



Caracterización de las gotas  
lipídicas en modelos esteatósicos de  
ratones carentes de *ApoE*

*Characterization of lipid droplets in  
steatosis mice models lacking ApoE*

---

**TRABAJO FIN DE GRADO**

---

**Autora:**

Laura Pardos Catalán

**Directores:**

Roberto Martínez Beamonte

Jesús De La Osada García

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular*

*Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza*

*Curso 2020-2021, Grado en Biotecnología*

## ÍNDICE

1.Resumen.....	1
2.Introducción .....	2
2.1.¿Qué son las gotas lipídicas?.....	2
2.2.Biogénesis de gotas lipídicas .....	2
2.3.Diferencia de tamaño y número de gotas lipídicas.....	4
2.3.1.Gotas de lípidos hepatocelulares .....	5
2.4.Proteínas de las gotas lipídicas .....	5
2.4.1.Influencia de la dieta y sexo en la expresión de genes en hígado adulto de modelo animal.....	6
2.5.Justificación del trabajo .....	6
3.Objetivos.. .....	7
4.Materiales y métodos .....	7
4.1.Procesado de muestras con separación de gotas lipídicas por tamaño .....	7
4.1.1.Separación de gotas lipídicas protocolo <i>Science</i> (1) .....	8
4.1.2.Separación de gotas lipídicas protocolo <i>Journal of Lipid Research</i> (2) .....	9
4.2.Extracción de proteínas asociadas a gotas lipídicas.....	9
4.3.Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford .....	10
4.4.Proteómica con LC/MS-MS .....	10
4.5.Detección inmunoespecífica de proteínas: Western Blot.....	11
4.6.Análisis de datos.....	14
5.Resultados y discusión .....	15
5.1.Resultados de separación de gotas lipídicas por tamaño de gota y concentración proteica en protocolos 1 y 2.....	15
5.2.Resultados de la proteómica.....	17
5.2.1.Proteína de la cadena pesada de clatrina 1(CLTC) .....	18
5.2.2.Proteína nucleolar 58 (NOP58) .....	18
5.2.3.Proteína lumican (LUM) .....	19
5.3.Inmunodetección y cuantificación de las proteínas de estudio.....	19
5.3.1.Proteína CLTC .....	20
5.3.2.Proteína NOP58.....	21
5.3.3.Proteína LUM .....	22
6.Conclusiones .....	24
7.Bibliografía .....	25

## Abreviaturas

**ACAT1 y ACAT2:** colesterol aciltransferasas 1 y 2

**ADDE:** agua destilada y desionizada

**APOE:** apolipoproteína E

**ARF1:** factor de ribosilación del ADP 1

**CCT- $\alpha$ :** fosfocolina citidililtransferasa- $\alpha$

**CID:** disociación inducida por colisión

**CIDE:** efector similar al factor alfa de fragmentación del DNA inductor de muerte celular

**CLTC:** proteína de la cadena pesada de clatrina 1

**COPI:** coat complex protein I

**DFFA:** subunidad alfa del factor de fragmentación del DNA

**DGAT1 y DGAT2:** diacilglicerol acetiltransferasas 1 y 2

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**eLD:** gotas de lípidos en expansión

**FIT:** proteína inductora de almacenamiento de grasa

**GBF1:** factor 1 de intercambio de nucleótidos de guanina con resistencia a brefeldina A específico de Golgi

**GPAT4:** glicerol 3-fosfato aciltransferasa 4

**iLD:** gotas de lípidos iniciales

**LC-MS/MS:** cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem

**LDLr:** receptor de lipoproteínas de baja densidad

**LUM:** proteína lumican

**NAFLD:** enfermedad del hígado graso no alcohólico

**NOP58:** proteína nucleolar 58

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**RE:** retículo endoplásmico

**snoRNA:** RNA nucleolares pequeños

**TG:** triacilgliceroles

**TRIS:** tris(hidroximetil)aminometano

**WD:** dieta occidental, Western Diet

## 1. Resumen

Las gotas lipídicas son consideradas orgánulos celulares dinámicos y ubicuos. Se componen de un núcleo central de lípidos neutros, fundamentalmente triglicéridos y ésteres de esteroides cubiertos por una monocapa de fosfolípidos y proteínas estrechamente relacionadas con la biosíntesis, metabolismo, tráfico e interacción de las gotas lipídicas con el resto de orgánulos celulares. Presentan un papel central en la homeostasis energética celular, así como en el almacenamiento lipídico y renovación de las distintas membranas celulares.

El estudio se centra en las gotitas de lípidos del hígado debido a que su acumulación anormal en este órgano conduce al desarrollo de esteatosis hepática inducida por una dieta Western, como resultado final de enfermedades metabólicas muy prevalentes actualmente como síndrome metabólico, obesidad o aterosclerosis. La esteatosis no alcohólica relacionada con la obesidad se conoce como NAFLD.

En este trabajo experimental se han aislado las gotitas lipídicas de hígado graso de ratones carentes de *ApoE* mediante separación por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. De este modo, se obtienen las gotas lipídicas en fracciones de distintos tamaños y se caracterizan las proteínas asociadas y expresadas diferencialmente entre sexos mediante proteómica e inmunodetección por Western Blot a nivel de fracción de gota lipídica total y en función de su tamaño.

**Palabras clave:** gotas lipídicas, hígado, esteatosis hepática, ultracentrifugación, proteínas, proteómica, Western Blot.

Lipid droplets are considered dynamic and ubiquitous cellular organelles composed of a central nucleus of neutral lipids, mainly triglycerides and sterol esters covered by a monolayer of phospholipids and proteins closely related to the biosynthesis, metabolism, trafficking and interaction of lipid droplets with the rest of cellular organelles. They have a central role in cellular energy homeostasis, as well as in lipid storage and renewal of the different cell membranes.

The study focuses on liver lipid droplets because their abnormal accumulation in this organ leads to the development of hepatic steatosis induced by a Western diet, as a result of currently prevalent metabolic diseases such as metabolic syndrome, obesity or atherosclerosis. Non-alcoholic steatosis related to obesity is known as NAFLD.

In this experimental work, fatty liver lipid droplets have been isolated from *ApoE* deficient mice by ultracentrifugation in a sucrose density gradient. In this way, different fat droplet size fractions are obtained and proteins with different levels of expression between sexes are characterized by proteomics and immunodetection by Western Blot at the level of the total lipid droplet fraction and depending on its size.

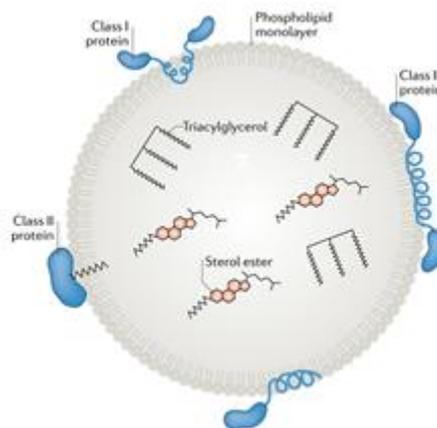
**Key words:** lipid droplets, liver, hepatic steatosis, ultracentrifugation, proteins, proteomics, Western Blot.

## 2. Introducción

### 2.1. ¿Qué son las gotas lipídicas?

Las gotas de lípidos (abreviadas como LD de “*Lipid Droplets*”) son consideradas orgánulos celulares ubicuos y especializados que permiten fundamentalmente el almacenamiento de lípidos y la reposición de las membranas celulares (1,2).

Se componen de un núcleo central de lípidos neutros que consta de triglicéridos (TG) y ésteres de esteroides y su capa más externa constituye una monocapa de moléculas anfipáticas, los fosfolípidos, entre los que cabe destacar la fosfatidilcolina (1). Estos tienen asociadas proteínas integrales y periféricas que van a participar en numerosas funciones relacionadas con la dinámica y el metabolismo de estas gotas de lípidos para la obtención de energía, biosíntesis de membranas celulares, pero también contribuyen en las vías de señalización mediadas por los lípidos, así como en el secuestro de aquellos lípidos tóxicos que pueda estar acumulando la célula.



*Figura 1. Organización estructural de la gota lipídica (2)*

Aunque se conocen desde hace mucho tiempo, se creía que constituían un almacenamiento inerte de lípidos hasta que en 1991 se descubrieron las primeras proteínas asociadas a estas gotas, aquellas que vieron en mayor abundancia fueron denominadas perilipinas (3). Cabe destacar el aumento en el interés de las mismas por su relación con enfermedades muy prevalentes actualmente como la obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis y enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (3,4).

Se trata de orgánulos muy dinámicos originados en el retículo endoplásmico (RE), que van a tener contacto con prácticamente todos los orgánulos celulares gracias a su capacidad de expansión y contracción y, que van a estar constantemente en un equilibrio entre formación y degradación a través de mecanismos especializados como lipólisis y lipofagia (1,2).

### 2.2. Biogénesis de gotas lipídicas

El retículo endoplásmico es el principal orgánulo implicado en su biogénesis y además va a proveer de estas gotas de lípidos a orgánulos como los peroxisomas, las mitocondrias y los lisosomas. La principal evidencia de situar la biogénesis en el RE es la gran cantidad de enzimas que presenta implicadas en síntesis de lípidos, sobre todo neutros (2,5). Aunque no hay un modelo plenamente validado de este proceso, el más aceptado por la comunidad científica divide la biogénesis en los siguientes cuatro pasos teniendo en cuenta que se trata de una mera simplificación:

- **Primer paso: síntesis de lípidos neutros**

Los lípidos neutros sintetizados son principalmente triacilgliceroles y ésteres de esteroides, resultantes de la esterificación de un ácido graso activado a un diacilglicerol o a un esteroide, respectivamente. Para ello, las enzimas implicadas en la síntesis de triacilgliceroles son diacilglicerol acetiltransferasas (DGAT1 y DGAT2) y para los ésteres de esteroide intervienen las colesterol aciltransferasas (ACAT1 y ACAT2). A bajas concentraciones de lípidos neutros, estos se encuentran dispersos a lo largo de la bicapa del RE (5).

