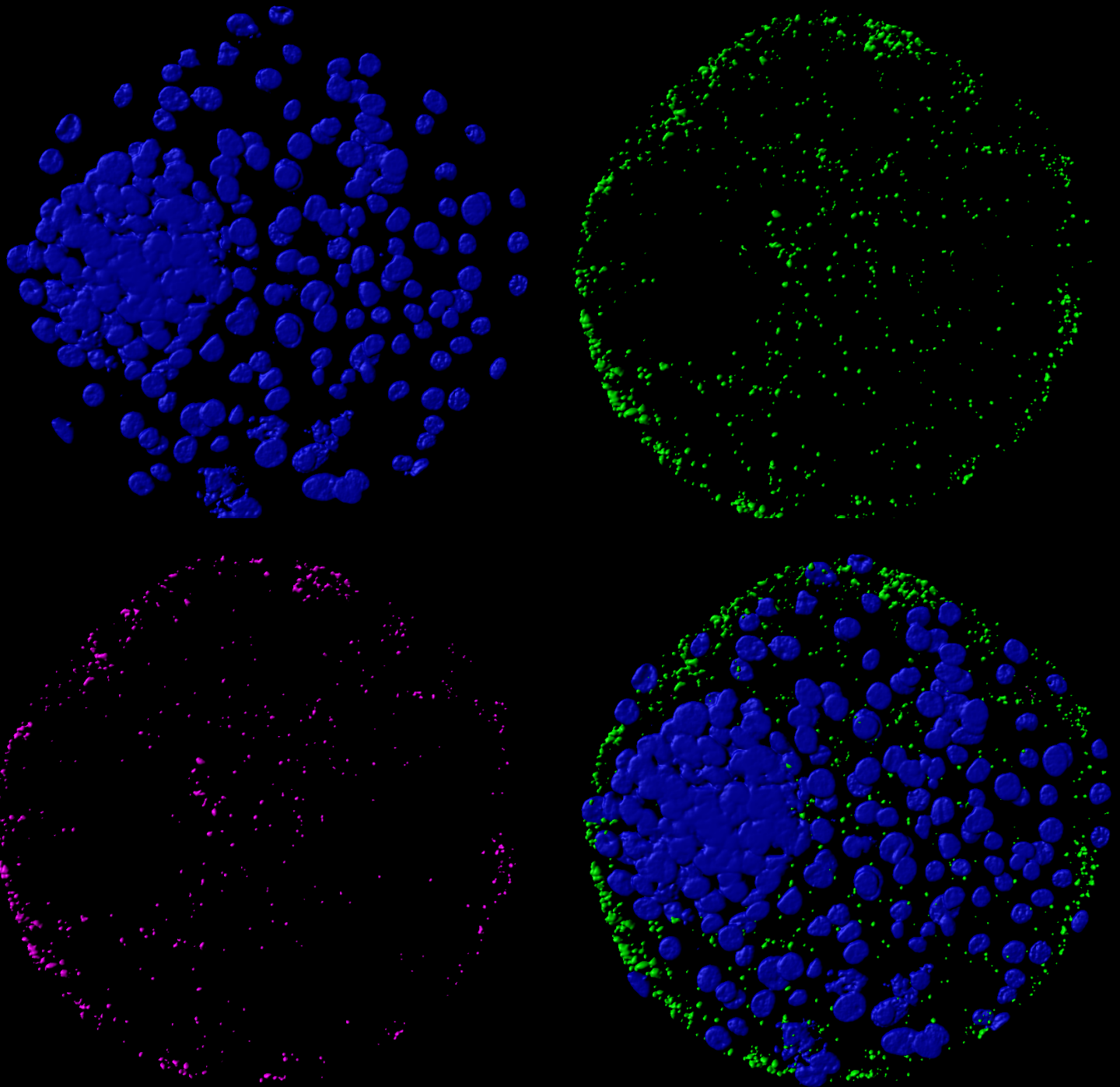




Universidad de Oviedo

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



PILAR NIETO OLMEDO



AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA EN FLUIDO UTERINO BOVINO



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN

AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA EN FLUIDO UTERINO BOVINO

TRABAJO FIN DE MÁSTER
JULIO 2016

PILAR NIETO OLMEDO

DIRIGIDO POR: MARTA MUÑOZ LLAMOSAS
MARCOS GARCÍA OCAÑA



AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas que han estado implicadas de un modo u otro. Por ello, no puedo continuar sin pararme a agradecer a cada una de ellas el apoyo proporcionado.

En primer lugar agradecer a Marta Muñoz, directora y alma mater del proyecto. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación han sido fundamentales para la elaboración de este trabajo. Agradecerle sobre todo su perseverancia, paciencia y sentido del humor, otros habrían tirado la toalla mucho antes, mientras que ella siempre aportaba un aliento de esperanza que infundía ganas de seguir adelante.

Gracias a Marcos G. Ocaña, codirector de este trabajo, por hacer que la purificación de proteínas sea un tema accesible, e incluso me atrevería a decir, divertido, impensable para mí hace unos meses cuando recibí por primera vez el título de mi Trabajo Fin de Máster.

Gracias a Enrique Gómez por permitirme, durante estos meses, formar parte de este gran grupo de investigación y por sus consejos y correcciones para la realización de este trabajo.

A Antonio Murillo, compañero de viajes, agradecerle especialmente esos martes lluviosos de olores poco agradables, sus trucos, recomendaciones y grandes correcciones a la hora de escribir. Desearle suerte con todos los proyectos que tiene por delante y que estoy totalmente segura que van a salir estupendamente.

A David Martín quiero pedirle sobre todo “perdón” por gastar todos sus materiales y darle las gracias por ser un gran compañero de laboratorio y por sus inestimables consejos y trucos de “Gran Maestro”.

Gracias a Susana Carrocera por dedicar una parte de su escaso tiempo para ilustrarme en la embriología, y que aún sin pedírselo, sabiendo que es mi gran pasión, no dudó en compartir sus conocimientos conmigo.

En general gracias al grupo de investigación del Área de Genética y Reproducción Animal del SERIDA, porque durante estos meses me he sentido parte de este proyecto y me han hecho sentir como en casa.

Agradecer también el apoyo y ayuda del grupo de investigación del Área de Sanidad Animal; a Rosa Casais por sus sabios consejos; a Ana del Cerro, Roxana y Begoña por su apoyo inestimable con el “temido” Bradford. A todos ellos agradecerles especialmente los materiales facilitados cada vez que nos hicieron falta.

Gracias al Dr. John Armando y al Dr. Damian Houde de Biogen, Cambridge, Massachusetts (EEUU), por su incondicional ayuda en nuestro intento agónico de aislamiento de Artemina Bovina. Gracias por brindarnos aliento cuando estábamos a punto de tirar la toalla. Estoy segura que con su colaboración algún día lo conseguiremos.

Gracias también a mi familia, en especial a Julián y María, sin ellos este año no habría sido posible, gracias por darme cobijo y apoyo, por hacer de canguros de mi prole y por aguantar mis “agonías”, que no fueron pocas. Agradecer también a mis padres y mi hermano, mis fans incondicionales, porque durante toda mi vida han creído en mí, a pesar de mí.

A todos mis compañeros de Máster, ha sido un placer compartir con vosotros esta etapa de mi vida y espero que podamos compartir muchas más. Os deseo suerte a todos.

A mis amigos, pedirles perdón por tenerlos un poco abandonados, gracias por estar siempre ahí.

Por último, me gustaría agradecer de un modo especial a Guille su apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida. Gracias por estar ahí, sin ti nada de esto sería posible.

A Helena, Guille y Artax

RESUMEN

La mejora de las condiciones de cultivo que se utilizan para la producción de embriones de mamíferos *in vitro* es esencial para mejorar la eficiencia de las técnicas de reproducción asistida. Los medios de cultivo (MC) habituales no proporcionan unas condiciones óptimas para el desarrollo del embrión, lo que produce grandes diferencias a nivel morfológico, cinética del desarrollo, expresión génica, supervivencia a la criopreservación y alteraciones epigenéticas entre los embriones producidos *in vitro* (EPIV) y los *in vivo*. Una de las estrategias utilizadas para paliar estas diferencias es la adición de factores de crecimiento (FCs) al medio de cultivo. El fluido oviductal y el fluido uterino (FU) contienen diversos FCs involucrados en la señalización materno-embionaria y en el desarrollo, por lo que la identificación y aislamiento de FCs presentes en el FU puede contribuir a mejorar la eficiencia de los MC *in vitro*. Estudios previos han confirmado la presencia de ARTEMINA (ART), FC perteneciente a la familia del factor neurotrófico derivado de células gliales (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) en el FU, el endometrio y en los blastocistos bovinos. En ratón, la ART mejora el desarrollo *in vitro* de los EPIV, disminuyendo los índices de apoptosis y aumentando la tasas de blastocistos. El objetivo del presente Trabajo de Fin de Máster es el aislamiento de ART a partir de muestras de FU bovino. La adición de ART al medio de cultivo utilizado en la producción de embriones *in vitro* bovinos podría mejorar su calidad lo que mejorará la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones y permitirá en última instancia aumentar los beneficios de la industria ganadera.

Palabras clave: Artemina, Fluido Uterino, Bovino, Producción de Embriones *in vitro*.

ABSTRACT

Optimization of embryo culture conditions is a key factor for improving outcomes from assisted reproductive technologies procedures. Culture media formulations are suboptimal for supporting embryo development and adversely impact *in vitro* produced embryo morphology, metabolism, gene expression, cryotolerance and epigenome. Consequently, several approaches such as growth factor addition to culture media have been employed to improve *in vitro* produced embryo quality. Growth factors in oviductal and uterine fluid are involved in embryo-maternal communication and embryo development thus their identification and isolation from uterine fluid might improve culture media formulation. Previous studies have state the presence of ARTEMIN (ART), a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family of ligands in bovine uterine fluid, endometrium and blastocysts. In mice, ART improves *in vitro* embryo development and reduces embryo apoptotic indexes. The present Master Thesis was designed to isolate ART from bovine uterine fluid. The addition of ART to bovine *in vitro* culture media might improve embryo production efficiency, which ultimately could improve cattle industry benefits.

Keywords: Artemin, Uterine fluid, Bovine, *In vitro* embryo production.

ABREVIATURAS

Ab	<i>Antibody</i>	Anticuerpo
Ag	Antígeno	
ALB	Albúmina	
ART	Artemina	
ARTr	Artemina recombinante	
bARTr	Artemina Bovina recombinante	
βME	β-mercaptoetanol	
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>	
CK	Citoquina	
CV	<i>Column Volumes</i>	Volúmenes de columna
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	Quimioluminiscencia mejorada
EL	Eluido	
EPIV	Embriones Producidos <i>in vitro</i>	
FC	Factor de Crecimiento	
FIV	Fecundación <i>In Vitro</i>	
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	Cromatografía líquida rápida de proteínas
FT	<i>Flow Through</i>	Fracción No pegada
FU	Fluido Uterino	
GDNF	<i>Glial cell-Derived Neurotrophic Factor</i>	Factor neurotrófico derivado de células gliales
HB-EGF	<i>Heparin-Binding Epidermal Growth Factor</i>	
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>	Peroxidasa del rábano
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>	Cromatografía de intercambio iónica
IHQ	Inmunohistoquímica	
MC	Medio de Cultivo	
MCI	Masa Celular Interna	
MIV	Maduración <i>In Vitro</i>	
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	
NP	No Pegada	

PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>	Tampón fosfato salino
pI	Punto Isoeléctrico	
PIV	Producción <i>in vitro</i>	
PM	Peso Molecular	
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>	Fluoruro de polivinilideno
RET	Receptor transmembrana Tirosin-Kinasa	
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Dodecilsulfato sódico
TE	Trofoectodermo	
TFM	Trabajo Fin de Máster	
UV	Ultravioleta	
WB	<i>Western Blot</i>	

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
EMBRIONES PRODUCIDOS <i>IN VITRO</i> VS EMBRIONES PRODUCIDOS <i>IN VIVO</i>	1
COMUNICACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA	4
IMPORTANCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	6
ARTEMINA	8
PROTEÍNAS RECOMBINANTES VS PROTEÍNAS NATIVAS	10
OBJETIVOS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RECOGIDA DEL FU	13
TEST BRADFORD	15
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y SDS-PAGE	16
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (INMUNOCROMATOGRAFÍA)	16
DEPLECIÓN DE ALBÚMINA	18
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	21
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS	25
RESULTADOS	28
RECUPERACIÓN DE FU A PARTIR DE ÚTEROS DE MATADERO	28
IDENTIFICACIÓN DE ART EN FU BOVINO	28
INMUNOAISLAMIENTO DE ART	29
AISLAMIENTO DE ART POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	33
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS	39
DISCUSIÓN	41
RECUPERACIÓN DEL FLUIDO UTERINO	42
PROCESAMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE FU	43
AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA	45
SÍNTESIS DE FCs Y FORMULACIÓN DE MCS EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA	47
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de embriones bovinos producidos in vivo o in vitro.	3
Figura 2. Ambiente intrauterino durante la pre-implantación.	5
Figura 3. Representación de la estructura de la Artemina (ART) y su receptor GFR α 3.	8
Figura 4. Expresión de ART y el receptor GFR α 3 en el embrión bovino.	10
Figura 5. Esquema del diseño experimental.	13
Figura 6. Cuerno uterino bovino tras disección.	14
Figura 7. Dibujo esquemático útero bovino.	14
Figura 8. Amicon [®] Ultra-15 3 KDa.	15
Figura 9. Columna de inmunocromatografía.	17
Figura 10. Columna Vivapure [®] Ion Exchange.	19
Figura 11. Columnas Macrosep [®] Advance Centrifugal Device.	20
Figura 12. Sistema Äkta-FPLC de los SCTs de Oviedo.	21
Figura 13. Columnas Hi Trap SP FF (A) y Hi Trap CM FF (B).	23
Figura 14. Columnas Hi Trap SP XL.	24
Figura 15. Columnas Hi Trap Q XL.	24
Figura 16. Flujo de partículas.	25
Figura 17. Inversión campo eléctrico sistema PAGE.	26
Figura 18. Diferencias SDS-PAGE y Nativa-PAGE	26
Figura 19. Tinción CBB en la que se observa la integridad de los componentes del FU.	28
Figura 20. WB para detectar ART de las muestras de FU.	29
Figura 21. Tinción Coomassie del gel tras pasar la muestras por las columnas Vivapure.	30
Figura 22. Tinción Coomassie (A) y WB (B) tras centrifugación con sistemas Macrosep [®] .	31
Figura 23. Cromatograma de una de las muestras.	31
Figura 24. Resultados cromatografía exclusión molecular.	32
Figura 25. WB fracciones inmunoafinidad.	33
Figura 26. Cromatograma IEX Hi Trap SP FF 1 mL.	34
Figura 27. Tinción Coomassie de las fracciones procedentes de la columna Hi Trap SP FF.	34
Figura 28. WB de las fracciones procedentes de la columna Hi Trap SP FF.	35
Figura 29. Cromatograma IEX Hi Trap CM FF 5 mL.	36
Figura 30. Tinción Coomassie de una de las muestras procedentes de la columna Hi Trap SP FF.	36
Figura 31. WB de una de las muestras procedentes de la columna Hi Trap CM FF.	37
Figura 32. Cromatograma IEX Hi Trap SP XL 1 mL.	37
Figura 33. Tinción Coomassie y WB de dos muestras tras IEX con la columna Hi Trap SP XL.	38
Figura 34. Cromatograma IEX Hi Trap Q XL 1 mL.	38
Figura 35. Tinción CBB y WB de las muestras tras IEX aniónica con la columna Hi Trap Q XL.	39
Figura 36. Gel teñido por CBB sobre WB tras electroforesis nativa.	40
Figura 37. Tinción CBB y WB de una de las muestras tras Native-PAGE.	40

INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (EPIV) de mamíferos es una tecnología que tiene múltiples aplicaciones tanto en biomedicina como en producción animal. Así, esta técnica se utiliza habitualmente para tratar problemas de esterilidad en la especie humana, acelerar el mejoramiento genético en el ganado, preservar animales de alto valor genético o en vías de extinción y rescatar material genético valioso después del sacrificio de hembras. Además, la EPIV permite adquirir los conocimientos básicos para entender las primeras fases del desarrollo embrionario *in vivo*.

EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO* VS EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VIVO*

En la actualidad, existen numerosos métodos para producir embriones *in vitro*, que una vez transferidos a receptoras, dan lugar al nacimiento de individuos aparentemente sanos. Sin embargo, el desarrollo de la mayoría de los embriones de mamífero *in vitro* es diferente comparado con el desarrollo de embriones *in vivo* en estadios similares. Así entre los embriones EPIV y los embriones *in vivo* existen numerosas diferencias a nivel morfológico, cinética del desarrollo, expresión génica, supervivencia a la criopreservación y alteraciones epigenéticas (Farin et al., 2006; Havlicek et al., 2010; Rizos et al., 2002; Urrego et al., 2014; van Soom et al., 1997).

En concreto en la especie bovina, los EPIV difieren de aquellos producidos *in vivo* en muchos aspectos importantes, como son:

- Un citoplasma más oscuro y de menor densidad, como consecuencia de un mayor contenido lipídico (Fair et al., 2001).
- Una zona pelúcida más frágil y blastómeros hinchados.
- Menor velocidad de crecimiento y mayor sensibilidad a cambios térmicos (Rizos et al., 2002).
- Diferencias en la comunicación intercelular (Boni et al., 1999) y en el metabolismo (Khurana y Niemann, 2000).

- Mayor incidencia de anomalías cromosómicas (Viuff et al., 1999).
- Diferencias en la ultraestructura (Crosier et al., 2001; Fair et al., 2001; Rizos et al., 2002).
- Diferencias en la expresión génica y alteraciones epigenéticas (Rizos et al., 2002; Urrego et al., 2014).

Además, los blastocistos bovinos producidos *in vitro* tienen menos células totales que los producidos *in vivo*; al igual que en la masa celular interna (MCI), origen del futuro embrión (Iwasaki et al., 1990). Hay que señalar también que, la cantidad de células apoptóticas de los EPIV es mucho mayor que en embriones producidos *in vivo* (Brison y Schultz, 1997).

En consecuencia, uno de los objetivos de los laboratorios de reproducción asistida es intentar reducir estas diferencias, con el fin de mejorar la calidad de los EPIV. La eficiencia en la producción de embriones hoy en día sigue siendo bastante baja, ya que a pesar de la gran variedad de técnicas existentes y la gran cantidad de investigaciones realizadas en las dos últimas décadas, del 90% de los ovocitos que maduran *in vitro*, sólo un 80% se logra fertilizar y apenas un 30-40% consigue alcanzar el estadio de blastocisto en el día 7 a 8 post-fertilización (Rizos et al., 2008).

Numerosos estudios han examinado cuales de las distintas partes de los sistemas de producción *in vitro* (PIV) (maduración, fertilización y cultivo) contribuyen a determinar la calidad y el rendimiento de los blastocistos producidos. En concreto, la importancia del periodo de cultivo después de la fertilización, se ha puesto de manifiesto en diversos trabajos donde cigotos PIV se cultivaron en oviductos de diversas especies. En bovino, los embriones cultivados en oviductos de oveja a partir de cigotos PIV presentan desde un punto de vista cualitativo, las mismas características que los embriones producidos totalmente *in vivo*, alcanzándose las mismas tasas de preñez tras su descongelación y transferencia que la que se obtienen con embriones *in vivo*: 60-70% (Rizos et al., 2010; Rizos et al., 2002).

Estos datos señalan que el ambiente y la composición de los medios utilizados para el cultivo *in vitro* (CIV) de embriones no proporcionan las condiciones óptimas para el desarrollo del embrión, ya que en su mayoría no se basan en un conocimiento preciso de las necesidades de los mismos (Rizos et al., 2008).

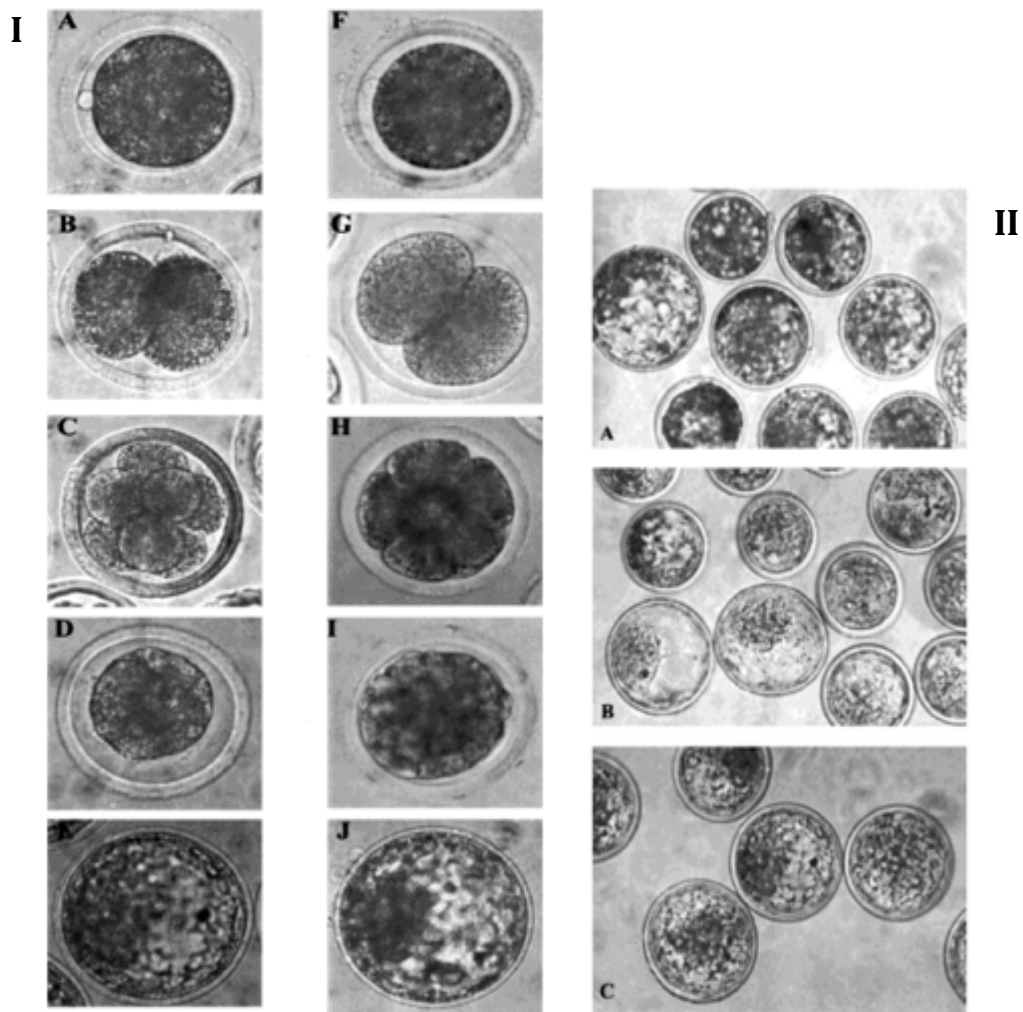


Figura 1. Morfología de embriones bovinos producidos *in vivo* o *in vitro*. En I se observa la diferente morfología de embriones bovinos producidos *in vivo* (A-E) o *in vitro* (F-J). En II, la morfología de embriones bovinos producidos mediante MIV/FIV/CIV (A), cultivo *in vivo* en oviducto de oveja de cigotos MIV/FIV (B) y embriones producidos completamente *in vivo* (C). Imagen adaptada de Rizos et al., 2002.

COMUNICACIÓN MATERNO-EMBRIONARIA

Los embriones de mamífero, durante la fase preimplantatoria, se desarrollan en el tracto reproductivo de la madre sin un contacto directo célula a célula hasta que no se produce la aposición con el endometrio. Los fluidos del tracto reproductivo de las hembras (fluido oviductal y fluido uterino), proporcionan el microambiente necesario para el desarrollo de los embriones durante las fases tempranas, además de facilitar la comunicación materno-embrionaria mediante señales moleculares tales como citoquinas, FCs, hormonas y otros factores, que actúan de forma paracrina, autocrina y juxtacrina y que van a contribuir decisivamente a alcanzar la receptividad en el útero (Wang y Dey, 2006). El análisis de los fluidos oviductal y uterino, proporcionará información valiosa sobre los periodos y eventos implicados en los procesos reproductivos como son la fertilización, receptividad endometrial, desarrollo embrionario temprano y comunicación materno-embrionaria (Hannan et al., 2010). Asimismo, el estudio e identificación de éstas moléculas, generalmente proteínas, presentes en el tracto reproductivo durante el desarrollo embrionario temprano, puede ayudar a mejorar las técnicas de cultivo de embriones *in vitro*.

La facilidad con la que se puede recuperar fluido uterino (FU) *in vivo*, de forma no invasiva ha permitido la realización de numerosos trabajos dedicados al estudio de su naturaleza, tanto en especies animales como en humanos (Beier-Hellwig et al., 1989; Dockery et al., 1988; Mikolajczyk et al., 2006). El estudio de dichas secreciones vence también parte de las dificultades que supone el estudio del endometrio propiamente dicho (Salamonsen et al., 2013), ya que la gran cantidad de proteínas estructurales habituales en los tejidos, generalmente no están presentes en el FU, haciendo de éste una mezcla menos compleja. Además, la composición del FU es fiel reflejo de las modificaciones generales del endometrio, dependientes de las fases del ciclo estral y de las interacciones entre los embriones y el tracto genital. Su análisis solventa también los inconvenientes de la biopsia uterina, ya que el FU integra todos los compartimientos endometriales, mientras que la biopsia únicamente representa una pequeña parte del endometrio.

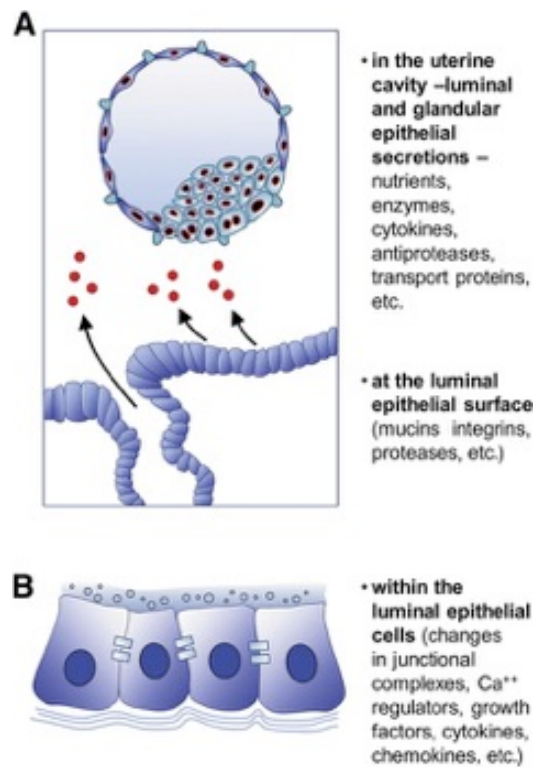


Figura 2. Ambiente intrauterino durante la pre-implantación.

(A) En la cavidad uterina, la secreciones glandulares, entre las que se incluyen nutrientes, enzimas, citoquinas, antiproteasas y proteínas de transporte; proporcionan el microambiente adecuado para el desarrollo final del blastocisto y su implantación. (B) En la superficie del epitelio luminal, se producen cambios tanto en el glicocáliz (mucinas), como en las moléculas de adhesión (integrinas). En las células del epitelio luminal y glandular, los cambios ocurren tanto a nivel de uniones, como de reguladores de Ca⁺⁺, y de moléculas secretadas. *Imagen adaptada de Salamonsen et al., 2013.*

Los estudios realizados para caracterizar la composición del FU, han determinado que muchos de los cambios encontrados en las proteínas, relacionados con la etapa del ciclo estral, la fertilidad en el endometrio o el desarrollo embrionario temprano, no se ven reflejados como cambios transcripcionales (Chen et al., 2009; Gómez et al., 2013; Haouzi et al., 2012; Muñoz et al., 2012). Recientemente se han llevado a cabo diversos trabajos que analizan los cambios que tienen lugar en el transcriptoma del endometrio bovino en respuesta a embriones durante el periodo preimplantatorio (Bauersachs y Wolf, 2013; Forde y Lonergan, 2012). De estos trabajos se puede inferir que, durante el desarrollo temprano del embrión (día 1 a día 8), se establece una comunicación materno-embionaria temprana rápida, quizás en consonancia con el movimiento

diario del embrión a lo largo del cuerno uterino hasta que se produce la implantación. Por tanto, la transcripción inducida por el embrión podría no ser esencial para el embrión en su desarrollo en estas primeras fases (Gómez y Muñoz, 2015). Este tipo de diálogo rápido y dinámico que se establece entre el embrión y la madre durante el desarrollo embrionario en fases muy tempranas, depende por tanto, en gran medida, de cambios en las proteínas (Gómez y Muñoz, 2015). Por todo ello, la proteómica puede resultar más útil que la transcriptómica en el estudio de la comunicación materno-embionaria.

IMPORTANCIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

El establecimiento de una interacción bidireccional y efectiva entre un embrión competente y un endometrio receptivo es un requisito esencial de la reproducción de mamíferos. Una vez en el medio materno, el embrión inicia una comunicación con la madre que está controlada por un gran número de moléculas complejas, entre ellas, los factores de crecimiento (FC). Diversos estudios sobre fertilización *in vitro* (FIV) en la especie humana y en diversas especies animales, han establecido que el cultivo de embriones en medios convencionales carentes de estas moléculas puede dar lugar a un crecimiento inferior al esperado, con alteraciones a corto y largo plazo en el desarrollo de la progenie (Richter, 2008). Además, recientemente se ha demostrado que la adición al medio de cultivo (MC) *in vitro* de moléculas presentes en el útero bovino puede aumentar la viabilidad de los embriones tras su transferencia a receptoras (Gómez, et al., 2014b; Trigal et al., 2011).

