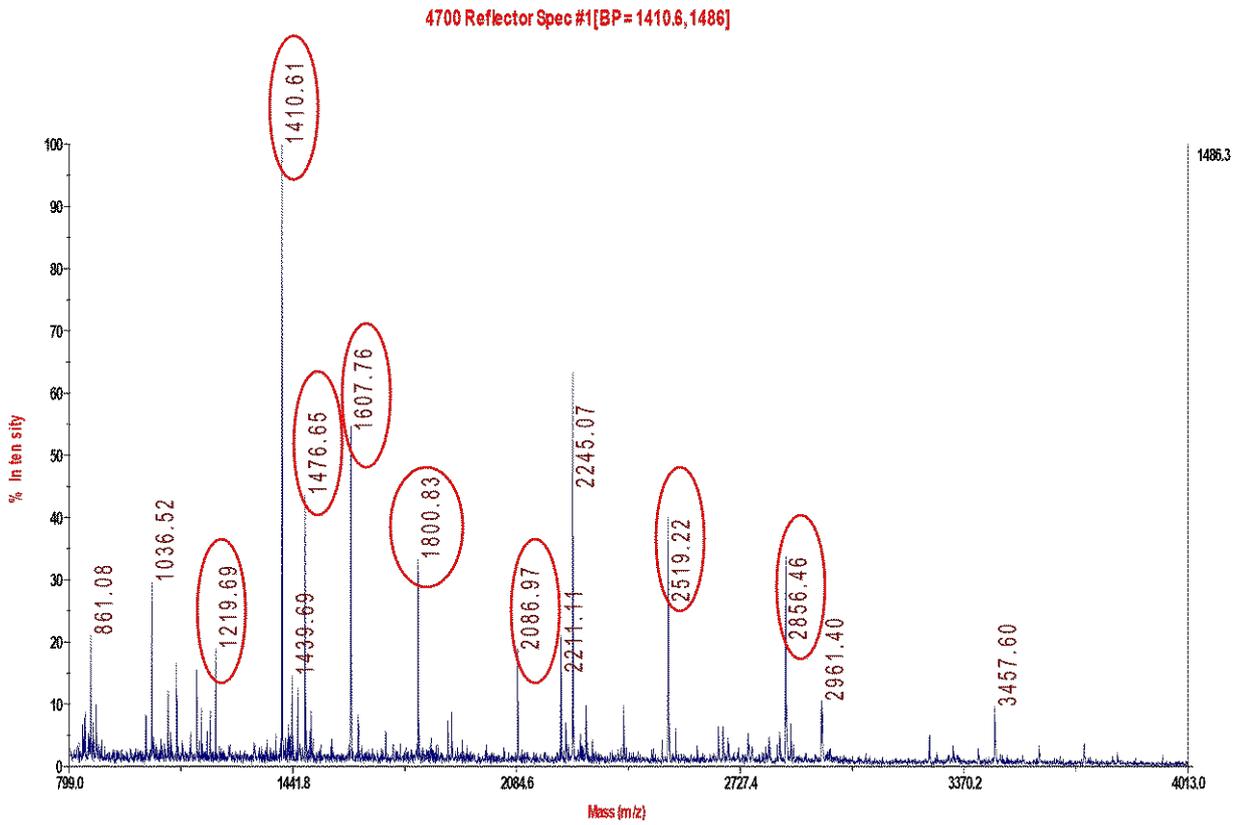
```

1  MLLSVPLLLG LLGLAVAEPV VYFKEQFLDG DGWTSRWIES KHKSDFGKFFV
51 LSSGKFYGDE EKDKGLQTSQ DARFYALSAS FEPFSNKGQT LVVQFTVKHE
101 QNIDCGGGYV KLFPNSLDQT DMHGDSEYNI MFGPDICGPG TKKVHVIIFY
151 KGKQVNLINKD IRCKDDEPTH LYTLIVRPDN TYEVKIDNSQ VESGSLEDDW
201 DFLPPKIKD PDASKPEDWD ERAKIDDPD SKPEDWDKPE HIPDPDAK
251 EDWDEEMDGE WEPPVIQNP YKGEWKPRQI DNPDYKGTWI HPEIDNPEYS
301 PDPSIYAYDN FGVLGLDLWQ VKSGTIFDNF LITNDEAYAE EFGNETW
351 KAAEKQMKDK QDEEQRLKEE EEDKKRKEEE EAEDKEDDED KDEDEE
401 KEEDEEEDVP GQAKDEL
  