- **Segundo paso: formación de una lente de aceite en la membrana de RE**

A partir de cierta concentración, los lípidos neutros se mezclan y forman una lente de aceite en un proceso de acumulación de lípidos localizada en la que se reducen las interacciones con los componentes de la membrana del RE, tales como fosfolípidos y proteínas, para minimizar los costes de entropía asociados a esta biogénesis. No está todavía claro si estas lentes se originan en zonas localizadas del RE ni se han identificado proteínas directamente implicadas en dicho proceso (5).

Sin embargo, la estructura del RE está muy bien caracterizada y se distinguen diferentes dominios con diferentes curvaturas de la membrana. A lo largo de su bicapa existen tanto láminas de membrana como túbulos, de manera que es en los túbulos donde existe cierta curvatura que podría facilitar la formación de estas lentes de triglicéridos (5).

Algunos estudios han propuesto a la familia de las proteínas transmembrana inductoras del almacenamiento de grasa (FIT) como partícipes en la formación de estas lentes. Dos de los miembros de esta familia son FIT1 y FIT2, bastante conservadas evolutivamente y entre las que cabe destacar a FIT2, que se une a estos lípidos neutros y parece participar en la repartición de estos TG entre las gotas lipídicas. La alteración de la expresión de FIT2 da lugar a gotas lipídicas de diferente tamaño, siendo más grandes si se produce una sobreexpresión y al contrario si hay pérdida de su expresión (2,5).

- **Tercer paso: formación de gotas de lípidos nacientes**

Este modelo sugiere la liberación de las gotas de lípidos del RE una vez han acumulado la proporción adecuada de lípidos neutros, pero todavía queda por validar si este fenómeno ocurre siempre o si por el contrario algunas gotas van a permanecer siempre conectadas al retículo. En mamíferos es donde existen más evidencias de que realmente se produzca esta gemación, la cual es realmente un proceso biofísico en el que se va a formar una emulsión posibilitada por la flexibilidad de los dominios del RE en cuanto a su composición en fosfolípidos y proteínas (2).

Algunos factores de biogénesis de la gota de lípidos como la seipina se incorporan a la estructura naciente que se ha formado y posibilitan el crecimiento de la gota de lípido naciente. La liberación de la gota desde el retículo hacia el citosol va a verse afectada por diferencias en la tensión superficial de las diferentes valvas del retículo puesto que la gota no presentara la misma composición a lo largo de toda su superficie externa (5).

- **Cuarto paso: crecimiento y expansión de gotas de lípidos mediante la adquisición de proteínas específicas**

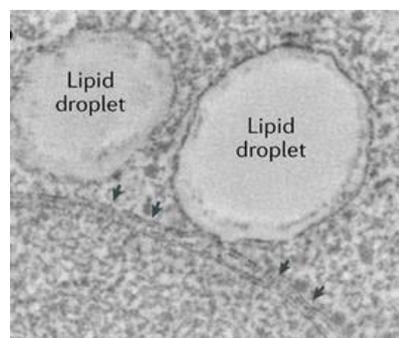
En este punto, van a coexistir dos poblaciones de LD en las células, por un lado, tenemos las gotas de lípidos iniciales (iLD) y, por otro lado, las gotas de lípidos en expansión (eLD) (5).

Por tanto, en las células de mamíferos estas gotas de lípidos formadas tienden a escindirse del RE y crecen mediante fusión con otras gotas lipídicas que pueden encontrar en su entorno más inmediato o mediante la síntesis *de novo* de triacilgliceroles directamente en la superficie de la gota. Esta fusión es llevada a cabo por proteínas efectoras tipo DFFA que inducen la muerte celular (CIDE) y a la que pertenecen los miembros CIDEA, CIDEB y CIDE. La forma en la que las proteínas CIDE median la unión entre dos gotas adyacentes se explica por su gran capacidad de difusión a través de la superficie de la gota en la que está formando un dímero a través de una hélice anfipática, de manera que difunden por la membrana de la gota hasta encontrar a otra gota lipídica adyacente positiva para CIDE que acabara con la fusión de las mismas (2).

Además, las eLD también requieren un aporte continuo de fosfolípidos para lo cual se activará la fosfolina citidililtransferasa- $\alpha$  (CCT- $\alpha$ ), que va a suministrar a las LD la cantidad necesaria de uno de los fosfolípidos mayoritarios como es la fosfatidilcolina (2).

La síntesis de TG que también van a tener que llevar a cabo las gotas de lípidos en extensión está relacionada con dos isoformas específicas de la vía de síntesis de estos lípidos, la GPAT4 y la DGAT2 y ambas dos son proteínas transmembrana capaces de difundir desde el RE hasta las gotas de lípidos (2).

Por último, destacar que hay una subpoblación de gotas de lípidos llamadas nano gotitas por ser las de menor tamaño (60 nm de diámetro), que siempre se van a liberar del RE. Sin embargo, se trata de una gemación reversible. En este proceso se ve implicado el complejo de coatómero COPI que es reclutado por la GTPasa ARF1 y por su factor de intercambio de nucleótidos de guanina GBF1, presentes en la superficie de las gotas para producir esa liberación. Debido a la reversibilidad del proceso, si hay un desajuste entre fosfolípidos y lípidos neutros, COPI puede hacer que esas nano gotas regresen y se fusionen de nuevo con el RE (2).



**Figura 2.** Tomografía 2D de gotas de lípidos emergentes del RE (2)

### 2.3. Diferencia de tamaño y número de gotas lipídicas

Existen diferencias entre el número, tamaño y composición de las gotas de lípidos entre las células de un mismo organismo e incluso dentro de la propia célula (6).

Estas diferencias ponen de manifiesto esa gran diversidad de disponibilidad de nutrientes que puede presentar la célula, puede haber periodos en los que haya un excedente que permita almacenar gran cantidad de lípidos formando gotas de tamaño superior mientras que, en periodos de inanición, estas gotas se degradarán reduciendo su tamaño para la movilización de reservas (2).

En cuanto al tamaño, en las células se suelen dar tres situaciones diferenciadas: las gotas lipídicas tienen un tamaño prácticamente uniforme; por el contrario, existe una diferencia de tamaño considerable entre la población de gotas o se observa una única gota de grasa gigante que ocupa prácticamente todo el citosol empujando al resto de orgánulos a la periferia celular, situación común en los adipocitos de mamífero (6). Por tanto, también hay diferencias en el número de gotas lipídicas según el tipo de tejido, lo cual está relacionado con la función que tienen en el mismo.

Además, también se distribuyen de manera diferente, bien por toda la célula, localizándose en determinados puntos o incluso pueden localizarse de forma polarizada (2,6).

#### 2.3.1. Gotas de lípidos hepatocelulares

El aislamiento de gotas de lípidos procedentes de tejidos animales presenta una gran cantidad de dificultades debido a la lentitud de los procedimientos requeridos, las alteraciones estructurales que pueden sufrir las gotas de grasa, la destrucción por coalescencia, la posibilidad de tener impurezas en la muestra de estudio y la dificultad que tiene la separación de las diferentes subfracciones. En hígado se han intentado solucionar estos problemas para el aislamiento de sus gotas tal vez por la estrecha relación existente con patologías asociadas al mismo. Las subpoblaciones de gotas lipídicas quedan separadas por tamaño de gota tras llevar a cabo un protocolo basado en su refluotación por gradiente de densidad, de manera que en un tubo de centrifuga quedaría en la superficie la banda correspondiente a las gotas grandes de lípidos de baja densidad y al ir bajando en el tubo, aparecen las bandas correspondientes a gotitas de lípidos progresivamente más pequeñas de mayor densidad. Los análisis de su composición en términos generales revelan que las gotas más grandes tienen un mayor contenido en triacilglicéridos y ésteres de colesterol y un menor contenido en colesterol libre que el resto de fracciones; por el contrario, a medida que las bandas contienen gotas cada vez más pequeñas se produce un aumento de la relación colesterol libre frente a ésteres de colesterol y también disminuye, aunque no siguiendo un patrón definido el contenido de triglicéridos (7).

Además, las poblaciones de gotas lipídicas más pequeñas son más ricas en fosfolípidos y proteínas que las de mayor tamaño. De hecho, tanto las proteínas como los fosfolípidos con mayor densidad que los triglicéridos, van a contribuir considerablemente a ese aumento secuencial de densidad de las partículas lipídicas a medida que disminuye el tamaño de gota. En estas bandas de mayor densidad también se ha identificado la presencia de elementos membranosos procedentes del Golgi y vesículas secretoras, quilomicrones, restos de VLDL en vesículas endocíticas y lisosomas secundarios ricos en triglicéridos (7).

#### 2.4. Proteínas de las gotas lipídicas

Los análisis proteómicos de LD aisladas de diversos organismos ponen de manifiesto la amplia variedad de proteínas que se encuentran asociadas a las gotas de lípidos con funciones muy diversas. Las diferentes estrategias basadas en proteómica y la diversidad entre los tipos de células estudiadas producen variabilidad en los resultados encontrados. Sin embargo, se ha podido caracterizar un listado común de 100-150 proteínas en las células de mamífero con un grado de confianza significativo (2). Entre ellas, se encuentran desde proteínas estructurales hasta relacionadas con el metabolismo de lípidos, proteínas de tráfico de estos orgánulos, de señalización celular, relacionadas con la degradación de proteínas, también hay proteínas ribosómicas, histonas, proteínas propias del citoesqueleto y proteínas efectoras que inducen muerte celular (8).