Aunque los FCs, en condiciones naturales, se encuentran en concentraciones muy pequeñas, éstas proteínas parecen ejercer un gran efecto sobre el crecimiento del tejido y su diferenciación a través de la unión a receptores de superficie específicos. Se sabe que son numerosos los FCs presentes en el ambiente que rodea a los embriones preimplantacionales de todas las especies, incluida la humana (Richter, 2008). También se ha demostrado que los propios embriones expresan numerosos FCs, pudiendo explicar esta síntesis porqué el cultivo de embriones en grupo y la reducción del volumen del medio de cultivo aumenta el desarrollo

embrionario (O'Neill, 1997 y 1998). Además, se ha demostrado que cuando se suplementan los MCs con FCs individuales tales como insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor, fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, brain-derived growth factors, hepatoma-derived growth factor, glial cell-line neurotrophic factor, y otros, se fomenta el desarrollo a blastocisto y se inhibe la apoptosis embrionaria (Brison y Schultz, 1997; Gómez et al., 2014b; Li et al., 2009; Richter, 2008).

El problema existente a la hora de identificar FCs en el FU es el amplio rango dinámico de las moléculas que lo constituyen y su complejidad. Muchos de estos FCs se han añadido previamente a los MC sin que se hubiera establecido su presencia durante el desarrollo temprano del embrión. Esto ha conducido a resultados desiguales, ya que algunos FCs favorecen el desarrollo embrionario, pero otros dependen del momento del desarrollo en el que se adicionan y otros no presentan ningún efecto (Fields et al., 2011; Gómez et al., 2014b; Larson et al., 1992; Loureiro et al., 2009; Trigal et al., 2011). Una de las posibles causas de estas controversias podría ser que los receptores para determinados FCs se expresan en el embrión también dependiendo de la fase del desarrollo en la que se encuentre. Es por ello, que los embriones son sensibles a algunos FCs presentes en el útero sólo durante periodos específicos de su desarrollo (Gómez et al., 2014b).

En la especie bovina, recientemente se ha utilizado una novedosa técnica de análisis proteómico para estudiar la composición del FU. Esta técnica, denominada Multiple Reaction Monitoring (MRM), permite el análisis cuantitativo de proteínas con amplio rango dinámico y presentes en concentraciones ínfimas (por debajo de femtomoles, 10^{-15}). Mediante el uso del MRM, así como de otras técnicas de cuantificación de proteínas como es el caso del Western Blot (WB), se han identificado una serie de FCs que podrían estar involucrados en la formación de blastocistos. Uno de los factores identificados en este estudio fue la ARTEMINA (ART) (Gómez et al., 2014a).

ARTEMINA

La ART es un factor neurotrófico descubierto en 1998 que pertenece a la familia de los factores neurotróficos del GDNF (del inglés, glial cell line-derived neurotrophic factor) (Baloh et al., 1998). La ART mejora la supervivencia de algunos tipos de neuronas y es importante en el desarrollo y diferenciación tanto del sistema nervioso central como del periférico, además de ser una molécula de orientación que induce la migración y la proyección axonal de neuronas simpáticas (Gao et al., 2015). Además, la ART, reduce el dolor neuropático y está implicada en la reparación del daño neuronal (Lippoldt et al., 2016; Merighi, 2016). Es una proteína que se expresa tanto en el tejido neuronal como en otros tejidos, entre los que se incluyen la próstata, placenta, páncreas, corazón, riñón, glándula pituitaria, pulmones y testículos (Masure et al., 1999).

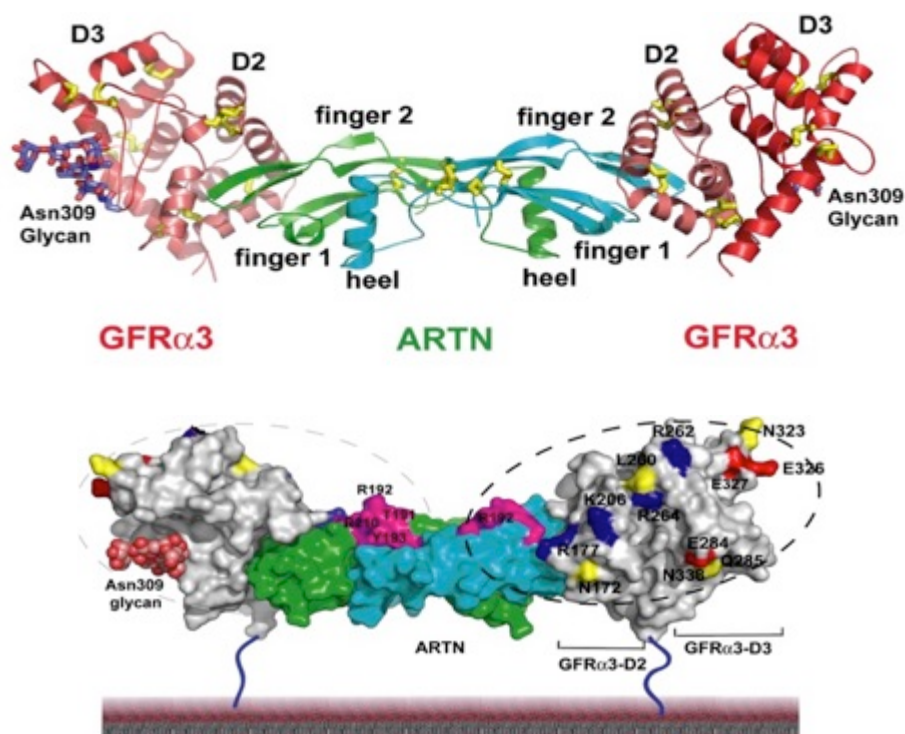


Figura 3. Representación de la estructura de la Artemina (ART) y su receptor GFR α 3. *Imagen adaptada de Wang et al, 2006.*

La expresión de ART en tejidos no neurológicos sugiere que dicha proteína podría tener un papel fundamental en otras actividades biológicas vitales (Masure et al., 1999). En el sistema reproductivo, se ha detectado por inmunohistoquímica (IHQ) la presencia de ART en la zona ampular de los oviductos de ratón (Li et al., 2009). También se han hallado las dos subunidades del sistema de receptores múltiple de la ART, tanto el receptor $GFR\alpha3$ como el receptor transmembrana tirosin-kinasa (RET), tanto en los ovarios, oviductos, úteros y embriones preimplantacionales de humanos, ratones y ratas (Li et al., 2009; Yang et al., 2006).

En embriones humanos, la ART actúa como factor autocrino y paracrino que mejora el desarrollo del embrión temprano (Kawamura et al., 2012). Además, Li y colaboradores demostraron que en EPIV tempranos de ratón, el tratamiento con ART promovía el desarrollo embrionario, observándose un notable aumento en los porcentajes de cigotos o embriones de 2 células que alcanzaban el estadio de blastocisto, un incremento en el número de células de los mismos, sobre todo a nivel del trofoectodermo (TE) y una reducción en los índices de apoptosis (Li et al., 2009). También encontraron que los receptores de ART ($GFR\alpha3$ y RET) se distribuían fundamentalmente a nivel del TE. Todos estos datos experimentales, sugieren que la ART juega un papel importante en la implantación y la placentación del embrión y que también actúa como un factor de supervivencia del mismo.

En la especie bovina, investigaciones recientes han puesto de manifiesto la presencia de ART, tanto en el FU como en el endometrio durante la fase lútea temprana, así como en el embrión en desarrollo (Muñoz et al., 2014). En concordancia con anteriores estudios en el ratón (Li et al., 2009), la expresión de ART en bovino se produce principalmente en las células epiteliales glandulares y lumbinales del endometrio, en la zona apical de las mismas. Dada su localización en el endometrio bovino, y que los niveles de ART en el FU no varían en presencia de embriones tempranos en el útero (Muñoz et al., 2014), cabe suponer, que la principal fuente de ART del FU es el endometrio. En este estudio también se demostró que los embriones bovinos preimplantacionales expresan ART en el TE y

en la MCI, tanto si los embriones se recuperaban del tracto reproductivo como si eran producidos completamente *in vitro*. Recientemente se ha demostrado que la cantidad de ARNm de ART, presente en los embriones, estaba significativamente sobre-expresada en los blastocistos bovinos producidos *in vitro* (datos no publicados).

Los efectos beneficiosos de la ART en el embrión en desarrollo del ratón y la expresión de ART en el tracto reproductivo bovino durante la formación del blastocisto, así como su presencia en el FU, hacen pensar, que dicha molécula tendrá los mismos efectos beneficiosos en el embrión bovino en formación.

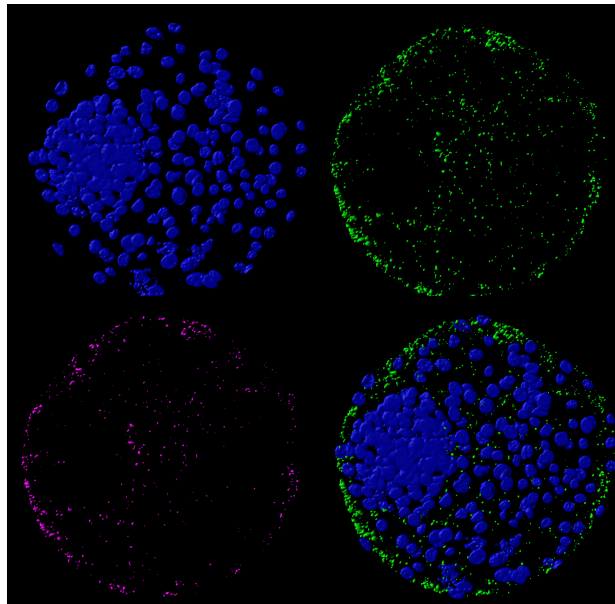


Figura 4. Expresión de ART (verde) y el receptor GFR α 3 (magenta) en el embrión bovino.

PROTEÍNAS RECOMBINANTES VS PROTEÍNAS NATIVAS

La producción de proteínas recombinantes (PR) es una tecnología que surgió hace más 30 años (1982) para responder a la necesidad de disponer de proteínas terapéuticas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. Las PR se pueden producir en una gran variedad de sistemas biológicos, como en bacterias, hongos, virus y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de insectos, plantas y de mamíferos (Jonasson et al.,

2002), sistemas de expresión de proteínas “sin células” y también en animales y plantas transgénicas (Farrokhi et al., 2009). Las PR pueden tener características estructurales y funcionales muy similares a las proteínas naturales y por lo general se producen con alta eficiencia. Sin embargo, algunas PR no son funcionales o sufren problemas de plegamiento cuando se expresan en células procariotas, y llevarlas a cabo en células animales, además de caro, puede resultar bastante complicado (Palomares et al., 2004). Es decir, que a pesar de la importancia y al amplio uso de la tecnología de PR tanto en la industria farmacéutica como en la investigación, aún no se cuenta con una estrategia infalible para la obtención de PR.

Por todo ello, el aislamiento proteínas en su forma nativa, en nuestro caso, la ART, a partir de muestras biológicas, como el FU, es una alternativa cuando la proteína de interés presenta una estructura compleja y modificaciones postranscripcionales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislamiento de ARTEMINA, factor de crecimiento perteneciente a la familia del factor neurotrófico derivado de células gliales (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) , a partir de muestras de fluido uterino bovino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Puesta a punto de la metodología adecuada para la obtención de FU a partir de úteros de matadero.
- II. Desarrollo de protocolos para el procesamiento y caracterización de las muestras de FU de forma previa al aislamiento de la ARTEMINA
- III. Aislamiento de ARTEMINA a partir de muestras de FU bovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

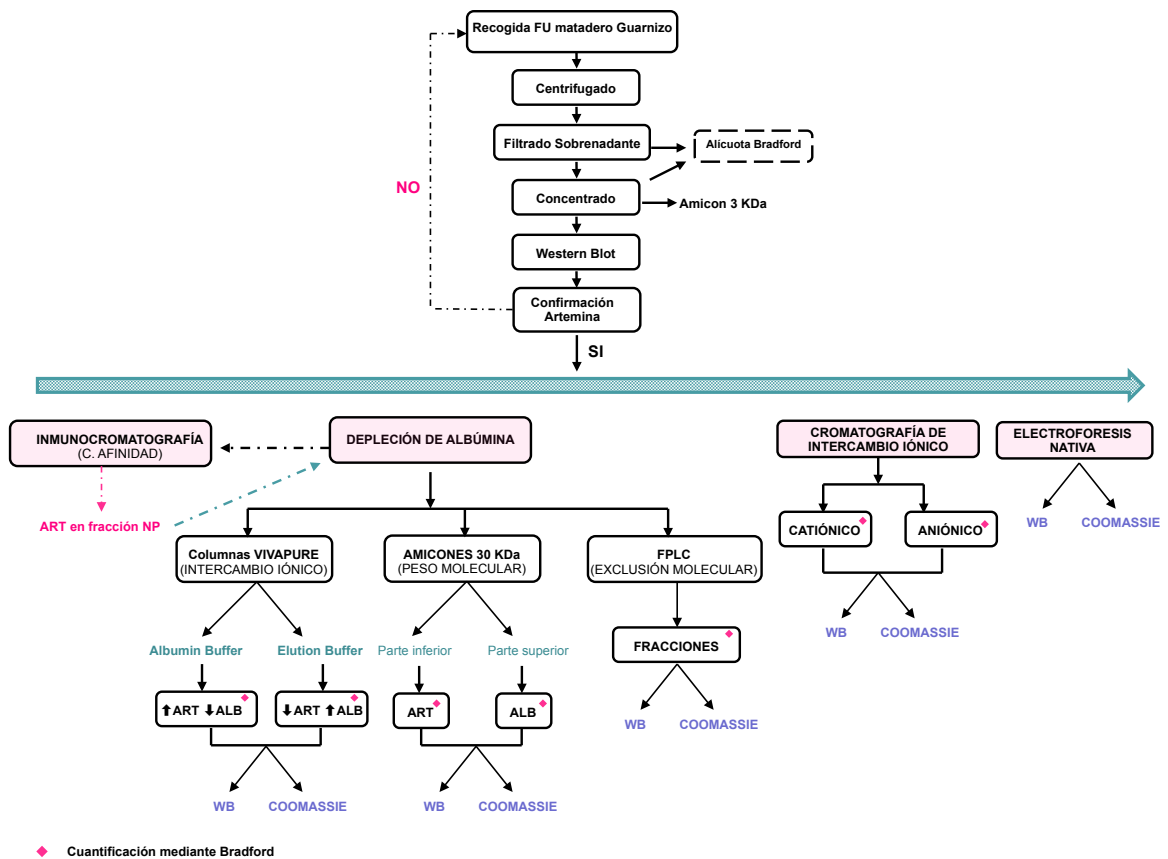


Figura 5. Esquema del diseño experimental.

RECOGIDA DEL FU

Los úteros utilizados para el experimento, se recogieron en el matadero de Guarnizo (Santander, España) y se procesaron *in situ* antes del transporte del FU al laboratorio.

El procedimiento llevado a cabo consistió en la recogida de úteros de vacas sacrificadas no gestantes, preferiblemente en los días 5 a 10 postovulación (Fase lútea temprana). Se seleccionaron aquellos que no presentaban alteraciones patológicas ni infecciones. Sobre un paño estéril, situado sobre una bandeja fría (para evitar la degradación de las proteínas), se diseccionó el útero y se separaron ambos cuernos uterinos. Una vez clampados (ver Figura 6), y tras cortar el extremo craneal del cuerno, cerca de la unión utero-tubárica, se introdujeron 15

mL de PBS (tampón fosfato salino) (P4417, SIGMA, Madrid) con una aguja roma para evitar lacerar el endometrio.



Figura 6. Cuerno uterino bovino tras disección.

Tras realizar un ligero masaje, se recogió el FU en un tubo de centrífuga de 50 mL y posteriormente se trasladó al laboratorio, permanentemente conservado a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

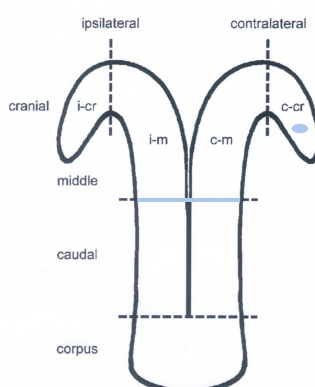


Figura 7. Dibujo esquemático útero bovino.

Una vez en el laboratorio, se centrifugaron las muestras a 5000xg durante 10 minutos, manteniendo siempre una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se filtró, bajo cabina de flujo laminar, con un filtro *protein low bind* de 0.45 μ (SLHV033NS, Merck Milipore Ltd., Irlanda). De este FU se guardó una pequeña alícuota para la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford.

Debido a la gran dilución de las muestras, se procedió a su concentración mediante los sistemas Amicon® Ultra-15 de 3 KDa (UFC900308, Merck Milipore Ltd., Irlanda), siguiendo las instrucciones del fabricante. El centrifugado de las muestras a 5000xg durante aproximadamente 45 minutos, permitió reducir su volumen hasta un volumen final de aproximadamente 500 μ L, volviendo a guardar una alícuota para su cuantificación mediante Bradford.



Figura 8. Amicon® Ultra-15 3 KDa.

Tanto las alícuotas separadas para su cuantificación como las muestras concentradas, se almacenaron en tubos de microcentrífuga Eppendorf Protein LoBind (022431081, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta que fueron procesadas.

TEST BRADFORD

Este test se basa en la unión de la tinción Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 a proteínas. Dicha unión, provoca un cambio en la absorción máxima de luz del colorante, que pasa de 465 nm a 595 nm. El colorante pasa de rojo a azul al unirse a las proteínas, y éste cambio de absorción se mide mediante espectrofotometría. El complejo proteína-colorante tiene un coeficiente de extinción muy rápido, lo que lleva a una gran sensibilidad en la medición de la concentración de proteína de una muestra (Bradford, 1976).

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT Y SDS-PAGE

Como paso previo al aislamiento de la ART en condiciones nativas, se procedió al análisis de las muestras para verificar si contenían dicha proteína. Para ello se llevó a cabo un análisis por Western Blot (WB), también conocido por immunoblotting, siguiendo la metodología descrita en el material suplementario (Practicum).

Brevemente, se calentaron a 95°C las muestras en el tampón de carga durante 5 minutos y posteriormente se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10% durante 90 minutos a 100 voltios. Las proteínas separadas respecto a su PM se transfirieron eléctricamente a 0,150 amperios durante 120 min a una membrana de PVDF, comprobando el éxito de la misma mediante una tinción con el reactivo Ponceau S (P7170, SIGMA, Madrid).

Una vez realizada la transferencia, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario, se procedió a su bloqueo con una solución al 5% de leche desnatada en PBS-T (0,1 M de tampón fosfato salino, pH 7,4; y 0,05% de Tween-20), durante 60 minutos. A continuación, se detectó la ART mediante un anticuerpo específico, desarrollado en cabra (ab109812), a una dilución 1:2500 en la solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C.

Después de lavar la membrana con PBS-T durante 60 minutos, se incubó con un anticuerpo secundario, Donkey anti-Goat HRP (ab6667) en una dilución de 1:4000, a temperatura ambiente durante 75 minutos. Para detectar la unión del anticuerpo, se utilizó el kit de detección Pierce ECL plus (32132, Thermo Scientific, Waltham, MA).

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (INMUNOCROMATOGRAFÍA)

La cromatografía de afinidad separa proteínas basándose en la interacción reversible entre una proteína (o un grupo de ellas) y un ligando específico el cual está unido a una matriz de cromatografía. Esta técnica presenta una gran

selectividad, y por tanto una resolución muy alta (información más detallada en material suplementario).

En el caso que nos ocupa, se inmunizó un conejo con un péptido sintético correspondiente a los residuos NSTWRTVDRLS (conjugado a KLH) de ART bovina. Tras 5 inmunizaciones se recogió el suero policlonal total y se purificó la fracción IgG específica frente al péptido mediante columna de inmunoafinidad.

Para realizar la inmovilización del anticuerpo (Ab) producido, se utilizó una resina comercial (4BCL-GL0-25, Glyoxal agarose beads, ABT, Madrid, España) que permite el enlace covalente a los grupos aminos de los ligando (anticuerpos y otras biomoléculas). Los grupos aldehídos de la resina reaccionan con las aminos primarias de los Ab, teniendo como resultado, la inmovilización estable y reusable de dichas biomoléculas.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se inmovilizaron los 4 mg totales de Ab anti-ART obtenido a la resina. Para su equilibrado, se procedió al lavado de la misma con PB (tampón fosfato) 25 mM, y tras diluir la muestra de FU en el mismo tampón, se introdujo en la columna (Figura 9). Se recogió la fracción no pegada (FT, del inglés *Flow Through*) para su análisis y posteriormente se lavó la resina con tampón PB. A continuación, se usó Glicina 0,2 M a pH 3 para la elución de la ART unida al anticuerpo. Se fueron recuperando fracciones del mismo volumen de la columna (2 mL), hasta completar un total de 5 fracciones, a las que se le añadía 100 mL de Tris 1M pH 9.0 para neutralizar la acidez y evitar desnaturalizar las proteínas eluidas.



Figura 9. Columna de inmunocromatografía.

Tanto las fracciones recogidas de la elución como el FT, tras concentrarlas en Amicones de 3 KDa, se procesaron por WB y tinción CBB R-250, para la detección de nuestra proteína de interés.

DEPLECIÓN DE ALBÚMINA

Al ser nuestra muestra un fluido biológico, presenta una gran complejidad a la hora de procesarla. Por un lado, la composición proteica del FU, en un 60% es albúmina (ALB) (Francis, 2010) a la que a su vez suelen pegarse algunos péptidos y proteínas de bajo peso molecular. Por otro, la concentración de nuestra proteína de interés, ART, es muy pequeña con respecto a otras.

El primer paso en el análisis de fluidos biológicos suele ser la eliminación de esas proteínas mayoritarias, el problema y la preocupación es por la cantidad de proteína que se elimina junto a esta ALB. El término “albuminoma” se refiere tanto al proteoma de la ALB como a los péptidos y proteínas que se unen a ella (Holewinski et al., 2013).

Para llevar a cabo la depleción, se utilizaron varias técnicas:

Columnas Vivapure®

Las columnas comerciales Vivapure® Ion Exchange Spin Columns (VS-1X20QH08, Sartorius Stedim Biotech, Alemania) (Figura 10) permiten la separación de proteínas basándose en la unión selectiva y reversible de moléculas cargadas a un grupo de intercambio iónico de la carga opuesta.

El pI de ambas isoformas predichas de ART (Uniprot, NCIB) es ligeramente superior a 11, lo que la convierte en una molécula muy básica. Por el contrario, la ALB tiene un pI de 4.7 en agua a 25°C (Ge et al., 1998), por lo tanto, a pH neutro, se trata de una proteína muy ácida. Esta gran diferencia hace posible la separación de ambas moléculas de una muestra biológica basándose en un sistema de intercambio iónico. Como el pI de la ALB es de 4.7, en un medio con un pH superior (por ejemplo, pH 8.0), tendrá una carga neta negativa, por lo que deberemos usar las columnas de intercambio aniónico (Q).

Para llevar a cabo el procedimiento y conferir a la ALB una carga negativa, según las instrucciones del fabricante, se diluyó la muestra, en proporción 1:5, en un tampón 25 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl a pH 8.0. Tras centrifugar a 500xg durante 5 minutos, se recuperó el volumen filtrado, supuestamente bajo en ALB y se procedió a eluir la misma de la unión a la membrana. Para realizar la elución de la proteína se pueden aplicar dos procedimientos, o bien aumentar el contenido en sal del tampón (fuerza iónica), o bajar el pH por debajo de 5. Puesto que si disminuimos demasiado el pH, podríamos desnaturalizar la muestra, se optó por aumentar el contenido de sal, por tanto, se procedió a centrifugar la columna a 500xg durante 5 minutos con un tampón 25 mM Tris/HCl, 1 M NaCl a pH 8.0. El eluido recogido fue el supuesto “albuminoma”.

De cada fracción obtenida se separaron pequeñas alícuotas para su análisis mediante tinción CBB y cuantificación mediante Bradford.



Figura 10. Columna Vivapure® Ion Exchange.

Amicones de 30 KDa

Otra característica que distingue nuestras dos proteínas problema, es el peso molecular (PM). Mientras que la ALB tiene un PM de 66.5 KDa (<http://www.uniprot.org/uniprot/P02769w>), la ART es un homodímero que tiene un PM de aproximadamente 24 KDa (Danwen et al., 2016; NCIB). Los amicones de 30 KDa, a través de la centrifugación, va a retener en la parte superior toda molécula con PM superior a 30 KDa, mientras que todas las moléculas con PM inferior van a pasar a través de la membrana.

Para este procedimiento, se utilizaron las columnas Macrosep® Advance Centrifugal Device (MAP030C36, Pall Life Sciences, MI, USA) (Figura 11), y según instrucciones del fabricante, se centrifugó la muestra a 5000xg durante 45 minutos. Se tomaron alícuotas tanto del FU filtrado, en el que supuestamente tenía que estar la ART, como del FU que queda en la zona superior, el supuesto “albuminoma”, y se sometieron ambas a análisis mediante Bradford, Coomassie y WB.



Figura 11. Columnas Macrosep® Advance Centrifugal Device.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Se trata de un tipo de cromatografía líquida, que se lleva a cabo en un sistema automatizado, ÄKTA-FPLC (del inglés, Fast Protein Liquid Chromatography) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), que separa las moléculas en función a diferencias en el tamaño, conforme van pasando a través de un gel específico empaquetado en una columna. A diferencia de otros tipos de cromatografía, no existe ninguna unión de las proteínas a ningún medio, por lo que la composición del tampón no afecta a la resolución de la técnica, aunque conviene utilizar un tampón con suficiente fuerza iónica para evitar uniones inespecíficas a la matriz de la columna (para más información véase el material suplementario).

Para procesar las muestras se usó la columna HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), previamente equilibrada con 1.5 volúmenes de columna (CV, del inglés, column volumes) de PBS 10 mM pH 7.4. Se cargaron volúmenes de muestra inferiores a 2 mL cada vez, se programó un flujo lento de 0,5-1 mL/min y se recogieron fracciones de 5 mL. Posteriormente se

procedió al concentrado de las mismas usando para tal fin los sistemas Amicon® Ultra-15 de 3 KDa. A continuación se separó una pequeña alícuota para su análisis y cuantificación por Bradford, WB y Coomassie.

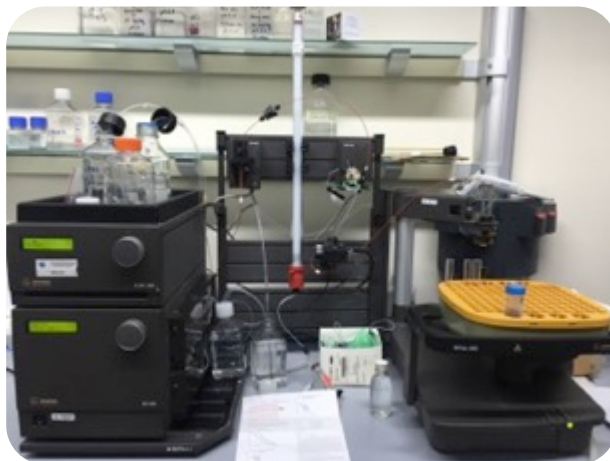


Figura 12. Sistema Äkta-FPLC de los SCTs de Oviedo.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

La técnica de separación de biomoléculas por intercambio iónico (IEX) se introdujo por primera vez en los años 60 y sigue siendo una de las principales técnicas de separación y purificación. La cromatografía IEX es una de las técnicas más usadas para la purificación de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas con carga. Con este procedimiento se pueden separar especies moleculares que sólo tienen pequeñas diferencias en sus propiedades de carga, llegando a separar incluso dos proteínas que sólo difieren en un aminoácido cargado.

Debido a que la carga neta de las proteínas varía en función del pH de la solución en la que se encuentren, la elección del tipo de intercambiador iónico (catiónico o iónico) se basará fundamentalmente en el tipo de muestra a analizar y en el tipo de solución en que dicha muestra sea más estable.

Esta cromatografía se llevó a cabo también en el sistema automatizado, ÄKTA-FPLC, al que se le adaptaron las columnas específicas para la realización de la IEX.

Los materiales que se usaron en este tipo de cromatografía, así como el sistema automatizado, pertenecen a la casa comercial GE Healthcare (Uppsala, Suecia) y todos los reactivos a la casa comercial SIGMA (Madrid, España).

Cromatografía de intercambio Catiónico

Debido a que nuestra proteína de interés posee un pI cercano a 11, el primer sistema elegido para llevar a cabo el IEX fue la columna de intercambio catiónico. La ART, en una solución con un rango de pH cercano al neutro (7-8), va a tener carga positiva, por lo tanto, quedará unida a la columna, la cual está cargada de forma negativa. Se usaron para tal fin diferentes tipos de columnas:

Columnas Hi Trap SP FF y Hi Trap CM FF

Mientras que la primera columna permite uniones de la molécula a la columna bastante fuertes, en la segunda, dichas uniones van a ser más débiles, aunque la sensibilidad de la columna es mayor.

Con este tipo de columna se siguieron dos procedimientos diferentes, el primero, mediante el uso del tampón recomendado por el fabricante y siguiendo una elución por gradientes, y el segundo con un sistema de tampones diferentes, en el que se usó una elución por pasos (protocolo facilitado por el Dr. John Armando, comunicación personal).

En la primera opción, se usó una columna de 1 mL, siguiendo las instrucciones del fabricante, tras el equilibrado de la columna con HEPES 50 mM a pH 8.0, se cargó la muestra diluida en el mismo tampón, y se recogió la fracción de muestra no pegada. Posteriormente se lavó la columna para eliminar posibles impurezas. Para eluir la muestra unida, se utilizó el mismo tampón de equilibrado al que se adicionó 1 M de NaCl, a través de un gradiente a lo largo de 20 CV, de 0 M hasta 1 M de sal, recogándose fracciones de 2 mL que posteriormente se analizaron mediante las técnicas de Bradford, WB y Coomassie.



Figura 13. Columnas Hi Trap SP FF (A) y Hi Trap CM FF (B).

