

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE
cDNA DE GENES DE *Euglena gracilis* QUE SE
EXPRESAN DIFERENCIALMENTE EN PRESENCIA
DE CADMIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

María Viridiana Olin Sandoval

MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Vocal	Profra. Herminia de Jesús Loza Tavera
Secretario	Prof. Francisco Ruiz Terán
1er suplente	Profra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2do suplente	Profra. María Eugenia de la Torre Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio 105. Edificio E.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.
Facultad de Química, UNAM.

Asesor:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Supervisor Técnico:

M. en C. Martín Pedro Vargas Suárez

Sustentante:

María Viridiana Olin Sandoval

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo económico del Proyecto PAPIIT IN215705, DGAPA-UNAM, otorgado a la Dra. Herminia Loza Tavera.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” por haberme permitido utilizar sus instalaciones para llevar a cabo los cultivos de *Euglena gracilis*.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por todo su apoyo, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez y al Dr. Carlos Cervantes por su apoyo y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. David Mendoza y a la Q.A. Jimena Martínez por su amistad y su apoyo durante los seminarios.

DEDICATORIAS

A mis papás, José Antonio y Ma. Cristina: gracias por todo el apoyo y la paciencia para que pudiera ver realizado mi sueño y sobre todo por haberme enseñado que solo con trabajo y dedicación puedo alcanzar mis metas. Los quiero mucho.

A Mari Cris mi hermana y mejor amiga: Gracias por estar ahí siempre. Eres la mejor.

A Alejandro Ocegüera: gracias por tu apoyo y tus consejos durante todo este tiempo y por hacer de esta etapa una de las más felices de mi vida. T.A.

A mi familia: porque de cada uno de ustedes he aprendido a ser una mejor persona. Gracias.

A Fátima, Karla, Karina, Nallely, Carolina, Berenice, Claudia, Rocío, Jimena, Adriana, Erika, Norma, Alina, Denia, Martín, Pedro, Miguel, Oscar, David: porque sin ustedes habría un hueco en mi vida.

A Yola, Selene, Andrea y a las pequeñas Claudia, Luzdei y Miryam por su amistad y apoyo en las buenas y en las malas.

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Antecedentes	3
Cadmio	3
Mecanismos de Tolerancia a Metales Pesados	4
Las Fitoquelatinas	5
Estudios moleculares relacionados con la respuesta al estrés por Cd ²⁺	6
<i>Euglena gracilis</i> , un organismo que resiste altas concentraciones de Cd ²⁺	8
Tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados	9
Antecedentes directos a este trabajo	10
Hipótesis	12
Objetivo	13
Estrategia experimental	14
Materiales y métodos	16
cDNA-AFLP (<u>A</u> mplified <u>E</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism)	16
Elución de cDNA del gel de poliacrilamida	25
Amplificación por PCR del cDNA recuperado de los geles de AFLP	25
Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	26
Preparación del pGem-T Easy con extremos con timinas para clonar fragmentos de PCR	26
Nueva estrategia	31
Identificación de la presencia de inserto por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7	32
Identificación de la presencia de inserto por PCR empleando los iniciadores Reverse y Forward M13	33

Obtención de los insertos clonados mediante reacciones de restricción	34
Clonación de los fragmentos restringidos en el vector pGem-T Easy (Promega)	35
Identificación de la presencia de inserto con los iniciadores T7 y Reverse	35
Secuenciación y análisis de los fragmentos obtenidos	36
Resultados y Discusión	37
cDNA-AFLP	37
Amplificación de los fragmentos de genes que se expresan diferencialmente en presencia de Cd ²⁺	38
Clonación de los fragmentos de genes amplificados	40
Verificación de la presencia de insertos clonados	41
Preparación de los fragmentos de genes que se expresan diferencialmente en presencia de Cd ²⁺ para su secuenciación	42
Secuenciación y análisis	47
Conclusiones	54
Apéndice	55
Bibliografía	59

ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
bp	Pares de bases
Cys	Cisteína
FQs	Fitoquelatinas
FQS	Fitoquelatina sintetasa
γ -EC	Gamma glutamil cisteína
γ -ECS	Gamma glutamil cisteína sintetasa
GSH	Glutación
GS	Glutación sintetasa
IC ₅₀	Concentración a la que se inhibe el crecimiento celular en un 50%
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal (ribosomal ribonucleic acid)
SH	Sulfhidrilo
TPI	Triosa fosfato isomerasa

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado cuya toxicidad en los organismos radica en que los iones Cd^{2+} penetran a la célula a través de los sistemas de transporte celular de iones fisiológicamente activos como el Zn^{2+} e interaccionan con los grupos sulfhidrilo y carboxilo de las proteínas así como con otras biomoléculas produciendo peroxidación de lípidos, ruptura de cadenas de DNA y desnaturalización de proteínas.

Sin embargo, existen organismos capaces de vivir en presencia de Cd^{2+} . Un ejemplo de ellos es *Euglena gracilis*, un protista de vida libre, fotoheterótrofo que es capaz de crecer en aguas contaminadas con Cd^{2+} y acumularlo en su interior, lo cual lo ubica como posible organismo bio-remediador. Uno de los mecanismos más estudiados de resistencia a Cd^{2+} y que es observado en *E. gracilis* es el incremento de las concentraciones de metabolitos capaces de quelar este metal, tales como cisteína (Cys), glutatión (GSH) y fitoquelatinas (FQs) los cuales son compartimentalizados en el cloroplasto o en la mitocondria.

Estudios en levaduras, plantas y hongos han reportado que además del incremento en la expresión de algunos genes de la vía de asimilación de azufre y de síntesis de Cys y GSH para la producción de FQs en respuesta a Cd^{2+} , existen otros genes, que modifican su expresión en presencia de este metal. Entre estos se han identificado genes relacionados con estrés oxidativo, proteínas de respuesta a estrés por calor, proteínas ribosomales e incluso proteínas del metabolismo basal como la glucólisis, que incrementan su expresión en respuesta a Cd^{2+} .

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar fragmentos de genes que se expresaran diferencialmente en *E. gracilis* a una concentración de 170 μM de Cd^{2+} , empleando la técnica de cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Así, en 105 reacciones de amplificación específica se observaron 30 fragmentos diferenciales de cDNA de los cuales 20 fueron aislados del gel de poliacrilamida y amplificados por PCR y 4 fueron clonados. Estos fragmentos se secuenciaron observándose las siguientes identidades: un fragmento que codifica 56 aminoácidos con 100% de identidad con la triosa fosfato isomerasa citosólica de *Euglena gracilis*; uno que codifica 38 aminoácidos con 36% de identidad con una proteína de procesamiento de rRNA con dominios WD40 de *Debaromyces hansenii*, otro que codifica 38 aminoácidos con 70% de identidad con una proteína ribosomal S23 de *Xenopus laevis* y otro que codifica 21 aminoácidos con 57% de identidad con una proteína similar a DUF877 de *Pseudomonas fluorescens*.

ANTECEDENTES

Cadmio

El cadmio tiene una densidad mayor a 5 g/mL por lo que es considerado un metal pesado. Se encuentra en la corteza terrestre en una concentración aproximada de 0.18 ppm encontrándose en suelos y rocas combinado como mineral con otros elementos como oxígeno, azufre y cloro. Su obtención se lleva a cabo al extraer otros elementos como Pb, Cu y Zn (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (ATSDR), 1999).

Algunas de las principales fuentes de contaminación por Cd^{2+} son la industria procesadora de baterías y acumuladores, cables eléctricos, colorantes, procesamiento de metales (aleaciones con Cd^{2+}), combustión de diesel y petróleo, fertilizantes fosfatados y pesticidas (Galvao *et al.*, 1987). En México la contaminación por Cd^{2+} se debe a la actividad de la industria del acero, galvanoplastia, hule, de síntesis de polímeros, a la de minería (Instituto Nacional de Ecología, <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/459/cap2.html>), el desecho de pilas (Granovsky, 2005) y el tabaco (Díaz-Barriga, 1995).

El Cd^{2+} , a diferencia del Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , es un metal no esencial y tóxico para la célula. Entra a la célula por sistemas de transporte de iones fisiológicamente activos como el Zn^{2+} , y tiene afinidad por el S, N y O de los grupos funcionales de las biomoléculas (Nieboer y Richardson, 1980) por lo que interacciona con grupos sulfhidrilo (SH) y carboxilo (COOH) de proteínas y otras biomoléculas promoviendo la desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos y ruptura de cadenas de DNA (revisado por Vallee, 1972).

Las principales rutas de exposición a Cd^{2+} en humanos son la inhalación de humos generados en actividades industriales o la ingestión de alimentos contaminados (Galvao *et al.*, 1987). Algunas de las enfermedades que han sido vinculadas a la exposición a cadmio son: cáncer de pulmón y de próstata, en el caso de personas ocupacionalmente expuestas; nefropatías, osteomalacia y osteoporosis debido a que el

Cd^{2+} es absorbido en el intestino delgado por transportadores de metales esenciales como el Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} ; además de que puede acumularse en la placenta ocasionando un retardo en el crecimiento del feto, así como malformaciones (World Health Organization (WHO), 1992; Hughes *et al.*, 1995; Brzóška *et al.*, 2001; Vahter *et al.*, 2002).

Mecanismos de tolerancia a Cd^{2+}

A pesar de la toxicidad del Cd^{2+} en humanos y otros mamíferos, existen organismos que son capaces de tolerar su presencia. Estos organismos han evolucionado presentando diferentes estrategias fisiológicas, bioquímicas y moleculares para contrarrestar el efecto tóxico de estos elementos. Algunas de estas estrategias han sido identificadas y consisten en: 1) unión del metal a la pared celular así como a la cara externa de la membrana plasmática; 2) reducción del transporte a través de la membrana celular, hacia el interior de la célula; 3) expulsión activa del metal; 4) compartimentalización del metal en algún organelo; 5) biotransformación ya sea por oxidación, reducción o alquilación del metal; 6) precipitación o atrapamiento por secreción de compuestos en el medio extracelular; 7) producción de moléculas quelantes, ya sean péptidos, como las metalotioninas o las fitoquelatinas, o bien compuestos orgánicos como citrato, malato, oxalacetato, o moléculas inorgánicas como sulfuro, fosfato y polifosfatos (revisado por Hall, 2002).

En el caso específico de resistencia a Cd^{2+} , un mecanismo que ha sido bastante estudiado en distintos organismos es la producción de moléculas especializadas en la quelación de este metal. Estas moléculas contienen residuos de cisteína, aminoácido que contiene un grupo tiol, el cual tiene una alta afinidad por el Cd^{2+} ($K_d = 10^{-10.5}\text{M}$) (Sillen y Martell, 1971).

Aunque la producción de moléculas quelantes es una estrategia empleada por diversos organismos, el tipo de moléculas sintetizadas en mamíferos, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, plantas, algas, levaduras y *Euglena gracilis* es distinto. En mamíferos y *C. elegans*, las moléculas quelantes son las metalotioninas, las cuales son

péptidos codificados genéticamente (Cobbett y Goldsbrough, 2002). En el caso de levaduras, algas y plantas las moléculas quelantes son las fitoquelatinas (FQs), que son sintetizadas por reacciones químicas a partir del glutatión (GSH).