#### 2.4.1. Influencia de la dieta y sexo en la expresión de genes en hígado adulto de modelo animal

Se han evidenciado diferencias en modelo animal respecto a la regulación que presentan los genes en el hígado en base a la dieta y al sexo. En cuanto a la dieta, cabe destacar la diferencia de expresión de genes como *Cidec/Fsp27B* debido al contenido en colesterol y en diferentes ácidos grasos. Esto se ha manifestado en modelos animales como ratones deficientes en la apolipoproteína E (*ApoE*) y deficientes en el receptor de LDL (*LDLR*) tras consumir dietas purificadas como la dieta occidental (WD) cuya fuente de grasa saturada es fundamentalmente colesterol y aceite de palma. Algunos de los componentes dietéticos que parecen tener más influencia en la dieta WD son el ácido oleanólico y el escualeno (9). En cuanto al sexo, se ha visto que la expresión hepática de algunos genes puede verse influenciada por las hormonas sexuales en ratones deficientes de *ApoE*, en este caso se han visto también diferencias de expresión a nivel de RNAm de *Cidec*, presentando una menor cantidad en las gotas hepáticas femeninas. Para llegar a resultados consistentes en cuanto a la regulación hormonal específica de sexo, se estudiaron ratones de ambos sexos alimentados con la misma dieta occidental purificada y sometidos a castración con extirpación quirúrgica de las gónadas con el fin de revelar la importancia que presentan las diferentes hormonas sexuales, lo cual puso en el punto de mira sobre todo a las hormonas ováricas (9).

#### 2.5. Justificación del trabajo

El estudio de las gotas de lípidos ha sido una de las áreas que más auge ha tenido durante la última década en biología celular. Anteriormente, se consideraban acumulaciones de lípidos inertes, mientras que su estudio en profundidad ha revelado todo lo contrario considerándose actualmente orgánulos celulares.

Además, ha habido un aumento en la prevalencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), junto con la diabetes, el síndrome metabólico y multitud de enfermedades cardiovasculares (10).

Por ello, se han desarrollado modelos *in vitro* y animales que tienen como uno de los focos principales de estudio a las gotas lipídicas para intentar caracterizar las diferentes poblaciones que coexisten en las mismas (10). Uno de los retos actuales es un análisis de la composición de estas poblaciones, tanto del contenido de esteroides como de proteínas, que podría dar una visión más detallada de los mecanismos moleculares que contribuyen a su formación, movilización, metabolismo y función tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Por último, las gotas de lípidos presentan diferencias en su composición lipídica y proteica entre sexos y resulta interesante caracterizar alguna de las proteínas cuya diferencia detectada sea significativa entre machos y hembras, como en el caso presentado anteriormente del gen *Cidec/Fsp27B*, para su uso como biomarcadores en este tipo de patologías.

### 3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la separación por tamaño de las gotas lipídicas de células hepáticas de ratón carente de *ApoE* con el fin de encontrar proteínas con diferente nivel de expresión entre sexos tanto a nivel de fracción total de gota lipídica como en las distintas fracciones obtenidas por tamaño de gota.

El objetivo principal podría subdividirse a su vez en varios objetivos específicos:

- Análisis de las gotas lipídicas de ratón *ApoE* macho y hembra como modelo de hepatoesteatosis espontánea alimentados con dieta rica en grasa y colesterol.
- Análisis de las proteínas presentes en las gotas lipídicas totales y en las diferentes fracciones separadas por tamaño.
- Identificación y cuantificación de las proteínas diferenciales entre sexos.

Para ello dividimos el trabajo en una serie de procesos diferenciados:

- Separación de las gotas lipídicas por tamaño en gradiente de sacarosa de muestras de ratón macho y hembra.
- Purificación de proteínas asociadas a las diferentes fracciones de gotas lipídicas y eliminación de lípidos.
- Proteómica de las muestras de gotas de lípidos totales en macho y hembra para seleccionar aquellas proteínas detectadas con más diferencia entre sexos.
- Confirmación de los datos obtenidos por proteómica mediante Western blot con uso de anticuerpos específicos de las proteínas de estudio.

### 4. Materiales y métodos

#### 4.1. Procesado de muestras con separación de gotas lipídicas por tamaño

Para la caracterización y separación de las gotas lipídicas por tamaño se toman las muestras de ratones deficientes en *ApoE* de ambos sexos alimentados con dieta grasa previamente preparadas en el laboratorio de bioquímica del departamento de veterinaria, de las cuales se conoce por estudios previos que existen diferencias significativas en porcentaje de esteatosis entre sexos.

Se van a estudiar dos muestras de gotas lipídicas, la primera muestra proviene de 0,8 gramos de hígado de macho y la segunda de 0,84 gramos de hígado de hembra, ambos dos ratones son alimentados con la misma dieta grasa para dar el fenotipo de hígado graso. Para la obtención de la muestra se pesan esas cantidades en la balanza de precisión a partir de los hígados todavía congelados. A partir de esas muestras se obtiene un homogeneizado de hígado en un homogenizador Potter disgregando el tejido hepático en 10 ml de buffer de homogenización de sacarosa al 65%, 10mM Tris-HCl a pH=7,4, 150 mM NaCl y 5mM EDTA, disolución a partir de la cual se preparan el resto de disoluciones necesarias para crear los gradientes de sacarosa de cada uno de los dos protocolos.

Cabe destacar la importancia de añadir a esta disolución un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa, que va a proteger a las proteínas de la degradación durante la extracción y purificación, esencial para que puedan ser estudiadas por proteómica en pasos posteriores. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se añade una tableta de cada inhibidor por cada 10 ml de las soluciones

a emplear. Se intenta recuperar la totalidad de homogeneizado hepático de las paredes del Potter mediante lavados sucesivos con la disolución buffer y se deposita en un tubo de centrífuga de 13,2 ml para ir añadiendo posteriormente el resto de disoluciones de concentraciones decrecientes.

Para la formación del gradiente se calcula el porcentaje de lo que supone cada una del resto de disoluciones necesarias respecto de la del 65% para tener en un tubo falcon cada una de esas disoluciones y añadir lo que falte hasta el 100% de buffer de homogenización sin sacarosa. Es decir, se añaden diferentes cantidades de sacarosa para obtener los volúmenes necesarios de cada densidad utilizada. Se mantienen tanto las muestras como todas las disoluciones refrigeradas en hielo picado durante todo el procedimiento. La formación del gradiente se lleva a cabo en el tubo de centrífuga donde ha sido depositado en la parte inferior el homogeneizado resultante y para ello se hace uso de pipetas Pasteur dobladas a la llama con un ángulo de 180° que permita introducir las en el tubo y depositar cada una de las disoluciones justo en la capa más superficial de la fase anterior con cuidado de no mezclar los diferentes gradientes. Una vez están preparados los tubos, se equilibran en la balanza de precisión mediante la adición de buffer de la fase superior y ya están listos para ser centrifugados.

Con objeto de optimizar la separación de esas gotas de grasa, se han usado dos protocolos de separación con diferentes condiciones tanto en el gradiente de sacarosa empleado como en las revoluciones por minuto y tiempo que se van a alcanzar en la ultracentrifugación de las gotas con el fin de elegir aquel en el que se obtengan fracciones con mayor concentración proteica (7,11).

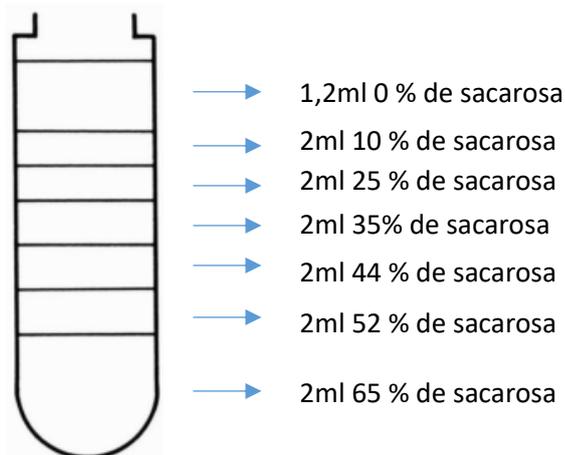
La centrifuga se programa en ambos dos protocolos a una temperatura de 4°C para garantizar la conservación de las muestras.

#### 4.1.1. Separación de gotas lipídicas protocolo *Science* (1)

Las condiciones de esta primera separación están basadas en el protocolo de un artículo publicado en la revista "*Science*", con el que consiguen un fraccionamiento y purificación de LD hepática en ratones (11). Las muestras son centrifugadas a 12.000 g que equivalen a 12.354 rpm en el rotor basculante SW41-Ti con el radio mínimo. El gradiente discontinuo de sacarosa en este caso es menos brusco que en el siguiente protocolo y con concentraciones de sacarosa menos concentradas que, en un principio parece que van a asegurar una mayor separación por tamaño de las gotas. Las concentraciones de sacarosa siguen el siguiente gradiente: la disolución de 65% de sacarosa en la que está el homogeneizado inicialmente pasa a tener un 42,7% de sacarosa por volumetría y las siguientes disoluciones son del 25%, 15%, 10%, 5% y 0%. En la última fase se añade únicamente buffer de homogenización sin sacarosa. Se añade un volumen de 2 ml de todos los gradientes, salvo en la última fase donde se añaden 1,2 ml.

#### 4.1.2. Separación de gotas lipídicas protocolo *Journal of Lipid Research* (2)

El segundo protocolo está basado en un método de aislamiento de gotas lipídicas publicado en la revista "*Journal of Lipid Research*", donde tras la homogeneización del hígado de rata y la ultracentrifugación en gradiente discontinuo de densidad de sacarosa confirman la aparición de seis bandas discretas de diferente tamaño de gota (7). Las condiciones de centrifugación son 30 minutos a 25.770 g lo cual es equivalente a 18.300 rpm con el radio mínimo en el rotor SW41-Ti de la centrífuga empleada. El gradiente discontinuo de sacarosa va a tener los siguientes porcentajes de sacarosa: homogeneizado disuelto en sacarosa al 65% y posteriormente se superponen por volumetría concentraciones con menor porcentaje de sacarosa: 52%, 44%, 35%, 25%, 10% y 0%, esta última adición es solo buffer de homogeneización sin sacarosa. Se añaden 2ml de todos los gradientes empleados, salvo en la última fase donde se añaden 1,2 ml.



**Figura 3.** Gradiente de sacarosa (Protocolo 2)

#### 4.2. Extracción de proteínas asociadas a gotas lipídicas

Se recogen las gotas lipídicas de cada una de las fracciones y como resultado se obtienen una serie de tubos eppendorf para macho y para hembra resultantes de cada uno de los protocolos. Las fracciones son enumeradas de tal forma que en la fracción 1 se recogen las gotas de mayor tamaño y en la 4/5 se encuentran las de menor tamaño.