El protocolo facilitado por el Dr. Armando, empleado esta vez con una columna con un volumen de 5 mL, consistió en un equilibrado previo de dicha columna con 5 CV (25 mL) de un tampón 50 mM Tris 150 mM NaCl a un pH de 8. A continuación se cargó la muestra en el sistema y se procedió a recoger la fracción no pegada (NP). Posteriormente se realizó un lavado de 5 CV con el mismo tampón. El primer paso de la elución, para eliminar las uniones inespecíficas, consistió en el lavado de la columna con 5 CV de un tampón 50 mM PB 250 mM NaCl. El segundo paso de la elución, consistió en un aumento de la fuerza iónica del tampón, suficiente para producir la elución de la proteína de interés (ART), para ello se realizó un lavado de 5 CV con un tampón 50 mM PB 550 mM NaCl. El último paso realizado consistió en la regeneración de la columna, con un lavado de 5 CV con 50 mM PB 2 M NaCl, con este paso, nos aseguramos que la columna quede libre de impurezas unidas. Las fracciones recogidas mediante este sistema de fraccionamiento, tras su concentración, se analizaron por WB y Coomassie.

Columnas Hi Trap SP XL

En estas columnas se aumenta la capacidad de unión de las moléculas sin variar significativamente la velocidad del flujo cuando las comparas con las anteriores.

Esta vez se utilizó como tampón de equilibrado PB (tampón fosfato) 25 mM, con un pH de 7.4. Se procedió al equilibrado de la columna y posteriormente se inyectó la muestra. Tras el lavado, se inyectó mediante gradiente a lo largo de 20 CV, PB 25 mM + NaCl 1 M para eluir la molécula unida a la columna. Se recogieron fracciones de 5 mL, que fueron procesadas mediante Bradford, WB y Coomassie.



Figura 14. Columnas Hi Trap SP XL.

Cromatografía de intercambio Aniónico

Columnas Hi Trap Q XL

Lo que se pretendió con el uso de esta columna fue que la unión se produjese con aquellas proteínas que no eran del interés de nuestra investigación, para recuperar la ART de la fracción no pegada. Para ello, siguiendo las instrucciones del fabricante, se procedió al equilibrado de la columna con un tampón Tris 20 mM a pH 7.5, tras inyectar la muestra y el posterior lavado de la columna, se realizó la elución de las proteínas mediante la adición de 1 M de NaCl al tampón de equilibrado. Se recogieron tanto las fracciones no pegadas como las pegadas y se sometieron a análisis y cuantificación mediante Bradford, WB y Coomassie.



Figura 15. Columnas Hi Trap Q XL.

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

Para separar las proteínas presentes en una muestra biológica en función de su PM, se puede emplear una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia de un detergente, y se suele hacer en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes. El detergente que se usa comúnmente es el SDS (sodium dodecyl sulfate), cuya principal función es proporcionar carga negativa a la masa molecular de la proteína, al formar una micela cargada negativamente alrededor de las mismas. Las principales ventajas de una electroforesis SDS-PAGE, aparte de conferir carga negativa a todas las proteínas es que, al calentar la muestra y adicionar β -mercaptoetanol (β ME), se rompen tanto los complejos como los puentes disulfuro de las proteínas, dotando a las misma de linealidad. Como consecuencia de todo ello, cuando las proteínas cargadas y alineadas se someten a un campo eléctrico, se separarán según su PM con un alto grado de resolución (Arndt et al., 2012).

Alternativamente, también se puede llevar a cabo una electroforesis sin adicionar ni SDS ni β ME y sin calentar la muestra, y es lo que se denomina electroforesis en condiciones nativas. En esas condiciones nativas, la carga de cada proteína va a depender de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína y del pH utilizado durante la electroforesis, que influirá en la movilidad de la proteína durante la electroforesis (Arndt et al., 2012).

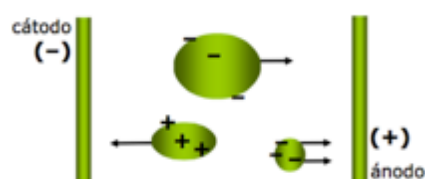


Figura 16. Flujo de partículas.

En la electroforesis nativa, las proteínas deben tener la carga apropiada para moverse dentro del gel. Si el pI de la proteína en cuestión es más alto que el pH del gel, al aplicar el campo eléctrico, la proteína, con carga positiva, se moverá hacia el cátodo, es decir, hacia el polo negativo, que en un sistema de electroforesis convencional, desplazará la proteína hacia fuera del gel. Para invertir el campo

eléctrico hay que invertir los electrodos en la fuente de alimentación del sistema de electroforesis, en nuestro caso hemos usado el sistema Mini-Protean tetracell® de Bio-Rad, convirtiendo el ánodo en cátodo y viceversa.

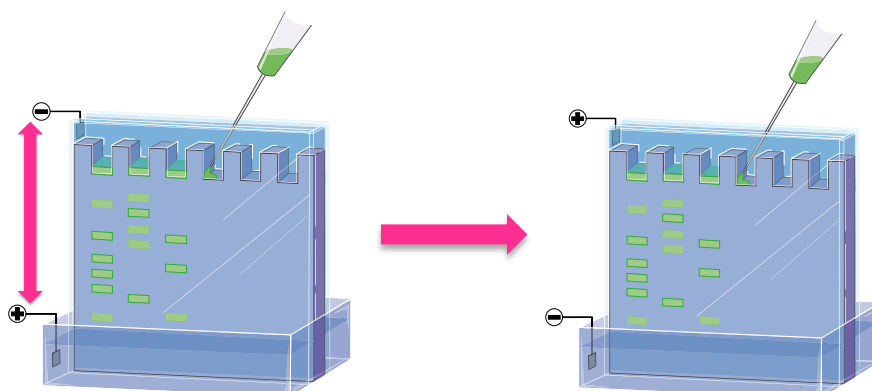


Figura 17. Inversión campo eléctrico sistema PAGE.

Al no contar con todas las ventajas, descritas anteriormente, de un sistema SDS-PAGE, las proteínas se moverán de forma diferente, en función de los cambios post-transcripcionales (fosforilación, metilación, acetilación, glicosilación), por el gel al aplicarles el campo eléctrico.

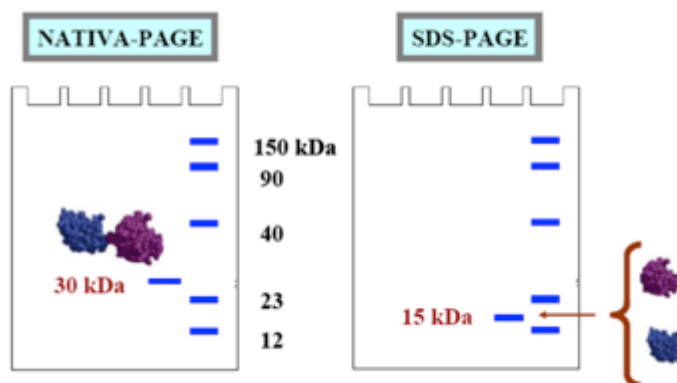


Figura 18. Diferencias SDS-PAGE y Nativa-PAGE

Para llevar a cabo esta electroforesis, se utilizó el sistema de tampones recomendado por D.E. Garfin en el capítulo 7, Gel Electrophoresis of Proteins, del libro Essential Cell Biology (Garfin, 2003). No existe un tampón universal ideal para la electroforesis nativa de todas las proteínas, ya que hay que tener en cuenta tanto la estabilidad de la propia proteína como la resolución. Normalmente se

recomienda el uso de los sistemas discontinuos de Ornstein-Davis (Davis, 1964; Ornstein, 1964) y los sistemas continuos de McLellan (McLellan, 1982).

Aunque muchos recomiendan el sistema discontinuo de Ornstein-Davis cuando se lleva a cabo por primera vez una electroforesis nativa en una proteína, normalmente se prefiere el sistema continuo en estas condiciones, ya que es mucho más simple. Además, algunas proteínas en estado nativo, cuando se usa el sistema discontinuo, pueden formar agregados y precipitar cuando se alcanza una alta concentración de proteínas durante el empaquetamiento.

La forma más simple de llevar a cabo una electroforesis en condiciones nativas es mediante el uso del conjunto de tampones recopilado por McLellan (McLellan, 1982). Dichos tampones se encuentran en un rango de pH bastante amplio (entre 3,8 y 10,2), todos ellos con baja conductividad.

En nuestro caso se siguió un sistema continuo, y de todos los tampones posibles, se eligió aquel compuesto por 43 mM de Imidazol como componente básico y 35 mM de HEPES como componente ácido, con un pH de 7,4, en el cual nuestra proteína, la ART, iba a estar cargada de forma positiva y además de conservar su bioactividad.

En una electroforesis nativa, la elección de una concentración adecuada de gel (%T) es también crítica para el éxito de la separación. Para el sistema continuo de McLellan se recomiendan un rango de geles de entre 5%T y 7%T. En nuestro caso se usó un gel al 6% (Garfin, 2003).

El tampón para la muestras también siguió el protocolo sugerido por Garfin (Garfin, 2003), añadiendo 0,5X del tampón de electroforesis y 10% (p/v) de glicerol.

RESULTADOS

RECUPERACIÓN DE FU A PARTIR DE ÚTEROS DE MATADERO

El lavado de los cuernos uterinos recuperados de matadero con PBS (n=20), permitió la recuperación de FU. De los 15 mL que se introdujeron en el lavado, por término medio se recuperaron 12,5 mL, siendo la concentración promedio de proteína total de este FU es de 58 μg / 100 μL .

La estabilidad de las proteínas presentes en el FU diluido, a pesar de que la solución de lavado no contenía inhibidores de proteasas, se mantuvo como se comprobó a través de la realización de una electroforesis PAGE y posterior tinción con el colorante CBB.

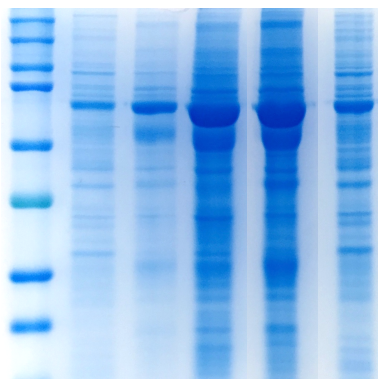


Figura 19. Tinción CBB en la que se observa la integridad de los componentes del FU.

IDENTIFICACIÓN DE ART EN FU BOVINO

El análisis mediante WB de las muestras de FU recuperadas, permitió confirmar la presencia de ART en la mayoría de ellas. Aquellas muestras en las que no se detectó ART se descartaron. Debido al reducido número de muestras, no se pudo establecer una relación entre la presencia/ausencia de ART durante el ciclo estral.

Es importante señalar que la presencia de ART sí que se detectó en ambos cuernos uterinos, tanto ipsilateral como contralateral al ovario en el que se ha producido la ovulación. Esto facilita en gran medida la obtención en grandes cantidades de fluido a partir del cual obtener ART.

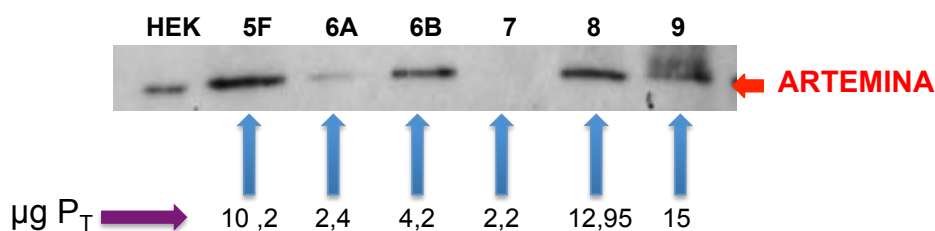


Figura 20. WB para detectar ART de las muestras de FU.

INMUNOAISLAMIENTO DE ART

El primer procedimiento realizado para intentar aislar la ART a partir de las muestras de FU recuperado, fue una inmunocromatografía utilizando una columna de afinidad en la que previamente se había inmovilizado el Ab anti-ART. Tras pasar por dicha columna el FU, se pudo observar que se producían muchas uniones inespecíficas entre la ALB y el Ab, lo que competía con la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ab), no pudiendo aislarse la ART.

Es por ello por lo que se procedió a realizar la depleción de ALB de las muestras del FU, siguiendo diversas metodologías.

Columnas Vivapure®

El protocolo utilizado, consistente en una serie de centrifugaciones secuenciales con tampones con diferente fuerza iónica, fue el facilitado por el fabricante de las columnas. Tras someter a la muestra procesada a una electroforesis SDS-PAGE, se realizó una tinción de las proteínas en el gel con el reactivo CBB. Se pudo comprobar que no se había producido depleción alguna y que las muestras de FU seguían presentando prácticamente la misma composición que la muestra original tras el paso por la columna.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se procedió a realizar depleciones sucesivas de la misma muestra para verificar la efectividad de las columnas (Figura 21).

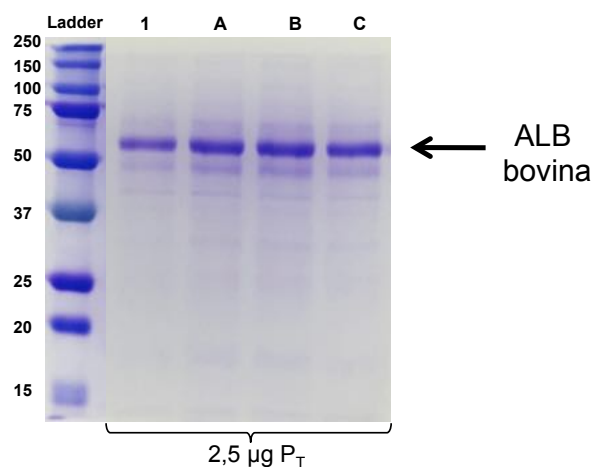


Figura 21. Tinción Coomassie del gel tras pasar la muestras por las columnas Vivapure. La diferencia entre las muestras A, B y C radica en la cantidad de veces que pasaron por las columnas, donde A pasó 3 veces, B 6 veces y C 12 veces.

Según se puede apreciar en la imagen, tras los sucesivos pases de la muestra por la columna Vivapure, el patrón de bandas es idéntico en todas las calles, por lo que se puede concluir que no se ha producido depleción alguna de la ALB.

Amicones 30 KDa

El segundo procedimiento utilizado para tratar de reducir la ALB presente en el FU fue el fraccionamiento de las muestras. Tras la centrifugación de las muestras en unos amicones de 30 KDa, se procedió a realizar el análisis de la muestra mediante tinción CBB y WB.

En la figura 22 se puede observar que mientras que en la primera muestra analizada sí que se producía algún tipo de fraccionamiento, la ART estaba presente en las dos fracciones recuperadas (teóricamente, la fracción superior del amicon debería contener sólo moléculas por encima de los 30 KDa, mientras que en la parte inferior deberían estar sólo presente moléculas por debajo de ese PM); en la segunda muestra, no se recuperó ningún tipo de proteína en la fracción de fluido que pasó a través de la membrana.

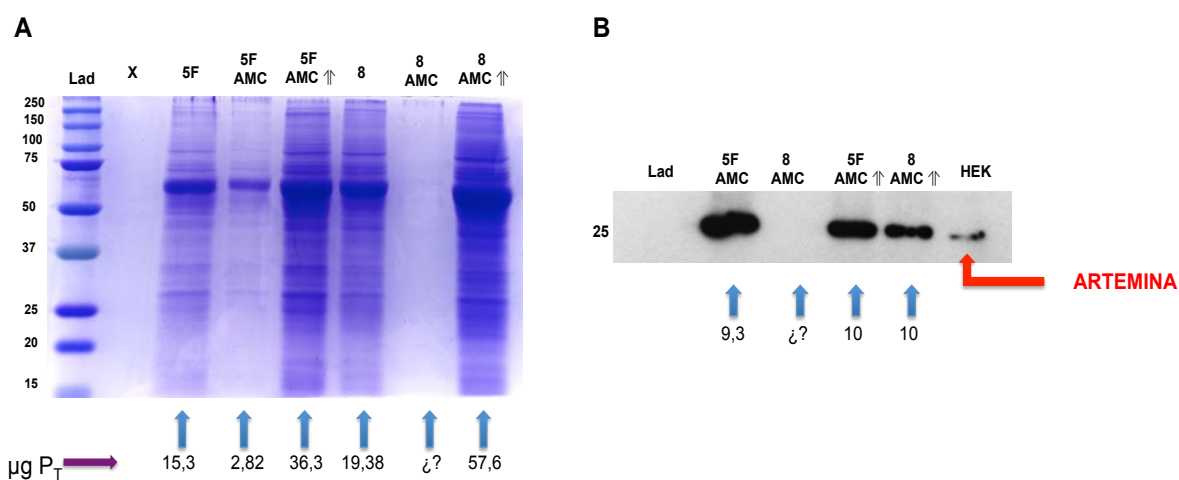


Figura 22. Tinción Coomassie (A) y WB (B) tras centrifugación con sistemas Macrosep®. Puede observarse como en la primera muestra (5F) sí que se reduce alguna banda, pero sin embargo, en la parte inferior del Amicon (5F AMC) sigue apareciendo la banda correspondiente a la ALB. En la segunda muestra (8), podemos observar que no se ha producido paso alguno de proteínas a través de la membrana del Amicon, ya que en la parte inferior (8 AMC) no encontramos ninguna proteína.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Dada la falta de resultados obtenida con los dos procedimientos anteriores, elegidos por su simplicidad, se decidió utilizar una cromatografía automatizada de exclusión molecular.

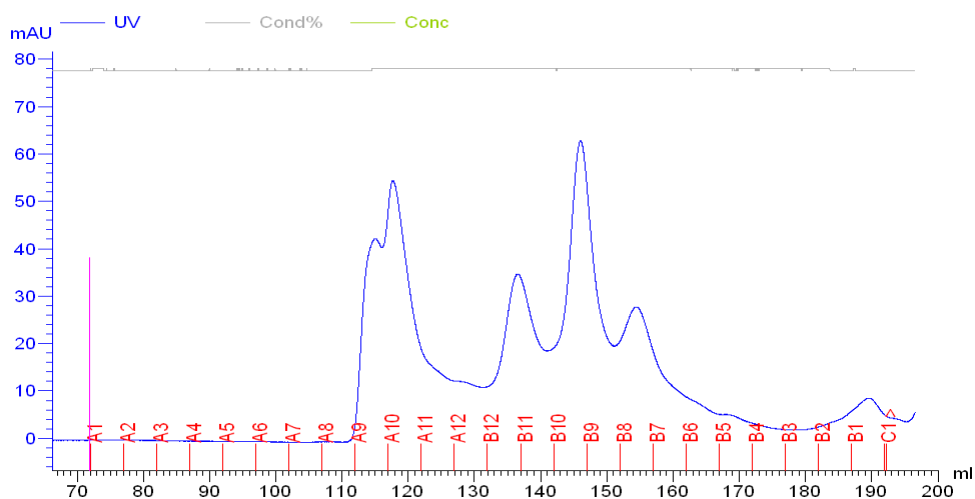


Figura 23. Cromatograma de una de las muestras.

Para ello, las muestras (n=4) se procesaron con la columna HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade, siguiendo el protocolo descrito en material y métodos, se recogieron fracciones de 5 mL, representadas en el cromatograma de la Figura 23. Dichas fracciones se concentraron posteriormente mediante los sistemas Amicon® Ultra-15, ya que la muestra obtenida estaba muy diluida, y se analizaron mediante WB. El resultado que se obtuvo indicó que la ART se hallaba en las fracciones B10 y B9. La tinción CBB también reveló que las fracciones B9 y B10 presentaban un menor número de proteínas (menor número de bandas detectadas) que las muestras originales de FU (Figura 24).

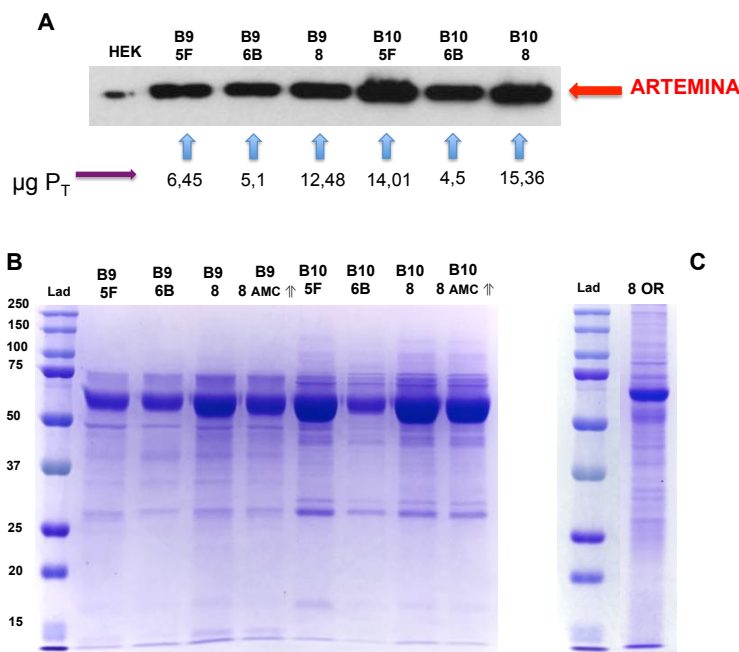


Figura 24. Resultados cromatografía exclusión molecular. (A) Se observa la ART por WB en las fracciones B9 y B10 de la cromatografía. (B) Tinción Coomassie de las fracciones B9 y B10. (C) Tinción Coomassie de una de las muestras originales.

Una vez obtenida una muestra menos compleja, se procedió a realizar la cromatografía de afinidad en la columna con el Ab anti-ART previamente inmovilizado. Tras recoger 5 fracciones de 2 mL con el eluido de la columna, junto con la muestra de FT y después de concentrarlas, se procedió a su procesamiento mediante WB. El resultado de este procedimiento fue que se detectó la ART en la fracción FT (no pegada) (Figura 25).

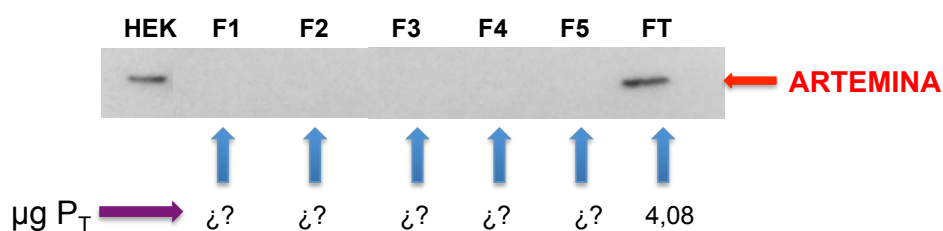


Figura 25. WB fracciones inmunoafinidad.

Este resultado puede deberse a que una de las grandes limitaciones que presenta esta técnica es que para que funcione de forma correcta, se necesita una gran cantidad de ligando, en nuestro caso Ab, cosa de la que no disponíamos, ya que tras la inmunización del conejo, se obtuvo una cantidad de Ab (4 mg) inferior a la recomendada (15-20 mg) para tapizar una columna.

AISLAMIENTO DE ART POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Al ser la ART una proteína muy básica en un pH cercano al neutro, el primer tipo de cromatografía IEX que se utilizó fue el intercambio catiónico, en el que la ART, con carga positiva, tras pasar por la columna, cargada negativamente, va a quedar unida a ella. Se utilizaron distintos protocolos y distintos tipos de columnas de IEX catiónica.

Columnas Hi Trap SP FF

Tras realizar la cromatografía con las columnas Hi Trap SP FF de 1 mL, se obtuvo el cromatograma de la figura 26. En dicho cromatograma podemos observar como existe un considerable aumento de la absorbancia de UV (que se corresponde a la concentración de proteína en el FU) en lo que sería la fracción no pegada (NP), mientras que cuando se realiza el aumento de la fuerza iónica mediante el gradiente de sal (conductividad, línea gris de la figura 26), el aumento de absorbancia, que tendría que corresponder con la elución de la proteína unida a la columna, es mínimo (línea azul).

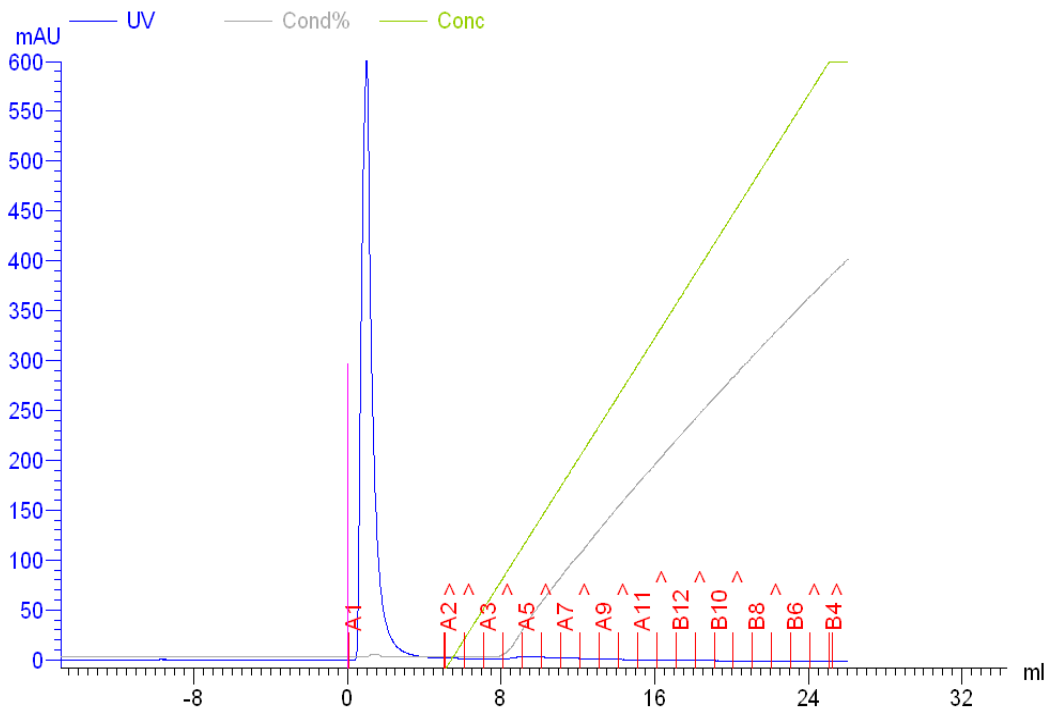


Figura 26. Cromatograma IEX Hi Trap SP FF 1 mL.

Una vez recogidas las fracciones, tras concentrarlas, se procedió a su análisis mediante tinción CBB y mediante WB (figuras 27 y 28).

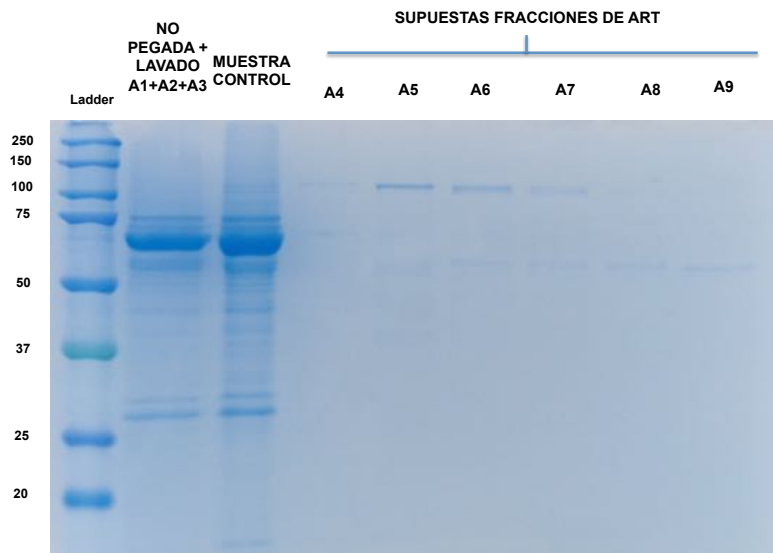


Figura 27. Tinción Coomassie de las fracciones procedentes de la columna Hi Trap SP FF.

Podemos observar en la tinción por Coomassie, que aunque sí que se produjo un cierto fraccionamiento, se observan más bandas de proteínas en la zona superior del gel en las fracciones eluidas que en la zona que correspondería por PM a la ART (24 KDa).

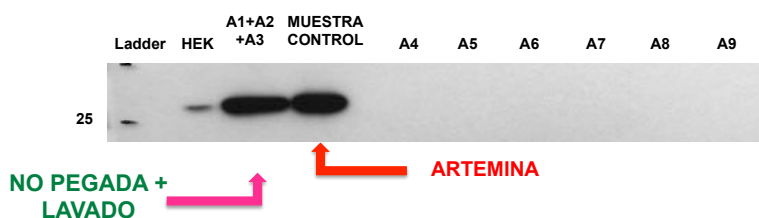


Figura 28. WB de las fracciones procedentes de la columna Hi Trap SP FF.

Se pudo confirmar por WB que efectivamente la ART había pasado por la columna junto con la fracción no pegada, mientras que en los eluidos podemos observar que no existe ningún tipo de ART. Por tanto, se concluye de este resultado, que el fraccionamiento de ART con este tipo de columna no fue posible.

Columnas Hi Trap CM FF

Con esta columna de intercambio catiónico, se modificó tanto el sistema de tampones como el sistema de elución, tal y como se describe en material y métodos. Esta vez, en vez de realizar una elución por gradientes, el sistema elegido fue una elución por pasos, como se observa en la línea de conductividad (gris) del cromatograma (Figura 29).

Las diferentes fracciones obtenidas tras el paso por la columna, se unificaron y concentraron en lo que se denominó fracción no pegada (NP), correspondiente a todas las proteínas que por su pI no se habrían pegado a la matriz, fracciones de A1, A2 y A3 del cromatograma; y la fracción eluida (EL), correspondiente a la fracción donde supuestamente se habría eluido la ART, que serían los 5 CV (25 mL) de la fracción entre X4 y X5, tras aplicarle la suficiente fuerza iónica mediante el aumento de NaCl del tampón fosfato. Se puede observar en la gráfica que tampoco se produce un aumento de la absorbancia de UV en el momento en el que aumenta la conductividad.