```

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	M	Peptide
25 - 36	1410.6091	1409.6018	1409.6212	-13.7	0	K.EQFLDGDGWT S .W
56 - 73	2086.9624	2085.9551	2085.9603	-2.49	2	K.FYGDEEKDKGLQTSQ DAR .F
74 - 87	1607.7567	1606.7494	1606.7667	-10.8	0	R.FYALSAS FEPFSNK .G
88 - 98	1219.6881	1218.6808	1218.6972	-13.5	0	K.GQTLVVQ FTVK .H
88 - 111	2677.3867	2676.3794	2676.3330	17.3	1	K.GQTLVVQFTVK HEQNIDCGGGYV .L + Carbamidomethyl (C)
99 - 111	1476.6426	1475.6353	1475.6463	-7.46	0	K. HEQNIDCGGGYV .L + Carbamidomethyl (C)
112 - 142	3456.6140	3455.6067	3455.5108	27.7	0	K.LFPNSLDQ TMHGDSEYNI MFGPDIC GP TK.K + Carbamidomethyl (C)
163 - 185	2856.4570	2855.4497	2855.3800	24.4	1	R. CKDDEP THLYTLIVRPD NTYEVK .I + Carbamidomethyl (C)
186 - 206	2391.1396	2390.1323	2390.0914	17.1	0	K. IDNSQVESGSLEDDW DFLPPK.K
186 - 207	2519.2188	2518.2115	2518.1864	9.99	1	K. IDNSQVESGSLEDDW DFLPPK.I
208 - 222	1800.8264	1799.8191	1799.8326	-7.48	1	K. IKDPDASKPEDW DER.A
223 - 248	2959.4792	2958.4719	2958.3883	28.3	1	R. AKIDDPD SKPEDWDK PEHIPDP AK.K

ANALISIS MSMS

Query	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
7	25 - 36	1410.6091	1409.6018	1409.6212	-0.0193	0	117	6.9e-09	<u>1</u>	U	K.EQFLDGDGWT S .W
11	74 - 87	1607.7567	1606.7494	1606.7667	-0.0173	0	98	5.4e-07	<u>1</u>	U	R.FYALSAS FEPFSNK .G
9	99 - 111	1476.6426	1475.6353	1475.6463	-0.0110	0	108	6e-08	<u>1</u>	U	K. HEQNIDCGGGYV .L + Carbamidomethyl (C)



Espectro MS del digerido trípico de la muestra 2

En círculo las señales correspondientes a Calreticulín

“BSA”

El estudio de las masas del espectro obtenido en modo reflectrón permite identificar seroalbúmina bovina de *Bos taurus*. El análisis se realizó con el programa Peptide Mass Fingerprint de MASCOT.

Resultado MASCOT PMF :

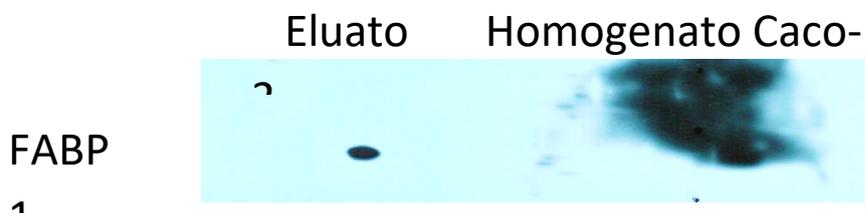
Protein sequence coverage: 29%

Matched peptides shown in *bold red*.

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFK GLVLIA
51	FSQYLQQCPF	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPILLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAK DAFL
351	GSPLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCDOFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPCLVV
601	STQTALA				

Anexo 2.

(a) Control de presencia de FABP1 en el homogenato y el eluato de la CoIP.



(b) Informe Técnico
Información General

Fecha

9 de mayo de 2018

Cliente

Natalia Bottasso

Betina Córscico

Número de muestras

10

Identificación de muestras

Nombre asignado por el cliente	Código Asignado por CEQUIBIEM
NB01	NB01
NB02	NB02
NB03	NB03
NB04	NB04
NB05	NB05
NB06	NB06
NB07	NB07
NB08	NB08
NB09	NB09
NB10	NB10

Tratamiento de las muestras

Procedimiento

Las muestras fueron reducidas con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56 grados y alquiladas con Iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg) durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo.

Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y vueltas a resuspender con 10 ul de Ácido Fórmico 0,1%.

Se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que nos permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos.

La ionización de las muestras se realiza por electrospray

El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa Proteome Discoverer.

Configuración del equipo

Cromatógrafo

Se utilizó un cromatógrafo marca Thermo Scientific, modelo EASY-nLC 1000 apto para separar complejos proteicos con un alto grado de resolución utilizando una columna de fase reversa.

Columna

Marca: **Thermo Scientific**

Modelo: **EASY-Spray Accucore (P/N ES801)**

Características: **C18, 2 μ m, 100^a, 75 μ m x 150 mm**

Temperatura: **35°C**

Pre- Columna

Marca: **Thermo Scientific**

Modelo: **Acclaim PepMap (P/N 164946)**

Características: **C18, 3 μ m, 100^a, 75 μ m x 20mm**

Gradiente

Se utiliza un gradiente con dos soluciones:

- Solución A: Agua con 0,1% de Ácido Fórmico
- Solución B: Acetonitrilo con 0,1 de Ácido Fórmico

Todas los solventes y reactivos utilizados son de calidad LC-MS.

Tiempo (min:seg)	Duración (min:seg)	Flujo (nl/min)	%B
00:00	N/A	300	5
110:00	110:00	300	35
111:00	1:00	300	95
120:00	09:00	300	95

Volumen de inyección: **2 μ l**

Ionizador

Se utilizó un ionizador por Electro Spray marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY.

Voltaje del Spray: **3,5 kV**

Espectrómetro de masa

Se utilizó un espectrómetro marca Thermo Scientific, modelo Q-Exactive. El equipo cuenta con una celda de HCD (High Collision Dissociation) y un analizador Orbitrap. La configuración del equipo permite que la identificación de los péptidos se realice al mismo tiempo que los mismos se separan por cromatografía, obteniendo Full MS y MSMS. Se utilizó un método que realiza la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo. La duración del ciclo depende de la resolución utilizada. En cada ciclo el equipo hace un Full MS y luego hace MSMS a los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

Análisis de Datos

Los espectros obtenidos son analizados con el programa Proteome Discoverer, utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión.

Proteome Discoverer

Marca: **Thermo Scientific**

Versión: **1.4**

Es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (High/Medium/Low) y el usuario decide con cual nivel de confianza trabajar, siendo siempre preferible utilizar solo los péptidos de nivel High.

Criterios de búsqueda

Base de datos (origen): *Homo sapiens, conejo y secuencias de FABPI humana.*

Enzima: **Tripsina**

Miscleavage: **2**

Tolerancia de masa para precursor: **10 ppm**

Tolerancia de masa para fragmento: **0,05 Da**

Modificaciones Dinámicas

- **Oxidación (M)**

Modificaciones estáticas

- **Carbamidometilación (C)**

Nivel de confianza de los péptidos: **High**

Resultados y conclusiones

Se adjuntan planillas Excel individuales que contienen las listas de hits identificados al realizar la búsqueda de cada muestra contra la base de datos mencionada arriba. Haciendo clic en el + que se encuentra a la izquierda de cada hit, se puede observar el detalle de los péptidos (secuencia, confianza etc.).

También se analizaron todas las muestras control juntas, generando un único excel de hits, y las muestras FABPI por otro, generando otro. Con estos datos se armó un archivo Multiconsensus (MC) que compara los hits en las dos condiciones.

Además se realizó un tercer análisis donde se juntaron los datos de las muestras de la Ig (NB02 y NB04 por un lado y NB07 y NB09 por otro) aparte se analizaron las otras tres bandas no Ig de cada condición (NB01-NB03-NB05 y NB06-NB08-NB10). Luego se realizaron MC comparando muestras Ig en cada condición y muestras no Ig en cada condición.

Definiciones de los ítems de las columnas de la tabla Excel que contiene la lista de proteínas identificadas

Accession: Muestra el identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada para generar el informe

Description: Proporciona el nombre de la proteína exclusiva del identificador que aparece en la columna accession.

Score: Muestra la puntuación de proteína, que es la suma de las puntuaciones de los péptidos individuales.

Coverage: Muestra el porcentaje de la secuencia de la proteína cubierto por los péptidos identificados.