Para la extracción de las proteínas asociadas a esas gotas lipídicas se sigue el siguiente procedimiento: precipitación de las proteínas añadiendo 3 veces el volumen obtenido en acetona fría y refrigeración de las muestras, inicialmente durante 10 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente, toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ , al día siguiente se centrifugan a 15.000 g que corresponden a 7.000 rpm en la centrífuga Sorvall durante 15 minutos y a  $4^{\circ}\text{C}$  en los tubos Oak Ridge FEP 3114-0050, se decanta en acetona y se lava 2 veces en acetona:dietiléter 1:1 (10ml/10 ml), se repite la misma centrifugación del paso anterior pero esta vez durante 10 minutos, de nuevo se decanta el sobrenadante y se lava finalmente con dietiléter para repetir la centrifugación de 10 min a 15.000 g. Se decanta y se dejan evaporar los restos de dietiléter en atmósfera de  $\text{N}_2$ .

Finalmente, se resuspende cada uno de los pellets obtenidos en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de PBS, 0,2% de tritón X-100 y 10% de glicerol y quedan recogidos en un eppendorf de 1,5 ml.

Las muestras se dejan en hielo 1 hora y se sonicán 1 minuto en pulsos de 10 segundos con una amplitud del 50% con el fin de recuperar la mayor cantidad de proteínas solubles presentes en las gotas lipídicas e ir a medir la concentración del sobrenadante obtenido mediante el método de Bradford.

#### 4.3. Determinación de la concentración proteica: Método de Bradford

La determinación de la concentración proteica por el método de Bradford permite seleccionar el protocolo más efectivo y con el que se han obtenido fracciones de gotas lipídicas más concentradas en proteínas lo cual facilitara su estudio y sensibilidad en el resto de técnicas empleadas y posteriormente, va a permitir establecer comparaciones derivadas de los diferentes Western blot teniendo en cuenta que la cantidad de proteína cargada para cada una de las muestras es la misma.

La concentración de proteína de cada una de las muestras se puede conocer si están en un rango de trabajo de 50 a 1200  $\mu\text{g/ml}$  mediante la elaboración de una recta de calibrado de albúmina con las siguientes concentraciones obtenidas por dilución 1/2: 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62,5  $\mu\text{g/ml}$ . En una placa de 96 pocillos se pipetea 2  $\mu\text{l}$  de las muestras y de los distintos puntos de la recta de calibrado por duplicado y se añaden 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford diluido 1/5, se mezclan bien los reactivos esperando 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente para que se adquiera coloración y se mide absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. El análisis se facilita mediante el uso del programa SPECTROstar Nano Control y las concentraciones de cada una de las muestras pueden obtenerse a partir de la recta de calibrado que relaciona absorbancia-concentración conocida de albúmina.

#### 4.4. Proteómica con LC/MS-MS

La identificación por espectrometría de masas de la muestra total de gotas lipídicas de ratones macho y hembra carentes de *ApoE* objeto de estudio en este trabajo experimental fue realizada en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

La proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo, en un momento dado y bajo unas determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, lo que se denomina proteoma (12). También se designa como proteómica al conjunto de técnicas que van a permitir el análisis de un proteoma.

Su estudio implica cuantificar la cantidad de proteína, estructura, funciones, interacciones y modificaciones postraduccionales, lo cual hace que se trate de una metodología mucho más compleja que la genómica debido a las fluctuaciones derivadas del control y la regulación de la traducción del hospedador.

Así mismo, es considerada la ómica más relevante para caracterizar un sistema biológico, así como los mecanismos moleculares que están detrás de los mismos por enfocar su estudio al conjunto de efectores finales de los procesos biológicos de las células, las proteínas (13).

La proteómica basada en espectrometría de masas para el estudio de un lisado de homogenizado hepático puede seguir la metodología expuesta a continuación. En primer lugar, se produce la lisis de la muestra y extracción de las proteínas del homogenizado seguida de proteólisis en péptidos mediante la peptidasa tripsina, este procesamiento de la muestra a menudo incluye diversos tratamientos físicos y químicos como la sonicación y aplicación de detergentes. Además, pudo realizarse un fraccionamiento previo mediante cromatografía de intercambio iónico para enriquecer la muestra en subpoblaciones específicas de péptidos debido a la enorme complejidad que supone la

digestión enzimática de un proteoma en un número de péptidos incompatible con la aplicación directa del resto de técnicas usadas más adelante en el procesamiento (13,14).

Posteriormente, estas fracciones se analizan individualmente en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en la que los péptidos quedan fragmentados tras aplicar espectrometría de masas en tándem (MS/MS), que suele ser estar basada en disociación inducida por colisión (CID) y genera iones de fragmentos característicos de los péptidos seleccionados (14). La modalidad de cromatografía más ampliamente usada en proteómica es la cromatografía líquida puesto que puede ser directamente acoplada a MS y las proteínas quedan separadas según la propiedad física o química en la que se base la cromatografía seleccionada, en esta ómica se hace uso fundamentalmente de cromatografía de afinidad, de intercambio iónico, de fase reversa, de penetrabilidad o líquida multidimensional. En términos generales, la cromatografía líquida permite separar las proteínas del homogenizado hepático en dos fases: una estacionaria y otra móvil. Las moléculas o péptidos van a separarse en función de su solubilidad o su interacción con alguna de las fases en una columna, habitualmente se pretende su retención en la fase estacionaria de manera que, aquellos péptidos con menor solubilidad o menor interacción quedarán menos retenidos en la fase estacionaria y se moverán con cierta facilidad y rapidez en la fase móvil, mientras que aquellos que tengan mayor solubilidad o interacción con la fase estacionaria, quedarán retenidos en la fase estacionaria durante más tiempo y se moverán más despacio por la fase móvil. Es decir, se espera que los primeros péptidos en pasar al espectrofotómetro de masas sean aquellos con mayor facilidad de movimiento en la fase móvil. Por otra parte, actualmente los estudios proteómicos se llevan a cabo mediante espectrometría con dos analizadores dispuestos en tándem, en el primer equipo se miden los espectros  $m/z$  de los péptidos sin fragmentar tras su paso por el mismo y en el segundo analizador de masas, se obtiene un espectro de  $m/z$  más detallado de los péptidos tras su fragmentación en una cámara de colisión por CID donde se trata la muestra con energía cinética seguida de colisiones con moléculas neutras como helio, nitrógeno o argón (14).

El paso final se basa en identificar inequívocamente cada proteína asociada a las gotas lipídicas hepáticas de la muestra mediante las masas de los péptidos que la conforman, lo cual se denomina huella peptídica. Estos espectros MS/MS basados en la relación masa-carga de cada fragmento molecular obtenidos se depositan en bases de datos como Mascot o Sequest para deducir a partir de ellos las secuencias de péptidos a las que podrían corresponder. Finalmente, a partir de las distintas secuencias de péptidos asignadas se realiza un ensamblaje para conocer la secuencia peptídica de la proteína final.

Para la validación biológica de estos resultados a menudo se hace estadística para comparar los espectros de MS-MS obtenidos en distintas bases de datos e identificar posibles falsos positivos (14).

#### 4.5. Detección inmunoespecífica de proteínas: Western Blot

El siguiente paso es la confirmación por Western Blot de los resultados obtenidos en proteómica con el objetivo de llegar a resultados similares mediante el análisis de esas gotas de lípidos hepatocelulares con dos técnicas distintas y complementarias y, además, llevadas a cabo en diferentes laboratorios.

Se utilizaron anticuerpos primarios específicos de los tres genes de estudio, el anticuerpo que reconoce CLTC es monoclonal, mientras que los anticuerpos de reconocimiento frente a NOP58 y LUM son policlonales. Para normalizar los resultados se hace uso del anticuerpo de HSC70 a dilución 1:500 ensayado y validado en estudios anteriores del grupo (9).

El procedimiento seguido en el Western es una primera separación de las proteínas de la muestra de acuerdo a su punto isoeléctrico, peso molecular, carga eléctrica y posibles modificaciones postraduccionales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, finalizada la electroforesis se realiza una electrotransferencia húmeda de las proteínas a una membrana de PVDF y posteriormente, se procede a la inmunodetección de las proteínas de interés mediante la incubación con el anticuerpo primario, una serie de lavados y la incubación del segundo anticuerpo marcado con un fluoróforo que tras una serie de lavados permite revelar en el equipo Odyssey la presencia de las proteínas en cada una de las fracciones de machos y hembras.

Para la electroforesis hay que preparar previamente el gel inferior o separador cuyo porcentaje de acrilamida va a depender del peso molecular de las proteínas de interés a separar, la proteína de menor peso molecular es LUM de 38,2 kDa y la proteína más pesada es CLTC de 191,4 kDa. Por tanto, la concentración inicial con la que se realiza el primer gel es de un 12% de acrilamida. Después de probar con esta concentración de poliacrilamida y tras intentar optimizar el Western, se preparan también geles del 8%, donde la proteína más pesada (CLTC) se podrá detectar mejor puesto que aumentará el tamaño de poro del gel. Las proteínas más pequeñas (NOP58 y LUM) se van a separar mejor en el del 12% de poliacrilamida, puesto que disminuye el tamaño de poro. Este gel se prepara entre dos cristales, el cristal espaciador y otro de menor tamaño y una vez llenado con la solución del gel separador, se añade isopropanol para evitar la desecación de la parte superior del gel y se deja polimerizar durante 30 minutos. Una vez ha polimerizado, retiramos el isopropanol y se prepara y añade el gel superior o stacking introduciéndose en él un peine que nos servirá de molde tras la polimerización para cargar las muestras en los pocillos generados. El peine usado es de 10 pocillos y de 0,75 mm de grosor lo cual nos limita el volumen de carga de proteína a 33  $\mu$ l.