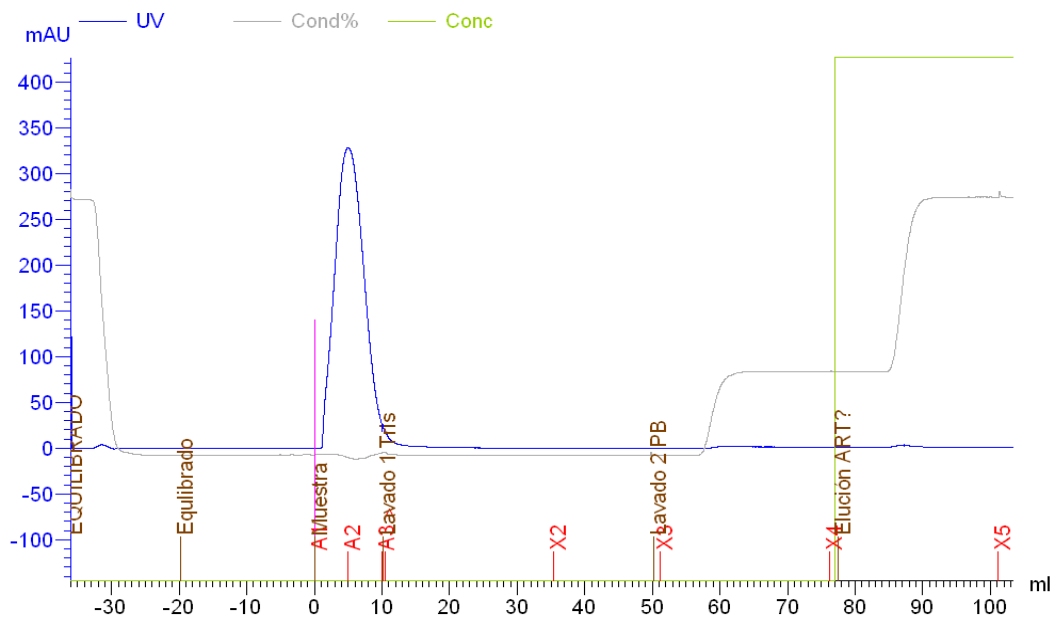


Figura 29. Cromatograma IEX Hi Trap CM FF 5 mL.

Tras la tinción CBB del gel tras su separación por PAGE (Figura 30), se puede observar, que en la fracción EL no existe ningún tipo de proteínas, mientras que el patrón de bandas de la fracción NP es prácticamente similar al de la muestra original.

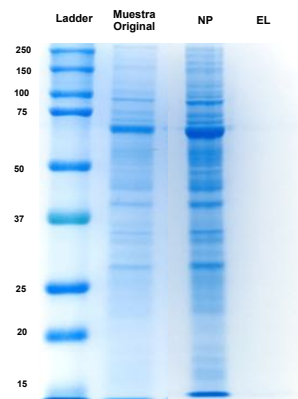


Figura 30. Tinción Coomassie de una de las muestras procedentes de la columna Hi Trap SP FF.

Asimismo, se comprobó por WB que en la fracción NP se encontraba la ART, mientras que en la EL no se detectaba nada, indicando nuevamente el fracaso de la técnica (Figura 31).



Figura 31. WB de una de las muestras procedentes de la columna Hi Trap CM FF.

Columnas Hi Trap SP XL

Tras el intento de un último tipo de cromatografía de intercambio catiónico, esta vez con una matriz capaz de unir mayor cantidad de molécula, se obtuvo el cromatograma de la figura 32. Se puede observar en él, que cuando se aplica el gradiente de sal (línea gris), no se observa modificación alguna de la absorbancia de UV (línea azul). La distorsión en la zona de la fracción no pegada se debe a que durante la carga de la muestra entró un poco de aire en la columna.

Tras la cromatografía de dos muestras, se unificaron tanto las fracciones no pegadas como los eluidos de ambas muestras y se realizó tanto el análisis por WB como la tinción de CBB (Figura 33). El resultado obtenido con esta columna fue el mismo que en las dos anteriores, la ART se encontraba en la fracción NP, mientras que en la fracción EL no obteníamos proteína alguna.



Figura 32. Cromatograma IEX Hi Trap SP XL 1 mL.

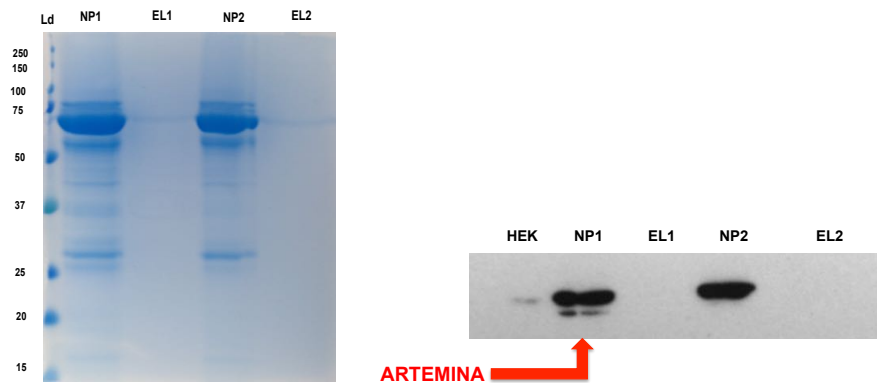


Figura 33. Tinción Coomassie y WB de dos muestras tras IEX con la columna Hi Trap SP XL.

Columnas Hi Trap Q XL

Finalmente, viendo que los resultados de la cromatografía IEX catiónica habían sido infructuosos, se procedió a realizar el procedimiento contrario, es decir, que la ART con carga positiva, fluyese a lo largo de la columna sin pegarse, mientras que el resto, mayoritariamente negativas, quedasen pegadas a la columna de intercambio aniónico.

En el cromatograma que se obtuvo tras la finalización del proceso (Figura 34), se observa que cuando se introduce el gradiente de sal, se produce un incremento de la absorbancia, que coincide con la elución de la fracción pegada. Sin embargo, no se observa dicho incremento durante el paso de la fracción no pegada.

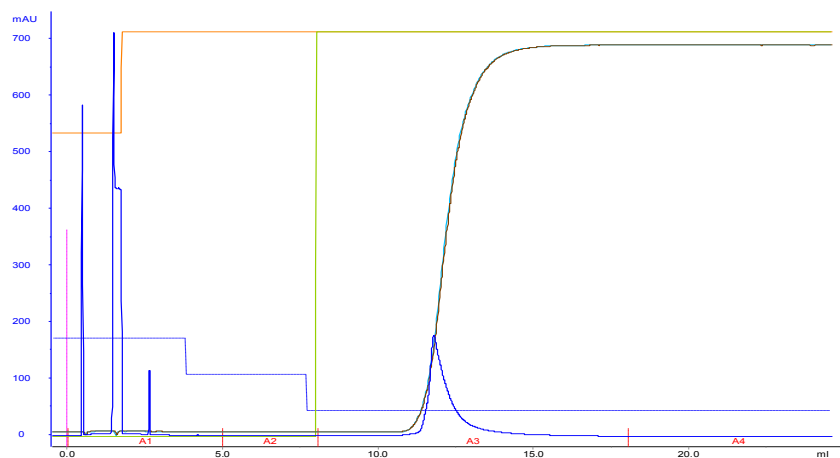


Figura 34. Cromatograma IEX Hi Trap Q XL 1 mL.

Tras procesar las muestras, se confirmó el resultado que se intuía en el cromatograma. La ART se había pegado junto con las demás proteínas a la columna, apareciendo en el eluido en vez de en la fracción no pegada como era de esperar (Figura 35).

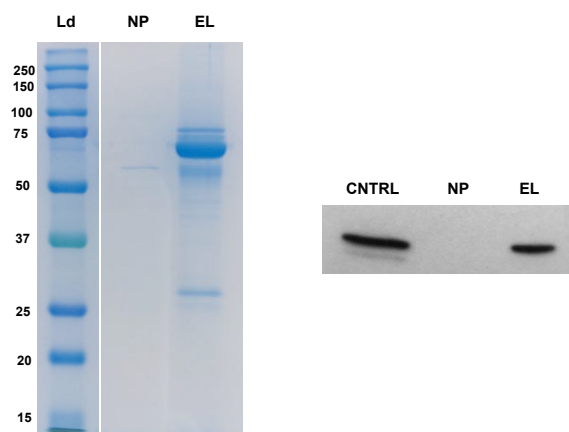


Figura 35. Tinción CBB y WB de las muestras tras IEX aniónica con la columna Hi Trap Q XL.

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

Debido a la falta de resultados obtenidos con las diferentes cromatografías, se decidió intentar sacar el máximo partido al alto pI que posee la ART, llevando a cabo una electroforesis invertida en condiciones nativas.

Es posible, tras la realización de una electroforesis y una vez localizada la proteína de interés, recortar la banda de dicha proteína y proceder a su aislamiento tras la elución del gel, y al realizarla de forma nativa, debería de conservar la bioactividad.

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente y tras invertir los electrodos para transformar el cátodo en ánodo y viceversa, se pudo observar, después de realizar la tinción CBB y el WB, que, la ART quedaba atrapada en la zona superior del gel, no siendo posible establecer si junto a ella estaban presentes otras proteínas (Figuras 36 y 37).

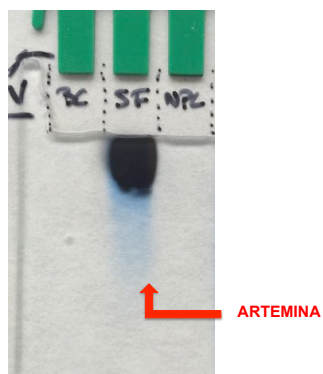


Figura 36. Gel teñido por CBB sobre WB tras electroforesis nativa.

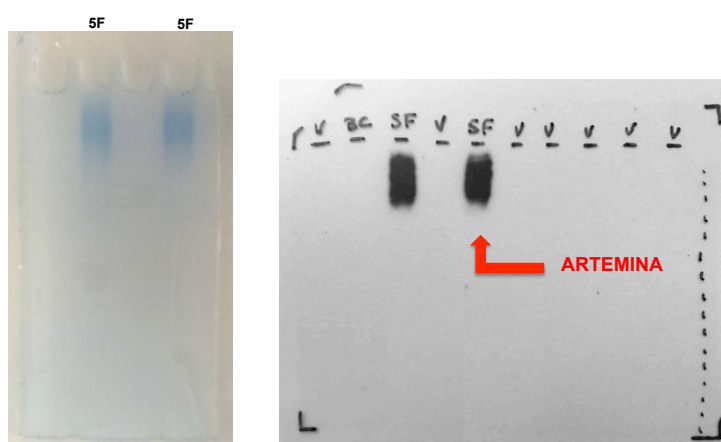


Figura 37. Tinción CBB y WB de una de las muestras tras Native-PAGE.

Al no introducirse de manera definida en el gel, tampoco fue posible la posterior elución para proceder al aislamiento.

DISCUSIÓN

La presencia de ART en las glándulas endometriales y el FU bovino, junto con su expresión en blastocistos bovinos (Muñoz et al., 2014), sugiere que este FC podría tener en la especie bovina una acción embriotrónica al igual que ocurre en el ratón (Li et al., 2009).

En la actualidad, no se dispone de ART bovina para establecer si la adición de este FC a los medios de cultivo puede mejorar la calidad de los EPIV bovinos. Comercialmente sólo es posible adquirir ART producida recombinantemente (ARTr) para la especie humana y para ratón, no obstante, dado que los efectos de numerosos factores de crecimiento son especie-específicos (Rodríguez et al., 2007) el uso de la ARTr disponible para cultivar embriones bovinos está altamente desaconsejado.

Los intentos realizados para producir ART recombinante bovina (bARTr) no han tenido éxito (datos no publicados). La producción de proteínas recombinantes es un proceso complejo, largo y costoso que muchas veces no da lugar a una proteína bioactiva. Los sistemas empleados más frecuentemente para sintetizar PR, son los sistemas procariotas. Las bacterias son capaces de producir grandes cantidades de proteínas de pequeño tamaño en un corto periodo de tiempo, sin embargo, no son capaces de sintetizar proteínas de gran tamaño, que presenten plegamientos complejos o que necesiten de la intervención de chaperonas para su plegamiento. Además, muchas de las proteínas producidas por células eucariotas requieren para su función la inclusión de modificaciones tras su síntesis, procesos que no pueden llevar a cabo los organismos procariotas. Un ejemplo de ello es la glicosilación, esencial para la función de muchas proteínas eucariotas. Los sistemas de expresión que utilizan células de mamíferos no presentan los problemas descritos anteriormente, pero adolecen de un rendimiento muy bajo comparado con los procariotas y las levaduras. Además, el cultivo y mantenimiento de cultivos celulares de este tipo es caro, al requerir condiciones más restrictivas en cuanto a ambiente y sistema de cultivo (Demain y Vaishnav, 2009).

Una vez descartada la posibilidad de obtener bARTr, la única alternativa posible para obtener ART bovina fue la puesta a punto de una metodología que permitiese el aislamiento de ART nativa a partir de muestras biológicas en las que esta proteína está presente en cantidades significativas, como es el FU. El aislamiento de proteínas bioactivas a partir de muestras biológicas sigue siendo una opción utilizada, actualmente, tanto por la industria farmacéutica (inmunoglobulinas, factores de coagulación, proteína C, así como la Troponina, obtenida de músculo cardíaco o el TGF β obtenido de plaquetas) como en los laboratorios de investigación cuando su expresión recombinante no es posible, si bien las formas nativas de proteínas adquiridas del tejido o fluido biológico original, casi siempre se obtienen en cantidades muy bajas.

RECUPERACIÓN DEL FLUIDO UTERINO

La obtención de FU mediante lavados uterinos es un procedimiento utilizado frecuentemente para su estudio tanto en especies domesticas como en la especie humana (Hannan et al., 2010; Koch et al., 2010; Muñoz et al., 2012). El procedimiento es relativamente sencillo y puede repetirse en el mismo individuo, de tal forma que, puede compararse la composición del FU en diferentes momentos del ciclo reproductivo (Bhusane et al., 2016), en respuesta a la presencia de embriones tempranos (Muñoz et al., 2012), o en respuesta a embriones de diferente sexo (Gómez et al., 2013). No obstante para evitar el uso de animales vivos y disponer de grandes cantidades de FU en un corto periodo de tiempo, en este estudio se abordó su obtención a partir de úteros recogidos en un matadero comercial.

El procedimiento empleado, permitió la obtención de FU de una forma rápida (por término medio se emplearon unos 20 minutos desde la recogida del útero hasta la obtención del FU) y eficiente. Así, la concentración de proteína total, establecida por Bradford, fue similar a la descrita tras la realización de lavados uterinos a vacas y novillas vivas (Muñoz et al., 2012). Además, a pesar de no añadir a la solución de lavado inhibidores de proteasas, para evitar cualquier posible interferencia con el aislamiento y uso final que se le pretende dar a la ART

bovina, la integridad de las proteínas presentes en las muestras de FU recogidas pudo mantenerse perfectamente como se comprobó mediante una electroforesis en gel en combinación con una tinción CBB. Adicionalmente, la detección de ART mediante WB en la mayoría de las muestras de FU recuperadas confirmó la validez del procedimiento establecido para obtener FU en grandes cantidades para aislar ART nativa

Por último, se pudo comprobar la presencia de ART tanto en el cuerno ipsilateral a la ovulación como en el contralateral. La presencia de ART en el cuerno contralateral no había sido estudiada previamente. En el estudio realizado por Muñoz y cols. (2014) se realizaban únicamente lavados del cuerno uterino ipsilateral al ovario donde se producía la ovulación, ya que era en el que previsiblemente se iban a desarrollar los embriones. La confirmación de la presencia de ART en los dos cuernos podría facilitar, en gran medida, la obtención de mayores cantidades de este FC.

PROCESAMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE FU

El FU es una sustancia biológica compleja, y su composición, aunque está sólo parcialmente definida, consiste en una mezcla de proteínas, aminoácidos, azúcares, lípidos e iones, derivados de la secreción de las células endometriales y de moléculas transportadas selectivamente desde el torrente sanguíneo materno (Spencer et al., 2008). Se cree que los componentes de dicho fluido desempeñan un papel importante en la inmunosupresión, necesaria para que el sistema inmunitario de la madre no rechace al nuevo individuo que se desarrolla en su interior, y el desarrollo embrionario durante el periodo preimplantatorio (Bhusane et al., 2016).

En la especie bovina, a pesar de que existe un amplio conocimiento sobre el transcriptoma del endometrio, la información disponible sobre la composición del FU bovino es más bien escasa, sobre todo durante la gestación temprana, aunque se sabe que incluye enzimas, FCs y citoquinas (Gómez et al., 2013; Muñoz et al., 2014; Spencer et al., 2008), que sufren numerosos cambios durante el periodo

preimplantatorio como consecuencia de secreciones tanto uterinas como embrionarias (Forde et al., 2014).

Uno de los mayores retos a la hora de analizar la composición del FU es el gran rango dinámico que poseen las moléculas que lo constituyen, que es de 10 órdenes de magnitud entre las moléculas menos abundantes (las citoquinas, interleuquinas, por ejemplo, se encuentran en el orden de 1-5 pg/mL) y las más abundantes (como es el caso de la ALB o la IgG, cuya concentración aproximada es de $35-70 \times 10^9$ pg/mL) (Greening y Simpson, 2010). Además, se ha establecido que las 22 proteínas más abundantes del plasma, constituyen aproximadamente el 99% de las proteínas presentes, siendo la ALB una de esas proteínas mayoritarias, tanto en el plasma sanguíneo como en el FU (Prieto et al., 2014).

Teniendo en cuenta la gran complejidad del FU y que la ALB constituye una de las proteínas más abundantes (Francis, 2010), una vez obtenidas las muestras de FU, el siguiente objetivo de este trabajo fue el de intentar reducir, en la medida de lo posible, dicha complejidad e intentar eliminar la ALB.

Existen, a nivel comercial, distintas estrategias para dar respuesta al problema de la complejidad de diversos fluidos biológicos, mediante la depleción de la ALB. En nuestro caso, se utilizaron las columnas comerciales Vivapure®, con las que, desafortunadamente, no se obtuvo la depleción esperada, permaneciendo la muestra prácticamente intacta. Es posible que esta falta de resultados se deba, principalmente, a la naturaleza química de las membranas de dichos dispositivos. Greening y Simpson (2010) compararon 4 dispositivos comerciales diseñados para la depleción de ALB y proteínas mayoritarias, y concluyeron que tanto la composición química, como la orientación de los filtros de los distintos dispositivos, producían resultados bastante desiguales, obteniéndose resultados satisfactorios sólo cuando usó uno de ellos, del cual no existen distribuidores en España.

Dada falta de éxito con las columnas Vivapure®, se procedió a intentar simplificar la muestra fraccionándola en base al distinto PM de las dos proteínas problema; para ello se utilizaron los dispositivos de ultracentrifugación

Macrosep®. Estos dispositivos dieron lugar a resultados muy dispares en todas las muestras analizadas. Es posible que el fraccionamiento esperado no se produjese debido a la mayor prevalencia de proteínas de alto PM, que muy probablemente obturaron los filtros, impidiendo el paso de moléculas de bajo PM.

Por último, se intentó abordar la simplificación del FU mediante el uso de una cromatografía de exclusión molecular. Esta metodología, permitió simplificar parcialmente la muestra, sin embargo el resultado no fue todo lo satisfactorio que se esperaba. Las cromatografías de exclusión molecular están recomendadas para separar mezclas muy sencillas de proteínas, y en el caso que nos ocupa, se procesó un fluido biológico de gran riqueza proteica sin haber realizado ninguna purificación previa. Posiblemente, el diferente comportamiento de las proteínas del FU en términos de patrones de movilidad, en comparación al que presentan estas proteínas cuando se encuentran en preparaciones puras o semipuras, es la causa de este resultado.

AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA

La separación de muestras biológicas complejas se puede realizar mediante el uso de diversas técnicas cromatográficas. Estas técnicas se emplean comúnmente para el aislamiento de proteínas y polipéptidos (Blom et al., 2008; Brigstock et al., 1997; Kim et al., 1995; Menckhoff et al., 2013).

El estudio realizado por Kim y cols. (1995) demuestra que, mediante la combinación de técnicas cromatográficas, se pueden aislar FCs tales como el HB-EGF (del inglés, *Heparin-Binding Epidermal Growth Factor*) del FU. El procedimiento utilizado por estos autores, se basó en una cromatografía de intercambio catiónica, desarrollada en estudios anteriores para el aislamiento de varios FC catiónicos, en combinación con una cromatografía de afinidad de heparina de uso comercial. Las características del FC aislado, el HB-EGF, que presenta una gran afinidad por la heparina, permitió el uso de la cromatografía de afinidad, que es la técnica de elección cuando se intenta aislar proteínas.

En nuestro caso, la primera elección también fue la cromatografía de afinidad, sin embargo, nuestra proteína de interés no tenía una afinidad específica por ningún ligando presente en las columnas de uso comercial. Por ello se realizó dicha cromatografía mediante la inmovilización de un anticuerpo específico, previamente desarrollado en los SCTs, a una resina comercial de una columna de afinidad. Una de las principales limitaciones con el uso de la inmunocromatografía es que se necesita una alta cantidad de ligando. Para obtener el ligando, en nuestro caso Ab, se procedió a la fabricación de un Ab policlonal, inmunizando para ello a un conejo, con un péptido sintético de ART bovina. Tras recoger el suero policlonal total, procedente de 5 inmunizaciones, la cantidad de Ab anti-ART era inferior a la recomendada, lo que puede ser la causa por la que no obtuviésemos los resultados esperados con la columna de inmuoafinidad. Además, el péptido usado para la inmunización hizo que el Ab policlonal resultante sólo reconociese epítomos que quizás estén ocultos en la molécula nativa.

Tras el poco éxito obtenido con la inmunocromatografía, basándonos en trabajos en los que se había conseguido, en parte, simplificar diversas proteínas tanto de origen animal como de vegetal, mediante el uso de distintas cromatografías de intercambio iónico (Blom et al., 2008; Kim et al., 1995; Menckhoff et al., 2013), y como en nuestro caso, la carga neta de la ART, significativamente positiva a pH neutro ($pI = 11$), parecía jugar a nuestro favor, se realizaron distintos procedimientos de IEX, tras los cuales tampoco se obtuvieron los resultados deseados.

Una posible explicación para los resultados obtenidos con las diversas cromatografías, puede ser porque se produzca algún tipo de arrastre de las proteínas minoritarias por aquellas como la ALB, que además de ser mayoritaria, tiene la capacidad de adherirse a multitud de sustancias (Francis, 2010). De esta forma, la ART, al ser una de las moléculas minoritarias, probablemente, interacciona con una de estas proteínas mayoritarias, quedando su capacidad de unión a la columna de cromatografía muy limitada. Además, las condiciones requeridas para intentar aislar la ART, manteniendo su bioactividad (no acidificar

mucho, no añadir mucha sal), pueden haber sido otras posibles causas de la falta de éxito en su aislamiento.

Como último recurso, se decidió intentar aislar la ART de la ALB mediante el uso de una electroforesis nativa, basándonos de nuevo en el hecho de que la proteína de interés era una proteína muy básica, con un pI muy distinto al de la ALB.

A pesar de que en teoría, las grandes diferencias existentes entre los puntos isoeléctricos de la ALB y de la ART (4,7 vs. 11), facilitarían su separación, ésta no fue posible, debido probablemente a la presencia de múltiples proteínas en el FU utilizado.

La comparación de los resultados obtenidos con los descritos por Danwen y cols. en su estudio sobre la glicosilación de la ART, donde también se realizan electroforesis nativas invertidas (Danwen et al., 2016), sugieren que en nuestro caso, la ART ha quedado retenida junto con otras proteínas al inicio del gel, percibiéndose, por tanto, como una banda ancha en la que, además, se puede intuir la presencia de más de una proteína.

SÍNTESIS DE FCs Y FORMULACIÓN DE MCs EN TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

El objetivo final de todo el trabajo realizado a lo largo de este estudio era el aislamiento de la ART bovina en su forma nativa y bioactiva para poder mejorar, con su adición, los MC que se utilizan actualmente para la obtención de EPIV.

Actualmente, una gran variedad de procedimientos médicos, científicos y comerciales, depende del cultivo *in vitro* de embriones de mamíferos. Entre otros, diversas técnicas utilizadas en reproducción asistida en la especie humana y en especies domésticas, la producción de animales transgénicos o la clonación incluyen en algún momento el CIV de embriones.

Durante el periodo de CIV, los embriones están sometidos a una gran variedad de condiciones adversas que no experimentan durante su desarrollo *in vivo*. Así factores como el pH del medio de cultivo, la exposición a la luz, la temperatura y la tensión de oxígeno de los incubadores, el MC o la acumulación de

toxinas en el medio debido a la naturaleza estática de los cultivos pueden impactar de forma negativa en la calidad de los EPIV.

Emular el microambiente en el que se desarrollan los embriones en el tracto reproductivo materno durante los primeros días de desarrollo no es fácil. Los embriones durante su avance por las trompas de Falopio hacia el útero, están expuestos a un gradiente de nutrientes, hormonas, citoquinas y FC (Gardner et al., 1996; Hannan et al., 2011; Thouas et al., 2014). Los embriones se desarrollan en el tracto femenino en unos pocos cientos de nanolitros de un fluido viscoso altamente complejo caracterizado por la presencia de mucinas, ALB y glicosaminoglicanos (Hoversland y Weitlauf, 1981; Lee y Ax, 1984; Leese 1988; Salleh et al., 2005; Zorn et al., 1995) y una baja concentración de O₂ (2–8%) (Fischer y Bavister, 1993). Además los embriones están en constante movimiento debido al epitelio ciliado y a los músculos del tracto reproductivo.

Durante los últimos años, numerosos estudios han tratado de establecer qué componentes deben formar parte de la composición del medio de cultivo. Aunque los embriones de mamífero pueden crecer en una gran diversidad de medios, cada vez existen más datos que ponen de manifiesto que el cultivo de embriones en medios subóptimos da lugar a anomalías durante el desarrollo post-implantacional y la vida post-natal (Khosla et al., 2001).

Una de las estrategias empleadas para mejorar la composición de los medios de cultivos es la adición de FC o de citoquinas (CKs). La importante función de algunos FCs y CKs presentes en el FU ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios sobre infertilidad (Boomsma et al., 2009; Dimitriadis et al., 2006; Mikolajczyk et al., 2006). Estas moléculas no están implicadas sólo en el crecimiento y diferenciación del endometrio durante el ciclo estral (Brigstock et al., 1989; Hannan et al., 2010; McLachlan et al., 1991), sino que también desempeñan una función muy importante en el desarrollo embrionario temprano (revisado por Brigstock et al., 1989; Richter 2008; Simmen y Simmen, 1991; Simmen et al., 1989).

Una de las dificultades encontradas para utilizar FCs y CKs homo-específicos en los MC *in vitro* en especies domesticas es la baja disponibilidad de estas moléculas a nivel comercial. La producción recombinante o el aislamiento de FCs y CKs a partir de muestras biológicas son procesos muy complejos y costosos que no se abordan frecuentemente para aplicaciones “poco rentables”, como es la producción de embriones *in vitro* en especies animales, cuando se compara con la humana.

El trabajo realizado en este TFM sugiere, que el aislamiento de la ART a partir de muestras de FU va a necesitar la puesta a punto de una metodología que permita, de manera muy eficiente, simplificar la muestra, de manera similar a lo que se hace habitualmente en los trabajos de búsqueda de biomarcadores en el plasma sanguíneo, para luego poder concentrarnos en su purificación (Drake et al., 2007; Liotta y Petricoin, 2006; Lopez et al., 2005). Aunque somos conscientes de que en estos estudios necesitan, al igual que en nuestro caso, la eliminación del albuminoma y proteínas mayoritarias del plasma (Björhall et al., 2005; Greenough et al., 2004; Rothmund et al., 2003), los dispositivos comerciales que se utilizan para este fin, normalmente están diseñados para muestras de volúmenes muy pequeños (del orden de unos pocos microlitros). Esto no sería útil para poder aislar ART en las cantidades necesarias para su posterior adición a los MC *in vitro*, que era la finalidad última del trabajo realizado.

CONCLUSIONES

- I. La obtención de FU bovino, con una calidad y concentración de proteína total similar a la recogida mediante lavados uterinos de animales vivos, es posible a partir de úteros recuperados en mataderos comerciales. Además, se ha confirmado la validez de la recogida de FU del cuerno contralateral a la ovulación para la obtención de ART.

- II. La utilización de diversos dispositivos comerciales, columnas Vivapure® y columnas Macrosep®, para reducir la complejidad del FU no fue exitosa. El único procedimiento empleado con el que se consiguió simplificar parcialmente el FU fue la cromatografía automatizada de exclusión molecular.

- III. Tanto la complejidad del FU, como el número y rango dinámico de las especies moleculares que lo componen, han impedido el aislamiento de la ART en su forma nativa con las metodologías empleadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., Bachmann, M. (2012). Protein Electrophoresis: Methods and Protocols. In T. B. Kurien & H. R. Scofield (Eds.), (pp. 49–53). Totowa, NJ: Humana Press.
- Baloh, R. H., Tansey, M. G., Lampe, P. A., Fahrner, T. J., Enomoto, H., Simburger, K. S., Milbrandt, J. (1998). Artemin, a Novel Member of the GDNF Ligand Family, Supports Peripheral and Central Neurons and Signals through the GFR α 3-RET Receptor Complex. *Neuron*, 21(6), 1291–1302.
- Bauersachs, S., Wolf, E. (2013). Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), 20–6.
- Beier-Hellwig, K., Sterzik, K., Bonn, B., Beier, H. M. (1989). Contribution to the physiology and pathology of endometrial receptivity: the determination of protein patterns in human uterine secretions. *Human Reproduction*, 4 (suppl 1), 115–120.
- Bhusane, K., Bhutada, S., Chaudhari, U., Savardekar, L., Katkam, R., Sachdeva, G. (2016). Secrets of Endometrial Receptivity: Some Are Hidden in Uterine Secretome. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 226–236.
- Björhall, K., Miliotis, T., Davidsson, P. (2005). Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 5(1), 307–17.
- Blom, H., Reyes, F., Carlsson, J. (2008). Purification and Characterization of an α -Mannosidase from the Tropical Fruit Babaco (*Vasconcellea* \times *Heilbornii* Cv. Babaco). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10872–10878.
- Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., Dale, B. (1999). Intercellular Communication in In Vivo- and In Vitro-Produced Bovine Embryos. *Biology of Reproduction*, 61 (4), 1050–1055.
- Boomsma, C. M., Kavelaars, A., Eijkemans, M. J. C., Amarouchi, K., Teklenburg, G., Gutknecht, D., Macklon, N. S. (2009). Cytokine profiling in endometrial secretions: a non-invasive window on endometrial receptivity. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(1), 85–94.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Brigstock, D. R., Heap, R. B., Brown, K. D. (1989). Polypeptide growth factors in uterine tissues and secretions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 85 (2), 747–758.

- Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., Vegunta, R. K., Diehl, J. R., Harding, P. A. (1997). Purification and Characterization of Novel Heparin-binding Growth Factors in Uterine Secretory Fluids: Identification as Heparin-regulated Mr10,000 forms of connective tissue growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (32), 20275–20282.
- Brison, D. R., Schultz, R. M. (1997). Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biology of Reproduction*, 56 (5), 1088–1096.
- Chen, J. I.-C., Hannan, N. J., Mak, Y., Nicholls, P. K., Zhang, J., Rainczuk, A., Stephens, A. N. (2009). Proteomic Characterization of Midproliferative and Midsecretory Human Endometrium. *Journal of Proteome Research*, 8(4), 2032–2044.
- Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., Farin, C. E. (2001). Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biology of Reproduction*, 64 (5), 1375–1385.
- Danwen, Q., Code, C., Quan, C., Gong, B.-J., Arndt, J., Pepinsky, B., Houde, D. (2016). Investigating the Role of Artemin Glycosylation. *Pharmaceutical Research*, 33(6), 1383–1398.
- Davis, B. J. (1964). Disc Electrophoresis – II Method and application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 404–427.
- Demain, A. L., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27(3), 297–306.
- Dimitriadis, E., Stoikos, C., Stafford-Bell, M., Clark, I., Paiva, P., Kovacs, G., Salamonsen, L. A. (2006). Interleukin-11, IL-11 receptor α and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window. *Journal of Reproductive Immunology*, 69(1), 53–64.
- Dockery, P., Li, T. C., Rogers, A. W., Cooke, I. D., Lenton, E. A. (1988). The ultrastructure of the glandular epithelium in the timed endometrial biopsy. *Human Reproduction*, 3 (7), 826–834.
- Drake, R. R., Cazares, L., Semmes, O. J. (2007). Mining the low molecular weight proteome of blood. *Proteomics – Clinical Applications*, 1(8), 758–768.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D. C., Hyttel, P., Ward, F. A., Boland, M. P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, 58(2), 186–195.

- Farin, P. W., Piedrahita, J. A., Farin, C. E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 65(1), 178–91.
- Farrokhi, N., Hrmova, M., Burton, A. R., Fincher, B. G. (2009). Plant Genomics: Methods and Protocols. In J. P. Gustafson, P. Langridge, & J. D. Somers (Eds.), (pp. 175–198). Totowa, NJ: Humana Press.
- Fields, S. D., Hansen, P. J., Ealy, A. D. (2011). Fibroblast growth factor requirements for in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*, 75(8), 1466–75.
- Fischer, B., Bavister, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99 (2), 673–679.
- Forde, N., Lonergan, P. (2012). Transcriptomic Analysis of the Bovine Endometrium: What is Required to Establish Uterine Receptivity to Implantation in Cattle? *Journal of Reproduction and Development*, 58(2), 189–195.
- Forde, N., McGettigan, P. A., Mehta, J. P., O'Hara, L., Mamo, S., Bazer, F. W., Lonergan, P. (2014). Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. *Reproduction*, 147(5), 575–587.
- Francis, G. L. (2010). Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*, 62(1), 1–16.
- Gao, L., Bo, H., Wang, Y., Zhang, J., Zhu, M. (2015). Neurotrophic Factor Artemin Promotes Invasiveness and Neurotrophic Function of Pancreatic Adenocarcinoma In Vivo and In Vitro. *Pancreas*, 44(1).
- Gardner, D. K., Lane, M., Calderon, I., Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility*, 65(2), 349–353.
- Garfin, D. E. (2003). Gel Electrophoresis of Proteins. *Essential Cell Biology*, 197–268.
- Ge, S., Kojio, K., Takahara, A., Kajiyama, T. (1998). Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9(2), 131–150.
- Gómez, E., Caamaño, J. N., Corrales, F. J., Díez, C., Correia-Álvarez, E., Martín, D., Muñoz, M. (2013). Embryonic sex induces differential expression of proteins in bovine uterine fluid. *Journal of Proteome Research*, 12(3), 1199–210.

- Gómez, E., Corrales, F. J., Mora, M. I., Correia, E., Carrocera, S., Martin, D., Muñoz, M. (2014). Quantification of peptide growth factors in cattle uterine fluid by Multiple Reaction Monitoring-LC-MS/MS. *Reproduction, Fertility and Development*.
- Gómez, E., Correia-Álvarez, E., Caamaño, J. N., Díez, C., Carrocera, S., Peynot, N., Muñoz, M. (2014). Hepatoma-derived growth factor: from the bovine uterus to the in vitro embryo culture. *Reproduction*, 148 (4), 353–365.
- Gómez, E., Muñoz, M. (2015). Multiple-embryo transfer for studying very early maternal-embryo interactions in cattle. *Reproduction*, 150 (2), R35–R43.
- Greening, D. W., Simpson, R. J. (2010). A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight (≤ 25 K) component of human plasma proteome. *Journal of Proteomics*, 73(3), 637–648.
- Greenough, C., Jenkins, R. E., Kitteringham, N. R., Pirmohamed, M., Park, B. K., Pennington, S. R. (2004). A method for the rapid depletion of albumin and immunoglobulin from human plasma. *Proteomics*, 4(10), 3107–11.
- Hannan, N. J., Paiva, P., Meehan, K. L., Rombauts, L. J. F., Gardner, D. K., Salamonsen, L. A. (2011). Analysis of Fertility-Related Soluble Mediators in Human Uterine Fluid Identifies VEGF as a Key Regulator of Embryo Implantation. *Endocrinology*, 152(12), 4948–4956.
- Hannan, N. J., Stephens, A. N., Rainczuk, A., Hincks, C., Rombauts, L. J. F., Salamonsen, L. A. (2010). 2D-DiGE analysis of the human endometrial secretome reveals differences between receptive and nonreceptive states in fertile and infertile women. *Journal of Proteome Research*, 9(12), 6256–64.
- Haouzi, D., Dechaud, H., Assou, S., De Vos, J., Hamamah, S. (2012). Insights into human endometrial receptivity from transcriptomic and proteomic data. *Reproductive Biomedicine Online*, 24(1), 23–34.
- Havlicek, V., Kuzmany, A., Cseh, S., Brem, G., Besenfelder, U. (2010). The Effect of Long-term In Vivo Culture in Bovine Oviduct and Uterus on the Development and Cryotolerance of In Vitro Produced Bovine Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(5), 832–837.
- Holewinski, R. J., Jin, Z., Powell, M. J., Maust, M. D., Van Eyk, J. E. (2013). A fast and reproducible method for albumin isolation and depletion from serum and cerebrospinal fluid. *Proteomics*, 13(5), 743–50.

- Hoversland, R. C., Weitlauf, H. M. (1981). The volume of uterine fluid in “implanting” and “delayed implanting” mice. *Journal of Reproduction and Fertility* , 62 (1), 105–109.
- Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S., Nakahara, T. (1990). Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* , 90 (1), 279–284.
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-Å., Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* , 35(2), 91.
- Kawamura, K., Chen, Y., Shu, Y., Cheng, Y., Qiao, J., Behr, B., Hsueh, A. J. W. (2012). Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. *PLoS One* , 7(11), e49328.
- Khosla, S., Dean, W., Reik, W., Feil, R. (2001). Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Human Reproduction Update* , 7(4), 419–427.
- Khurana, N. K., Niemann, H. (2000). Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. *Biology of Reproduction* , 62 (4), 847–856.
- Kim, G. Y., Besner, G. E., Steffen, C. L., McCarthy, D. W., Downing, M. T., Luquette, M. H., Brigstock, D. R. (1995). Purification of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor from pig uterine luminal flushings, and its production by endometrial tissues. *Biology of Reproduction* , 52 (3), 561–571.
- Koch, J. M., Ramadoss, J., Magness, R. R. (2010). Proteomic Profile of Uterine Luminal Fluid from Early Pregnant Ewes. *Journal of Proteome Research* , 9(8), 3878–3885.
- Larson, R. C., Ignatz, G. G., Currie, W. B. (1992). Platelet derived growth factor (PDGF) stimulates development of bovine embryos during the fourth cell cycle. *Development* , 115(3), 821–826.
- Lee, C. N., Ax, R. L. (1984). Concentrations and Composition of Glycosaminoglycans in the Female Bovine Reproductive Tract. *Journal of Dairy Science* , 67(9), 2006–2009.
- Leese, H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* , 82 (2), 843–856.
- Li, J., Klein, C., Liang, C., Rauch, R., Kawamura, K., Hsueh, A. J. W. (2009). Autocrine regulation of early embryonic development by the artemin-GFRA3 (GDNF family receptor-alpha 3) signaling system in mice. *FEBS Letters* , 583(15), 2479–85.

- Liotta, L. A., Petricoin, E. F. (2006). Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(1), 26–30.
- Lippoldt, E. K., Ongun, S., Kusaka, G. K., McKemy, D. D. (2016). Inflammatory and neuropathic cold allodynia are selectively mediated by the neurotrophic factor receptor GFR α 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (16), 4506–4511.
- Lopez, M. F., Mikulskis, A., Kuzdzal, S., Bennett, D. A., Kelly, J., Golenko, E., Wolfe, G. M. (2005). High-Resolution Serum Proteomic Profiling of Alzheimer Disease Samples Reveals Disease-Specific, Carrier-Protein-Bound Mass Signatures. *Clinical Chemistry*, 51 (10), 1946–1954.
- Loureiro, B., Bonilla, L., Block, J., Fear, J. M., Bonilla, A. Q. S., Hansen, P. J. (2009). Colony-Stimulating Factor 2 (CSF-2) Improves Development and Posttransfer Survival of Bovine Embryos Produced in Vitro. *Endocrinology*, 150(11), 5046–5054.
- Masure, S., Geerts, H., Cik, M., Hoefnagel, E., Van Den Kieboom, G., Tuytelaars, A., Gordon, R. D. (1999). Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. *European Journal of Biochemistry*, 266(3), 892–902.
- McLachlan, J. A., Nelson, K. G., Takahashi, T., Bossert, N. L., Newbold, R. R., Korach, K. S. (1991). Estrogens and Growth Factors in the Development, Growth, and Function of the Female Reproductive Tract. In: D. W. Schomberg (Ed.), *Growth Factors in Reproduction* (pp. 197–203). New York, NY: Springer New York.
- McLellan, T. (1982). Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 94–99.
- Menckhoff, L., Mielke-Ehret, N., Buck, F., Vuletić, M., Lüthje, S. (2013). Plasma membrane-associated malate dehydrogenase of maize (*Zea mays* L.) roots: Native versus recombinant protein. *Journal of Proteomics*, 80, 66–77.
- Merighi, A. (2016). Targeting the glial-derived neurotrophic factor and related molecules for controlling normal and pathologic pain. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(2), 193–208.
- Mikolajczyk, M., Wirstlein, P., Skrzypczak, J. (2006). Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis. *Human Reproduction*, 21 (12), 3054–3058.

- Muñoz, M., Corrales, F. J., Caamaño, J. N., Díez, C., Trigal, B., Mora, M. I., Gómez, E. (2012). Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 751–66.
- Muñoz, M., Martín, D., Caamaño, J. N., Carrocera, S., Gómez, E. (2014). Expression of artemin in the bovine endometrium, uterine fluid and early embryos. *Reproduction, Fertility and Development*.
- O'Neill, C. (1997). Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biology of Reproduction*, 56 (1), 229–237.
- O'Neill, C. (1998). Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. *Biology of Reproduction*, 58 (5), 1303–1309.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis - I Background and Theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121(2), 321–349.
- Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., Ramírez, O. T. (2004). Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols. In: P. Balbás, A. Lorence (Eds.), (pp. 15–51). Totowa, NJ: Humana Press.
- Predicted: Artemin isoform X1 [Bos taurus] - Protein - NCBI. Consultado el 22 de Abril de 2016 en: https://protein/,DanaInfo=www.ncbi.nlm.nih.gov+XP_015322100.1
- Predicted: Artemin isoform X2 [Bos taurus] - Protein - NCBI. Consultado el 22 de Abril de 2016 en: <https://protein/,DanaInfo=www.ncbi.nlm.nih.gov+clipboard>
- Prieto, D. A., Johann, D. J., Wei, B.-R., Ye, X., Chan, K. C., Nissley, D. V, Blonder, J. (2014). Mass spectrometry in cancer biomarker research: a case for immunodepletion of abundant blood-derived proteins from clinical tissue specimens. *Biomarkers in Medicine*, 8(2), 269–286.
- Richter, K. S. (2008). The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 20(3).
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De La Fuente, J., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A. (2008). Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 44–50.

- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutiérrez-Adán, A. (2002). Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction*, 66 (3), 589–595.
- Rizos, D., Ramirez, M. A., Pintado, B., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A. (2010). Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73(6), 777–85.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 234–248.
- Rodríguez, A., Díez, C., Caamaño, J. N., de Frutos, C., Royo, L. J., Muñoz, M., Gómez, E. (2007). Retinoid receptor-specific agonists regulate bovine in vitro early embryonic development, differentiation and expression of genes related to cell cycle arrest and apoptosis. *Theriogenology*, 68(8), 1118–1127.
- Rothmund, D. L., Locke, V. L., Liew, A., Thomas, T. M., Wasinger, V., Rylatt, D. B. (2003). Depletion of the highly abundant protein albumin from human plasma using the Gradiflow. *Proteomics*, 3(3), 279–287.
- Salamonsen, L. A., Edgell, T., Rombauts, L. J. F., Stephens, A. N., Robertson, D. M., Rainczuk, A., Hannan, N. J. (2013). Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and Sterility*, 99(4), 1086–92.
- Salleh, N., Baines, D. L., Naftalin, R. J., Milligan, S. R. (2005). The Hormonal Control of Uterine Luminal Fluid Secretion and Absorption. *The Journal of Membrane Biology*, 206(1), 17–28.
- Simmen, F. A., Simmen, R. C. (1991). Peptide growth factors and proto-oncogenes in mammalian conceptus development. *Biology of Reproduction*, 44 (1), 1–5.
- Simmen, F., Simmen, R., Bazer, F. (1989). Maternal growth factors as mediators of embryonic and neonatal growth. *Biochemical Society Transactions*, 17(3), 587–589.
- Spencer, T. E., Sandra, O., Wolf, E. (2008). Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135 (2), 165–179.

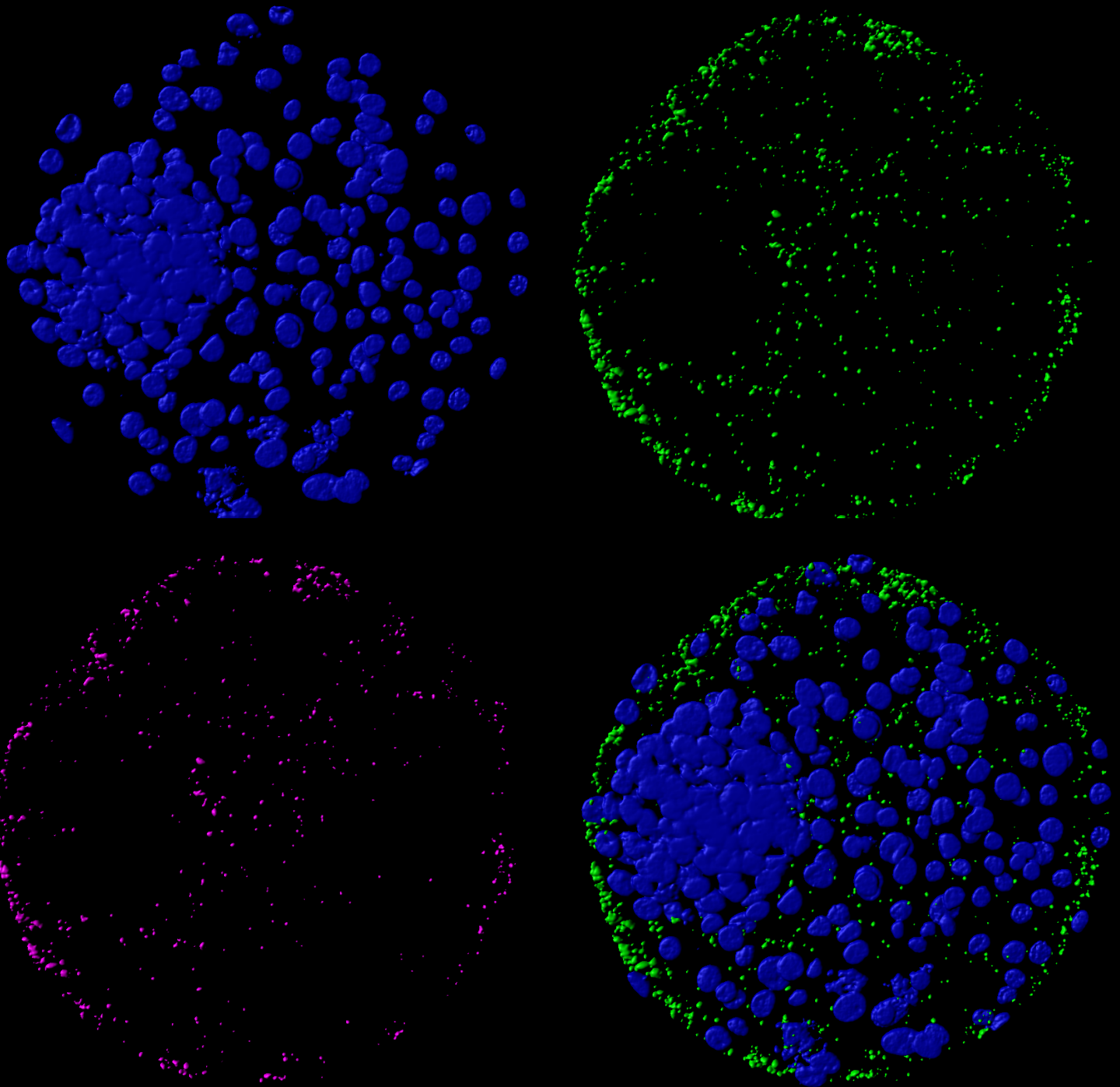
- Thouas, G. A., Dominguez, F., Green, M. P., Vilella, F., Simon, C., Gardner, D. K. (2014). Soluble Ligands and Their Receptors in Human Embryo Development and Implantation. *Endocrine Reviews*, 36(1), 92–130.
- Trigal, B., Gómez, E., Díez, C., Caamaño, J. N., Martín, D., Carrocera, S., Muñoz, M. (2011). In vitro development of bovine embryos cultured with activin A. *Theriogenology*, 75(3), 584–8.
- Urrego, R., Rodriguez-Osorio, N., Niemann, H. (2014). Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics*, 9(6), 803–15.
- van Soom, A., Ysebaert, M.-T., de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47(1), 47–56.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenber, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Thomsen, P. D. (1999). A High Proportion of Bovine Blastocysts Produced In Vitro Are Mixoploid. *Biology of Reproduction*, 60 (6), 1273–1278.
- Wang, H., Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 7(3), 185–199.
- Wang, X., Baloh, R. H., Milbrandt, J., Garcia, K. C. (2006). Structure of artemin complexed with its receptor GFRalpha3: convergent recognition of glial cell line-derived neurotrophic factors. *Structure (London, England : 1993)*, 14(6), 1083–92.
- Yang, C., Hutto, D., Sah, D. W. Y. (2006). Distribution of GDNF family receptor $\alpha 3$ and RET in rat and human non-neural tissues. *Journal of Molecular Histology*, 37(1), 69–77.
- Zorn, T. M., Pinhal, M. A., Nader, H. B., Carvalho, J. J., Abrahamsohn, P. A., Dietrich, C. P. (1995). Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 41(1), 97–106.



Universidad de Oviedo

MATERIAL SUPLEMENTARIO

MÁSTER EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



PILAR NIETO OLMEDO



AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA EN FLUIDO UTERINO BOVINO



Universidad de Oviedo

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE
LA REPRODUCCIÓN

AISLAMIENTO DE ARTEMINA NATIVA EN FLUIDO UTERINO BOVINO

PRÁCTICUM

JULIO 2016

PILAR NIETO OLMEDO

DIRIGIDO POR: MARTA MUÑOZ LLAMOSAS
MARCOS GARCÍA OCAÑA



ABREVIATURAS

Ab	<i>Antibody</i>	Anticuerpo
AC	<i>Affinity Chromatography</i>	Cromatografía de afinidad
Ag	Antígeno	
ART	Artemina	
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albúmina Sérica Bovina
βME	β-mercaptoetanol	
CV	<i>Column Volumes</i>	Volúmenes de columna
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol	
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	Quimioluminiscencia mejorada
FC	Factor de Crecimiento	
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	Cromatografía líquida rápida de proteínas
FU	Fluido Uterino	
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>	Cromatografía de interacción hidrofóbica
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>	Peroxidasa del rábano
ICQ	Inmunocitoquímica	
IEX	Ion Exchange Chromatography	Cromatografía de intercambio iónica
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>	Suero normal de cabra
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>	Colección de Ovocitos
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
PM	Peso Molecular	
PSA	Persulfato de Amonio	
PVA	Polivinil Alcohol	
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>	Fluoruro de polivinilideno
PVP	Polivinil Pirrolidona	
SCTs	Servicios Científico-Técnicos	
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Dodecilsulfato sódico
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	Cromatografía de exclusión molecular
SERIDA	Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario	
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilediamino	
TFM	Trabajo Fin de Máster	
WB	Western Blot	

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ORGANIZACIÓN	1
OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS	3
DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS	4
OBTENCIÓN DE FLUIDO UTERINO	4
PROCESAMIENTO DEL FU	6
CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS MEDIANTE BRADFORD	7
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR WESTERN BLOT Y SDS-PAGE	9
PREPARACIÓN DEL GEL	10
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	12
ELECTROFORESIS	14
TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE PVDF	16
INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS	20
DETECCIÓN	21
ANÁLISIS	22
TINCIÓN DE GELES CON AZUL DE COOMASSIE	23
COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250	23
QC COLLOIDAL COOMASSIE STAIN	24
CROMATOGRAFÍA FPLC	26
CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	27
CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	31
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	35
ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS	38
INMUNOCITOQUÍMICA DE EMBRIONES	40
VALORACIÓN PERSONAL	43
ANEXO I	44
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Útero bovino libre de tejidos adyacentes.	4
Figura 2. Cuerno uterino clampado.	5
Figura 3. Nevera para el transporte de las muestras.	5
Figura 4. Centrifugado y filtrado del FU.	6
Figura 5. Esquema de trabajo del WB	9
Tabla 2. Porcentajes de acrilamida en función del tamaño de proteínas.	11
Figura 6. Casette para preparación de geles de Bio-Rad.	12
Figura 7. Sistema de electroforesis vertical.	14
Figura 8. Representación electroforesis.	15
Figura 9. Frente avanzando durante la electroforesis.	16
Figura 10. Esquema representativo de la transferencia de proteínas.	17
Figura 11. Componentes de la transferencia equilibrándose.	18
Figura 12. Sistema de transferencia.	19
Figura 13. Tinción con el reactivo Ponceau S.	19
Figura 14. Principio de detección por ECL en WB.	22
Figura 15. Bandas de ART detectadas por WB en varias muestras.	22
Figura 16. Patrón de bandas de distintas muestras de FU tras tinción con Coomassie clásico.	24
Figura 17. Muestras de FU teñidas con la solución QC Colloidal Coomassie Stain tras PAGE.	25
Tabla 3. Diferentes tipos de cromatografías.	26
Figura 18. Diseño esquemático de un sistema ÄKTA-FPLC.	27
Figura 19. Proceso de separación por SEC.	28
Figura 20. Cromatograma teórico de separación por SEC.	29
Figura 21. Sistema ÄKTA-FPLC de los SCTs de Oviedo con la columna Superdex 200.	30
Figura 22. Cromatograma tras SEC del FU.	30
Figura 23. Cromatograma teórico de separación por gradientes.	33
Figura 24. Cromatograma teórico de IEX usando elución por pasos.	33
Figura 25. Principios de la cromatografía de intercambio aniónico.	34
Figura 26. Representación cromatografía afinidad típica.	36
Figura 27. Columna de inmutofinidad.	37
Figura 28. Representación gráfica de la disposición que adoptaría una proteína dimérica en una electroforesis nativa vs. una electroforesis convencional.	38
Figura 29. Inversión de electrodos del sistema de electroforesis.	39
Figura 30. Patrón de bandas de diferentes formas de ART en (A) electroforesis no desnaturizante, (B) desnaturizante y (C) no desnaturizante invertida.	39
Figura 31. (A) Expresión de ART en un embrión y (B) expresión del receptor GFR α 3.	42

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Diluciones de la curva estándar del test de Bradford.</i>	7
<i>Tabla 2. Porcentajes de acrilamida en función del tamaño de proteínas.</i>	11
<i>Tabla 3. Diferentes tipos de cromatografías.</i>	26
<i>Tabla 4. Diferentes volúmenes de reactivos para la preparación de geles.</i>	44
<i>Tabla 5. Reactivos para el gel de empaquetamiento.</i>	44
<i>Tabla 6. Reactivos para el tampón de carga.</i>	44
<i>Tabla 7. Tampón de electroforesis 10X.</i>	45
<i>Tabla 8. Componentes del tampón de transferencia.</i>	45

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo durante los meses de Marzo, Abril, Mayo y Junio en las instalaciones del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), en Deva (Gijón, Asturias) y en los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

ORGANIZACIÓN

El SERIDA es una entidad pública del Principado de Asturias, que tiene por finalidad contribuir a modernizar y mejorar las capacidades del Sector Agroalimentario Regional. Para este fin es importante tanto el impulso como la ejecución de la investigación y el desarrollo tecnológico agropecuario, forestal y alimentario, con el objeto de mejorar la productividad, diversificar el sector y aumentar las rentas de los activos primarios, redundando en una mejora de la competitividad del sector agroalimentario asturiano.

Se estructura en los siguientes departamentos y áreas:

- Departamento de Administración y Apoyo.
- Departamento Tecnológico y de Servicios.
- Departamento de Investigación. El departamento de investigación se encarga de la gestión científica de los programas de investigación y de coordinar las acciones y los medios de la investigación con las actividades que se ejecutan en el resto de los departamentos del SERIDA. Se estructura en seis áreas: Sistemas de Producción Animal; Nutrición, Pastos y Forrajes; Sanidad Animal; Genética y Reproducción Animal; Cultivos Hortofrutícolas y Forestales; y Tecnología de Alimentos.

De éstas, la que nos atañe es el Área de Genética y Reproducción Animal, situada en el Centro de Biotecnología Animal de Deva, Gijón, que realiza, desde hace casi dos décadas, una intensa actividad investigadora en el campo de las nuevas biotecnologías reproductivas.

Los proyectos de investigación desarrollados por esta área emplean de forma rutinaria las técnicas de maduración, fertilización, cultivo de embriones *in vitro*, Ovum Pick-Up (OPU), vitrificación de embriones y predicción no invasiva del sexo del embrión *in vitro*.

Los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo son estructuras destinadas a dar soporte a investigadores, equipos y grupos de investigación de la Institución, así como de otras instituciones públicas y empresas privadas. Desde su creación en 1987, al amparo del artículo 39 de los Estatutos de la Universidad de Oviedo, su objetivo primordial ha sido la optimización de los recursos científicos de la Institución, consiguiendo su máximo rendimiento al hacerlos accesibles a otros investigadores externos.

Los objetivos finales de los SCTs son:

- Dar soporte a la investigación que realizan los investigadores, equipos o grupos en los departamentos, centros o institutos de la Universidad de Oviedo, del Hospital Universitario y de cualquier otro organismo público o privado.
- Desarrollar métodos y técnicas de apoyo a la investigación de acuerdo con las directrices de política científica de la Universidad de Oviedo.
- Proporcionar formación científica y técnica especializada en los ámbitos de competencia de cada unidad.
- Contribuir como elemento activo en las relaciones Universidad-empresa en el campo del desarrollo de tecnología y prestación de servicios, directamente o en colaboración con otros servicios de la Universidad.
- Prestar especial apoyo a la transferencia de conocimiento a través de las Empresas de Base Tecnológica y Spin off universitarias.
- Participar en redes nacionales e internacionales de centros de soporte a la investigación

OBJETIVO DE LAS PRÁCTICAS

El objetivo principal de las prácticas, fue la adquisición de los conocimientos necesarios sobre las técnicas a aplicar en la realización del trabajo fin de Máster (TFM) perteneciente al Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Universidad de Oviedo. Dicho trabajo, encuadrado en el proyecto de Interacciones materno-embrionarias (AGL2012-37772), tenía como objetivo final poner a punto las metodologías necesarias para el aislamiento de la Artemina (ART), un factor de crecimiento (FC) presente en el fluido uterino (FU).

Uno de los retos actuales en Biotecnología Reproductiva consiste en diseñar condiciones de cultivo *in vitro* similares al ambiente uterino en el que se desarrolla el embrión temprano. La importancia del estudio de los FCs presentes en el FU radica en que el establecimiento de una interacción bidireccional y efectiva entre un embrión competente y un endometrio receptivo es un requisito esencial de la reproducción de mamíferos. En el medio materno, el embrión inicia una comunicación con la madre, que está controlada por un gran número de moléculas complejas, entre ellas se encuentran los FCs. Diversos estudios sobre fertilización *in vitro* en la especie humana y en animales, han establecido que el cultivo de embriones en medios convencionales carentes de estas moléculas puede dar lugar a un crecimiento inferior al esperado, con alteraciones a corto y largo plazo en el desarrollo de la progenie. Además, recientemente se ha demostrado que la adición al medio de cultivo *in vitro* de moléculas presentes en el útero bovino puede aumentar la viabilidad de los embriones tras su transferencia a receptoras. Por tanto, el estudio e identificación de proteínas que intervienen en la comunicación materno-embrionaria puede ayudar a mejorar las técnicas de cultivo de embriones *in vitro*.