Peptides: Muestra el número de secuencias de péptido únicas a un grupo de proteínas

PSMs: Muestra el número total de secuencias de péptidos identificados (Peptide Spectrum Matches) para la proteína, incluyendo aquellos identificados de forma redundante.

Proteins: Muestra el número de proteínas identificadas en el grupo de proteínas de una proteína de referencia

A2 (Confidence): Indica un nivel de confianza asociado con la secuencia del péptido

Sequence: Muestra la secuencia de aminoácidos que componen el péptido

Protein Group Accessions: Muestra los identificadores únicos (accessions) de todas las proteínas de referencia de todos los grupos de proteínas que incluyen esta secuencia peptídica

Modifications: Muestra las modificaciones estáticas y dinámicas identificadas en el péptido

XCorr: Calcula la puntuación de correlación cruzada para todos los péptidos candidatos de la base de datos consultados

Charge: Muestra el estado de carga del péptido

MH+ (Da): Muestra la masa monoisotópica protonada de los péptidos, en daltons

DM (ppm): Muestra la diferencia entre la masa teórica del péptido y la masa experimental del ión precursor

m/z (Da): Muestra la relación masa- carga del ion precursor , en daltons

RT (min): Muestra el tiempo de retención de la columna de HPLC cuando se observó el péptido, en minutos.

Missed Cleavages: Muestra el número de sitios de escisión en una secuencia de péptido que un reactivo de escisión (enzima) no escindió. Este número excluye los casos en que un aminoácido como la prolina inhibe la enzima de escisión.

No duden en contactarnos por cualquier consulta

Realizado por:	Pia Valacco	9 de mayo de 2018
-----------------------	-------------	----------------------

Nombre	y	Fecha
Apellido		

Aprobado por:	Silvia Moreno	9 de mayo de 2018
----------------------	---------------	----------------------

Nombre	y	Fecha
Apellido		

(c) Tabla de datos de espectrometría

Accession	Description	Sum PEP Score	Coverage	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# Protein Groups	# AAs	MW [kDa]	calc .pI	emPA I	Score A Control Sequences tHT	# Peptides sA Control Sequences tHT	Score B FABP Sequences tHT	# Peptides sB FABP Sequences tHT
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	102.40	44.10	32	457	28	1	644	66	8.12	8.412	450.34	29	293.08	24
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	94.48	56.51	27	424	11	1	584	58.8	5.21	12.895	372.36	24	370.72	26
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	74.17	51.17	26	264	23	1	639	65.4	8	3.725	263.29	25	172.04	23
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	67.85	45.10	21	242	20	1	623	62	5.24	3.748	340.47	19	239.93	15

P00352	Retinal dehydrogenase 1 OS=Homo sapiens GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2	25.85	18.36	8	78	8	1	501	54.8	6.73	1.154			123.8	8
P60709	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	25.71	32.00	8	70	8	1	375	41.7	5.48	2.008	22.54	6	91.01	8
P13647	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	20.50	14.41	9	85	6	1	590	62.3	7.74	0.808	73.65	9	49.95	6
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	16.21	16.31	8	79	2	1	472	51.5	5.16	0.693	67.72	8	38.02	7
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7	12.99	11.18	6	33	4	1	483	53.7	5.59	0.501	33.61	6	16.91	4
P08727	Keratin, type I cytoskeletal 19	12.08	15.50	6	63	3	1	400	44.1	5.14	0.52	53.17	6	25.25	5

P10809	OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=4	11.90	11.34	4	8	4	1	573	61	5.87	0.292	20.76	4				
P02768	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	11.52	10.51	5	16	5	1	609	69.3	6.28	0.315	2.45	3	13.24	4		
F5H5D3	Scrum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	8.31	8.09	3	19	3	1	519	57.7	5.07	0.269	0	1	36.24	3		
P07195	Tubulin alpha chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1	8.00	11.38	3	8	2	1	334	56.6	6.05	0.389			14.48	3		
P13646	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Homo sapiens GN=LDHB PE=1 SV=2	7.97	9.39	4	28	1	1	458	49.6	4.96	0.334	30.3	4	11.66	3		
	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13																