El orden de carga seguido de izquierda a derecha en todas las imágenes que aparecerán a continuación es el siguiente: en el primer pocillo se carga el patrón de peso molecular Dual color (10 kDa-250 kDa), seguido de las cuatro fracciones de machos, a continuación, se cargan las cuatro fracciones de hembras y en el último pocillo a modo de control positivo, una muestra preparada de gotas lipídicas totales de macho del mismo estudio. Una vez ha polimerizado este segundo gel, se retira con cuidado el peine y se coloca en la cubeta de electroforesis el tampón de electroforesis 1X de manera que quede cubiertos todos los geles y se permita el paso de corriente para la correcta migración de las muestras.

Previamente a la preparación de las muestras, se les da un pulso en el sonicador con el objetivo de cargar solo proteína soluble y se les añade tampón de carga en un volumen correspondiente al 20% del volumen final de la muestra para favorecer la entrada por densidad.

Las muestras se desnaturizan a una temperatura de 95-100°C durante 5-10 minutos para romper los puentes disulfuro, se incuban en hielo 2 minutos para que no se revierta la desnaturización y se centrifugan, de manera que ya pueden ser cargadas. El gel se deja correr durante 3 horas a 80 V a temperatura ambiente.

Para poder hacer cualquier estudio de expresión diferencial, se ha de cargar la misma cantidad de proteína de todas las muestras por lo que la fracción con menor concentración de proteína actúa como limitante. Tras concentrar la fracción 1 de gotas lipídicas de machos que estaba limitando considerablemente la cantidad de carga, se corren los geles con 30  $\mu$ g de todas las muestras y para ello se calcula el volumen necesario de cada fracción a partir de la concentración.

Finalizada la electroforesis, el gel se deja unos 15-30 minutos en tampón de transferencia para quitar las sales y el detergente del buffer de electroforesis y se prepara la transferencia húmeda. El material necesario es una membrana de PVDF por gel en la que quedarán las muestras transferidas, se activa tras sumergirla en metanol durante 20 segundos, posteriormente se aclara en agua otros 20 segundos y se equilibra con el tampón de transferencia húmeda 1X y, 16 papeles Whatman del tamaño del gel. En la transferencia húmeda el gel se coloca en un sándwich que va a permitir el paso de la corriente de cátodo a ánodo, la disposición del sándwich es 8 papeles Whatman, después la membrana, encima el gel y otros 8 papeles Whatman, de manera que, en esta disposición y evitando la presencia de burbujas, tras el paso de la corriente se logra una adecuada transferencia de las proteínas del gel a la membrana. En la cubeta de electroforesis, se coloca el sándwich de acuerdo al paso de la corriente eléctrica, se rellena con buffer de electrotransferencia y se pone el bloque de hielo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se transfiere a 30V durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y en rotación orbital lenta.

El siguiente paso es la inmunodetección. En este caso, se sabe el peso en el que deberían aparecer las bandas para las proteínas de estudio, también se consultó en los catálogos de la casa comercial el peso esperado en el que se suelen detectar estas proteínas con el uso de esos anticuerpos y la ventaja es que van a aparecer bastante separadas entre sí: CLTC 191,4 kDa, NOP58 50 kDa y LUM 38,2 kDa. Teniendo en cuenta estas consideraciones y con la ayuda del marcador de peso molecular, se corta la membrana con el objetivo de reducir el uso de reactivos, anticuerpos primario y secundario, y favorecer la sensibilidad y especificidad de la inmunodetección. Para todos los geles y membranas, se han normalizado los resultados con el uso del gen normalizador HSC70, que pertenece junto a HSP70, GRP75 y GRP78 a la familia de HSP70. Actúan como chaperonas moleculares que facilitan el ensamblaje de complejos de múltiples proteínas, la translocación de polipéptidos a través de membranas y ayudan al plegamiento adecuado de polipéptidos nacientes. Se usa por ser altamente recomendado para la detección de la proteína en humano, ratón y rata mediante Western Blot y se espera obtener una banda a la altura de 70 kDa. Por tanto, a pesar de cortar las membranas según el peso donde esperamos ver a cada una de las proteínas, se etiqueta cuidadosamente cada uno de los trozos con el fin de normalizar cada uno de los geles con su respectivo gen normalizador.

- En el gel del 8% se estudia a CLTC y se realiza un corte de manera que, tendremos la membrana dividida en dos fragmentos, en uno se encuentra la proteína CLTC (parte superior de la membrana) y con el resto de la membrana detectamos a HSC70.
- En el gel del 12% se estudia a NOP58 y a LUM y el corte divide a la membrana en dos partes en uno de ellas esperamos detectar a NOP58 y a HSC70 y en la restante a LUM (parte inferior de la membrana).

Tras el corte de las membranas, se bloquean con la solución de bloqueo (sin tween al revelar en el Odyssey) de manera que queden recubiertas en su totalidad durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, cada fragmento de membrana se incuba con su correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón de anticuerpos a una concentración de 0,125-0,16 ml/cm<sup>2</sup> durante 1,5 horas a T<sup>a</sup> ambiente en agitación suave, salvo para la proteína HSC70 la cual requiere una incubación con su anticuerpo primario durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (en el caso de querer detectar simultáneamente dos proteínas se pueden añadir dos anticuerpos primarios a la vez puesto que se puede hacer uso de anticuerpos secundarios con fluoróforos excitables a diferentes longitudes de onda simultáneamente, 680 y 800). Se lava la membrana 3 veces con solución de lavado y en agitación durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente cubriéndola en su totalidad y se pasa a incubar con el anticuerpo secundario conjugado

con un fluoróforo que va a permitir su revelado por la señal emitida tras la excitación a 600 o 800 nm mediante el escáner del Odyssey, la concentración es de nuevo 0,125-0,16 ml/cm<sup>2</sup>. El anticuerpo secundario se incuba durante 1 hora a T<sup>amb</sup> ambiente en agitación y finalmente, se vuelve a lavar la membrana tres veces con las mismas condiciones anteriores y en este caso, se realiza un cuarto lavado con agua Adde durante 10 minutos para eliminar el Tween y las sales, necesario para poder usar el equipo Odyssey.

Para el revelado, se añade un poco de agua sobre el cristal del escáner, se coloca la membrana de manera que las proteínas queden orientadas pegadas al cristal, se coloca una plantilla de silicona sin que queden burbujas y se escanea con dos canales o con uno en función del fragmento de membrana que estudiemos. La sensibilidad y especificidad del escaneado mejora al revelar por separado cada una de las proteínas.

Los anticuerpos secundarios seleccionados para el revelado de las proteínas son los siguientes: Anti-Goat 680 a una dilución 1:10.000 para revelar la presencia de HSC70, Anti-Mouse 680 para detectar a CLTC a dilución 1:15.000 (CLTC se detecta a partir del gel al 8%, aunque tanto CLTC como HSC70 son revelados con un anticuerpo excitable a 680 nm, cada una de las proteínas se encuentran en fragmentos distintos de la membrana con lo que se revela por separado y no hay solapamientos) y, finalmente, Anti-Rabbit 800 para detectar tanto a NOP58 como a LUM a una dilución 1:20.000 (aunque ambas dos proteínas se van a detectar a partir del gel del 12% de poliacrilamida se puede usar el mismo anticuerpo y con la misma longitud de onda puesto que vamos a detectar cada una de las proteínas en diferentes fragmentos de la membrana, es decir, por separado y normalizamos los resultados con el anticuerpo conjugado con el fluoróforo excitable a 680 nm). De esta manera, no se produce solapamiento en la detección de ninguna de las proteínas y las diluciones usadas para los distintos anticuerpos son el resultado de una optimización a partir de los diferentes Western realizados a lo largo del trabajo experimental.

#### 4.6. Análisis de datos

Se han usado diversas herramientas informáticas para la interpretación de los datos. El programa SPECTROstar Nano permite la visualización de los resultados llevados a cabo en lectores de microplacas de absorbancia (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). En este caso, se usa para medir las concentraciones de proteína de las fracciones de gotas lipídicas tras su purificación. Para la obtención de las imágenes tras el escaneado de las membranas en el equipo Odyssey y el análisis cuantitativo de las mismas se van a usar dos softwares distintos. En primer lugar, el software Image Studio de LI-COR Biosciences permite la captura de imágenes con los anticuerpos fluorescentes usados. Posteriormente, el software Quantity One 1-D análisis permite la cuantificación de las proteínas detectadas en los Western, con las imágenes en blanco y negro se señalan individualmente las bandas a cuantificar y tras considerar el volumen y área que ocupan y el ruido de fondo de la membrana, da el valor de proteína detectada. Se emite un fichero para cada gen como resultado de este análisis.

En cuanto a las herramientas informáticas para el análisis bioestadístico, se ha usado fundamentalmente Excel y GraphPad Prism 9. Se empiezan manejando los datos en Excel, de manera que se crea un fichero con los datos de los genes de estudio por geles para así normalizar y tener en cuenta la cantidad de proteína cargada en cada uno de los mismos particularmente, además todos los datos deben ser expresados en tanto por ciento para poder establecer comparaciones. Se realizan tablas del porcentaje de cada una de las proteínas por fracción de gota y por sexo y se calculan tanto el promedio como la desviación típica.

Por último, se realizan tablas para recopilar todos los datos y reflejar el contenido total de esas proteínas en macho y hembra sin considerar la separación por fracciones, es decir, para este análisis se suma la cantidad de proteína detectada en el total de las fracciones.

La herramienta GraphPad permite analizar si los datos obtenidos son significativos y se pueden aplicar diferentes test estadísticos. Por una parte, para el análisis de diferencias significativas en la población de gotas lipídicas en términos generales se usa el test Ordinary one way-ANOVA, de manera que aquí cada valor se considera independiente y no se pueden establecer diferencias significativas por sexo, solo se puede afirmar si la hay, una heterogeneidad a nivel de todas las muestras estudiadas. Por otra parte, para el establecimiento de comparaciones de cantidad de proteína en la misma fracción entre macho y hembra se ha utilizado el test no paramétrico Mann-Whitney.