Las fitoquelatinas (FQs)

Las fitoquelatinas (FQs) son péptidos con una estructura $(\gamma\text{-glutamil-cisteína})_n\text{-glicina}$, donde $n=2-11$, las cuales se sintetizan enzimáticamente a partir de glutatión (GSH) (Figura 1).

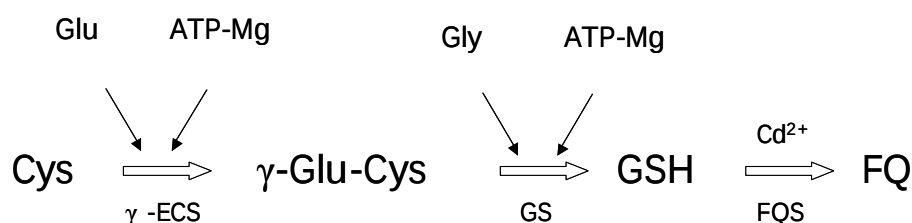


Figura 1. Síntesis de fitoquelatinas. Estos péptidos se sintetizan a partir de GSH por medio de la fitoquelatina sintetasa (FQS).

El GSH es sintetizado en dos pasos dependientes de ATP-Mg^{2+} : primeramente se sintetiza γ -glutamil-cisteína (γ -EC) a partir de cisteína (Cys) y glutamato (Glu) por medio de la γ -glutamil-cisteína-sintetasa (γ -ECS); posteriormente la glutatión sintetasa (GS) añade glicina (Gly) a la γ -EC formando el GSH (revisado por Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004). En presencia de cationes como Ag^{1+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} pero principalmente Cd^{2+} , el GSH formado es utilizado por la fitoquelatina sintetasa (FQS) para sintetizar a las FQs (Cobbett, 2000; Vatamaniuk *et al.*, 2000).

La exposición a Cd^{2+} promueve un aumento en la cantidad de FQs (Zhu *et al.*, 1999) debido a un aumento en la actividad de las enzimas de las vías que proporcionan los metabolitos necesarios para su síntesis. Esto se ha observado en *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea* en donde la presencia de Cd^{2+} promueve un aumento en la transcripción de genes de la vía de síntesis de cisteína y de GSH, aumentando con esto la síntesis de FQs (Schäffer *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2002).

El mecanismo por el cual las FQs actúan es formando complejos con el Cd^{2+} en una relación 2:1 (FQs:Cd) en el citoplasma. El Cd^{2+} se une a los grupos tioles de las FQs y el tamaño de los complejos depende del tiempo de exposición a Cd^{2+} ya que conforme aumenta este tiempo, la FQS va adicionando de manera secuencial γ -EC al GSH (Rauser, 1990; Steffens, 1990). Posteriormente estos complejos son compartamentalizados en la vacuola por medio de transportadores como el YCF1 y HMT1 de levadura (Ortiz *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997) y de CAX2 en el caso de plantas (revisado por Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004).

Estudios moleculares relacionados con la respuesta al estrés por Cd^{2+}

Recientemente han aparecido trabajos en los que se analiza la expresión genética y proteómica de diversos organismos en respuesta a Cd^{2+} . De estos estudios se ha logrado descubrir que si bien la síntesis de moléculas quelantes o de factores de expulsión del metal son estrategias bioquímicas de resistencia a Cd^{2+} , los organismos requieren de la expresión de otros genes para contender con la toxicidad o el estrés por este metal.

Estudios a nivel de transcripción han reportado que en organismos como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, las plantas *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea* y el hongo *Paxillus involutus*, la presencia de Cd^{2+} promueve el aumento en la expresión de mensajeros que codifican proteínas de respuesta a estrés por calor (HSP70 y HSP80); de diferentes factores de transcripción; de proteínas relacionadas con transporte como los transportadores de sulfato y de Zn^{2+} para *A. thaliana* y ATPasas para *P. involutus* y *B. juncea*. La presencia de Cd^{2+} modifica la expresión de proteínas ribosomales pero en algunos organismos como *P. involutus* disminuye la expresión mientras que en *A. thaliana*, *B. juncea* y *C. elegans* aumenta (Liao *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 2004; Kovalchuk *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2005).

Se ha observado que existen mensajes de enzimas del metabolismo basal que también aumentan su expresión en presencia de Cd^{2+} como la aconitasa, la malato deshidrogenasa en *P. involutus*; la aldehído deshidrogenasa en *B. juncea* y la isocitrato

liasa en *A. thaliana* (Liao *et al.*, 1998; Jacob *et al.*, 2004; Kovalchuk *et al.*, 2004; Fusco *et al.*, 2005).

La presencia de Cd^{2+} genera estrés oxidativo por lo que también se ha observado que en *A. thaliana* aumenta la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa y glutatión-S-transferasa (Kovalchuk *et al.*, 2004).

A pesar de que el Cd^{2+} promueva la expresión diferencial de mensajes para proteínas diversas, no significa que la cantidad de proteína esté aumentando. Sin embargo, existe un estudio proteómico de la respuesta a Cd^{2+} en *Saccharomyces cerevisiae* que reporta que proteínas relacionadas con estrés oxidativo, de choque térmico, relacionadas con metabolismo basal, ribosomales e incluso del metabolismo del azufre aumentan su expresión en presencia del metal (Vido *et al.*, 2001). Esto indica que ese aumento en la transcripción de esos genes también significa un aumento en la cantidad de proteína por lo que se podría decir que la respuesta a estrés por Cd^{2+} está regulada transcripcionalmente (Fauchon *et al.*, 2002), aunque no se descarta la regulación a otro nivel.

Estudios proteómicos en *Saccharomyces cerevisiae* también han reportado que en presencia de Cd^{2+} se induce la expresión de isoformas de enzimas del metabolismo de azúcares que contienen 30% menos azufre que en ausencia de Cd^{2+} al parecer como una forma de ahorro ya que se destinará a los aminoácidos azufrados necesarios para la síntesis de GSH (Fauchon *et al.*, 2002). Jacob *et al.*, (2004) reportaron que en *P. involutus*, el Cd^{2+} promueve una disminución de hasta 4 veces la transcripción de una hidrofobina, que es una proteína rica en Cys, llegando a la misma hipótesis acerca del ahorro de aminoácidos azufrados. Algo que hace más fuerte esta hipótesis es que se ha observado que en *S. cerevisiae* la vía de síntesis de GSH se ve incrementada (Vido *et al.*, 2001; Fauchon *et al.*, 2002) por lo que requiere más Cys.

***Euglena gracilis*, un organismo que resiste altas concentraciones de Cd^{2+}**

Euglena gracilis Z es un protista, capaz de crecer en aguas contaminadas con Cd^{2+} . Altas concentraciones de Cd^{2+} en *E. gracilis* producen una disminución en su crecimiento, motilidad, fotosíntesis y en la asimilación de CO_2 (De Fillips, 1980; Navarro *et al.*, 1997). Sin embargo, tiene un IC_{50} para Cd^{2+} de 100 μM (Navarro *et al.*, 1997), el cual comparándolo con algas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* y con *Saccharomyces cerevisiae* cuyos IC_{50} para Cd^{2+} son de 5.8 μM , 22.24 μM y 10 μM respectivamente (Trevors *et al.*, 1986), la hace un buen candidato para bioremoción de este metal. Además se ha observado que en condiciones de laboratorio al aplicar un pre-tratamiento con 1.5 μM de Hg^{2+} a células heterótroficas (Navarro *et al.*, 1997) o de 50 μM de Cd^{2+} a células fotoheterótroficas (Devars *et al.*, 1998), se incrementa la acumulación de Cd^{2+} dentro del organismo en comparación con los que no fueron pre-tratados.

Se han estudiado algunos mecanismos por medio de los cuales *E. gracilis* puede resistir la presencia de Cd^{2+} observándose que las células fotoheterótroficas compartimentalizan el metal en el cloroplasto (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002), entrando a ese organelo probablemente por medio de un transportador de Zn^{2+} (Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005) y las células cultivadas en la oscuridad (Avilés *et al.*, 2003) lo compartimentalizan en la mitocondria, incrementándose las concentraciones de FQs, GSH y Cys dentro de estos organelos. Otros mecanismos que parecen estar relacionados con esto son, el aumento en la cantidad de proteínas de respuesta a estrés por calor (Barque, 1996) y la activación de una proteína similar a las P-glicoproteínas (proteínas de resistencia a drogas) (Einicker-Lamas, 2003) aunque este último no ha sido bien estudiado.

Una parte importante del estudio de resistencia a Cd^{2+} en *E. gracilis* es el metabolismo del GSH y los efectos que el Cd^{2+} tiene sobre éste ya que es en esta vía donde se sintetizan las FQs. Mendoza-Cózatl (2005) propuso un modelo para la regulación de la síntesis de GSH y FQs en plantas utilizando datos cinéticos disponibles en la literatura y el software GEPASI. Con este estudio concluyó que en ausencia de

Cd^{2+} , el flujo de la vía de síntesis de GSH está controlado por las enzimas consumidoras de éste (FQS, glutatión transferasas, etc.). Sin embargo, en presencia de Cd^{2+} la demanda de GSH aumenta por lo que el control de la vía está dado tanto por el bloque consumidor como el productor de GSH (γ -ECS y GS). Martínez (2005) observó que en presencia de Cd^{2+} las enzimas productoras de GSH, la γ -ECS y la GS, aumentan su velocidad máxima en 4 y 2.43 veces respectivamente. Además encontró que la GS es más sensible a Cd^{2+} ($\text{IC}_{50 \text{ GS}}$ por Cd^{2+} de 8 pM e $\text{IC}_{50 \gamma\text{-ECS}}$ por Cd^{2+} de 33 pM). Este comportamiento ocasiona que se acumule la γ -EC siendo la GS la enzima que gane el control del flujo de la vía en el bloque productor de GSH.

Tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados

En México la contaminación de aguas por metales pesados está regulada por la NOM-127-SSA-1994 que señala el límite máximo de Cd^{2+} en el agua potable el cual es de 0.005 mg Cd^{2+} /L; la Norma Técnica Ecológica NTE-CCA-017/88, la cual establece los límites máximos permisibles en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria de acabados metálicos, permite una concentración de 0.2-0.4 mg de Cd^{2+} /L; y en aguas residuales para riego agrícola se permite una concentración de 0.2 mg/L de Cd^{2+} (NOM-001-ECOL-1996).

En México existen varios lagos y ríos contaminados con metales pesados. Un ejemplo de ellos es el lago de Chapala donde la contaminación por metales pesados es preocupante. Se han calculado aportes muy altos en ciertas áreas de la Cuenca del Lerma. Por ejemplo, el análisis de la aportación de las industrias petroquímica, textil, de alimentos para animales, metalúrgica y de ensamble de vehículos de los estados de Querétaro y Guanajuato, indica que se están vertiendo a la cuenca más de 12,400 gramos de cromo y más de 4,300 gramos de zinc diariamente (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, <http://www.semarnat.gob.mx/regiones/chapala/problematika.shtml>).

El tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados busca reducir la cantidad de metales y prevenir las consecuencias ecológicas que la presencia de éstos

conlleve. Estos tratamientos se llevan a cabo utilizando métodos como la coagulación-floculación-sedimentación-filtración o por intercambio iónico (Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA-1994, 1994). Estos métodos son eficientes cuando la concentración del metal es alta o moderada pero a concentraciones bajas, estos procesos suelen ser poco costosos o inefectivos (Yan *et al.*, 2003).

Se ha estudiado la capacidad que tienen varios organismos como bacterias, hongos y algas para remover Cd^{2+} de soluciones acuosas. Estos organismos se han propuesto como una alternativa a la biorremoción de metales pesados como el Cd^{2+} de aguas contaminadas. Ejemplos de estos serían algas como *Chlorella vulgaris* que es capaz de remover un 66% de Cd^{2+} en 60 h de aguas con una concentración de 5 mg de Cd^{2+} /L y *Scenedesmus acutus* que remueve 73% de este metal en las mismas horas cuando se encuentran fijadas a Kappa-carragenina en aguas con 0.5 mg de Cd^{2+} /L (Travieso *et al.*, 1999); hongos como *Mucor rouxii* que remueve hasta 9.40 mg de Cd/g de peso seco de un cultivo que contiene una concentración de Cd^{2+} de 10 g/L (Yan *et al.*, 2003) y protozoarios como *Euglena gracilis* que puede acumular 11.2 g de Cd^{2+} /Kg de peso seco cuando es expuesta a 200 μM de Cd^{2+} por 96 h (Avilés *et al.*, 2005). Incluso se ha observado que *E. gracilis* puede acumular Cd^{2+} y Zn^{2+} simultáneamente cuando se encuentran a una concentración debajo de 100 μM de cada metal aunque no puede acumular Pb^{2+} de manera eficiente además de que disminuye la eficiencia de captación de Cd^{2+} y Zn^{2+} (Mendoza-Cózatl *et al.*, en revisión).

Antecedentes directos de este trabajo

A pesar de que existen varios estudios analizando los mecanismos bioquímicos por los que *E. gracilis* tolera Cd^{2+} , pocos estudios han abordado el análisis de los genes que incrementan o reprimen su transcripción en presencia de Cd^{2+} y que permitirían identificar los mecanismos genéticos que le ayudan a contender con el metal. Hernández-Navarro (2003), mediante la técnica de cDNA-AFLP, encontró varios fragmentos de genes que se incrementaban en respuesta a Cd^{2+} . Éstos fueron el de una proteína de unión a colas de poly A (PolyA binding protein, PABP) y una proteína de

respuesta a estrés por calor (HSP 70). Sin embargo, la confirmación de la expresión diferencial en respuesta a Cd^{2+} por Northern Blot, no fue realizada. También se encontró que el gen de la triosa fosfato isomerasa aumenta su expresión a 3, 6 y 9 horas de exposición a Cd^{2+} , pudiendo corroborar sus resultados por Northern Blot.

HIPÓTESIS

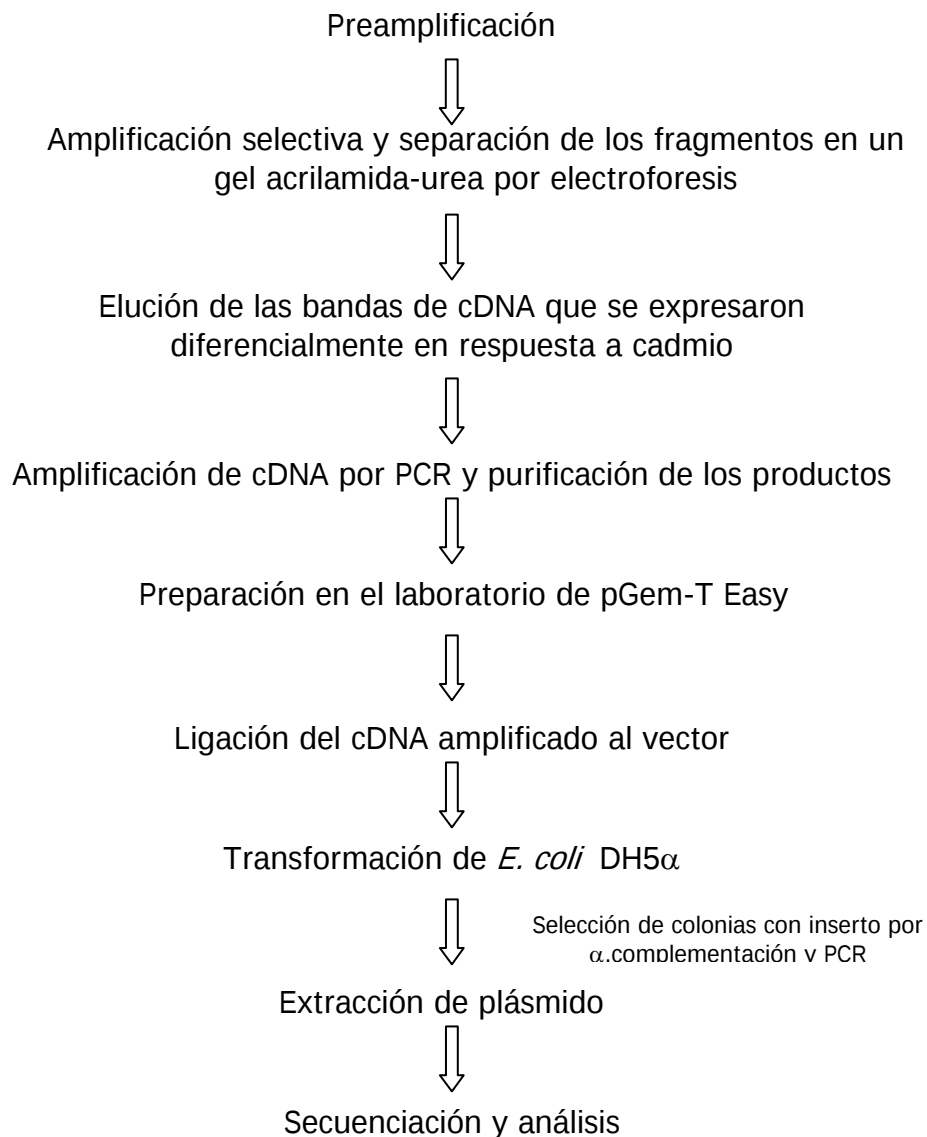
Dado que *Euglena gracilis* es un organismo capaz de crecer en presencia de Cd^{2+} , deben existir genes que modifiquen su expresión a nivel transcripcional, para poder contender con la toxicidad del metal.

OBJETIVO

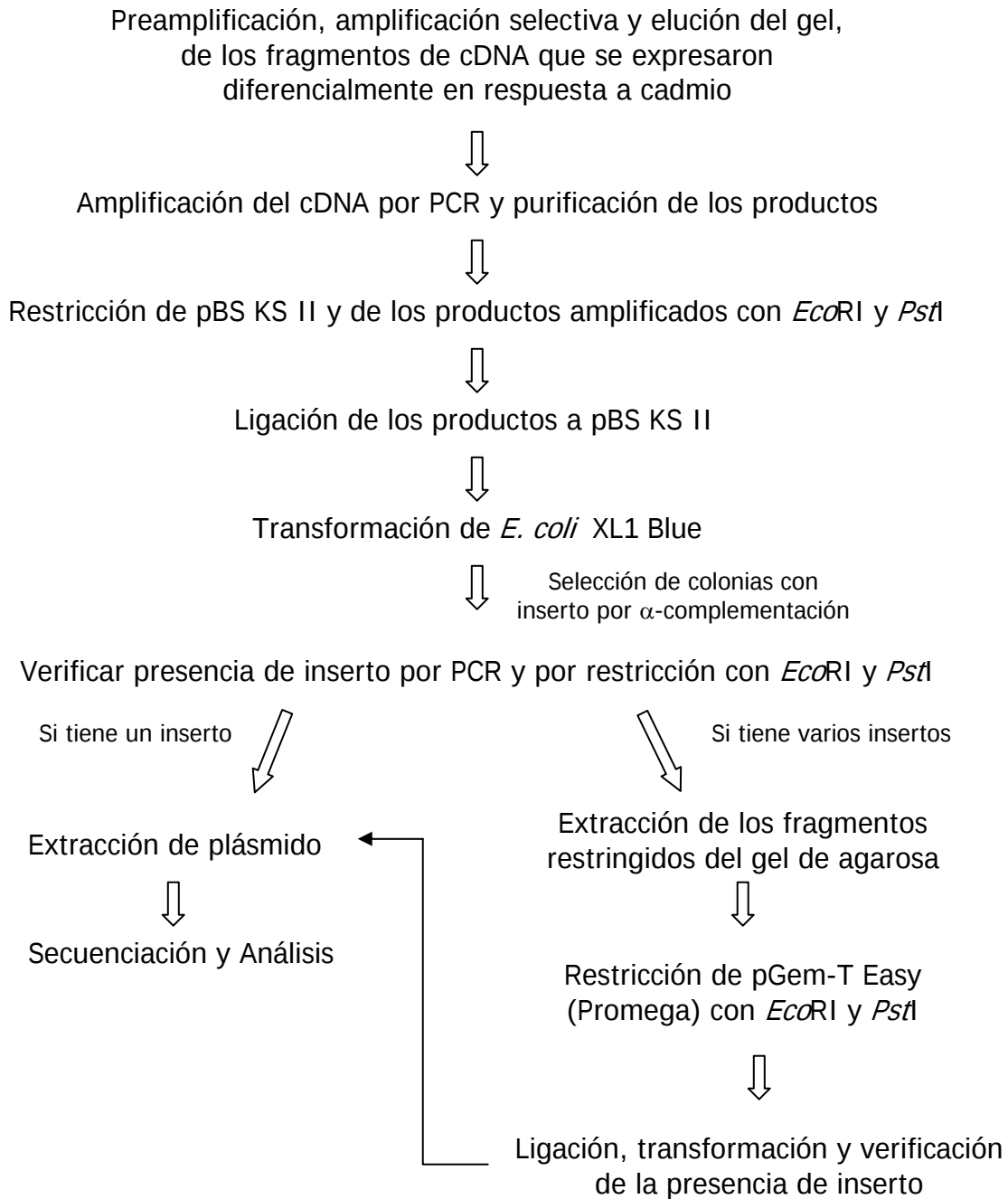
- Aislar, amplificar e identificar fragmentos de genes de *Euglena gracilis* que se expresan diferencialmente en respuesta a cadmio.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En un esfuerzo por conocer una mayor cantidad de genes que se expresan diferencialmente en presencia de Cd^{2+} se decidió partir del estudio realizado por Hernández-Navarro (2003). En ese trabajo se llevó a cabo la purificación del RNA mensajero de cultivos de *E. gracilis* que estuvieron a diferentes tiempos (3, 6 y 9 horas) en ausencia y en presencia de $170 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . Posteriormente sintetizó cDNA el cual fue restringido con las enzimas *EcoRI* y *MseI*. Así, este trabajo inició con la preamplificación de estos cDNAs restringidos (Figura 2, paso f). La estrategia experimental que se planteó originalmente fue la siguiente:



Sin embargo, debido a problemas con el manejo del vector y de los insertos, no se lograron clonar los insertos en el vector pGem- T Easy preparado en el laboratorio ni con el comercial por lo que se propuso una nueva estrategia.