P0DP09	PE=1 SV=1 Immunoglobulin kappa variable 1-13 OS=Homo sapiens GN=IGKV1-13 PE=3 SV=1	3.99	13.68	1	31	1	1	1	117	12.6	7.84	1.154	13.61	1	30.65	1
		3.96	13.68	1	17	1	1	1	117	12.8	4.78	0.585	24.35	1	15.06	1
P01593	Immunoglobulin kappa variable ID-33 OS=Homo sapiens GN=IGKV1D-33 PE=1 SV=2	3.82	4.15	2	7	1	1	578	61.9	5.99	0.141	4.15	2	1.87	1	
Q7Z794	Keratin, type II cytoskeletal Ib OS=Homo sapiens GN=KRT77 PE=1 SV=3	3.67	8.40	2	3	2	1	381	42.6	5.59	0.222			3.97	2	
P12277	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	3.61	7.65	2	3	2	1	523	58.7	6.67	0.179	2.04	2			
Q8WXF1	Paraspeckle component 1 OS=Homo sapiens GN=PSPCI															

Q5D862	PE=1 SV=1 Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1	3.42	0.50	1	2	1	1	1	239	247.9	8.31	0.026	4.17	1		
P13639	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	3.14	3.50	2	4	2	1	1	858	95.3	6.83	0.089	7.3	1	0	1
A0A0B4J269	Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1	2.85	2.26	1	1	1	1	1	797	88.3	5.86	0.062	3.1	1		
Q92734	Protein TFG OS=Homo sapiens GN=TFG PE=1 SV=2	2.83	9.75	2	4	2	1	1	400	43.4	5.1	0.425	2.81	1	2.2	2
E7EUC7	UTP--glucose-1- phosphate uridylyltransferas e OS=Homo sapiens GN=UGP2 PE=1 SV=1	2.73	3.48	1	1	1	1	1	517	57.8	8.13	0.075	3.23	1		
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens	2.66	4.42	2	18	1	1	1	430	48	5.45	0.166	14.24	1	9.17	2

P05109	dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	2.03	11.83	1	1	1	1	93	10.8	7.03	0.334	2.29	1						
P80748	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	1.82	9.40	1	3	1	1	117	12.4	5.29	0.585			8.52	1				
P14618	Immunoglobulin lambda variable 3-21 OS=Homo sapiens GN=IGLV3-21 PE=1 SV=2	1.75	3.39	1	1	1	1	531	57.9	7.84	0.064	2.33	1						
P18085	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	1.74	5.56	1	2	1	1	180	20.5	7.14	0.194			1.64	1				
A0A0G2JN16	ADP-ribosylation factor 4 OS=Homo sapiens GN=ARF4 PE=1 SV=3	1.54	2.29	1	2	1	1	349	38.8	6.95	0.116	1.69	1	1.67	1				
	Killer cell immunoglobulin- like receptor 2DS1 OS=Homo sapiens																		

P00558	GN=KIR2DS1 PE=4 SV=1 Phosphoglycerate kinase 1 OS=Homo sapiens GN=PGK1 PE=1 SV=3	1.51	4.32	1	2	1	1	1	1	417	44.6	8.1	0.08	9.21	1	3.81	0	1
A0A0A0MITQ 8	Coiled-coil domain- containing protein 175 OS=Homo sapiens GN=CCDC175 PE=1 SV=1	1.50	0.85	1	8	1	1	1	1	828	97.4	5.99	0.039	9.21	1	3.81	0	1
Q14247	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=2	1.45	3.64	1	1	1	1	1	1	550	61.5	5.4	0.077			1.62		1
G5E914	Breast cancer metastasis suppressor 1, isoform CRA_c OS=Homo sapiens GN=BRMS1 PE=1 SV=1	1.40	4.83	1	15	1	1	1	1	290	33.7	5.02	0.136	7.04	1	11.27		1
A0A0G2J9Q6	Uncharacterized protein	1.37	6.84	1	13	1	1	1	1	117	12.7	8.29	0.389	11.43	1	5.54		1

P04792	(Fragment) OS=Homo sapiens PE=1 SV=4	1.35	8.29	1	2	1	1	1	1	205	22.8	6.4	0.194	0	1
Q4G0N4	Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	1.27	2.71	1	1	1	1	1	1	442	49.4	8.18	0.07	1.67	1
P68871	NAD kinase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NADK2 PE=1 SV=2	1.26	8.84	1	1	1	1	1	1	147	16	7.28	0.233	1.67	1
	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=2														

Anexo 3.