Ambos test estudian si hay una diferencia significativa entre las medias de los datos tratados y permiten conocer los valores del P valor y R cuadrado. Se considera significativo un P valor < 0.05 representado como \* y un P valor < 0.01 representado mediante \*\*. El factor limitante de estas herramientas es el tamaño de muestra o número necesario de valores para poder detectar una determinada diferencia entre los distintos grupos de estudio o condiciones estudiadas.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Resultados de separación de gotas lipídicas por tamaño de gota y concentración proteica en protocolos 1 y 2

Como resultado de la ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa de la fracción total de gotas lipídicas se obtiene su separación por tamaño. En la parte superior de los tubos de centrifuga aparece la fracción lipídica que tiene un mayor tamaño en la gota de grasa y presenta baja densidad, lo cual hace que reflote con más facilidad, y en la parte inferior se encuentran las gotas de grasa más pequeñas y de mayor densidad. En las bandas centrales aparecen gotas de grasa de tamaños intermedios, de manera que a medida que aparecen en gradientes de sacarosa más elevados son de menor tamaño.

- Tras aplicar el primer protocolo, las gotas lipídicas aparecen distribuidas en cinco fracciones tanto en macho como en hembra.
- Tras centrifugar las gotas lipídicas con el gradiente de sacarosa del segundo protocolo, pueden verse cuatro fracciones en macho y hembra.

Tras la recogida de las fracciones de gotas obtenidas, el siguiente paso es seleccionar aquel protocolo que ha sido más eficiente en la separación en base a la concentración de proteína soluble asociada a cada una de esas fracciones. En las imágenes mostradas se observan diferencias significativas en cuanto a la cantidad de gotas que aparecen reflatadas en cada una de las fracciones entre los dos protocolos, viéndose un mayor contenido de gotitas en el protocolo 2. Este hecho tiene sentido si se tiene en cuenta que las gotas han quedado distribuidas en una fracción menos respecto al protocolo 1.

En las siguientes tablas se muestra la concentración de proteína asociada a cada una de las fracciones tras su purificación en  $\mu\text{g/ml}$ .

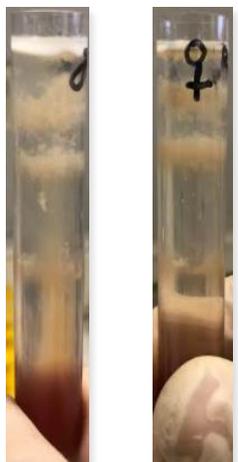


**Figura 4.** Separación de gotas lipídicas de ratón deficiente en ApoE macho (izquierda) y hembra (derecha) por tamaño de gota lipídica en gradiente de sacarosa 42,7%, 25%, 15%, 10%, 5% y 0%



**Figura 5.** Tubos de centrifuga tras la recogida de las cinco fracciones de gotas lipídicas obtenidas

Protocolo de separación 1			
Fracciones de machos	µg/ml proteína	Fracciones de hembras	µg/ml proteína
LD1	98,4	LD1	0
LD2	261,8	LD2	0
LD3	143,7	LD3	0
LD4	13,8	LD4	70,8
LD5	309,0	LD5	320,8



**Figura 6.** Separación de gotas lipídicas de ratón deficiente en ApoE macho (izquierda) y hembra (derecha) por tamaño de gota lipídica en gradiente de sacarosa 65%, 52%, 44%, 35%, 25%, 10% y 0%



**Figura 7.** Tubos de centrifuga tras la recogida de las cuatro fracciones de gotas lipídicas resultantes

Protocolo de separación 2			
Fracciones de machos	µg/ml proteína	Fracciones de hembras	µg/ml proteína
LD1	1428,8	LD1	1957,5
LD2	2244,1	LD2	1231,9
LD3	1396,5	LD3	1241,0
LD4	1832,5	LD4	1622,1

Como se ve todas las fracciones presentan proteínas asociadas a las distintas gotas lipídicas, salvo las fracciones 1,2 y 3 de hembras obtenidas del primer protocolo. Este hecho seguramente se podría explicar debido a problemas de resuspensión de las proteínas de estas fracciones minoritarias en hembras o a la falta de sensibilidad del método de cuantificación. El resto de fracciones del protocolo 1 también presentan una menor concentración de proteínas respecto al protocolo 2, razón por la cual se continua el estudio de las proteínas con las fracciones obtenidas del segundo protocolo. Sin embargo, la fracción 1 de machos seguía presentando una baja concentración proteica, lo cual limitaba la cantidad de proteína a cargar en electroforesis. Para solventar este problema, se concentró dicha fracción gracias a un tubo con filtro especializado en concentración de proteínas en muestras mediante centrifugación.

## 5.2. Resultados de la proteómica

Como resultado de la proteómica de la muestra de gotas lipídicas totales de ratón deficiente en *ApoE* macho y hembra se genera un archivo en el que aparecen un total de 2.399 proteínas detectadas en al menos algún sexo. Si la proteína ha sido detectada en la muestra aparece como “*high*”, mientras que si no se detecta se refleja como “*not found*”. Además, cada proteína recibe una puntuación según la cobertura y el número de péptidos constituyentes de la misma que han podido ser detectados en el espectrómetro de masas. El criterio mínimo seguido para poder confirmar la presencia de una proteína es que se hayan detectado al menos dos o tres péptidos de la misma. El siguiente paso es el purgado y procesado de datos, se seleccionan aquellas proteínas en las que se ve un cambio significativo entre sexos, primero se filtran aquellas proteínas en las que se han identificado al menos dos péptidos en ambos sexos y posteriormente, estas proteínas se someten a un filtro en el que se fija la presencia de un número de péptidos en un sexo y en el otro sexo debe aparecer al menos un cambio de al menos el doble en el número de péptidos. En estas condiciones, siguen apareciendo un total de 1.400 proteínas, por lo que se debe seguir subiendo la magnitud de cambio para quedarnos con aquellas proteínas cuya diferencia sea más significativa. Además, también se tiene en cuenta en este punto el score del Mascot, que refleja la puntuación con la que esa secuencia de péptidos ha sido asignada con las depositadas en la base de datos.

Al final del análisis, se obtienen 7 proteínas con una diferencia de *scores* significativa entre macho y hembra, diferencia calculada como el cociente del *score* de la proteína en hembra entre el *score* en macho. Esa diferencia se hace más notable si calculamos su logaritmo en base dos, de manera que las tres proteínas finalmente seleccionadas son aquellas cuyo logaritmo sea más negativo o más positivo. Finalmente, las proteínas detectadas con una diferencia en machos significativamente mayor que en hembras son la proteína de la cadena pesada de clatrina 1 (CLTC) y la proteína nucleolar 58 (NOP58), mientras que la proteína seleccionada por su mayor presencia en la muestra de hembra respecto a la de macho es la proteína Lumican (LUM).

En la siguiente tabla, quedan reflejados los parámetros más relevantes tratados para la selección de las proteínas de estudio.

Proteína	Machos			Hembras			Diferencia	Log2 diferencia
	Score Mascot	Cobertura (%)	Péptidos	Score Mascot	Cobertura (%)	Péptidos		
<b>CLTC</b>	893	26	35	106	6	7	0,1187	-3,0746
<b>NOP58</b>	421	29	10	44	13	4	0,1045	-3,2582
<b>LUM</b>	22	8	2	152	12	3	6,9090	2,7885

El estudio de las proteínas seleccionadas se justifica a continuación:

#### 5.2.1. Proteína de la cadena pesada de clatrina 1 (CLTC)

La cadena pesada de clatrina 1 está codificada por el gen *CLTC* localizado en el cromosoma 17 en *Homo sapiens* (humano) y en el cromosoma 11 en *Mus musculus* (ratón doméstico). Esta proteína de 191,6 kDa codifica para uno de los constituyentes más importantes de las vesículas y hoyos recubiertos de clatrina, sin embargo, el complejo funcional de clatrina conocido como triskelion requiere de la asociación de tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras. Tiene asociadas múltiples funciones biológicas entre las que cabe destacar el aclaramiento de partículas de lipoproteínas de baja densidad motivo por el cual podría aparecer en las gotas lipídicas.

Sin embargo, también participa en otros procesos muy importantes como la organización de la membrana celular, división celular, autofagia y endocitosis mediada por clatrina que hacen que tenga una expresión ubicua en la célula. Por tanto, se trata de una proteína que no entra en ninguna clasificación de las enumeradas anteriormente, ya que podría estar implicada tanto en el metabolismo de los lípidos que contiene la gota como en el tráfico de estos orgánulos. Además, en la red de interacción de CLTC podemos ver tanto proteínas implicadas en señalización celular como proteínas características del citoesqueleto con las que contribuye a la remodelación celular (UniProtKB-Q00610, NCBI-ID del gen: 1213).

#### 5.2.2. Proteína nucleolar 58 (NOP58)

La proteína nucleolar 58 también llamada ribonucleoproteína 58 está codificada por el gen *NOP58* situado en el cromosoma 2 en humano y en el cromosoma 1 en ratón, y tiene una masa de 59,6 kDa. Se trata de una de las proteínas ribosómicas encontradas en los estudios de proteómica de LD ya que tiene como función la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S y es un componente central de los RNA nucleolares pequeños (snoRNA) ubicados en el nucléolo para modificar el RNAr. Los snoRNA se clasifican en dos grupos: los de la caja C/D y los de caja H/ACA, concretamente esta proteína se asocia con los de la caja C/D que introducen modificaciones en el RNA ribosómico de tipo metilación y algunos ejemplos de snoRNAs de los que forma parte son U3, U8 y U14. En esta línea, se ha sugerido que las gotas lipídicas están asociadas con procesos de traducción de proteínas y la posibilidad de que exista un autoabastecimiento de proteínas (UniProtKB-Q9Y2X3, NCBI- ID del gen: 51602).

### 5.2.3. Proteína lumican (LUM)

La proteína llamada lumican está codificada por el gen *LUM* y se encuentra en el cromosoma 12 y 10 para humano y ratón, respectivamente. Forma parte de la familia de los proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) y regula el ensamblaje de fibras de colágeno en la matriz extracelular de diversos tejidos, así como la migración de células epiteliales y la reparación de los mismos (15) (UniProtKB-P51884, NCBI-ID del gen: 4060).