MATERIALES Y MÉTODOS

cDNA-AFLP (Amplified Eragment Length Polymorphism) (Liscum, 1998)

Esta técnica se basa en la amplificación selectiva por PCR, de fragmentos de cDNA ligados a iniciadores, con el fin de visualizar variaciones moleculares existentes entre poblaciones de ácidos nucleicos estrechamente relacionadas, correspondientes a condiciones fisiológicas, ambientales o de desarrollo diferentes. Esta estrategia permite encontrar fragmentos de cDNA de *Euglena gracilis* que estén modificando su expresión debido a la presencia de Cd^{2+} . Esta técnica involucra los siguientes pasos (Figura 2):

1. Aislamiento de mRNA de las condiciones de interés: cultivos de *E. gracilis* cultivadas en ausencia y presencia de $170 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} durante 3, 6 y 9 horas.
2. Síntesis de cDNA a partir del mRNA.
3. Digestión del cDNA con endonucleasas de restricción. Se utilizan dos enzimas de restricción, una de corte raro que reconozca 6 bp (en este caso *EcoRI*) y otra de corte frecuente que reconozca 4 bp (en este caso *MseI*).
4. Ligación de adaptadores (oligonucleótidos de doble cadena de secuencia conocida y complementaria a los extremos del cDNA digerido) al cDNA digerido.
5. Preamplificación por PCR de los fragmentos de DNA. Esto se lleva a cabo para asegurarse de tener la cantidad suficiente de molde para la amplificación selectiva. Aquí se utilizan iniciadores llamados *MseI* y *EcoRI* con secuencia complementaria a los adaptadores.
6. Amplificación selectiva por PCR (AFLP-PCR). Aquí se utilizan iniciadores con secuencias complementarias a los adaptadores pero además tienen dos bases adicionales en el extremo 3' que deben ser complementarias al mensaje que se va a amplificar. Uno de los iniciadores se marca con ^{33}P , en este caso se eligió *EcoRI*.
7. Electroforesis en geles de secuenciación de poliacrilamida y autorradiografía.

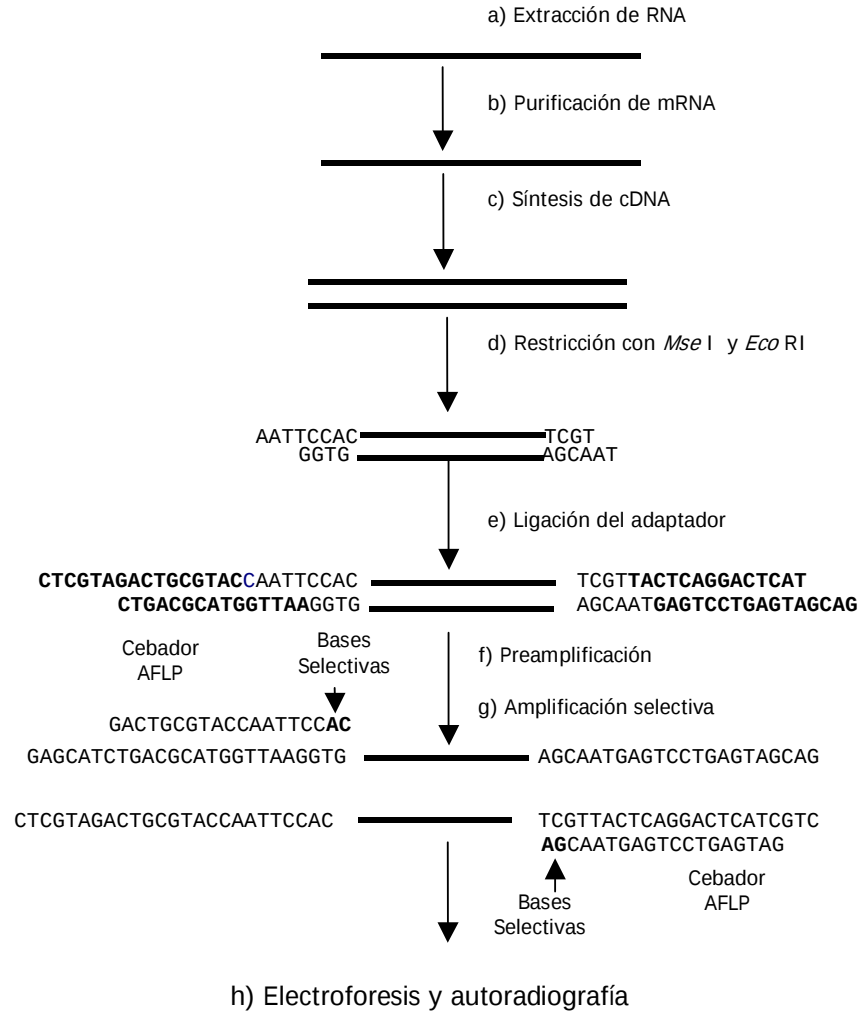


Figura 2. cDNA-AFLP. Se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción obtenidos a partir de un digerido total de cDNA de *E. gracilis* proveniente de mRNA extraído de cultivos realizados en presencia y ausencia de Cd^{2+} .

La ventaja de esta técnica radica en que no es necesario conocer la secuencia de los genes como en el caso de microarreglos o de Genechip. Además de que permite detectar genes expresados raramente así como distinguir entre genes homólogos (Reijans *et al.*, 2003). Además, en relación a la técnica de differential display en este caso, la ligación de adaptadores a los fragmentos de cDNA permite la preamplificación

de estas secuencias haciendo más factible su posterior utilización como molde para la amplificación con los iniciadores selectivos que tienen las diferencias en las bases en la region 3'.

En un trabajo previo se llevó a cabo lo siguiente (Hernández- Navarro, 2003):

Cultivo y cosecha de células

A) Cultivo fresco

Se sembraron 0.2×10^6 células/mL en un medio de glutamato y malato como fuente de carbono (Ver apéndice). Se cultivaron durante cuatro días (fase exponencial) con ciclos de 12 h luz ($60\text{--}70 \mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$) y 12 h oscuridad.

B) Cultivos utilizados para la extracción de RNA

1. Se sembraron 4 L de medio fresco y se cultivaron como se describió en el apartado anterior. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 15°C en un rotor de ángulo fijo empleando una centrífuga Sorvall RB-X.
2. Se lavaron las células con medio fresco y se volvieron a centrifugar. Se resuspendieron en aproximadamente 100 mL de medio fresco.
3. Las células se contaron haciendo una dilución 1:1000.
4. Las células se resembraron en 8 matraces con 1 L de medio de cultivo cada uno, a una concentración de 1.5×10^6 células/mL.
5. A 4 de los 8 L de medio de cultivo se les añadió CdCl_2 $170 \mu\text{M}$ a partir de un stock de 50 mM.
6. Luego de 3, 6 y 9 horas de haber sembrado, se recolectaron aproximadamente 1.3 L de células centrifugando en frascos limpios (no necesariamente estériles) a 5000 rpm. Se lavaron con medio KME (Ver apéndice). Las células se pasaron a tubos de plástico de 50 mL y se volvieron a centrifugar en una centrífuga de mesa con rotor de columpio a 3000 rpm durante 5 min. El paquete celular se congeló inmediatamente con N_2 líquido.

Purificación de RNA total (Chomczynsky y Sacchi, 1987)

1. Se cosecharon células de *E. gracilis* como se describió anteriormente.
2. Se tomaron 1.5 g de peso fresco de células y se trituraron con N₂ líquido en un mortero previamente enfriado hasta obtener un polvo fino.
3. Se prepararon 15 ml de solución D con β -mercaptoetanol (ver apéndice).
4. Se añadieron 5 mL sobre las células congeladas en el mortero y se mezcló bien con ayuda del pistilo.
5. La pasta que se formó, se pasó a un tubo de vidrio estéril (Corex) con tapa y se adicionó el resto de la solución D, mezclando perfectamente.
6. La mezcla se separó en dos partes iguales.
7. Se adicionó secuencialmente 1 mL de acetato de sodio 2M, pH 4.0, 10 ML de fenol y 2 mL de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1, mezclando perfectamente por inversión después de adicionar cada reactivo. La suspensión final se agitó vigorosamente por 10 s y fue incubada en hielo por 15 min.
8. Se centrífugo a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C en un rotor de ángulo fijo en una centrífuga Sorvall RB-X.
9. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se repitieron de dos a tres veces los pasos 6 y 7 cuando después de la centrifugación aún se veía una capa blanca en la interfase (proteína precipitada).
10. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se mezcló con 10 mL de isopropanol helado, se incubó a -20 °C durante 1 h.
11. Se centrífugo a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C.
12. La pastilla de RNA se resuspendió en 3 mL de solución D y se presipitó con un volumen de isopropanol helado incubando a -20 °C durante 1 h.
13. Se centrífugo a 10 000 x g durante 20 min a 4 °C.
14. La pastilla se lavó dos veces con 10 mL de etanol al 75% y se centrifugó 15 min después de cada lavado.

15. La muestra se resuspendió en 1 a 2 mL de agua DEPC y se conservó a -70°C hasta su uso.

Nota: el RNA debe resuspenderse fácilmente en agua de lo contrario es muy probable que la muestra tenga polisacáridos, lo cual dificulta su manejo posterior. Cultivos de *E. gracilis* de más de tres días tienen muchos polisacáridos.

Purificación de RNA poliA⁺

La purificación se hizo de acuerdo a las indicaciones descritas en el kit PolyA tract de Promega. El RNA poliA⁺ recién purificado se guardó precipitado en 174 de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y 2 µL de glucógeno 2 mg/mL a -70 °C. Al momento de utilizarlo, se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C en una microcentrífuga. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 15 µL de agua estéril libre de RNAsas.

Síntesis de cDNA

A) Primera cadena

1. Se mezclaron cantidades iguales (2 µg) de RNA poliA⁺ de células control cosechadas después de 3, 6 y 9 h de cultivo o de células tratadas con Cd²⁺ durante el mismo tiempo. Se añadió 1µL de oligonucleótidos dT-(12-18) y se llevó a 12 µL con agua. Se incubó a 70 °C durante 5 min y se pasó inmediatamente a hielo.
2. A la mezcla anterior se le añadieron:
Amortiguador para la primera cadena
de cDNA (Invitrogen) 4.0 µL
DTT 0.1 M 2.0 µL
dNTPs 10mM 1.0 µL
3. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 2 min, se añadió 1 µL de transcriptasa reversa (200 U/µL, Invitrogen) y se incubó 2 h a 42 °C. El volumen final de reacción fue de 20 µL.