El análisis de proteínas en los diferentes fluidos biológicos constituye una de las aproximaciones más antiguas e importantes llevadas a cabo en los laboratorios clínicos, ya que existe un interés creciente desde el punto de vista biomédico en el aislamiento de moléculas bioactivas a partir de fluidos biológicos.

A continuación se procederá al análisis en detalle de cada una de las técnicas empleadas para el aislamiento de la proteína de interés, la Artemina.

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS

OBTENCIÓN DE FLUIDO UTERINO

Los úteros utilizados para el experimento, se recogieron en el matadero de Guarnizo (Santander, España) y se procesaron *in situ* antes del transporte del FU al laboratorio.

En primer lugar se procedió a la selección de los úteros. Se seleccionaron aquellos úteros que cumpliesen con las siguientes características:

- Vacas no gestantes.
- Preferiblemente en los días 5 a 17 post-ovulación, que es cuando el endometrio se prepara para recibir al embrión.
- Sin alteraciones patológicas ni infecciones aparentes.

Una vez recogidos, durante su procesamiento, se mantuvo una temperatura constante de refrigeración, ya que a temperaturas superiores las proteínas tienden a la degradación.

Sobre un paño estéril colocado sobre una bandeja fría se separaron ambos cuernos uterinos de los tejidos adyacentes, para permitir la recogida del FU.



Figura 1. Útero bovino libre de tejidos adyacentes.

Tras separar ambos cuernos uterinos, la técnica empleada para la recolección del FU consistió en clampar ambos extremos del cuerno para delimitar la zona a lavar. Uno de los clamps se colocó cerca de la unión utero-tubárica y el otro cerca de la base del cuerno uterino. A continuación, se introdujeron 15 mL de PBS (tampón fosfato salino, SIGMA, Madrid, España) con una aguja roma, para evitar lacerar el endometrio, y se procedió a realizar un suave masaje del cuerno.



Figura 2. Cuerno uterino clampado.

A continuación, se introdujo ligeramente el extremo craneal del cuerno uterino en un tubo de centrífuga de 50 mL y se masajeó nuevamente el útero para recoger todo el FU diluido en el tampón PBS.

Las muestras de FU se trasladaron al laboratorio, manteniendo en todo momento la temperatura de refrigeración.



Figura 3. Nevera para el transporte de las muestras.

PROCESAMIENTO DEL FU

Una vez en el laboratorio, el FU se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos, para eliminar restos de sangre y partículas más gruesas en suspensión. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se filtró con un filtro *protein low bind* de 0.45 μ (Merck Milipore Ltd., Irlanda) en cabina de flujo laminar.

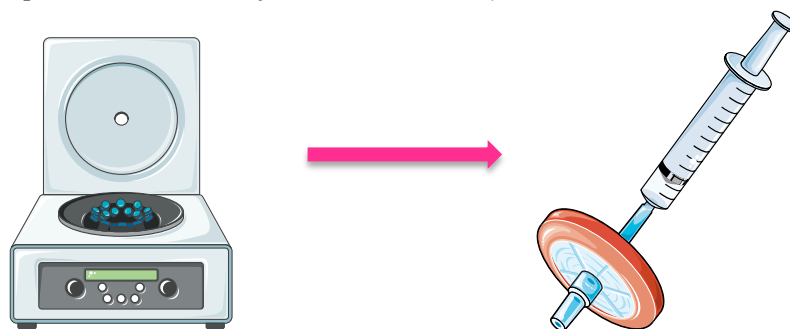


Figura 4. Centrifugado y filtrado del FU.

Debido a que para realizar el lavado del útero hay que introducir un gran volumen de PBS, la muestra recogida se encontraba muy diluida, por ello el FU se centrifugó de nuevo para concentrarlo con los sistemas Amicon® Ultra-15 de 3 KDa (Merck Milipore Ltd., Irlanda). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se centrifugaron las muestras a 5000 xg durante aproximadamente 45 minutos, hasta un volumen final de aproximadamente 500 μ L. De estas muestras se tomaron alícuotas para su cuantificación y análisis y se guardó el resto de las muestras en tubos de microcentrífuga *protein low bind* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), de 1,5 mL.

Las muestras experimentales se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta que fueron procesadas.

CUANTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS MEDIANTE BRADFORD

Este test se basa en la unión de la tinción Coomassie Brilliant Blue G-250 a proteínas. Dicha unión cambia la absorción máxima de luz del colorante, que pasa de 465 nm a 595 nm, y éste cambio de absorción se mide mediante espectrofotometría. Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre el colorante hidrofóbico Coomassie Brilliant Blue y las proteínas. Las disoluciones acuosas del Coomassie Brilliant Blue, en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo, y cuando pasan al entorno hidrofóbico del interior de una proteína, pasa a tener un color azul intenso que se puede medir fácilmente. El complejo proteína-colorante tiene un coeficiente de extinción muy rápido, lo que lleva a una gran sensibilidad en la medición de la concentración de proteína de una muestra¹.

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra mediante este test, se requiere la preparación de una curva patrón. La proteína patrón más usada a este respecto es la albúmina sérica bovina (BSA, del inglés Bovine Serum Albumin). Para su preparación, se disolvió una alícuota de 100 μL de BSA (Sigma-Aldrich, USA) de concentración 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en 900 μL de agua. A partir de este stock de BSA, se realizaron las diluciones de la curva estándar (Tabla 1).

Tabla 1. Diluciones de la curva estándar del test de Bradford.

Dilución	Agua (μL)	BSA (μL)
0	800	0
0.5	795	5
1	790	10
1.5	785	15
3	770	30
6	740	60
12	680	120

Posteriormente, en función de la concentración estimada de las muestras de interés, se prepararon distintas diluciones:

- Si estaban muy concentradas se hacía una dilución con 2 μL de muestra y 798 μL de agua.
- Si por el contrario estaban muy diluidas, se hacían diluciones 10:790 o incluso 30:770

Tanto en la curva estándar como en la preparación de las muestras se tenía que alcanzar un volumen final de 800 μL .

A continuación, se añadieron 200 μL del reactivo de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Por último, se procedió a la lectura de las muestras en el espectrofotómetro SmartSpec Plus de los laboratorios Bio-Rad.

Los valores obtenidos indican los μg de proteína que hay en 1000 μL de volumen de reacción total. Por tanto, habrá que dividir entre el volumen de proteína problema que añadimos, para obtener el valor de concentración final que nos interesa.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR WESTERN BLOT Y SDS-PAGE

Como paso previo al aislamiento de la ART en condiciones nativas, se analizaron las muestras para verificar si contenían dicha proteína. Para ello se llevó a cabo un análisis por Western Blot (WB), también conocido por immunoblotting.

El WB es una técnica analítica bien establecida y ampliamente usada en el análisis y la detección de proteínas específicas en una muestra biológica compleja. Está basada en el principio de la unión de anticuerpos (Ab) a antígenos (Ag) específicos, en nuestro caso, proteínas, previamente inmovilizadas en una membrana. Este método se describió por primera vez en 1979 y desde entonces se ha convertido en una de las técnicas más empleadas².

Uno de los primeros pasos que se realizan en esta técnica es una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés polyacrylamide gel electrophoresis). Una de las principales ventajas que presenta esta técnica es que permite separar muestras complejas de proteínas. La electroforesis en gel proporciona información sobre el peso molecular (PM), la carga neta de las proteínas, las subunidades proteicas y la pureza de la muestra en cuestión, es muy fácil de usar y es un método altamente reproducible. La electroforesis más usada para separar proteínas es la SDS-PAGE (del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), ya que proporciona una sencilla forma de estimar el número de polipéptidos presentes en una muestra y de medir la complejidad o la pureza de una preparación³.

Aunque la técnica puede variar entre las distintas aplicaciones, todas siguen un esquema general básico:

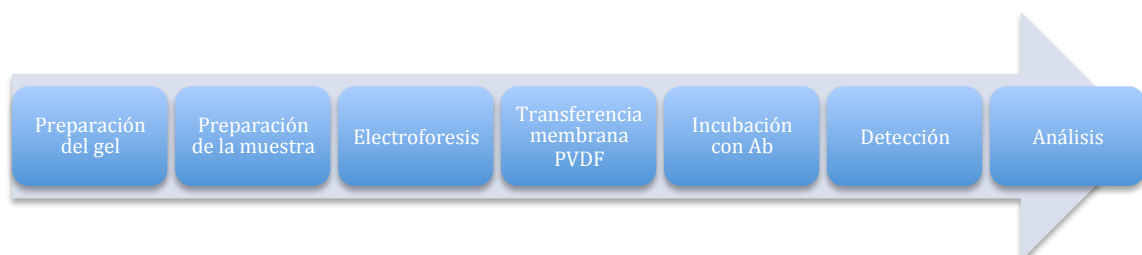


Figura 5. Esquema de trabajo del WB

Preparación del gel

El gel determina la tasa de migración de las proteínas y mantiene a las mismas en la misma posición al final de la electroforesis hasta que son teñidas para su visualización o transferidas a una membrana³. Los geles de poliacrilamida son los que mejor funcionan en la electroforesis de proteínas por varias razones:

- I. Pueden prepararse en una amplia gama de tamaños, en función de los tamaños de las proteínas que se quieran clasificar.
- II. La reacción de polimerización es fácil y reproducible y se pueden fabricar geles de una gran variedad de formas.
- III. El tamaño de los poros, que viene determinado por las condiciones de polimerización, se puede alterar fácilmente cambiando la concentración del monómero.
- IV. Los geles de poliacrilamida son hidrofílicos y eléctricamente neutros.
- V. Son transparentes en longitudes de ondas por encima de los 250 nm y no se unen a colorantes de proteínas.

Para la preparación del gel se necesitarán los siguientes reactivos:

- **Acrilamida.** Se usa una mezcla de acrilamida-bisacrilamida. Por convención, los geles de poliacrilamida se caracterizan por dos valores, %T y %C, donde %T es el peso en tanto por ciento del total del monómero en g/100 mL y %C es la proporción de la bisacrilamida como porcentaje del monómero total. El tamaño efectivo del poro de un gel de poliacrilamida es la función inversa de la concentración total del monómero (%T) y la función bifásica de %C. Es decir, cuando %T está aumentado a un %C fijo, el número de cadenas aumenta y el tamaño del poro disminuye. Geles con bajo %T se usan para separar proteínas grandes, mientras que los geles con alto %T se usan para separar proteínas pequeñas³. En nuestro caso usaremos una solución con un 30% Acrilamida/Bisacrilamida en un ratio 29:1.

- **Reacción de polimerización.** En la formación de los geles de poliacrilamida, la reacción química que se utiliza más frecuentemente para formar los radicales libres necesarios para la polimerización consta de Persulfato de Amonio (PSA), que es el catalizador y N,N,N',N'-Tetrametiletilenediamino (TEMED), que es el iniciador. El TEMED acelera la descomposición de las moléculas de persulfato en radicales libres de sulfato, y esto es lo que inicia la polimerización. La tasa de polimerización va a depender de la concentración neta del monómero y del iniciador, la temperatura y de la pureza de los reactivos y del agua (Milli-Q).
- **Tampones.** Las electroforesis se clasifican, en función del sistema de geles y tampones usado, en continuas y discontinuas. El método más utilizado es el sistema discontinuo diseñado por Laemmli⁴, en el que la base de los tampones es el Tris-HCl y el SDS, a distintas concentraciones según se trate del gel de empaquetamiento o del gel de separación.

En la tabla 4 del Anexo I podemos observar los volúmenes necesarios para preparar distintos geles en función del grado de separación requerido.

La elección del porcentaje del gel se hará en función del tamaño de la proteína de interés, ya que mientras más pequeño sea el tamaño de la proteína en cuestión, mayor porcentaje de acrilamida/bis tendrá que haber y viceversa.

En la Tabla 2 podemos observar unos valores predeterminados que nos van a permitir elegir el gel adecuado.

Tabla 2. Porcentajes de acrilamida en función del tamaño de proteínas.

TAMAÑOS DE PROTEÍNA	PORCENTAJE DE ACRILAMIDA
4-40 KDa	20%
12-45 KDa	15%
10-70 KDa	12,5%
15-100 KDa	10%
25-200 KDa	8%

En nuestro caso, al tener nuestra proteína de interés un peso molecular de 24 KDa, optamos por la preparación de dos geles al 10%, para poder realizar tanto un WB como una tinción de bandas mediante el reactivo de Coomassie (ver más adelante).

El gel de empaquetamiento lo prepararemos con los volúmenes especificados en la tabla 5 del anexo I.

Para que se produzca la polimerización del gel de separación será necesario esperar unos 10 minutos, durante los cuales cubriremos dicho gel con butanol saturado para que polimerice recto y evitar la formación de burbujas. Una vez transcurrido ese tiempo, se decanta el butanol y a continuación se dispensa el gel de empaquetamiento sobre el de separación. Este último gel tardará en polimerizar unos 30 minutos, ya que el volumen de acrilamida es menor. Una vez polimerizado, se retirará el peine, dejando libres los pocillos de carga de las muestras.



Figura 6. Cassette para preparación de geles de Bio-Rad.

Preparación de la muestra

Independientemente de la naturaleza de la proteína a analizar, para poder separarlas en base a su peso molecular y poder identificarlas siempre en el mismo lugar, hay que añadir una serie de reactivos que alterarán la carga neta de las mismas y romperán su estructura tridimensional, es decir, habrá que desnaturar las proteínas, en lo que se denomina una electroforesis desnaturante.

Uno de los componentes más importantes del tampón de carga es el SDS, éste detergente forma una micela alrededor de la moléculas, anulando la carga individual de cada una, adoptando de esta forma todas las moléculas del complejo, una carga negativa. De este modo, al someterlas al campo eléctrico tenderán a moverse hacia el polo positivo, es decir, el ánodo.

Además, el tampón de carga debe incluir un reactivo del grupo tiol, como el β -mercaptoetanol (β ME), cuya función es romper los puentes disulfuro, si están presentes, dentro de la misma proteína o uniendo subunidades⁵.

Asimismo es importante añadir glicerol, que va a conferir mayor densidad a las proteínas, favoreciendo su alineación en los sistemas verticales.

Por último, se añadirá azul de bromofenol, que se trata de un compuesto coloreado y con carga, utilizado para comprobar el progreso de la electroforesis. Debido a su menor tamaño, se mueve más rápido que las proteínas, es decir, marca el "frente de avance". Puesto que su color azul-violeta es bien visible, permite detener la electroforesis con la confianza de que las moléculas de proteína no se hayan salido del gel.

Como consecuencia, cuando las proteínas cargadas y alineadas se someten a un campo eléctrico, se separarán según su PM con un alto grado de resolución⁵.

En la tabla 6 del anexo I se especifican los reactivos y la cantidad de los mismos, necesarios para la preparación de un tampón de carga a una concentración 4X.

Las muestras se prepararán añadiendo 1/4 de volumen del tampón a 1 volumen de muestra, es decir, si las muestras están en un volumen de 15 μ L habrá que añadir 5 μ L de tampón de muestra.

Una vez mezclada y homogeneizada la muestra con el tampón de carga, se calentarán a 99°C para separar los complejos proteicos. Tras este paso, habrá que realizar una ultracentrifugación rápida para unificar toda la muestra.

Electroforesis

Preparados los geles y las muestras, el siguiente paso a realizar es la electroforesis propiamente dicha.

La electroforesis es una técnica de separación basada en la movilidad de moléculas cargadas en un campo eléctrico. Normalmente se lleva a cabo cargando una muestra que contiene las moléculas de interés en un pocillo en una matriz porosa a la que se aplica un voltaje. Las moléculas, diferentes en tamaño, forma y carga, se mueven a través de la matriz a diferentes velocidades. Al final de la separación, y tras la tinción apropiada del gel, dichas moléculas, en nuestro caso proteínas, se observan como diferentes bandas dentro del gel² (Figura7).

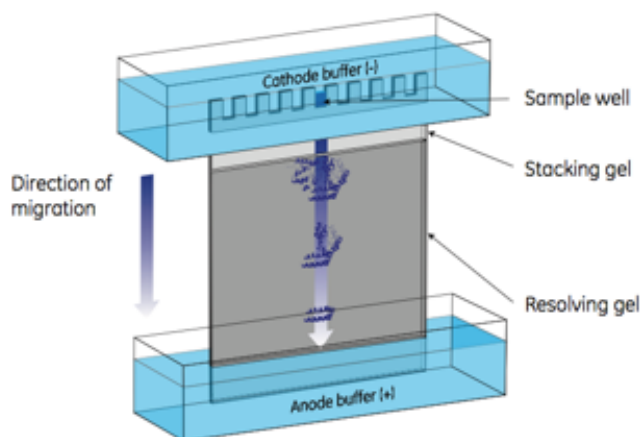


Figura 7. Sistema de electroforesis vertical. En la imagen se muestra la dirección de la migración de proteínas desde el cátodo hasta el ánodo. Imagen obtenida del manual Western blotting: Principles and methods. GE Healthcare, 2014².

Cuando se usa un sistema de electroforesis discontinuo y un gel de empaquetamiento, las muestras se concentran al inicio de la electroforesis. Para que esto se produzca, ambos geles tienen que ser diferentes (ver sección anterior). El pH inferior del gel de empaquetamiento resulta en una aceleración de las proteínas, es decir, se desplazan más rápidamente en el gel. Esto se debe a que las proteínas son las únicas moléculas cargadas en el pH del gel de empaquetamiento. Una vez que entran en el gel de separación, el pH cambia (de 6,8 a 8,8), y a este pH, ciertos aminoácidos como la glicina, que no estaban cargados al inicio de la

electroforesis, ahora sí que lo están. Como resultado, el campo eléctrico se rompe y durante la electroforesis en el gel de separación, las proteínas se separan en función de su movilidad individual⁵.

Para la preparación del tampón de electroforesis se siguió igualmente el método de Laemmli⁴ (preparado según se describe en la tabla 7 del Anexo 1).

Para preparar un litro de tampón de electroforesis a una concentración de 1X (que es la que se necesitará durante la electroforesis), hay que diluir 100 mL de la solución concentrada en 900 mL de agua ultrapura (Milli-Q).

Una vez preparado el tampón, se cargaron tanto las muestras ya preparadas en los pocillos del gel de empaquetamiento, como la escalera, que servirá como referencia del peso de las distintas proteínas (de los laboratorios Bio-Rad). A continuación se añadió el tampón de electroforesis, y tapada la cubeta, se comenzó la electroforesis con una intensidad de 100 V durante aproximadamente 1 hora y 15 minutos (siempre comprobando que el frente no se escapase del gel) (Figuras 8 y 9).

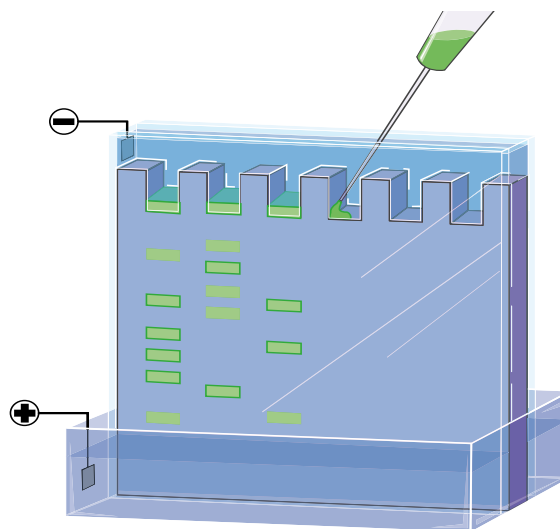


Figura 8. Representación electroforesis.



Figura 9. Frente avanzando durante la electroforesis.

Transferencia a membrana de PVDF

La técnica para la inmovilización y detección de proteínas en un soporte sólido después de una separación en gel por electroforesis se originó en los laboratorios de George Stark en la Universidad de Stanford⁶. El término “Western Blot” se aplicó específicamente a la transferencia de proteínas y su detección mediante anticuerpos (Ab)⁷ y presumiblemente fue acuñado para indicar su relación con una técnica similar a la usada para la detección de ADN, la cual se llamó Southern blot que era el nombre de su inventor.

Tras la separación de las proteínas en el sistema SDS-PAGE, el siguiente paso es transferir las mismas desde el gel a un soporte sólido, es decir, una membrana, generalmente fabricada con una sustancia química inerte como la nitrocelulosa o el PVDF (del inglés, polyvinylidene difluoride), que fue la que usamos en el caso que nos ocupa².

La electrotransferencia es casi exclusivamente el único método de transferencia que se utiliza hoy en día, debido a su velocidad, uniformidad y eficiencia. Se basa en los mismos principios de la migración de proteínas durante la separación en un sistema PAGE. El gel, la membrana y los electrodos se montan en una celda, de modo que las proteínas se mueven del gel a la membrana, donde se capturan en un patrón que refleja perfectamente sus posiciones de migración en el gel de origen⁸ (Figura 10).

En nuestro caso realizamos una transferencia húmeda, en la que tanto el gel como la membrana permanecen inmersos continuamente en el tampón de

transferencia. Este tipo de transferencia generalmente requiere refrigeración y una recirculación del tampón mediante un agitador magnético, debido a que se genera bastante calor, poniendo en peligro la integridad de las proteínas.

El tampón de transferencia debe actuar como un medio conductor de electricidad en el cual las proteínas sean solubles y no debe interferir con la unión de las proteínas a la membrana².

Para comenzar a realizar la transferencia, lo primero que hubo que hacer fue cortar la membrana de PVDF a un tamaño de 8.5 x 6.5 cm., y también se cortó una esquina de la membrana para mantener la orientación. La esquina cortada se corresponderá con la parte superior (proteínas grandes) de la escalera.

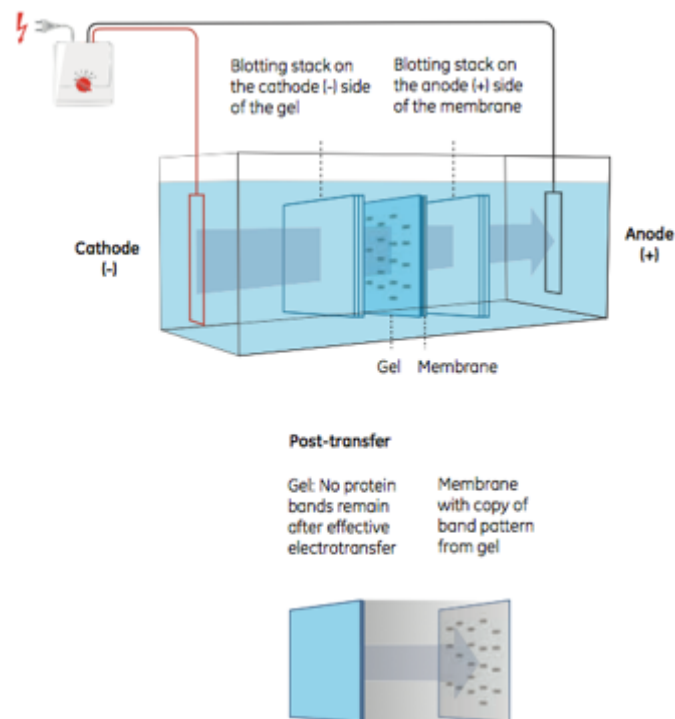


Figura 10. Esquema representativo de la transferencia de proteínas. Imagen obtenida del manual Western blotting: Principles and methods. GE Healthcare, 2014².

A continuación se cortaron 4 rectángulos de papel Whatman al tamaño adecuado para nuestro sistema de transferencia (en nuestro caso 10.2 x 7.6).

Se sumergió la membrana en metanol al 100% durante 45 segundos para activarla, y posteriormente se aclaró en agua durante 2 minutos.

Un paso importante en la transferencia es poner en equilibrio en el tampón de transferencia a todos los componentes, y para ello se sumergieron el papel Whatman, las esponjas, la membrana (tras pasar por el metanol y el agua) y el gel (se habrá cortado previamente la parte del gel de empaquetamiento, dejando sólo el gel de separación) en una bandeja con tampón de transferencia durante 5 minutos (Figura 11).



Figura 11. Componentes de la transferencia equilibrándose.

Para que las proteínas transfieran desde el gel a la membrana (donde el gel es el polo negativo y la membrana es el positivo), la disposición de los elementos en la celda es importante. Así, sobre la parte blanca de la “celda” de transferencia se procedió a disponer, una de las esponjas, dos papeles Whatman, la membrana y sobre ésta el gel. A continuación, se dispusieron los dos papeles Whatman restantes sobre el gel, la esponja y se cerró la “celda” de transferencia.

Una vez montados los paneles en el sistema de transferencia, se añadió el tampón, se introdujo un bloque de hielo y un imán dentro de la cubeta, y se situó la cubeta sobre un agitador.

La transferencia se realizó a 0,150 A durante 2 horas.

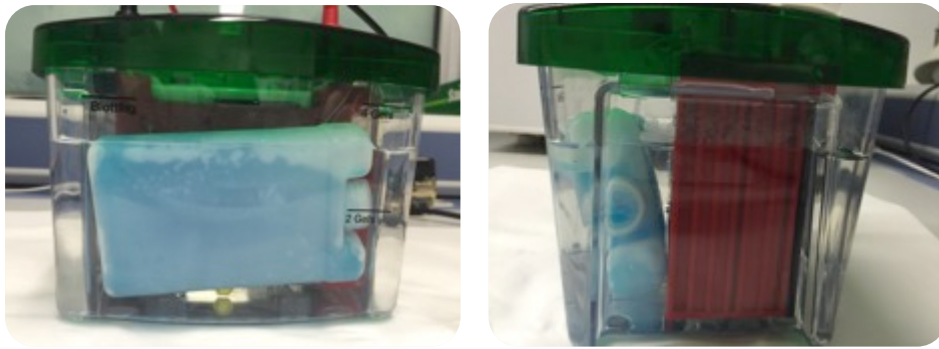


Figura 12. Sistema de transferencia.

El tampón de transferencia utilizado en nuestro caso es similar al de electroforesis, aunque sin adicionar SDS, ya que el SDS actúa de forma perjudicial en la unión de las proteínas a la membrana. En su lugar se utiliza el metanol, que es necesario para conseguir una unión eficiente de las proteínas a la membrana, ya que elimina el exceso de SDS de las proteínas. En la tabla 8 del anexo I se especifican los componentes utilizados para preparar el tampón de transferencia a una concentración de 10X y de 1X.

Después de la electrotransferencia, es necesario confirmar que todas las proteínas del gel han sido transferidas a la membrana. Para ello, se tiñe la misma con una tinción específica para proteínas. Una de las tinciones más usadas es mediante el colorante Ponceau S, que ofrece una tinción rápida y reversible de la membrana. La gran ventaja de este colorante es que se elimina con facilidad con agua y no interfiere con la detección inmunológica posterior.

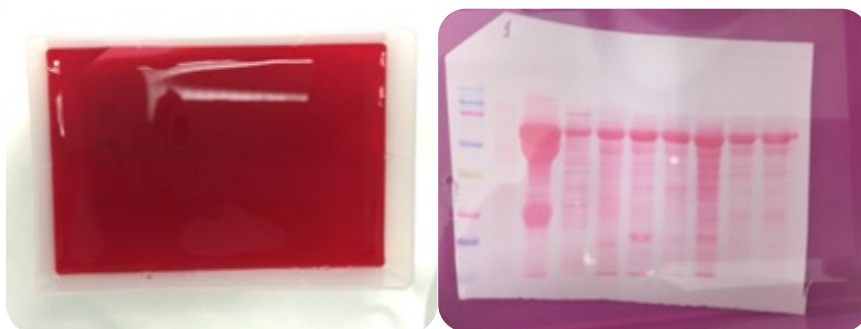


Figura 13. Tinción con el reactivo Ponceau S.

Incubación con anticuerpos

Una vez separadas las proteínas de la muestra y transferidas a una membrana, para localizar y detectar la proteína de interés se utilizó un Ab específico contra la ART.

En el WB, para identificar proteínas que se encuentran en bajas concentraciones, normalmente se utiliza un anticuerpo primario no marcado dirigido contra la proteína diana y un anticuerpo secundario marcado especie-específico dirigido contra la región constante del anticuerpo primario. El anticuerpo secundario, además de unirse al anticuerpo primario, sirve de mecanismo de amplificación de la señal emitida².

Con este proceso de inmunodetección altamente específico, es posible revelar la presencia de una cantidad muy baja de una proteína específica en una muestra compleja.

Previo a la incubación con el Ab primario, es necesario hacer un bloqueo de la membrana, ya que las uniones inespecíficas del Ab a la membrana son perjudiciales para la sensibilidad y especificidad de la medición. Para que esto no se produzca, es necesario “bloquear” los espacios no ocupados por las proteínas. En nuestro caso, como agente bloqueante se usó leche semidesnatada en polvo, ya que la leche contiene muchas proteínas con capacidad de inhibir tanto las interacciones no específicas entre la proteínas y la membrana como las interacciones entre las mismas proteínas. Estas proteínas, son agentes bloqueantes permanentes, ya que forman una unión física con la membrana y tienen una mayor afinidad por los espacios libres de la membrana que el Ab en cuestión.

Para la preparación de la solución de bloqueo, se utilizó una dilución al 5% de leche desnatada en PBS-Tween 0,02%, y se mantuvo la membrana durante una hora en agitación, en dicha solución.

Una vez realizado el bloqueo, se procedió a incubar la membrana con nuestro Ab primario, en este caso se usó un anticuerpo específico comercial, desarrollado en cabra (ab109812), a una dilución 1:2500 en la solución de bloqueo y se dejó incubando toda la noche en cámara húmeda, en agitación y en refrigeración a 4°C.