Ha sido asociada recientemente con múltiples papeles biológicos como la organización del citoesqueleto, regulación de vías de señalización celular de proliferación, adhesión y migración, así como en regulación de la respuesta inmune del huésped. Se han estudiado sus niveles de expresión en el hígado debido a que un exceso de producción de colágeno es indicador de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y va a potenciar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y otras enfermedades cardiovasculares, concluyendo que efectivamente sus niveles de expresión son más altos en sujetos con estas patologías (16).

### 5.3. Inmunodetección y cuantificación de las proteínas de estudio

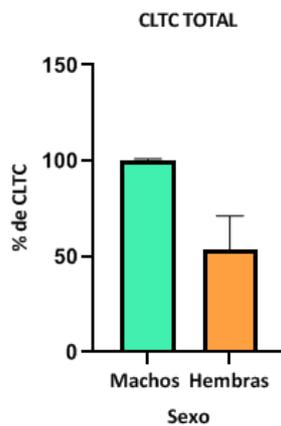
El objetivo es confirmar mediante Western blot los resultados obtenidos en proteómica de las tres proteínas seleccionadas. Cualquier estudio de expresión diferencial o comparativo, se suele validar obteniendo resultados similares o compatibles mediante el uso de técnicas diferentes o realizadas por distintos operarios. En este caso, se validan los resultados de proteómica comparando la cantidad de cada una de las proteínas en macho y hembra en la muestra de gotas lipídicas totales mediante Western blot. Adicionalmente, debido a que se ha optimizado la separación de las gotas por tamaño, se buscan posibles diferencias significativas de estas proteínas en las fracciones 1,2, 3 y 4 entre macho y hembra.

Se han realizado diferentes Western blot para cada una de las proteínas con el fin de optimizar las condiciones y conseguir una mayor sensibilidad y especificidad de los anticuerpos usados. Para homogeneizar los resultados, la cuantificación de cada una de las proteínas de los diferentes geles ha sido normalizada con la proteína normalizadora HSC70 y los valores finales son representados en tanto por ciento de manera que se asigna a los resultados obtenidos para machos la totalidad o 100%, para así obtener el porcentaje de proteínas en hembras respecto al 100% de machos.

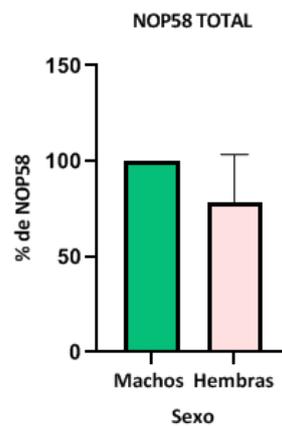
A partir del revelado por fluorescencia de las membranas con el escáner Odyssey se tiene una visión cualitativa de la presencia de cada una de las proteínas en las distintas fracciones lipídicas. Gracias al software Quantity One se cuantifican individualmente cada una de las bandas, de manera que se obtienen los valores detectados para cada gen de estudio y el valor de HSC70 de todos los geles. Teniendo en cuenta el ratio del gen de estudio respecto del gen estándar, la concentración de proteína obtenida por Bradford en cada fracción, el volumen de cada fracción (aproximadamente 500  $\mu$ l) y la cantidad de proteína cargada en cada pocillo de electroforesis, se puede conocer la cantidad detectada de cada uno de los genes.

Para la interpretación de los resultados obtenidos con CLTC se cuantifican tres Western blot, mientras que tanto para NOP58 como para LUM se dispone solo de dos, lo cual limita en cierto modo el establecimiento de comparaciones estadísticamente significativas.

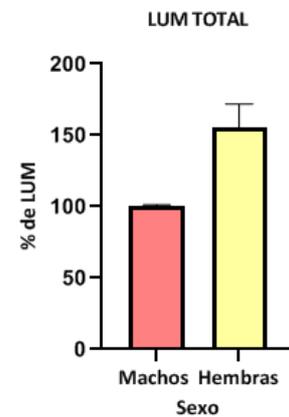
En las siguientes gráficas, se muestran los resultados obtenidos en % para CLTC, NOP58 y LUM en la fracción lipídica total, obtenidos como la suma del total de cantidad de proteína detectada en las cuatro fracciones, cuyos valores son normalizados para cada Western blot individualmente:



**Figura 8.** Porcentaje de CLTC en fracción de gotas lipídicas totales en macho y hembra



**Figura 9.** Porcentaje de NOP58 en fracción de gotas lipídicas totales en macho y hembra



**Figura 10.** Porcentaje de LUM en fracción de gotas lipídicas totales en macho y hembra

Los datos expuestos acerca de la cantidad relativa de los genes en la muestra total de gotas lipídicas pretende dar una validación a los resultados obtenidos por proteómica. Sin embargo, aunque para CLTC y NOP58 se haya confirmado una diferencia superior en machos que, en hembras, y, para LUM también se demuestre una mayor presencia en las gotas lipídicas del sexo femenino respecto del masculino, el análisis estadístico mediante Mann-Whitney test solo da un P valor significativo para la proteína CLTC, P valor < 0.05 \*. Este hecho se explica por la baja cantidad de datos sobre los que se hace la estadística: n (Western)=3 de CLTC; n (Western)=2 de NOP58 y LUM.

A continuación, se analiza cada uno de los genes individualmente y por tamaño de gota lipídica y se muestran algunos de los Western realizados a lo largo del trabajo experimental. En todas las membranas de izquierda a derecha los cuatro primeros carriles corresponden a la fracción 1,2,3 y 4 en macho y los cuatro siguientes a la fracción 1,2,3 y 4 en hembra.

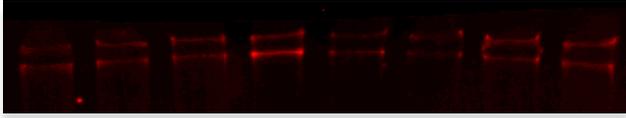
### 5.3.1. Proteína CLTC

Si se hace un análisis de todos los datos obtenidos en las distintas fracciones lipídicas aplicando el test estadístico Ordinary one-way ANOVA en este gen no existen diferencias significativas en cuanto al % de CLTC en el conjunto de las gotas lipídicas. Además, como se observa en las gráficas las desviaciones estándares para este gen también son bastante elevadas por lo que no se ha conseguido alcanzar una homogeneidad en los resultados. Del mismo modo, si se compara la cantidad de CLTC en cada fracción de un sexo y otro mediante el test Mann-Whitney tampoco se pueden establecer diferencias significativas entre sexos.

Para llegar a resultados más concluyentes acerca de la expresión diferencial de este gen, se podría realizar algún Western más, de manera que aumentara el número de datos en la estadística. No obstante, en la gráfica se puede observar una mayor abundancia de CLTC detectada en el sexo masculino, siendo esta diferencia más notable entre la fracción 1 y 2 de macho y hembra.

Como se ve en las imágenes, el anticuerpo monoclonal usado para detectar CLTC permite la visualización de bandas bastante definidas y en concreto para el gel mostrado, cabe destacar la diferencia cualitativa detectada en la fracción 4 de macho respecto a la de hembra.

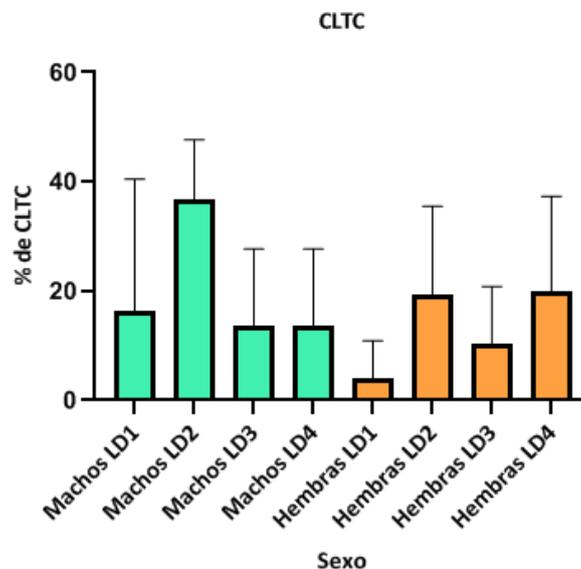
La proteína normalizadora en este gel no muestra a priori las bandas ideales necesarias para usar la proteína como control, sin embargo, en la cuantificación de las bandas, se obtenían unos valores similares, que fueron considerados aceptables.



**Figura 11.** Western blot de la proteína CLTC en gel de poliacrilamida al 8%, dilución del anticuerpo 1º específico de Cltc 1:20.000 y secundario anti Mouse 680 1:15.000



**Figura 12.** Western blot de la proteína HSC70 en gel de poliacrilamida al 8%, dilución del anticuerpo 1º Hsc70 1:500 y secundario anti Goat 680 1:10.000



**Figura 13.** Gráfica de % de CLTC en fracción 1,2, 3 y 4 en macho y hembra. Media y desviación estándar de las fracciones, n (Western) =3.

### 5.3.2. Proteína NOP58

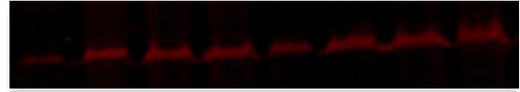
Tras el estudio estadístico de todos los datos obtenidos para la proteína NOP58 en las diferentes fracciones lipídicas, se concluye mediante el uso de Ordinary one-way ANOVA que existen diferencias significativas de su presencia en las diferentes poblaciones de gotas separadas en términos generales. En este caso, se obtiene un P valor <0.05 \*. Sin embargo, al enfrentar los datos de cada fracción con su misma fracción en sexos opuestos no hay diferencia estadísticamente significativa, la explicación puede deberse a que hay n=2 valores de proteína cuantificada para cada una de las fracciones de gotas.

Por tanto, de nuevo podría hacerse alguna réplica más de Western con el fin de confirmar que existen las diferencias reveladas por el estadístico ANOVA para NOP58.