B) Segunda cadena

Para sintetizar la segunda cadena se utilizó DNA polimerasa I. También se añadió RNAsa H, una endonucleasa que deja fragmentos de RNA que la DNA polimerasa I utiliza como cebadores para la síntesis de la nueva cadena.

1. Al final de la síntesis de la primera cadena de cDNA, se incubó a 95 °C para desnaturalizar a la enzima y se añadió:

Amortiguador 5x para la segunda cadena (Ver apéndice)	30.0 µL
dNTPs 25 mM	1.0 µL
DNA polimerasa I	3.5 µL
RNAsa H	1.5 µL
Agua	94.0 µL

Se incubó a 16 °C durante 2 h. El volumen final de reacción fue de 150 µL, el cual se guadó precipitado en ¼ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y 2 µL de glucógeno 2 mg/mL a – 70 °C. Al momento de utilizarlo se centrifugo a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C en una microcentrífuga y se resuspendió en 15 µL de agua.

Digestión y Ligación de adaptadores

Para 40 µL de reacción se mezclaron:

cDNA de cadena doble	6.0 µL
Amortiguador de digestión-ligado (ver apéndice)	8.0 µL
<i>Mse</i> I (1 U/µL) (Invitrogen)	1.0 µL
<i>Eco</i> RI (1 U/µL) (Invitrogen)	1.0 µL
Agua	24.0 µL

Se incubó durante 3 h a 37 °C.

A la reacción anterior se le añadió:

Adaptadores <i>MseI</i> (ML33 y 34) (Ver apéndice)	1.0 μ L
Adaptadores <i>EcoRI</i> (ML 35 y 36)	1.0 μ L
Amortiguador de digestión-ligado	4.0 μ L
ATP 10 mM	1.0 μ L
T4 DNA Ligasa (1 U) (Invitrogen)	1.0 μ L
Agua	1.0 μ L

Se dejó incubando durante 12 h a 16 °C. Se almacenó a –20 °C hasta su uso.

Este trabajo continuó de estos pasos anteriores a partir de la preamplificación (Figura 2, paso f).

Preamplificación

Para 20 μ L de reacción se tomaron:

H ₂ O	4.6 μ L
Iniciador ML37 (<i>MseI</i> core + adapter)	0.5 μ L
Iniciador ML38 (<i>EcoRI</i> core + adapter)	0.5 μ L
dNTPs 10 mM	0.8 μ L
MgCl ₂ 50 mM	0.6 μ L
Buffer de reacción 10 X (Invitrogen)	2.0 μ L
cDNA con adaptadores	10.0 μ L
<i>Taq</i> polimerasa (1 U/ μ L)	1.0 μ L
(dilución 1:5 de <i>Taq</i> pol, 5 U/ μ L, Invitrogen)	

Se hizo la siguiente reacción de PCR

Desnaturalización	2 min	94 °C	}
Desnaturalización	30 s	95 °C	

Adición de iniciadores	1 min	56 °C	40 ciclos
Extensión	1 min	72 °C	
Extensión	5min	72 °C	

De los 20 µL de reacción, 10 µL se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% para ver los productos y el resto se diluyó 1:10 para usarse como molde en la amplificación AFLP, empleando los iniciadores selectivos (Figura 2, paso g).

Marcaje radiactivo de iniciadores

Se marcó el iniciador *EcoRI* para lo cual se mezclaron

H ₂ O	4.0 µL
Iniciador <i>EcoRI</i> (una de las opciones ML44, 46-49, 54, 55. Ver apéndice)	10.0 µL
Buffer de reacción 5 X (Gibco)	5.0 µL
(γ - ³³ P)-ATP (10 µCi/mmol)	5.0 µL
T4 polinucleótido cinasa 1 U/µL (Gibco)	1.0 µL

La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Amplificación AFLP

Se mezclaron:

H ₂ O	6.55 µL
Iniciador selectivo <i>EcoRI</i> - ³³ P (ML 44,46-49,54 y 55. Ver apéndice)	0.15 µL
Iniciador selectivo <i>MseI</i> (ML 66-81. Ver apéndice)	0.3 µL
dNTPs 10 mM	0.4 µL
MgCl ₂ 50 mM	0.4 µL
Buffer de reacción 10 X (Invitrogen)	1.0 µL
DNA (de la reacción de preamplificación)	1.0 µL
<i>Taq</i> polimerasa (1 U/µL) (Invitrogen)	0.3 µL

El PCR se hizo en las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min	95 °C	}	12 ciclos
Desnaturalización	30 s	95 °C		
Adición de iniciadores	30 s	65 °C a 57 °C		
(bajando 0.7 °C en cada ciclo)				
Extensión	1 min	72 °C	}	30 ciclos
Desnaturalización	30 s	95 °C		
Adición de iniciadores	30 s	56 °C		
Extensión	1 min	72 °C		
Extensión	2 min	72 °C		

Electroforesis para productos del PCR-AFLP

1. Se hizo un gel de poliacrilamida al 5% utilizando vidrios de 35 x 45 cm y separadores de 0.3 mm.

Para el gel se mezclaron:

Urea/Acrilamida/Bisacrilamida (Ver apéndice)	60 mL
Temed	35 µL
Persulfato de amonio al 20%	150 µL

A los productos de PCR (10 µL) se les añadió 8 µL de amortiguador de carga desnaturalizante 2 X (ver apéndice), se calentaron a 95 °C, 10 min. Se cargaron en el gel y se corrieron aproximadamente 2.5 h a 60 W en una cámara modelo S2 de Life Technologies™, en amortiguador TBE 1 X.

2. El gel se colocó en papel filtro Whatman, se cubrió con plástico adherente y se secó a 80 °C con vacío en un secador de geles modelo 583 de Bio Rad. Se marcó con un

crayón fluorescente en las esquinas del papel filtro y se expuso en una película Kodak MS de 2 a 5 días (autoradiografía).

Elución de cDNA del gel de poliacrilamida

1. Se quitó la cubierta de plástico del gel seco y se alineó con la película revelada (autoradiografía) en donde se había identificado la posición de las bandas presentes diferencialmente.
2. Se cortaron las bandas del gel y se pasaron a un tubo de microcentrífuga (Eppendorf). Se añadieron 100 μL de agua estéril y se incubaron 10 min.
3. Se hirvieron a baño María durante 15 min y se centrifugaron a 12,000 x g (Denville Micro 240 A) por 30 s. Los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios y se precipitó el cDNA con $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol absoluto helado y 2 μL de glucógeno 2 mg/mL.
4. Se incubó 12 h a -70°C y se centrifugó a 14,000 x g (Eppendorf Centrifuge 5417C) por 15 min.
5. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 15 μL de agua estéril.

Amplificación por PCR del cDNA recuperado de los geles de AFLP

Se monta una reacción con los siguientes reactivos:

Agua	9.5 μL
DNA molde	5.0 μL
Iniciador universal ML39 que contiene un sitio de corte para <i>EcoRI</i>	1.0 μL
Iniciador universal ML40 que contiene un sitio de corte para <i>PstI</i>	1.0 μL
dNTPs 10 mM (Promega)	0.8 μL
MgCl ₂ 50 mM (Promega)	0.6 μL
Buffer de reacción 10 X (Promega)	2.0 μL

Taq polimerasa (5 U/ μ L) (Promega)

0.1 μ L

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Hybaid Omn-E (Labnet)) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización	95 °C	2 min	} 35 ciclos
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Adición de iniciadores	60 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	

Electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa 1.5 %

1. Se pesaron 0.38 g de agarosa (Gibco BRL) y se disolvieron en 25 mL de Buffer SB 1 X (ver apéndice) y 2 μ L de bromuro de etidio.
2. La muestra se mezcló con buffer de carga (ver apéndice) y se cargó en los pozos.
3. Se hizo una electroforesis en un gel de agarosa 1.5% a 120 V en una cámara (MINNIE Submarine Agarose Gel Unit Model HE33, Hoefer Scientific Instruments), con una fuente de poder (Power Pac 200; Biorad)
4. El gel se visualizó en el transiluminador de UV (FOTO/UV 21; Fotodyne).

Preparación del pGem-T Easy con extremos con timinas para clonar fragmentos de PCR

Como primera opción se pensó en clonar los fragmentos recuperados en el plásmido pGem-T Easy (Promega) (Figura 3). Este vector por tener una timina en cada uno de sus extremos, es muy útil para clonar productos de PCR, los cuales debido a la actividad de polimerización inespecífica que presenta la *Taq* polimerasa al final de la síntesis, tienen adeninas en los extremos 3' de la molécula amplificada.

Sin embargo, debido a que se observaron una gran cantidad de fragmentos que modifican su expresión en respuesta a cadmio en los geles de AFLP, se decidió prepararlo en el laboratorio empleando una técnica reportada por Hadjeb (1996).

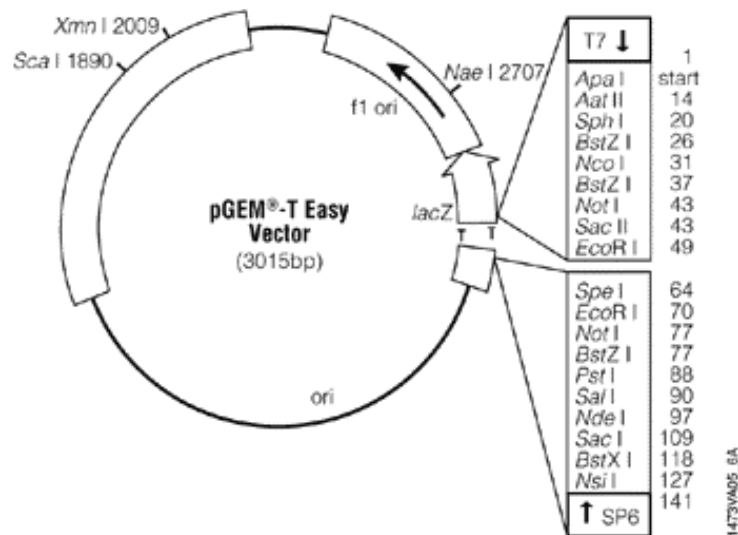


Figura 3. pGem-T Easy (Promega). Este vector es un plásmido linealizado que fue cortado con *EcoRV* en la base 60 y contiene una timina en cada uno de sus extremos 3'.

La preparación de este plásmido se inició con la ligación de una alícuota del kit comercial, ya que debido a que algunas de las moléculas del plásmido en el kit comercial no tienen las timinas, es posible re-circularizar correctamente el plásmido con una ligación. Con esta reacción se transformaron bacterias, a partir de las cuales se preparó una gran cantidad de plásmido con su sitio *EcoRV* reconstituido en la base 60.