Tras la incubación con el Ab primario, fue necesario lavar la membrana para eliminar el exceso de Ab, que podría darnos un exceso de fondo y consecuentemente una baja relación señal-ruido. Para ello se utilizó una solución con una concentración baja de detergente, en este caso, una solución al 0,02% de Tween-20 en PBS, y se realizaron 3 lavados de 20 minutos.

La elección del Ab secundario depende sobre todo de la especie en la que fue producida el Ab primario. En nuestro caso se usó un Ab anti-cabra desarrollado en burro (Donkey anti-Goat HRP, ab6667) a una dilución de 1:4000 en solución de bloqueo, y se incubó a temperatura ambiente durante 75 minutos.

Posteriormente se realizaron 3 nuevos lavados de 20 minutos en la solución 0,02% de Tween-20 en PBS, para retirar el exceso de Ab secundario. Por último se realizó un lavado de 5 minutos en PBS sin Tween-20 para evitar la interacción entre el detergente y el sistema de detección, según instrucciones del fabricante.

Detección

Existe una gran variedad de sistemas de detección para el WB, pero los más utilizados actualmente son aquellos basados en la detección enzimática, la quimioluminiscencia, que consiste en la adición de un reactivo que emite luz cuando reacciona con una enzima conjugada con un Ab secundario.

La quimioluminiscencia, se basa en la conjugación del Ab, en nuestro caso el secundario, a la peroxidasa del rábano (HRP, del inglés, horseradish peroxidase), la cual cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido, resultando en la emisión de luz. Este proceso es conocido como ECL (del inglés, Enhanced Chemiluminescence). La intensidad de la señal es el resultado del número de moléculas de enzima que reaccionan y es por tanto proporcional a la cantidad de Ab, que está relacionada a su vez con la cantidad de proteína procedente de la transferencia² (Figura 14).

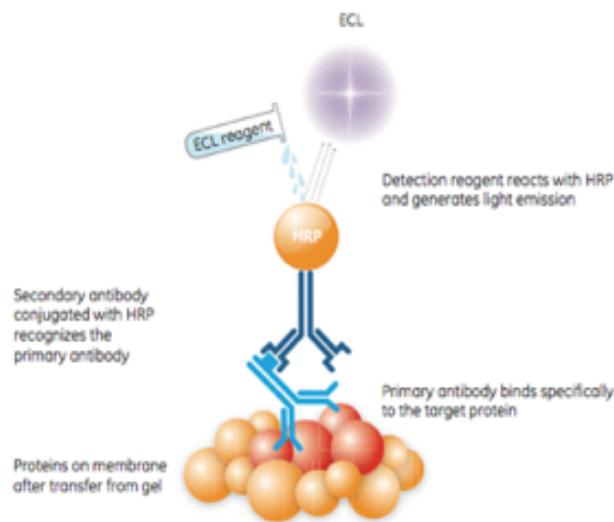


Figura 14. Principio de detección por ECL en WB. Imagen obtenida del manual Western blotting: Principles and methods. GE Healthcare, 2014².

En nuestro caso utilizamos el kit de detección Pierce ECL plus (Thermo Scientific, Waltham, MA), siguiendo instrucciones del fabricante.

Análisis

Para la adquisición de la imagen, se utilizó el sistema convencional de detección mediante un film de rayos X. Éste sistema proporciona una alta sensibilidad y flexibilidad en los tiempos de exposición, que muchas veces es necesario para la detección de señales muy débiles. Sin embargo, una de las principales desventajas de este sistema es la limitación a la hora de realizar un análisis cuantitativo, ya que las señales con alta intensidad tienden a saturar a aquellas señales más débiles cuando se detectan en la misma placa.

En nuestro caso, este sistema fue suficiente, ya que nuestro último objetivo era analizar la presencia o ausencia de la proteína de interés y no su cuantificación.



Figura 15. Bandas de ART detectadas por WB en varias muestras.

TINCIÓN DE GELES CON AZUL DE COOMASSIE

Una vez completada la electroforesis de proteínas en un gel, existen varias opciones, una de ellas es transferir dichas proteínas a una membrana de PVDF para realizar un WB como hemos visto en la sección anterior. Otra posibilidad es realizar la tinción del gel para poder observar el patrón de bandas de proteínas de una muestra.

Existen proteínas coloreadas que se pueden observar directamente en un gel sin necesidad de tinción (mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C), sin embargo, para la visualización de la mayoría de proteínas se requiere el uso de algún tipo de colorante. La sensibilidad (500 a 50 ng de proteína por banda), la simplicidad (dos pasos) y la relativa rapidez (2-8 horas) de la tinción con azul de Coomassie, han hecho que esta técnica sea ampliamente utilizada en todos los laboratorios a la hora de detectar y cuantificar proteínas separadas por PAGE⁹. Ésta tinción requiere un medio ácido para que se produzca una unión electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. Las proteínas y el colorante forman complejos mediados por fuerzas de Van Der Waals, unión que es totalmente reversible en condiciones apropiadas.

Para la tinción de los diversos geles generados a lo largo del desarrollo de este prácticum y del TFM correspondiente, se usaron dos reactivos de Coomassie diferentes cuyos protocolos se detallan a continuación.

Coomassie Brilliant Blue R-250

La tinción con este colorante, en nuestro caso suministrado por los laboratorios Bio-Rad, es la que clásicamente se utiliza en la tinción de geles de proteínas separadas por PAGE.

Lo primero que hubo que hacer, una vez concluida la electroforesis, fue lavar el gel al menos 3 veces durante 5 minutos cada vez en 200 mL de agua ultrapura, con el fin de eliminar el SDS, ya que los restos de este detergente interfieren de forma negativa con la tinción.

Una vez concluidos los lavados, se añadió el reactivo en cantidad suficiente para la completa cobertura del gel y se dejó una hora tiñendo en agitación a temperatura ambiente.

Una vez realizada la tinción, se eliminó la tinción inespecífica del gel con la solución comercial Coomassie Brilliant Blue R-250 destaining solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante al menos 2 horas, cambiando la solución cada 30 minutos.

Transcurridas las dos horas, se procedió a analizar las bandas de proteínas procedentes de cada muestra (Figura 16).

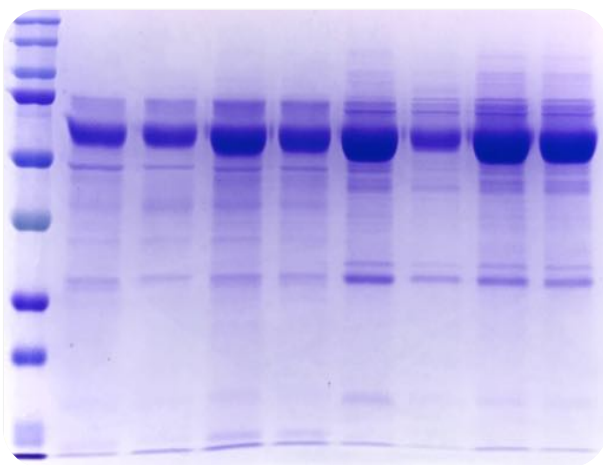


Figura 16. Patrón de bandas de distintas muestras de FU tras tinción con Coomassie clásico.

QC Colloidal Coomassie Stain

Es otra solución comercial, también suministrada por los laboratorios Bio-Rad, pero que está formulada con el colorante Coomassie G-250. Éste colorante proporciona una máxima sensibilidad para proteínas que se encuentran en bajas concentraciones. Además de una mayor sensibilidad, ésta solución tiene la ventaja de que no contiene ni metanol ni ácido acético, con lo que resulta menos contaminante.

El protocolo a seguir, según instrucciones del fabricante es el siguiente:

- I. Lavar gel 3 veces durante 5 minutos en agua ultrapura (Milli-Q) para eliminar el SDS.
- II. Fijar el gel en una solución con un 40% de etanol puro y un 10% ácido acético durante 15 minutos en agitación.
- III. Enjuagar el gel con 100 mL de H₂O durante al menos 1 minuto.
- IV. Añadir el colorante y dejar en agitación de 10 a 20 horas para obtener una máxima sensibilidad o 1 hora para seguir el protocolo rápido.
- V. Desteñir el gel en 100 mL de H₂O ultrapura, cambiando el agua al menos 3 veces en agitación, en función del protocolo usado:
 - Protocolo de máxima sensibilidad → 3 horas.
 - Protocolo rápido → 1 hora.

Al finalizar el protocolo, se observan los diferentes patrones de bandas de las proteínas de las muestras analizadas (Figura 17).

Los geles teñidos mediante este protocolo se pueden almacenar durante unos 3 días sin una significativa reducción en la sensibilidad.

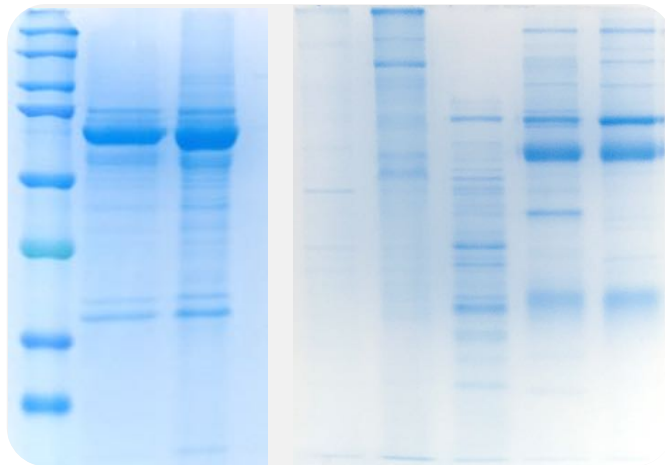


Figura 17. Muestras de FU teñidas con la solución QC Colloidal Coomassie Stain tras PAGE.

CROMATOGRAFÍA FPLC

La cromatografía es un proceso físico de separación para la caracterización de mezclas complejas. Dicha mezcla, ya se encuentre en un líquido o en un gas, es separada en sus distintos componentes como resultado de la distribución diferencial de los solutos cuando fluyen sobre o alrededor de una fase líquida o sólida estacionaria.

En nuestro caso, el tipo de cromatografía usada fue la cromatografía líquida, y más concretamente se usó un sistema automatizado denominado FPLC (del inglés, Fast Protein Liquid Chromatography), que proporciona una separación de alta resolución de biopolímeros compatible, con el mantenimiento de la bioactividad de las moléculas presentes en las mezclas analizadas. Este sistema, desarrollado por los laboratorios Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia (actualmente GE Healthcare), es un tipo de cromatografía líquida completamente automatizada (ÅKTA-FPLC) diseñado exclusivamente para la purificación de proteínas¹⁰ (Figura 18). El FPLC permite la aplicación de varias técnicas de separación de biomoléculas en función de las diferencias en sus propiedades específicas (ver Tabla 3).

Durante los distintos intentos de aislamiento de nuestra proteína de interés, se usaron dos tipos de cromatografías FPLC:

- Cromatografía de exclusión molecular.
- Cromatografía de intercambio iónico.

Además se usó otro tipo de cromatografía líquida en columna, la cromatografía de afinidad, pero ésta se realizó de manera manual.

Tabla 3. Diferentes tipos de cromatografías.

PROPIEDAD	TÉCNICA RECOMENDADA
Tamaño	Cromatografía de exclusión molecular (SEC)
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)
Carga	Cromatografía de intercambio iónico (IEX)
Bioreconocimiento	Cromatografía de afinidad (AC)

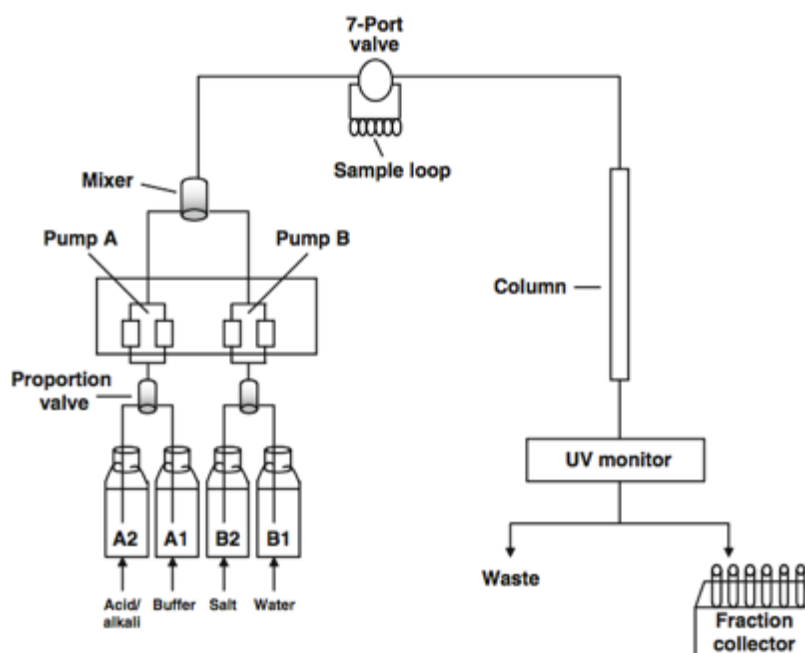


Figura 18. Diseño esquemático de un sistema ÄKTA-FPLC. Imagen obtenida de Madadlou et al, 2011¹⁰.

Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de exclusión molecular SEC (del inglés, Size Exclusion Chromatography) separa moléculas en función a sus diferencias de tamaño conforme van pasando a través de un medio especial para SEC empaquetado en una columna¹¹. A diferencia de otros tipos de cromatografía, no existe ninguna unión de las proteínas a ningún medio, por lo que la composición del tampón no afecta a la resolución de la técnica, aunque conviene utilizar un tampón con suficiente fuerza iónica para evitar uniones inespecíficas a la matriz de la columna.

Para llevar a cabo la separación, se empaqueta el medio SEC en la columna de manera que forma un lecho de gel. Los medios para este tipo de cromatografías consisten en una matriz porosa de partículas esféricas con estabilidad química y física y con inercia (falta de reactividad y propiedades adsortivas). Antes de realizar la cromatografía, es necesario equilibrar la columna con el mismo tampón en el que se encuentra la muestra, para rellenar los poros de la matriz y el espacio entre las partículas. De esta manera, el líquido dentro de los poros, o fase estacionaria, se encuentra en equilibrio con el líquido fuera de las partículas, o de

la fase móvil. Debido a que la elución de la muestra se produce de forma isocrática, no hay necesidad de usar diferentes tampones durante la separación, aunque es recomendable realizar un lavado con el tampón de muestra para eliminar los restos de moléculas que podrían haber quedado retenidas en la matriz y de este modo preparar la columna para una nueva ejecución. En la figura 19 podemos observar todo el proceso de separación por SEC.

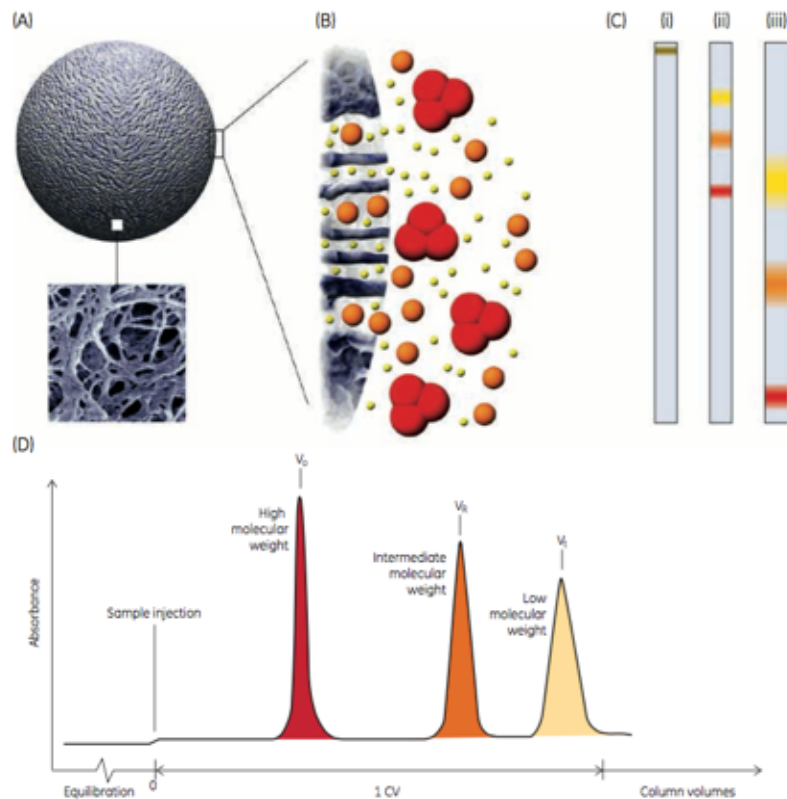


Figura 19. Proceso de separación por SEC. (A) Imagen esquemática de la matriz. (B) Dibujo esquemático de las moléculas pasando a través de los poros. (C) Descripción gráfica de la separación: (i) introducción de la muestra; (ii) las moléculas pequeñas tardan más en pasar que las grandes (iii) las moléculas más grandes pasan antes por la columna. (D) Esquema de un cromatograma. Imagen obtenida del manual *Size Exclusion Chromatography: Principles and methods*. GE Healthcare, 2014¹¹.

Los resultados obtenidos tras la SEC se expresan normalmente como perfiles de elución o cromatogramas que muestran la variación en la concentración (normalmente en términos de absorbancia de UV, que para proteínas normalmente se realizan a 280 nm) de los componentes de la muestra en función de su peso molecular.

En la figura 20 podemos observar un cromatograma teórico de un fraccionamiento de alta resolución. Las moléculas que no entran en la matriz por su gran tamaño, se eluyen juntas en el volumen vacío (V_0), ya que pasan directamente a través de la columna a la misma velocidad a la que fluye el tampón. Las moléculas con acceso parcial a los poros de la matriz, se van eluyendo conforme disminuyen de tamaño, mientras que las pequeñas moléculas, tales como las sales, entran completamente en la columna, pero no se separan las unas de las otras. Éstas últimas, generalmente se eluyen justo antes de un volumen total de la columna (V_t) de tampón¹¹. Los rangos de separación van a depender del tamaño de partícula y del tipo de matriz de la columna.

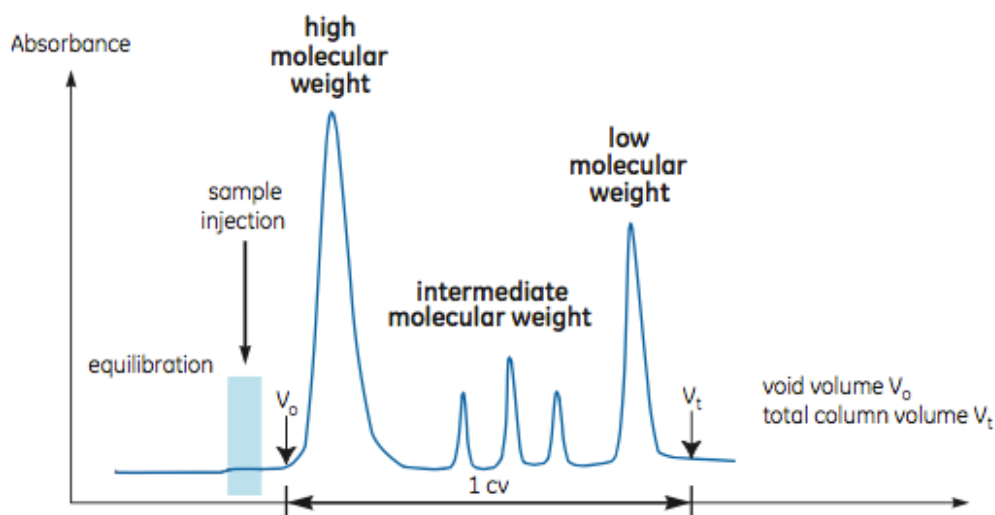


Figura 20. Cromatograma teórico de separación por SEC. Imagen obtenida del manual Size Exclusion Chromatography: Principles and methods. GE Healthcare, 2014¹¹.

En nuestro caso, para procesar las muestras se usó la columna comercial HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, Uppsala, Suecia)(Figura 21), formada por un dextrano de 34 μ de diámetro y cuyos rangos de separación óptimos de proteínas van desde 600 kDa a 10 kDa. Previamente, se equilibró con 1.5 volúmenes de columna de PBS 10 mM a pH 7.4. Se cargaron volúmenes de muestra inferiores a 2 mL cada vez, se programó un flujo lento de 0,5-1 mL/min y se recogieron fracciones de 5 mL.

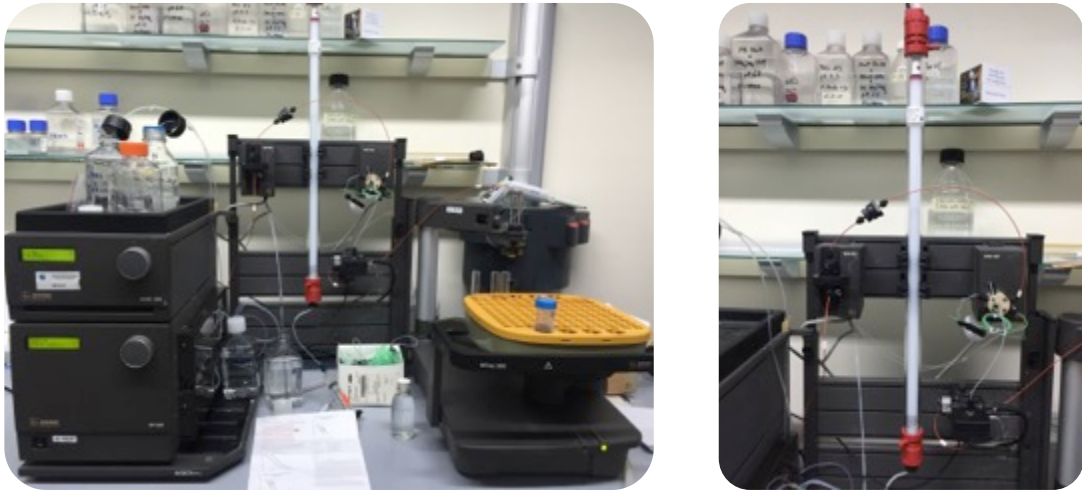


Figura 21. Sistema ÄKTA-FPLC de los SCTs de Oviedo con la columna Superdex 200.

Tras pasar la muestra por el sistema, se obtuvo el cromatograma de la figura 22. Debido a que nuestra muestra era un fluido biológico de gran complejidad, y este tipo de cromatografías están recomendadas para mezclas muy sencillas de proteínas, el cromatograma no es tan claro como el teórico ya que las proteínas en estas condiciones muestran patrones de movilidad diferentes a cuando se encuentran en preparaciones puras o semipuras.

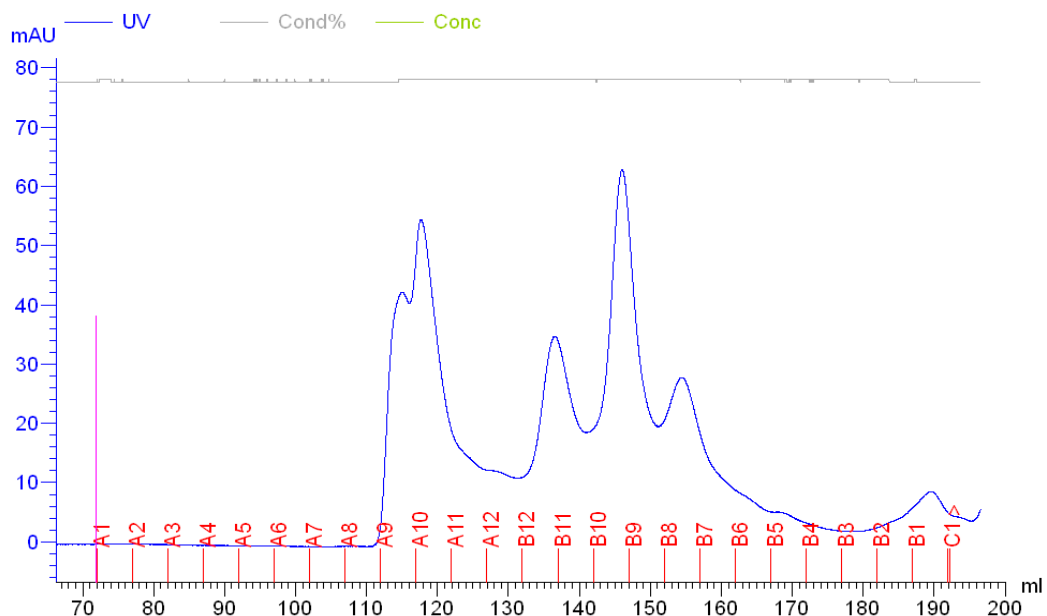


Figura 22. Cromatograma tras SEC del FU.

Cromatografía de intercambio iónico

La técnica de separación de biomoléculas por intercambio iónico (IEX, del inglés Ion Exchange Chromatography) se introdujo por primera vez en los años 60 y sigue siendo una de las principales técnicas de separación y purificación. La cromatografía IEX es una de las técnicas más usadas para la purificación de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas con carga. Con este procedimiento se pueden separar especies moleculares que sólo tienen pequeñas diferencias en sus propiedades de carga, llegando a separar incluso dos proteínas que sólo difieren en un aminoácido cargado¹².

Este tipo de cromatografía se fundamenta en el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, que dependiendo del pH del medio en que se encuentren, pueden tener carga neta positiva, negativa o cero. Para toda proteína existe un pH específico en el cual su carga neta es cero, es el valor de este pH a lo que se denomina el pI. Por tanto, las proteínas van a estar positivamente cargadas en soluciones con valores de pH inferiores a su pI, y a la inversa, van a estar negativamente cargadas cuando el pH es superior a éste³.

Pasos a realizar en un fraccionamiento por IEX

La matriz en la que se realizará la IEX consiste en un medio en el que las partículas esféricas se han sustituido por grupos iónicos que están positivamente o negativamente cargados. La matriz es, por lo general, porosa, para proporcionar una gran área de superficie interna. Este medio viene empaquetado en una columna, y antes de realizar la cromatografía, es necesario equilibrar la columna con el mismo tampón en el que se encuentra la muestra, para rellenar los poros de la matriz y el espacio entre las partículas.

Para realizar toda IEX hay que seguir los siguientes pasos:

Equilibrado

Lo primero que hay que realizar es un equilibrado de la fase estacionaria para lograr las condiciones adecuadas a nuestra IEX.

Una vez logrado el equilibrio, todos los grupos de la fase estacionaria están cargados con iones de carga contraria intercambiables, tales como el cloruro o el sodio. El pH y la fuerza iónica del tampón de equilibrio se tienen que seleccionar en base al pI de la proteína de interés, de manera que cuando carguemos la muestra, ésta quede pegada a la columna con el menor número de impurezas posible¹².

Carga de la muestra y lavado

A continuación, se procederá a cargar la muestra en el sistema. Durante este paso, la proteína de interés debe quedarse unida a la matriz de la columna, pasando a través de ella el resto de proteínas sin unirse. Es importante que el tampón de la muestra se encuentre al mismo pH y tenga la misma fuerza iónica que el de equilibrio¹².

Elución

El siguiente paso a seguir es la elución de la proteína que se quedó unida a la columna, para ello se deben alterar las condiciones del tampón. Esto se puede llevar a cabo de dos formas diferentes, bien aumentando la fuerza iónica (aumentando la concentración de sales), o bien cambiando el pH.

El método de elución de proteínas más usado es mediante la utilización de tampones en los que se va aumentando la fuerza iónica (generalmente con NaCl), y como a mayor carga neta de la proteína, mayor concentración de sales se va a necesitar, lo que se realiza normalmente es un gradiente, de manera que la concentración de sal va aumentando progresivamente. Este gradiente puede ser lineal o por pasos, como veremos a continuación.

Los volúmenes de tampón usados durante todos los pasos se expresan por lo general en volúmenes de columna (CV, del inglés, column volumes), por ejemplo, 5 CV equivaldrían a 5 mL en una columna de 1 mL¹².

Elución por gradientes (Figura 23)

Normalmente se utiliza cuando se empieza con una muestra compleja y desconocida, de esta manera se obtiene una gran resolución en la separación.

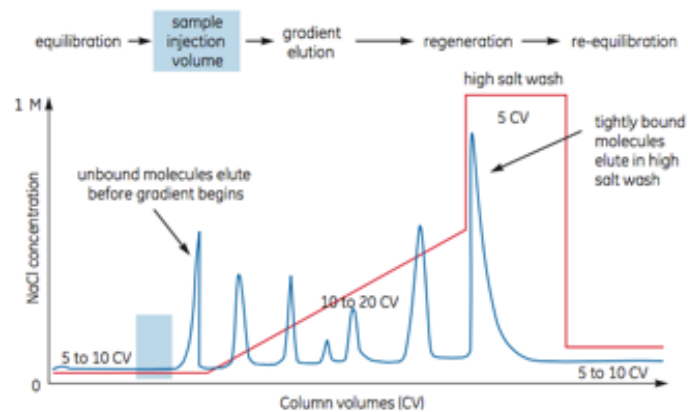


Figura 23. Cromatograma teórico de separación por gradientes. Imagen obtenida del manual Ion Exchange Chromatography: Principles and methods. GE Healthcare, 2016¹²

Elución por pasos (Figura 24)

Este tipo de elución se utiliza cuando la técnica se ha optimizado mediante el paso anterior.

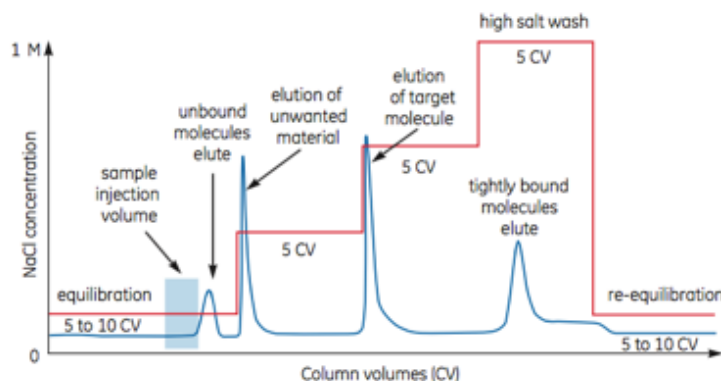


Figura 24. Cromatograma teórico de IEX usando elución por pasos. Imagen obtenida del manual Ion Exchange Chromatography: Principles and methods. GE Healthcare, 2016¹².