Como se observa en las imágenes, en este caso la proteína HSC70 aparece detectada en una cantidad similar en todas las fracciones separadas, sin embargo, en la fracción 1 parece haber menor cantidad de proteína cargada. Además, también se ve una señal más tenue en esta fracción en el gel de NOP58, por lo que pudo haber algún problema en la entrada de la muestra al pocillo de electroforesis. En el gel mostrado es difícil afirmar cualitativamente que haya una mayor abundancia de esta proteína en el sexo masculino.

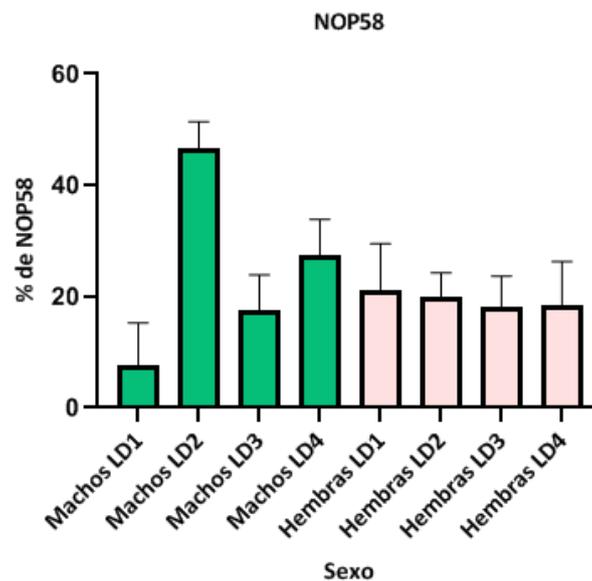


**Figura 14.** Western blot de la proteína NOP58 en gel de poliacrilamida al 12%, dilución del anticuerpo 1º específico de Nop58 1:1.000 y secundario anti Rabbit 800 1:30.000



**Figura 15.** Western blot de la proteína HSC70 en gel de poliacrilamida al 12%, dilución del anticuerpo 1º Hsc70 1:500 y secundario anti Goat 680 1:10.000

En la gráfica, se manifiesta esa mayor abundancia de NOP58 en las fracciones correspondientes al sexo masculino y de nuevo, la diferencia más relevante parece manifestarse en las fracciones de lípidos de mayor tamaño de gota, es decir, en las fracciones 1 y 2.

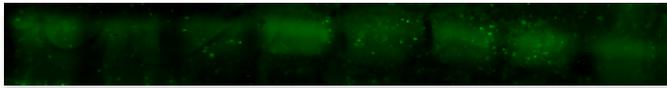


**Figura 16.** Gráfica de % de NOP58 en fracción 1,2, 3 y 4 en macho y hembra. Media y desviación estándar de las fracciones, n (Western) =2.

### 5.3.3. Proteína LUM

Finalmente, en el análisis global de la abundancia detectada de la proteína LUM en las ocho poblaciones de gotas lipídicas, se observan diferencias significativas mediante el test Ordinary one-way ANOVA, con un P valor < 0.05 \*\* para estas muestras de estudio. Sin embargo, como en los casos anteriores el bajo número de valores de cantidad detectada de la proteína para cada una de las fracciones de gotas limita el que estas diferencias puedan aparecer también a nivel de fracciones separadas entre sexo.

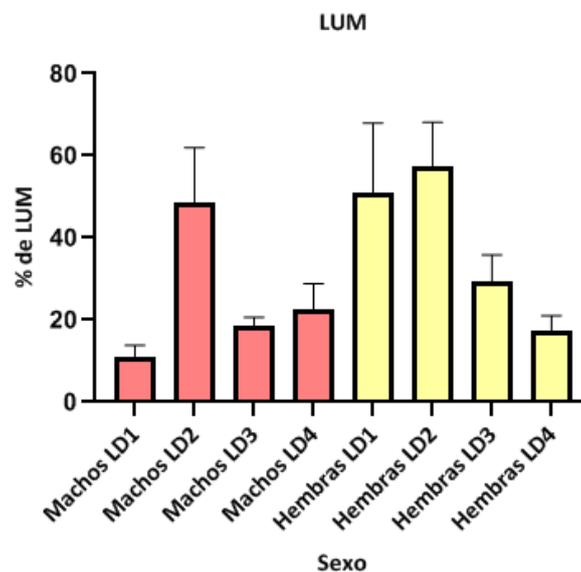
En la imagen obtenida para HSC70 es difícil observar las bandas debido al ruido de fondo, sin embargo, tras su cuantificación, se obtienen valores válidos para normalizar los valores detectados para LUM. Como se muestra en la fotografía, el anticuerpo policlonal usado para la detección de LUM tampoco nos permite la visualización de unas bandas perfectamente definidas y existe bastante ruido de fondo. Salvo por la fracción 4 de machos donde se ve una gran intensidad, el resto de fracciones muestran una mayor presencia de LUM en las gotas de hembra.



**Figura 17.** Western blot de la proteína LUM en gel de poliacrilamida al 8%, dilución del anticuerpo 1º específico de Lum 1:800 y secundario anti Rabbit 800 1:50.000



**Figura 18.** Western blot de la proteína HSC70 en gel de poliacrilamida al 8%, dilución del anticuerpo 1º Hsc70 1:500 y secundario anti Goat 680 1:10.000



**Figura 19.** Gráfica de % de LUM en fracción 1,2, 3 y 4 en macho y hembra. Media y desviación estándar de n (Western) =2.

En la gráfica se observa a diferencia de en los casos anteriores, una mayor abundancia relativa de LUM en las fracciones del sexo femenino, aunque en la fracción 2 de machos también se ha detectado una cantidad considerable de esta proteína. La fracción que mejor refleja la diferencia entre sexos detectada para LUM es la fracción 1 con una abundancia relativa bastante superior en hembra que en macho.

## 6. Conclusiones

Las conclusiones que se extraen de este trabajo experimental son las siguientes:

- La separación de las gotas lipídicas por tamaño de gota puede resultar interesante para estudiar los diferentes lípidos y proteínas que las constituyen y entender los mecanismos moleculares de su formación y metabolismo tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.
- El estudio de proteómica de las gotas lipídicas pone de manifiesto la gran abundancia de proteínas que pueden encontrarse en esta matriz biológica, de manera que se pueden caracterizar aquellas diferenciales entre sexos y asociarlas con ciertas patologías.
- La proteína CLTC es significativamente más detectada en la muestra total de gotas lipídicas del sexo masculino, lo cual se puede confirmar cualitativamente mediante Western blot. Sin embargo, no se puede concluir que esas diferencias existan también por tamaño de gota lipídica.
- La proteína NOP58 presenta una mayor expresión en el sexo masculino respecto al femenino mediante proteómica e inmunodetección. No obstante, son necesarios más ensayos para poder garantizar diferencias en las distintas fracciones entre sexos.
- La proteína LUM se detecta más en la fracción total de gotas lipídicas de hembra respecto a macho y queda verificado mediante proteómica y Western. Sin embargo, para verificar esta afirmación a nivel de fracciones serían necesarias más réplicas.

The conclusions extracted from this experimental work are:

- The separation of lipid droplets by droplet size could be interesting to study the different lipids and proteins that constitute them and to understand the molecular mechanisms of their formation and metabolism, both of them under physiological and pathological conditions.
- The study of proteomics of lipid droplets reveals the great abundance of proteins that can be found in this biological matrix, so that proteins, which have different expression between the sexes, can be characterized and associated with several pathologies.
- The CLTC protein is significantly more detected in the total sample of male lipid droplets, which can be qualitative confirmed by Western blot. However, it cannot be concluded that these differences also exist by lipid droplet size.
- The NOP58 protein has a higher expression in males than in females by proteomics and immunodetection. However, more tests are necessary to confirm differences in the different fractions between the sexes.
- The LUM protein is more detected in the total fraction of female lipid droplets than in male droplets. Proteomics and Western verify it. Nevertheless, to verify this statement at the fraction level, more immunodetections are required.

## 7. Bibliografía

1. Cohen S. Lipid Droplets as Organelles. In: International Review of Cell and Molecular Biology. 2018.
2. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. Vol. 20, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2019.
3. Gluchowski NL, Becuwe M, Walther TC, Farese R V. Lipid droplets and liver disease: From basic biology to clinical implications. Vol. 14, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2017.
4. Meyers A, Weiskittel TM, Dalhaimer P. Lipid Droplets: Formation to Breakdown. Vol. 52, Lipids. 2017.
5. Walther TC, Chung J, Farese R V. Lipid droplet biogenesis. Vol. 33, Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2017.
6. Thiam AR, Beller M. The why, when and how of lipid droplet diversity. Vol. 130, Journal of Cell Science. 2017.
7. Ontko JA, Perrin LW, Horne LS. Isolation of hepatocellular lipid droplets: The separation of distinct subpopulations. J Lipid Res. 1986;27(10).
8. Xu S, Zhang X, Liu P. Lipid droplet proteins and metabolic diseases. Vol. 1864, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2018.
9. Herrera-Marcos L V., Sancho-Knapik S, Gabás-Rivera C, Barranquero C, Gascón S, Romanos E, et al. Pgc1a is responsible for the sex differences in hepatic Cidec/Fsp27 $\beta$  mRNA expression in hepatic steatosis of mice fed a Western diet. Am J Physiol - Endocrinol Metab. 2020;318(2).
10. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. Vol. 24, Nature Medicine. 2018.
11. Bosch M, Sánchez-Álvarez M, Fajardo A, Kapetanovic R, Steiner B, Dutra F, et al. Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. Science (80- ). 2020;370(6514).
12. Bjellqvist B, Ek K, Giorgio Righetti P, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. J Biochem Biophys Methods. 1982;6(4).
13. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and their applications. Vol. 55, Journal of Chromatographic Science. 2017.
14. Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. Next-generation proteomics: Towards an integrative view of proteome dynamics. Vol. 14, Nature Reviews Genetics. 2013.
15. Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. Vol. 60, IUBMB Life. 2008.
16. Karamfilova V, Gateva A, Assyov Y, Nedeva I, Velikova T, Cherkezov N, et al. Lumican in Obese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease with or without Prediabetes. Metab Syndr Relat Disord. 2020;18(9).