A) Reacción de ligación de la alícuota de pGem-T Easy (Promega) (Hadjeb,1996)

La mezcla de reacción contenía lo siguiente:

Agua	44.0 µL
Buffer de reacción de Ligasa (Invitrogen)	4.0 µL
Alícuota pGem T-Easy (Promega)	1.0 µL
T4 DNA Ligasa (1 U/µL)(Invitrogen)	1.0 µL

Incubar a 16 °C durante 16 h.

B) Preparación de células competentes (Hanahan, 1983)

1. Se sembró una colonia aislada de *E. coli* DH5 α en 50 mL de medio LB y se incubó con agitación (Lab-Line Incubator Shaker) durante 12 horas a 37 °C.
2. Se tomó 1 mL del cultivo y se resembró en 49 mL de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una D.O. a 600 nm, de 0.6.
3. Las células se centrifugaron a 1,400 x g (Eppendorf Centrifuge 5417C) en tubos estériles y se resuspendieron en 25 mL de CaCl₂ 0.05 M. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 min.
4. Las células se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5417C) a 1,400 x g y se resuspendieron en 1 mL CaCl₂ 0.05 M.
5. Se hicieron alícuotas de 100 μ L con glicerol al 15% y se congelaron inmediatamente con N₂ líquido. Se guardan a -70 °C hasta su uso.

C) Transformación y selección de bacterias transformadas por α -complementación (Horwitz *et al.*, 1964; Ullmann *et al.*, 1967; Hanahan, 1983)

1. Se añadieron 10 μ L de la reacción de ligación a 100 μ L de *E. coli* DH5 α competentes y se incubaron en hielo durante 30 min.
2. Se sacaron los tubos del hielo y se incubaron a 42 °C durante 3 min e inmediatamente se pasaron a hielo por un min.
3. Se añadieron cuatro volúmenes de medio SOC (ver apéndice) a las células y se incubaron a 37 °C durante dos horas.
4. Se centrifugaron a 15,000 x g durante 30 s, se tiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de medio LB. Se resuspendieron las células y se sembraron en cajas con agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) al cual se le añadieron X-Gal e IPTG.
5. Se incubó a 37 °C por 12 h (Thelco Laboratory Incubator).

D) Extracción del plásmido por lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979; Ish-Horowicz and Burke, 1981)

1. Se seleccionó una colonia azul del medio anterior. Se inoculó en 5 mL de medio LB.
2. Se incubó a 37 °C durante 12 h
3. Se centrifugó 20 s a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante.
4. Se resuspendió la pastilla en 100 µL de GTE (ver apéndice) y se incubó 5 min a temperatura ambiente.
5. Se añadieron 200 µL de la solución SDS/ NaOH (ver apéndice), se mezcló y se dejó en hielo por cinco minutos.
6. Se agregaron 150 µL de acetato de potasio 3 M, pH 5.2 y se mezcló. Se incubó 5 min en hielo.
7. Se centrifugó 3 min a máxima velocidad.
8. Se pasó el sobrenadante a otro tubo y se añadieron 0.8 mL de etanol absoluto a -20 °C y se incubó a -20° C por una hora.
9. Se centrifugó a 15,000 x g (Denville Micro 240 A), 1 min a temperatura ambiente.
10. Se eliminó el sobrenadante y se enjuagó la pastilla con etanol al 70%.
11. Se resuspendió el DNA en 40 µL de agua.

D) Reacción de restricción

a) La mezcla de reacción contenía lo siguiente:

Agua	55.0 µL
Buffer de reacción 10 X (Promega)	10.0 µL
DNA	33.0 µL (≈10 µg)
BSA acetilada 10 µg/mL (Promega)	1.0 µL
<i>EcoRV</i> (10 U/µL) (Promega)	1.0 µL

Incubar a 37 °C durante toda la noche.

b) Extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol (Brawerman *et al.*, 1972).

1. Se agregó un volumen igual al de la muestra (mínimo 100 μL) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a máxima velocidad por 15 s. El fenol estaba saturado con el buffer Tris-HCl equilibrado a pH 7.4 (Invitrogen).
2. Se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se agregó $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M, dos volúmenes de etanol absoluto helado y se incubó 2 horas a -20°C .
3. Se centrifugó 5 min a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante.
4. Se agregó 1 mL de etanol 70% y se mezcló. Se centrifugó 5 min a máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante.
5. Se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en el volumen mínimo de agua.

E) Reacción de adición de timinas.

a) La mezcla de reacción contenía lo siguiente:

DNA en agua	84.0 μL
dTTP 100 mM (Promega)	2.0 μL
MgCl ₂ 50 mM (Promega)	3.0 μL
Buffer de reacción 10 X (Promega)	10.0 μL
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ μL) (Promega)	1.0 μL

Se incubó a 72°C durante toda la noche.

b) Extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol.

F) Reacción de Ligación (Sgaramella and Khorana, 1972; Sgaramella and Ehrlich, 1978).

a) La mezcla de reacción contenía:

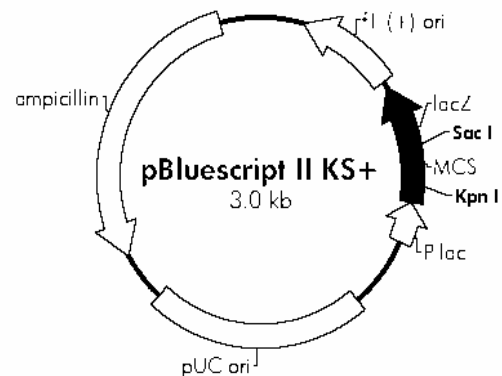
Buffer de reacción de Ligasa 5 X(Invitrogen)	10.0 μL
Plásmido en agua	30.0 μL
ATP 10 mM	5.0 μL
T4 DNA Ligasa (1 U/ μL) (Invitrogen)	5.0 μL
Se incubó a 14°C durante 16 h (Tropicooler, Boekel)	

- b) Extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y precipitación con etanol.
- c) Electroforesis en gel de agarosa 0.9% a 120 V
- d) Extracción de bandas del gel con el kit “Concert Rapid Gel Extraction System” siguiendo las especificaciones del fabricante (Life Technologies).

Nueva estrategia

Clonación del cDNA recuperado en el vector pBS KS II

f1 (+) origin 135–441
 β-galactosidase α-fragment 460–816
 multiple cloning site 653–760
 lac promoter 817–938
 pUC origin 1158–1825
 ampicillin resistance (bla) ORF 1976–2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)

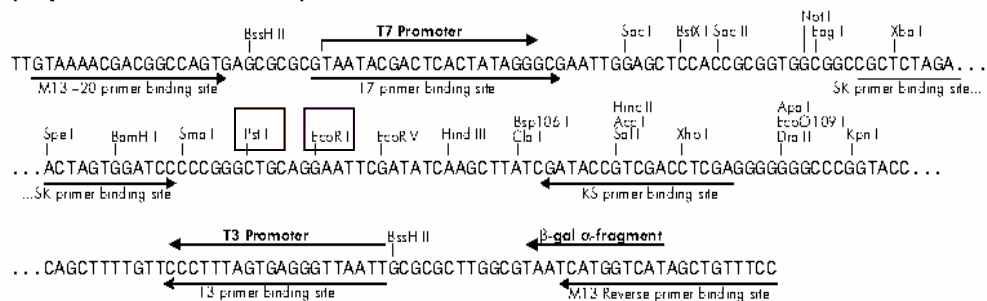


Figura 4. Vector Bluescript KS II. Este vector contiene los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *PstI* los cuales también se encuentran en los insertos a clonar.

a) Digestión de plásmido y de los insertos con *Pst*I

Buffer React2 10 X (Invitrogen)	20 µL
pBS	2 µL ($\approx$ 2 µg)
<i>Pst</i> I (Invitrogen)	4 µL
Agua	174 µL

Se incubó a 37 °C por 2.5 h.

En un gel de agarosa al 1% se verifica que la reacción de digestión sea completa.

Posteriormente se hace una extracción fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y una precipitación del DNA con etanol al 100% y acetato de amonio 10 M. Se resuspende en 174 µL de agua. Se pone la reacción de digestión con *Eco*RI.

Buffer H 10 X (Promega)	20 µL
BSA Acetilada 10 µg/mL (Promega)	2 µL
DNA en agua	174 µL
<i>Eco</i> RI (Promega)	4 µL

Se incubó a 37 °C por 2.5 h.

Se corre en un gel de agarosa al 1% y se extrae del gel.

b) Ligación de los insertos al plásmido.

c) Transformación de células de *E.coli* DH5 α

Identificación de la presencia de inserto por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7.

1. Se inoculó una colonia blanca en 100 µL de medio LB con ampicilina y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación.
2. Se tomaron 2 µL de este cultivo y se mezclaron con lo siguiente:

Agua	11.97 µL
Iniciador T3 (16.40 pmol/µL)	1.21 µL
Iniciador T7 (16.32 pmol/µL)	1.22 µL
dNTP's 10 mM (Promega)	0.8 µL

MgCl ₂ 50 mM (Altaenzymes)	0.6 µL
Buffer de reacción 10X (Altaenzymes)	2 µL
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/µL) (Altaenzymes)	0.2 µL

La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización:	95 °C	5 min	} 35 ciclos
Desnaturalización:	95 °C	2 min	
Adición de iniciadores:	56 °C	1.5 min	
Extensión	72 °C	1.5 min	
Extensión	72 °C	5 min	

3. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% para verificar la amplificación.
4. A aquellas colonias de las cuales se obtuvieron insertos del tamaño esperado, se les agregó glicerol hasta quedar a una concentración del 15% y se almacenaron a –70 °C.

Verificando los productos de amplificación en un gel de agarosa se detectó que la preparación de iniciadores T3 y T7 estaba contaminada por lo que se decidió utilizar otros iniciadores que tuvieran un sitio en pBS KS II y que se contara con ellos en el laboratorio. Se decidió utilizar Reverse y Forward M13.

Identificación de la presencia de inserto por PCR empleando los iniciadores Reverse y Forward M13

Se tuvieron que ajustar las condiciones para la reacción de PCR con estos iniciadores. Se llevaron a cabo diferentes combinaciones de variables dentro de las que se consideraron temperaturas de anillamiento, concentración de iniciadores, de nucleótidos y de MgCl₂. Las condiciones adecuadas en la reacción fueron:

- Concentración de cada iniciador: 1 pmol/µL
- 2.5 mM de MgCl₂

- 20 mM de cada deoxinucleótido
 - Temperatura de anillamiento: 51 °C
1. Se preparó una parte de la mezcla de reacción en la cual se agregó lo siguiente:

Agua	13.7 µL
Iniciador M13 (18.14 pmol/µL)	1.1 µL
Iniciador Reverse (16.3 pmol/µL)	1.2 µL
MgCl ₂ 50 mM (Altaenzymes)	1.0 µL
Buffer de reacción 10 X (Altaenzymes)	2.0 µL
 2. Se tomó la colonia de interés con un palillo estéril y se estrió en una caja. Lo que quedó de la colonia en el palillo se resuspendió en la mezcla para la reacción de PCR preparada.
 3. Se calentó a 95 °C durante 10 minutos. Se dejó enfriar unos minutos para que al agregar la enzima no se desnaturalizara y los dNTP's no se degradaran.
 4. Se agregaron 0.8 µL de dNTPs 10 mM y 0.2 µL de *Taq* polimerasa. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización:	95 °C	5 min	
Desnaturalización:	95 °C	2 min	
Adición de iniciadores	51 °C	1.5 min	} 35 ciclos
Extensión	72 °C	1.5 min	
Extensión	72 °C	5 min	
 5. Se verificó la amplificación en un gel de agarosa 2%.