Regeneración

Finalmente, se debe realizar un lavado con un tampón con una carga iónica muy alta. Este paso es necesario para eliminar cualquier molécula que permanezca unida, y así poder utilizar nuevamente la columna en otra IEX.

En la figura 25 podemos ver una representación de los pasos descritos anteriormente, en los que sería un esquema básico de cromatografía IEX. Posteriormente, para cada muestra habrá que ir variando las distintas condiciones.

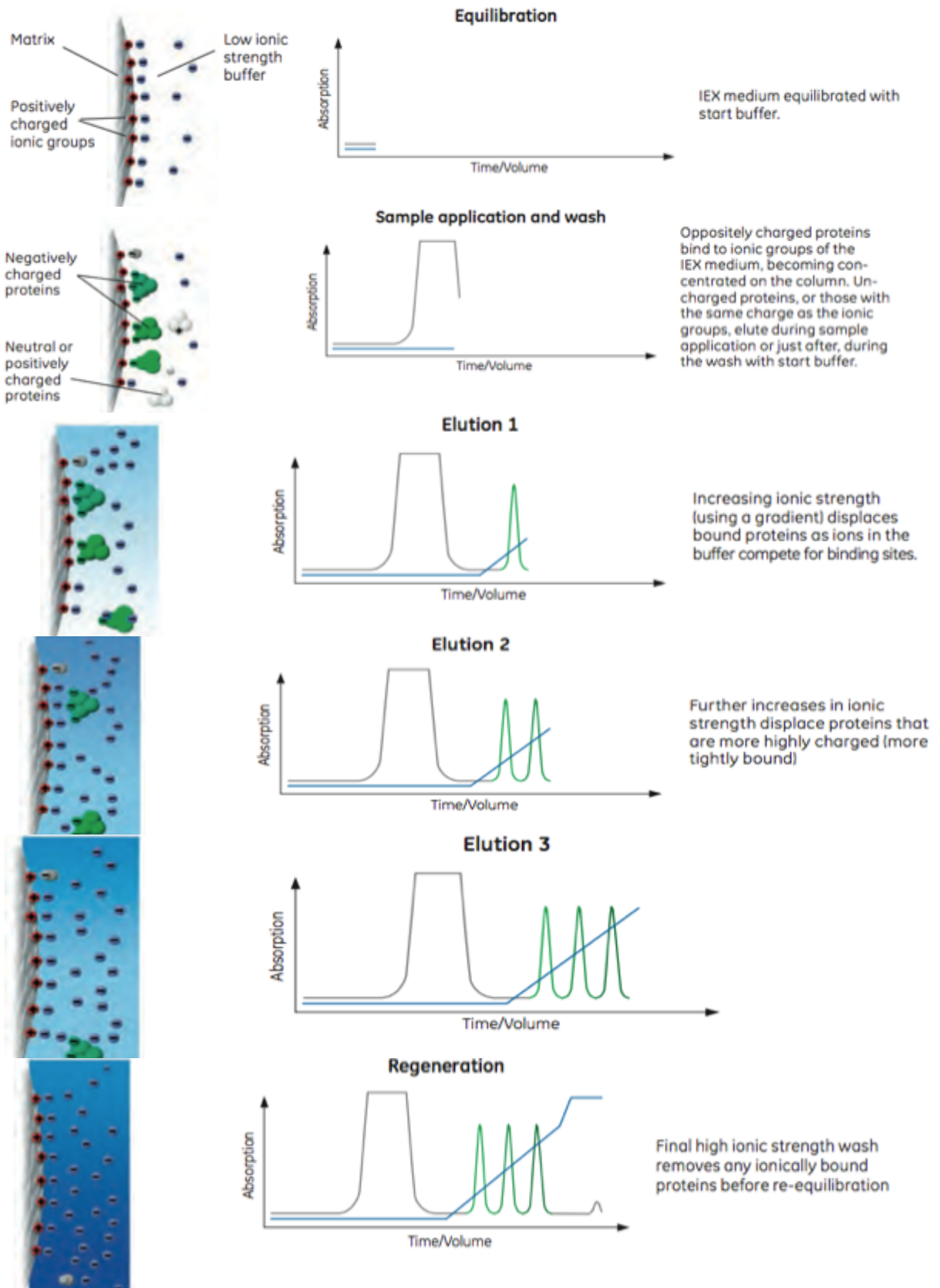


Figura 25. Principios de la cromatografía de intercambio aniónico. Imagen obtenida del manual Ion Exchange Chromatography: Principles and methods. GE Healthcare, 2016¹².

Elección del tampón

El pH del tampón y la fuerza iónica deben ser compatibles con la estabilidad de la proteína de interés y con su actividad. Debe ser un tampón que permita la unión de la proteína de interés a la columna, pero que tenga un pH relativamente próximo al punto de elución, ya que si el pH es muy alto o muy bajo, la elución se hace difícil y se van a necesitar grandes cantidades de sal que van a interferir con la viabilidad de la proteína¹².

Intercambio catiónico o aniónico

Para moléculas del tipo ácido nucleicos, que sólo tienen grupos con carga negativa, el intercambio aniónico es la elección más obvia. Sin embargo, como la carga neta de las proteínas varía en función del pH, la elección del tipo de cromatografía va a depender de la proteína en cuestión, del grado de resolución deseado y el tipo de tampón en el cual la muestra vea comprometida su estabilidad.

Debido a que nuestra proteína de interés poseía un pI cercano a 11, el primer sistema elegido para llevar a cabo el IEX fue la columna de intercambio catiónico. La ART, en una solución con un rango de pH cercano al neutro (7-8), en el que no va a perder su bioactividad, va a tener carga positiva, por lo tanto, quedará unida a la columna, la cual está cargada de forma negativa. Aunque en algún momento, a lo largo del desarrollo del trabajo, también se intentó la separación en el sentido inverso, es decir, se utilizó un intercambio aniónico, para que las únicas moléculas que no se uniesen a la columna fueran nuestras proteínas.

Cromatografía de Afinidad

La cromatografía de afinidad, separa proteínas basándose en la interacción reversible entre una proteína (o un grupo de ellas) y un ligando específico el cual está unido a una matriz de cromatografía. Esta técnica presenta una gran selectividad, y por tanto una resolución muy alta¹³.

Las interacciones biológicas entre el ligando y la molécula diana puede ser el resultado de interacciones electrostáticas o hidrofobias, uniones de van der Waals

y/o uniones de hidrógeno. Para eluir la molécula de interés de la columna de afinidad, la interacción se puede revertir bien específicamente, usando un ligando competitivo, o no específicamente, cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad.

El éxito para la purificación mediante afinidad, requiere de un ligando bioespecífico que puede ser unido covalentemente a la matriz de cromatografía¹³.

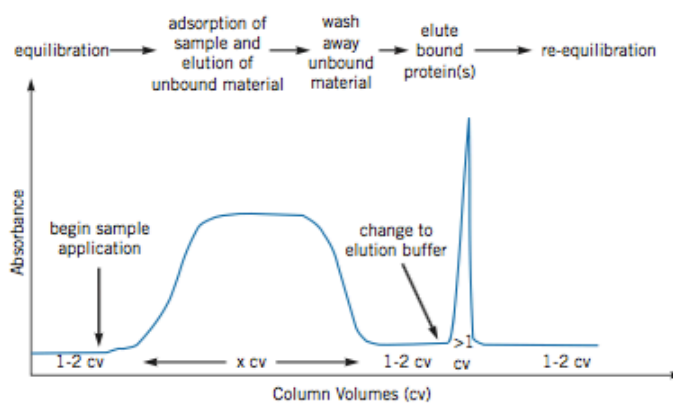
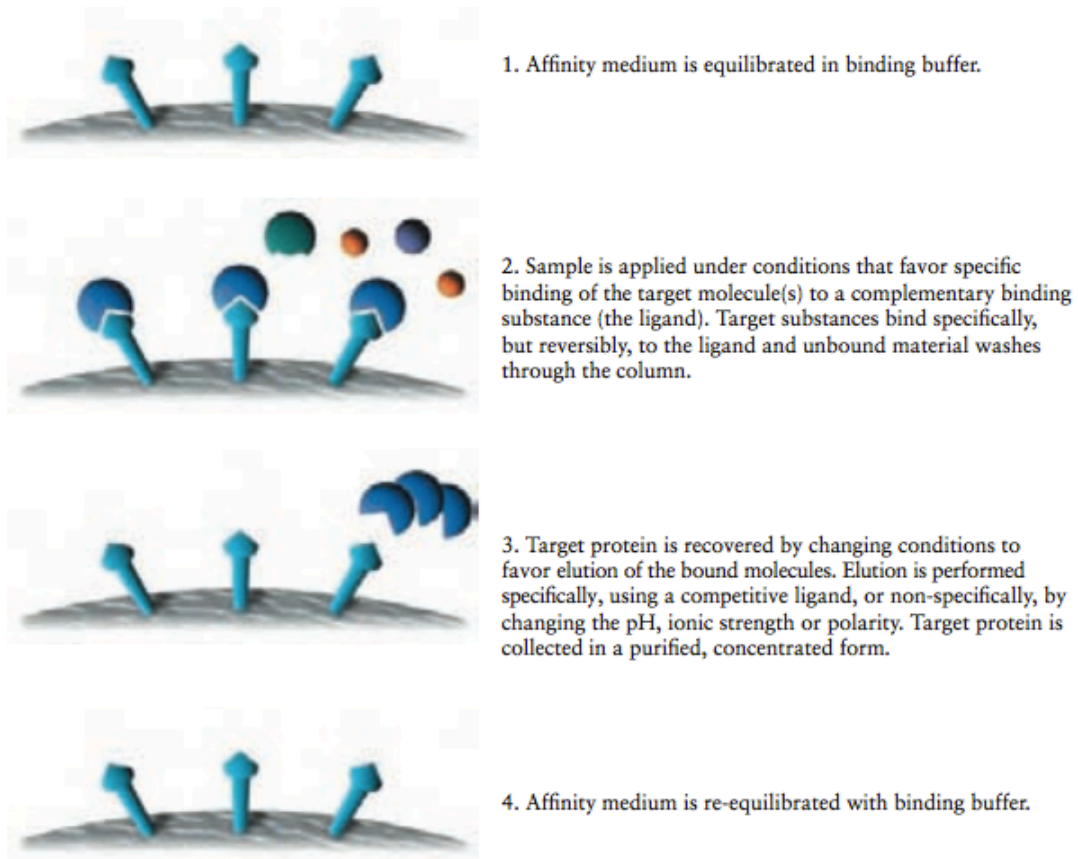


Figura 26. Representación cromatografía afinidad típica. Imagen obtenida del manual Affinity Chromatography: Principles and methods. GE Healthcare, 2007¹³.

En nuestro caso, se realizó una inmunocromatografía de afinidad, y para realizar la inmovilización del Ab, se utilizó una resina comercial (Glyoxal agarose beads, ABT, Madrid, España) que permite el enlace covalente a los grupos aminos de los ligando (anticuerpos y otras biomoléculas) a la proteína de interés. Los grupos aldehídos de la resina reaccionan con las aminos primarias de los Ab, teniendo como resultado, la inmovilización estable y reusable de dichas biomoléculas.



Figura 27. Columna de inmunoafinidad.

Aunque ésta técnica es muy específica y muy sensible, y podría parecer *a priori* la técnica de elección, tiene una gran limitación, y es la gran cantidad de ligando (en este caso Ab) que necesita. Tras la inmunización del conejo, la cantidad de Ab recuperada fue bastante escasa, de hecho, inferior a la necesaria para que funcionase la técnica.

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

Es aquella electroforesis que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación, las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además, en ciertos casos se mantienen las interacciones entre subunidades protéicas y entre proteínas. Al no añadir ni SDS ni β -ME ni calentar la muestra, no se altera la conformación ni la bioactividad de la molécula de interés. Cuando se realiza una electroforesis en condiciones nativas, la carga de cada proteína va a depender de la secuencia primaria de aminoácidos y del pH utilizado durante la electroforesis, que influirá en la movilidad de la proteína durante la electroforesis⁵.

En la electroforesis nativa, las proteínas deben tener la carga apropiada para moverse dentro del gel. Normalmente, la mayoría de las proteínas, a pH cercano al neutro, suelen tener carga negativa, con lo cual, al aplicarles una corriente eléctrica en los sistemas de electroforesis convencionales, tenderán a desplazarse hacia el polo positivo, entrando de esta forma en el gel.

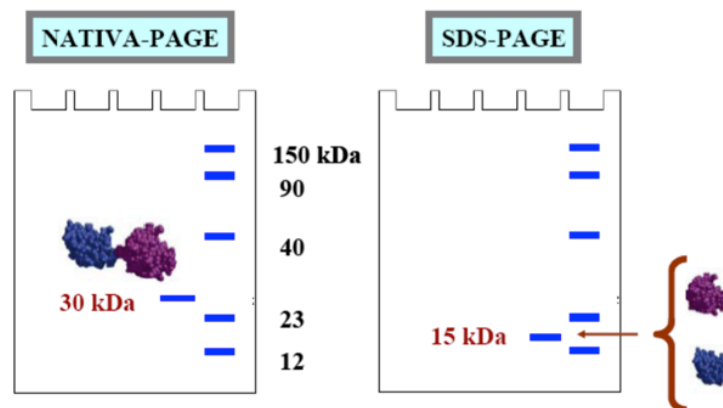


Figura 28. Representación gráfica de la disposición que adoptaría una proteína dimérica en una electroforesis nativa vs. una electroforesis convencional.

Sin embargo, si el pI de la proteína en cuestión, como es nuestro caso (pI ART = 11) es más alto que el pH del gel (7-8), al aplicar el campo eléctrico, la proteína, con carga positiva, se moverá hacia el cátodo, es decir, hacia el polo negativo, que en un sistema de electroforesis convencional, desplazará la proteína hacia fuera del gel.

Para invertir el campo eléctrico, se deben invertir los electrodos en la fuente de alimentación. En nuestro caso, hemos usado el sistema Mini-Protean tetracell® de Bio-Rad, convirtiendo el ánodo en cátodo y viceversa (Figura 29).

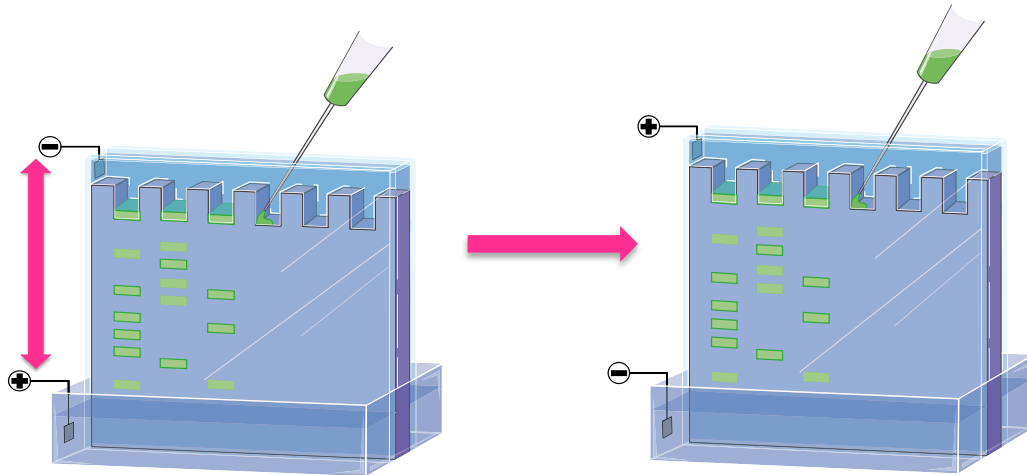


Figura 29. Inversión de electrodos del sistema de electroforesis.

Al invertir los electrodos y cambiar el sistema de tampones, se pudo observar que el campo eléctrico que se generaba tenía menos fuerza que el de una electroforesis convencional, por lo que hubo que aumentar el voltaje y aumentar el tiempo de la electroforesis. En este caso se utilizaron unas condiciones de 150 V durante 3 horas.

Tras la electroforesis, el patrón de bandas que se obtiene difiere bastante tanto de una electroforesis desnaturalizante como de una nativa en condiciones normales, como podemos ver en la figura 30.

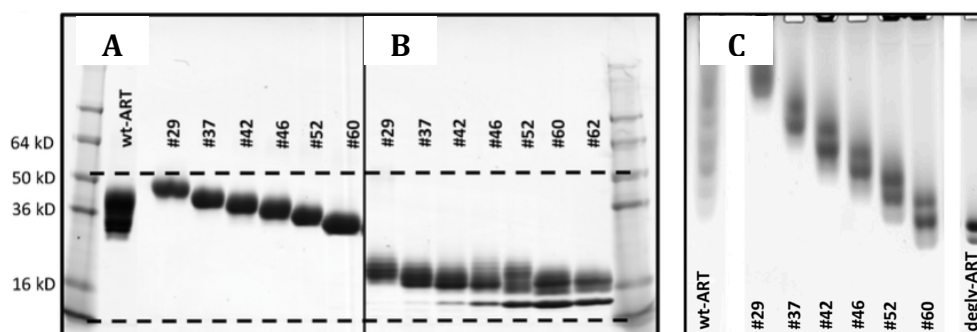


Figura 30. Patrón de bandas de diferentes formas de ART en (A) electroforesis no desnaturalizante, (B) desnaturalizante y (C) no desnaturalizante invertida. Imagen obtenida de Danwen et al., 2016¹⁴.

INMUNOCITOQUÍMICA DE EMBRIONES

Durante el periodo preimplantacional del desarrollo de mamíferos tienen lugar multitud de eventos a nivel molecular y celular. Para su estudio, se han desarrollado o adaptado diversas técnicas de análisis dado el limitado número de células del embrión en este periodo y la ausencia de transcripción génica hasta la activación del genoma embrionario¹⁵. En el caso del embrión bovino, durante la primera semana de desarrollo, se produce la activación del genoma embrionario (en estadio de 8-16 células) y el cigoto, da lugar a un blastocisto el día 7, que contiene por término medio unas 120. Por todo esto, la inmunocitoquímica (ICQ) ha sido una técnica ampliamente utilizada en la embriología del desarrollo para detectar antígenos, habitualmente proteínas, en células mediante el uso de anticuerpos específicos, y su posterior visualización mediante microscopía.

En el desarrollo de mis prácticas, la finalidad de emplear esta técnica ha sido estudiar el patrón de expresión y distribución del receptor de ART (GFR α 3) en blastocistos bovinos. De forma previa (datos no publicados), en el SERIDA se había demostrado que los blastocistos bovinos expresaban ART. Sin embargo, se desconocía si este FC tendría tan sólo un efecto paracrino sobre el endometrio o si podría tener un efecto autocrino sobre el propio embrión.

A continuación se detalla el protocolo desarrollado para establecer si la ART y su receptor colocalizaban en las mismas células. Este protocolo consiste en la realización de dos ICQ simples secuenciales, que previamente habían sido puestas a punto de manera independiente.

Los embriones se fijaron previamente con 4% de paraformaldehído en PBS-PVA ó PBS-PVP y se almacenaron a 4°C en PBS-PVA ó PBS-PVP hasta su procesamiento.

Se dividieron los embriones disponibles en dos grupos: (i) Grupo control negativo, que al final del protocolo habrán pasado por los mismos pasos que los embriones experimentales, excepto las incubaciones con anticuerpos primarios y (ii) grupo experimental.

Los embriones se lavaron 3 veces por 5 minutos en solución “Rinse Buffer”, compuesta por 0,1% Tween-20 diluido en PBS-PVA. Después, se procedió a la permeabilización de los mismos. Para ello se incubaron durante media hora en solución de permeabilización (0,5% Triton X-100 + 0,1% Tween-20 en PBS-PVA) a temperatura ambiente.

Para evitar las uniones inespecíficas, se incubaron todos los embriones en una solución comercial especialmente diseñada para ICQ fluorescentes, Image-iT FX Signal Enhancer durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó un segundo bloqueo con una solución de 5% de NGS (del inglés, normal goat serum) en PBS + 0.1% Tween 20, y se dejaron en esta solución durante 1 hora.

Mientras que el grupo experimental se incubó con el Ab primario anti-ART (Abbotec 250550), diluido 1:200 en solución de bloqueo, durante 24 horas y a 4°C, los controles negativos se mantuvieron en solución de bloqueo.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno tanto de los embriones experimentales como de los controles negativos (siempre por separado) en la solución de lavado (Rinse Buffer).

A continuación se incubaron los embriones de ambos grupos con el anticuerpo secundario anti-rabbit (Ab 150085), ya que el primario fue desarrollado en conejo, el cual estaba marcado con el fluorocromo Alexa 488 (cuya emisión de luz es verde). Se utilizó una dilución de este Ab de 1:400 en solución de bloqueo y se incubaron durante 75 minutos a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, para evitar la degradación de la fluorescencia.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos de todos los embriones, y se procedió a la incubación de los embriones experimentales con el segundo Ab primario, el anti-GFR α 3 (Ab 8028), diluido a 1 μ g/mL en solución de bloqueo, durante 24 horas y a 4°C, y siempre manteniendo las condiciones de oscuridad. Mientras tanto, los embriones del control negativo, permanecieron en solución de bloqueo.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos, tanto del grupo experimental como del grupo control y a continuación, se incubaron con el

segundo Ab secundario, un goat anti-rabbit (Invitrogen A21429 lab 017 150085), esta vez marcado con el fluorocromo Alexa-555 (que emite en amarillo) en una dilución 1:600 en solución de bloqueo. Se dejaron incubando todos los embriones durante 75 minutos a temperatura ambiente y siempre manteniendo las condiciones de oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno de todos los grupos, y a continuación se procedió a la tinción de todos los núcleos de las células del embrión, con la tinción nuclear DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en Adenina y Timina en secuencias de ADN, a una concentración de 300nM en PBS (Invitrogen D1306) durante 1 minuto.

Después de un nuevo lavado, se montaron los embriones entre cubre y porta con la solución Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA) y se procedió a su observación, primero en el microscopio de fluorescencia y posteriormente en el microscopio confocal (Imagen 31).

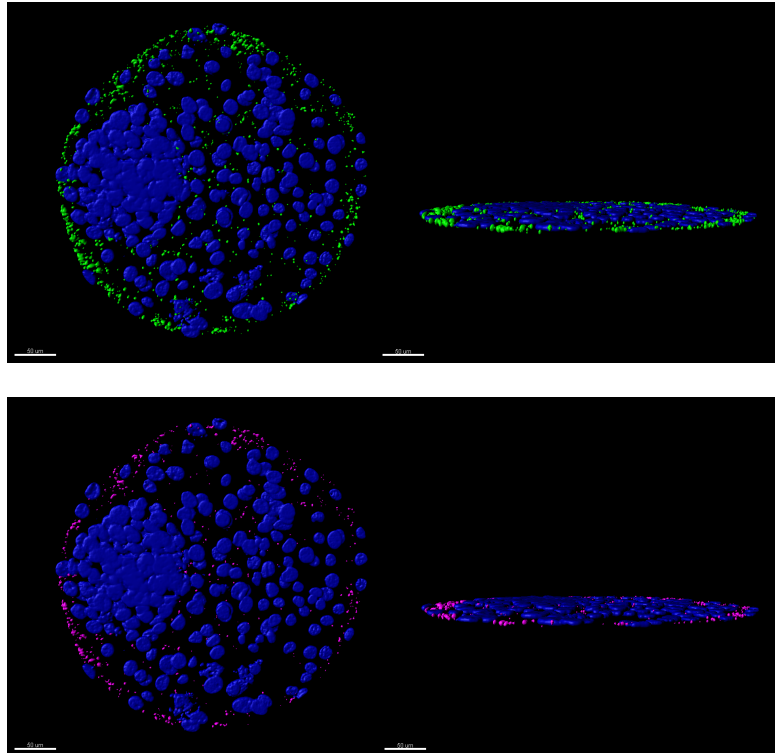


Figura 31. (A) Expresión de ART en un embrión y (B) expresión del receptor GFR α 3.

VALORACIÓN PERSONAL

Debo reconocer que como persona perteneciente a un grupo profesional que, aunque dentro de las ciencias, se encuentra más cercano a la medicina clínica, mi primera impresión cuando recibí por primera vez el título del que iba ser mi trabajo fin de Máster, fue pensar en salir corriendo e incluso en elegir otro trabajo.

Sin embargo, después de unos meses peleando con la “Ciencia”, he de reconocer que he disfrutado ampliamente de ella, con sus pros y sus contras, y que se me ha abierto un campo de posibilidades que descartaba con anterioridad, que más bien rechazaba. Incluso he llegado a disfrutar de técnicas ampliamente odiadas por casi todos, como es el caso del Western Blot o del test de Bradford.

Todo esto no sería posible sin la acogida de este gran grupo de investigación, que han hecho que me sienta como una más y que incluso en los momentos más difíciles, en los que lo único que se apetecía era tirar la toalla, nunca perdieron la fe ni en mí ni en la Artemina y su posible aislamiento. Y aunque no siempre, o más bien casi nunca, obtuvimos los resultados deseados, no se perdió ni la esperanza ni el sentido del humor, que creo que son dos de los factores más importantes cuando de Ciencia se trata.

Si se trata de dar una valoración a este periodo de mi vida, la única palabra que se me viene a la mente es excelente. Excelente en el trato recibido, excelente en el material puesto a mi disposición, excelente en las enseñanzas facilitadas, excelente en la bibliografía recomendada..., excelente en todo.

Comencé este máster con el objeto de ampliar mi formación, y gracias a la realización de las prácticas y del TFM, ahora considero haber abierto el abanico de posibilidades hasta un punto que no me planteaba, ya que he descubierto un campo que de verdad me apasiona y que hasta ahora era desconocido para mí.

Solo puedo concluir este trabajo con palabras de agradecimiento y con la gran satisfacción de haber elegido un gran sitio para mejorar profesionalmente.

ANEXO I

En este anexo se muestran las tablas con los diferentes reactivos y volúmenes de los mismo usados para la realización de los diferentes procedimientos:

Tabla 4. Diferentes volúmenes de reactivos para la preparación de geles.

GEL DE SEPARACIÓN	6%			8%			10%			12%			15%		
	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4	X1	X2	X4
H2O	2,62 ml	5,24 ml	10,5 ml	2,3 ml	4,6 ml	9,2 ml	1,9 ml	3,9 ml	7,7 ml	1,6 ml	3,2 ml	6,4 ml	1,12 ml	2,24 ml	4,48 ml
Acrilamida	0,98 ml	1,96 ml	3,92 ml	1,3 ml	2,6 ml	5,3 ml	1,7 ml	3,4 ml	6,8 ml	2 ml	4 ml	8 ml	2,48 ml	4,96 ml	9,92 ml
Tris-HCl 1.5M pH8.8	1,25 ml	2,5 ml	5 ml	1,25 ml	2,5 ml	5 ml	1,25 ml	2,5 ml	5 ml	1,25 ml	2,5 ml	5 ml	1,25 ml	2,5 ml	5 ml
SDS 10%	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl
TEMED	10 µl	20 µl	40 µl	10 µl	20 µl	40 µl	10 µl	20 µl	40 µl	10 µl	20 µl	40 µl	10 µl	20 µl	40 µl
PSA 10%	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl	50 µl	100 µl	200 µl

Tabla 5. Reactivos para el gel de empaquetamiento.

GEL DE EMPAQUETAMIENTO	
H2O	3 ml
Acrilamida	0,6 ml
Tampón TrisHCl 0.5M pH 6.8	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
TEMED	10 µl
PSA 10%	50 µl

Tabla 6. Reactivos para el tampón de carga.

TAMPÓN DE CARGA 4X	
Tris-HCl 250mM pH 6.8	5 mL
SDS 8%	8 grs
Glicerol 35%	250µL
βME 2.5%	3,5 mL
EDTA 8mM	160 µL
Azul de bromofenol	
H₂O	cantidad suficiente para 10 mL

Tabla 7. Tampón de electroforesis 10X.

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 10 X (1 LITRO)	
0.248M Tris base	30g/L
1.92M Glicina	144.12g/L
1% SDS	10g/L

Tabla 8. Componentes del tampón de transferencia.

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 10 X	
0.248M Tris base	30g/L
1.92M Glicina	144.12g/L

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA 1X	
T. transferencia 10X	10%
Metanol	20%
H₂O	70%

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
2. GE Healthcare Life Sciences. Western Blotting: Principles and Methods. *GE Healthc Handbooks.* 2014:176.
3. Garfin DE. Gel Electrophoresis of Proteins. *Essent Cell Biol.* 2003:197-268.
4. Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature.* 1970;227.
5. Arndt C, Koristka S, Bartsch H, Bachmann M. Protein Electrophoresis: Methods and Protocols. In: Kurien TB, Scofield HR, eds. Totowa, NJ: Humana Press; 2012:49-53.
6. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-3120.
7. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
8. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76 (9):4350-4354.
9. Fernandez-Patron C, Hardy E, Sosa A, Seoane J, Castellanos L. Double Staining of Coomassie Blue-Stained Polyacrylamide Gels by Imidazole-Sodium Dodecyl Sulfate-Zinc Reverse Staining: Sensitive Detection of Coomassie Blue-Undetected Proteins. *Anal Biochem.* 1995;224(1):263-269.
10. Madadlou A, O'Sullivan S, Sheehan D. Fast Protein Liquid Chromatography. In: Walls D, Loughran TS, eds. *Protein Chromatography: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2011:439-447.
11. GE Healthcare Life Sciences. Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods. *GE Healthc Handbooks.* 2014:139.
12. GE Healthcare Life Sciences. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods. *GE Healthc Handbooks.* 2016:170.

13. GE Healthcare Life Sciences. Affinity Chromatography: Principles and Methods. *GE Heal Handbooks*. 2007:159.
14. Danwen Q, Code C, Quan C, et al. Investigating the Role of Artemin Glycosylation. *Pharm Res*. 2016;33(6):1383-1398.
15. Dehghani H. Immunocytochemistry in Early Mammalian Embryos. In: *Applications of Immunocytochemistry*. InTech; 2012.