Obtención de los insertos clonados mediante reacciones de restricción

1. Se extrajo el plásmido con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante.
2. Se llevó a cabo la restricción del plásmido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*.
3. Verificar la restricción en un gel de agarosa 2%.

Clonación de los fragmentos restringidos en el vector pGem-T Easy (Promega)

Se aislaron del gel de agarosa cada uno de los fragmentos restringidos, por separado, empleando el Qiagen II Gel Extraction Kit (Qiagen).

1. Se llevó a cabo la restricción del pGem-T Easy con las enzimas *EcoRI* y *PstI* de manera similar al pBS KS II.
2. Se calculó la cantidad de inserto que se debía agregar a la reacción de ligación tomando en cuenta una relación 3:1 vector: inserto con la siguiente fórmula (Promega, 2003):

$$\frac{\text{ng de vector} * \text{kb del inserto}}{\text{kb del vector}} * \text{radio molar inserto : vector}$$

3. Se incubó la mezcla de reacción de ligación 2 h a 23 °C.
4. Se tomaron 10 µL de la reacción de ligación y se transformaron 50 µL de células competentes *E. coli* XL1-Blue.
5. Se seleccionaron las colonias transformadas con el vector con inserto por alfa complementación.

Identificación de la presencia de inserto con los iniciadores T7 y Reverse

1. Se preparó una parte de la mezcla de reacción en la cual se agregó lo siguiente:

Agua	13.7 µL
Iniciador T7 (16.3 pmol/µL)	1.2 µL
Iniciador Reverse (16.3 pmol/µL)	1.2 µL
MgCl ₂ 50mM (Altaenzymes)	1.0 µL
Buffer de reacción 10 X (Altaenzymes)	2.0 µL

2. Se siguió el mismo procedimiento de la identificación de inserto con los iniciadores M13 Forward y Reverse.

Secuenciación y análisis de los fragmentos obtenidos

Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, por el método *Taq* FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Las secuencias fueron analizadas y comparadas con los registros en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cDNA-AFLP

Se realizaron 105 reacciones de amplificación por PCR de cDNAs de *Euglena gracilis* cultivadas en ausencia y en presencia de 170 μM de Cd^{2+} utilizando 7 iniciadores *EcoRI* y 15 *MseI* (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores selectivos utilizados para la amplificación de cDNA de *E. gracilis* cultivada en presencia y ausencia de Cd^{2+} .

<i>EcoRI</i> ^{33P}	<i>MseI</i>
44	66-81
46	66-81
47	66-81
48	66-81
49	66-81
54	66-81
55	66-81

Se obtuvieron 30 bandas diferenciales incluyendo bandas que aparecen, aumentan o desaparecen en presencia de Cd^{2+} . En la Figura 5 se presenta un ejemplo de un gel AFLP mostrando algunas de las bandas con expresión diferencial obtenidas, las cuales se extrajeron del gel y se amplificaron.

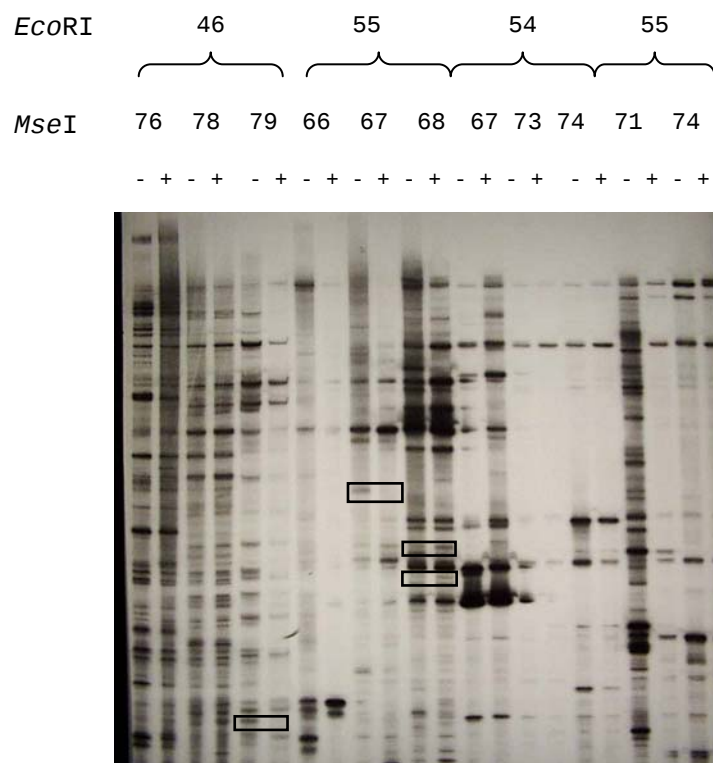


Figura 5. Autorradiografía de AFLPs. Señales de AFLP obtenidas en presencia (+) y ausencia (-) de Cd^{2+} . Algunas bandas diferenciales se muestran en un recuadro. Las combinaciones de los iniciadores utilizados se encuentran en la parte superior.

Amplificación de los fragmentos de genes que se expresan diferencialmente en presencia de Cd^{2+}

Los fragmentos de cDNA que presentaban una expresión diferencial fueron recortados y eluidos del gel de poliacrilamida (Figura 6A y 6C) y amplificadas por PCR (Figura 6B) con los iniciadores universales ML39 que contenía un sitio de restricción para *EcoRI* y ML40 que contenía un sitio de restricción para la enzima *Pst* I (Ver apéndice). De 30 bandas con expresión diferencial, se lograron amplificar alrededor de 20 bandas.

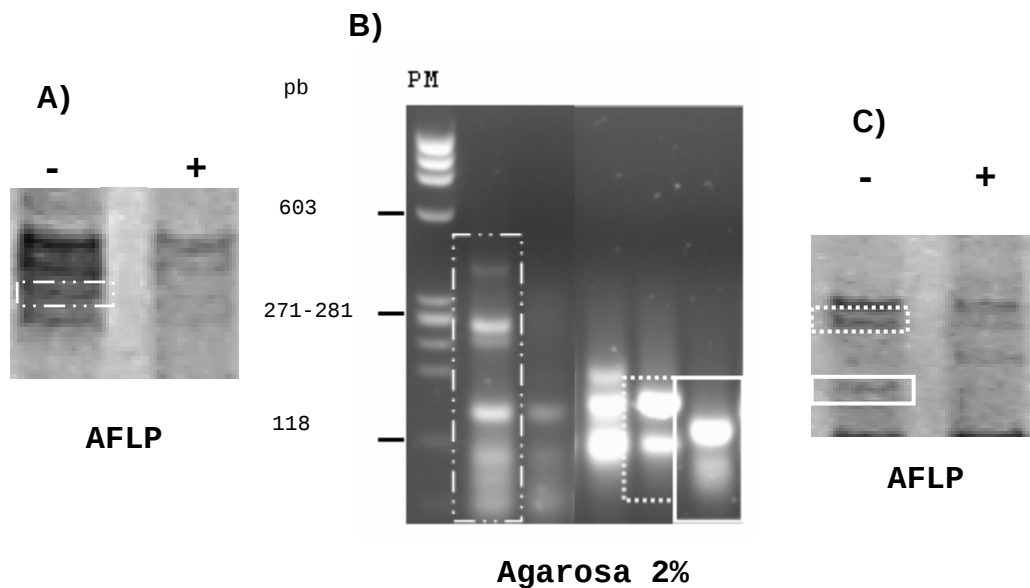


Figura 6. Amplificación de bandas que se expresan diferencialmente en presencia (+) de Cd^{2+} . A) y C) Autorradiografía de geles de AFLP; B) Gel de agarosa 2% con los productos de amplificación de las bandas diferenciales del AFLP. Cada banda encerrada en un recuadro del gel de agarosa, proviene de la banda del gel de AFLP encerrada en un recuadro del mismo formato.

Se esperaba obtener un solo producto amplificado por cada fragmento de cDNA eluido del gel de poliacrilamida pero en la mayoría de los casos se obtuvo más de una banda (Figura 6B). En un inicio se pensó que alguno de los reactivos empleados estaba contaminado, inclusive se mandaron sintetizar nuevos iniciadores pero los resultados fueron los mismos. Otra razón podía ser que la temperatura de anillamiento de los iniciadores fuera baja, lo cual favorecería la iniciación de la amplificación de forma inespecífica, así que se probaron varias temperaturas, obteniéndose resultados semejantes con todas ellas. Ante la imposibilidad de saber cual de las bandas correspondía a la que se observaba diferencialmente expresada en los geles AFLP, se decidió que se iban a clonar todas las bandas obtenidas.

Clonación de los fragmentos de genes amplificados

A. Preparación del pGem-T Easy con timinas, para clonar los productos de PCR

Se obtuvieron 289 μg de plásmido pGEM-T Easy de la maxiprep realizada. Se cortaron 10 μg de plásmido y se agregaron las timinas como fue descrito en materiales y métodos. El plásmido que contenía las timinas en el extremo 3', el cual pudo identificarse por no haber sido re-ligado en la reacción de ligación se extrajo del gel (Figura 7, carriles 5, 6 y 7 recuadro negro).

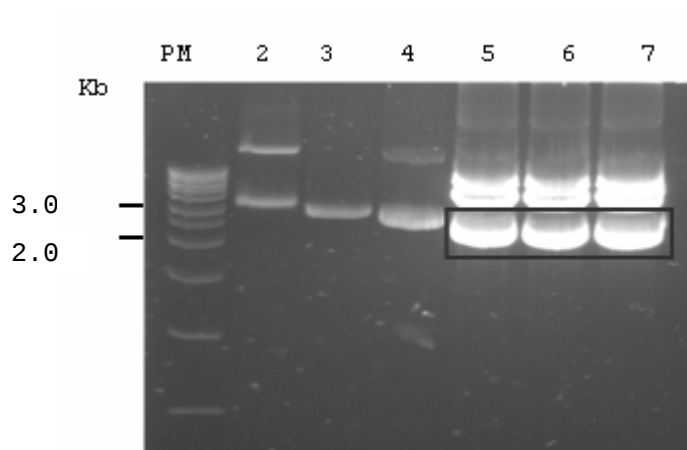


Figura 7. Preparación del pGem-T Easy con timinas. Carril 2: plásmido sin cortar; carril 3: plásmido cortado con *EcoRV*; carril 4: plásmido con timinas; carriles 5, 6 y 7: plásmido con timinas y religado. La banda encerrada en el recuadro corresponde al vector sin religar y fue la banda que se extrajo del gel con el kit Rapid Gel Extraction System (Marligen).

El rendimiento de la reacción fue bajo ya que si se observa la Figura 7, carriles 5, 6 y 7 la cantidad de plásmido con timinas es aproximadamente la misma de aquel que se religó. Aún así el plásmido extraído del gel fue utilizado en las ligaciones de los insertos amplificados. Sin embargo, no se produjo ninguna clonación exitosa. Debido a esto se intentó la clonación empleando el kit pGEM-T Easy comercial, para cuando menos ligar algunos de los fragmentos, pero tampoco fue posible la clonación exitosa. Suponemos que esto se debió a que no se supo manejar el plásmido ni los insertos ya que, por la información que después pudimos obtener, parece ser que las adeninas en los extremos del producto amplificado de PCR se desprenden fácilmente y podría ser que se perdieran durante el proceso de purificación del inserto, el cual se

hacía por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con etanol. Cabe la posibilidad de que ésta haya sido también la causa por la cual la clonación en el pGem-T preparado en el laboratorio no fuera exitosa.

B. Obtención de pBS KS II

Por lo anterior, se decidió realizar las clonaciones de los fragmentos con expresión diferencial amplificados extraídos de los geles de AFLP, en el plásmido Bluescript KS II, en los sitios de restricción presentes en los iniciadores, con los que se prepararon los insertos amplificados (*Pst*I y *Eco*RI). Para esto se realizaron reacciones de restricción consecutivas con las enzimas *Pst*I y *Eco*RI tanto de los fragmentos diferenciales como de Bluescript (Figura 8).

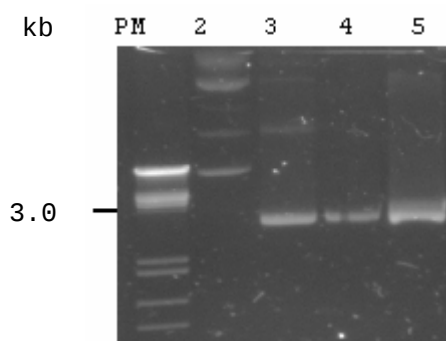


Figura 8. Obtención de pBS KS II. Carril 2: Bluescript; carril 3 Bluescript cortado con *Pst*I; carriles 4 y 5: Bluescript cortado con *Eco*RI y *Pst*I, el cual fue extraído del gel con el kit Rapid Gel Extraction System (Marligen).

Se llevaron a cabo las ligaciones de los insertos al vector pBS KS II restringido y se transformaron células de *E. coli* XL1 Blue.

Verificación de la presencia de insertos clonados

La selección de colonias con inserto se hizo por medio de α -complementación, es decir, escogiendo las colonias blancas las cuales, debido a la presencia del inserto, no son capaces producir la región amino de la proteína β - galactosidasa, por lo que no pueden romper el sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido) el cual otorga un color azul a las colonias que pueden romperlo (Horwitz *et al.*, 1964; Ullmann *et al.*, 1967; Sambrook *et al.*, 1990).

Posteriormente se verificó la presencia del inserto por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7. Para determinar que existía un inserto clonado se consideró que los iniciadores debían dar un producto de amplificación de 165 pb que correspondía al sitio múltiple de clonación, sin ningún inserto clonado. Por lo tanto, la amplificación de una clona conteniendo inserto iba a tener un tamaño correspondiente a la suma del tamaño de éste, más 165 pb.

En la Figura 9 se puede observar que los fragmentos 23 y 33 (Panel A) tienen un tamaño de aproximadamente 196 pb y al ser amplificadas con los iniciadores T3 y T7 (Panel B) tienen un tamaño aproximado de 310 pb que es la suma del tamaño del inserto más el tamaño del sitio múltiple de clonación.

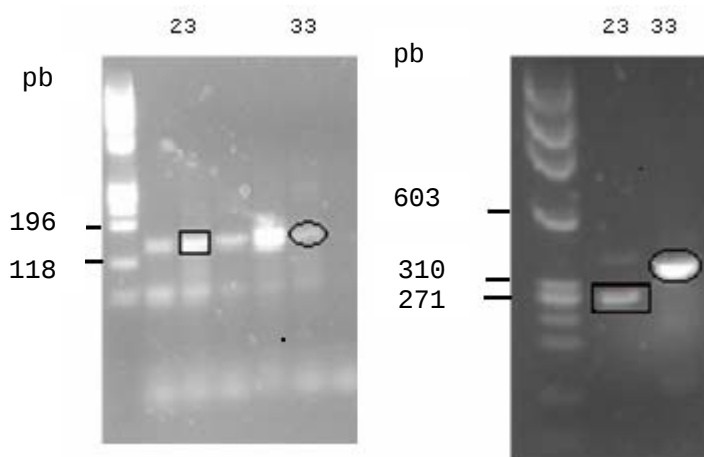


Figura 9. Verificación de la presencia de inserto clonado en pBS KS II por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7. A) Gel de agarosa 2% con los productos amplificados del cDNA extraído del gel de AFLP; B) Gel de agarosa 2% con la amplificación de los insertos con T3 y T7. El producto amplificado del recuadro del Panel B proviene de la amplificación del recuadro de la misma forma del panel A.

Se lograron clonar 4 bandas diferenciales. Estas clonas fueron almacenadas en glicerol al 15% a -70 °C para luego hacer minipreps y enviar a secuenciar.

Preparación de los fragmentos de genes que se expresan diferencialmente en presencia de Cd^{2+} para su secuenciación

Se sembraron las células que contenían los fragmentos clonados con el fin de obtener los plásmidos recombinantes. Estos plásmidos contenían los fragmentos 23 y 33 que desaparecen en presencia de Cd^{2+} y las clonas 1, 8 y 9, que aparecen en presencia de Cd^{2+} . Para verificar que estos plásmidos contenían los insertos clonados, provenientes de las bandas re-amplificadas de los geles AFLP, se hicieron ensayos de restricción con las enzimas *EcoRI* y *PstI* (sitios en los que los fragmentos de cDNA fueron clonados), así como amplificación de los insertos clonados por PCR empleando los iniciadores Forward y Reverse.

A. Análisis por ensayos de restricción con *PstI* y *EcoRI*

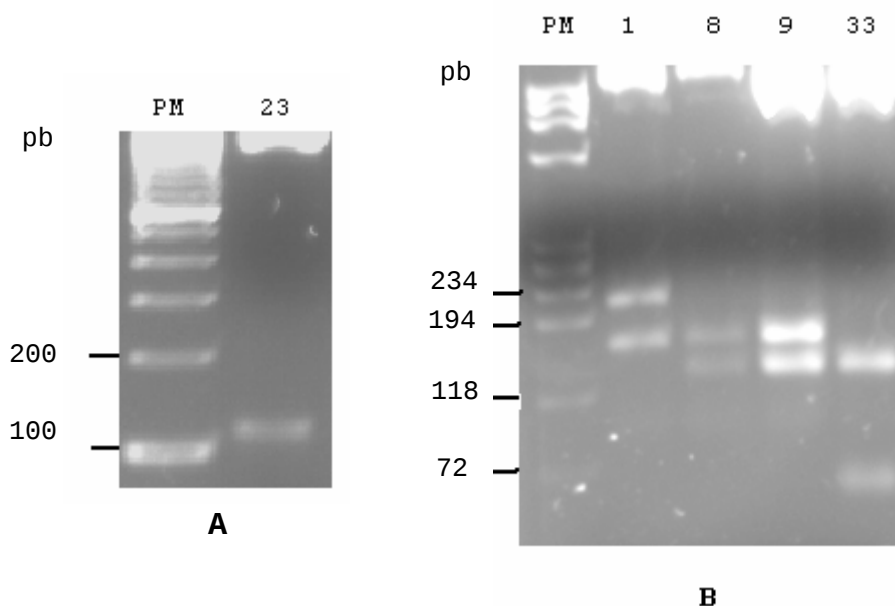


Figura 10. Obtención de insertos clonados mediante la restricción de pBS KS II con *EcoRI* y *PstI*. A y B: geles de agarosa 2% con los productos obtenidos por la restricción de pBS KS II.

Al llevar a cabo estos ensayos se observó que los plásmidos contenían dos insertos cada uno. Este resultado era algo que no se esperaba ya que, debido a que se

habían digerido los fragmentos con dos enzimas de restricción, la inserción del fragmento debía ser direccional en los sitios complementarios *EcoRI* y *PstI* de pBS. Inicialmente se pensó que quizá la colonia de la que se había partido para hacer la preparación de plásmido podría no provenir de una única célula bacteriana. Por lo que se repitió la selección varias veces, tomando especial cuidado en elegir colonias perfectamente separadas que fueron originadas de una única célula bacteriana. Sin embargo, siempre se obtenían dos insertos.

La clona 23, la cual presentó una sola banda en el ensayo de restricción, se mandó secuenciar.

B. Por PCR

Se buscó verificar la presencia de insertos con los iniciadores T3 y T7 pero se encontraban contaminados. Debido a esto se utilizaron otros iniciadores, Forward y Reverse. El producto de amplificación obtenido de una colonia transformada con un plásmido sin inserto debía tener un tamaño aproximado de 234 pb.

Se verificó la presencia de inserto de las mismas colonias que habían presentado dos bandas en la reacción de restricción (Figura 11).

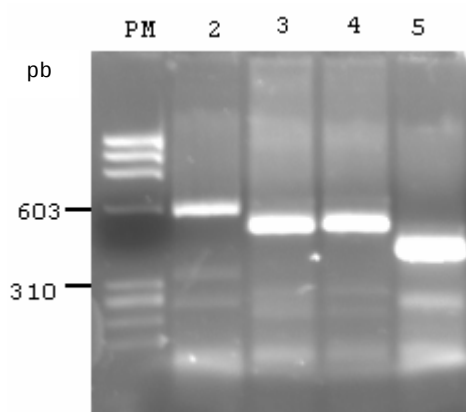


Figura 11. Obtención de insertos mediante PCR con los iniciadores Forward y Reverse. Carril 2-5: PCR de la clonas 1, 8, 9 y 33 respectivamente de la Figura 9 Panel B. Las bandas de abajo corresponden a una contaminación en la reacción.

Los resultados mostraron que, aunque por ensayos de restricción se obtenían dos insertos (Figura 10), por PCR solo se obtenía una sola banda, de un tamaño que no correspondía a la suma del tamaño de un inserto obtenido por reacciones de restricción, más el tamaño del fragmento entre los iniciadores de una colonia sin inserto (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos por ensayos de restricción y por PCR utilizando los iniciadores Forward y Reverse.

Clona	Tamaño de inserto determinado por ensayo de restricción	Tamaño esperado + 234 pb (tamaño del sitio múltiple de clonación)	Tamaño obtenido por PCR
1	234 pb 190 pb	468 pb 424 pb	una banda 603 pb
8	190 pb 150 pb	424 pb 384 pb	una banda de aprox. 550 pb
9	190 pb 150 pb	424 pb 384 pb	una banda de aprox. 550 pb
33	150 pb 72 pb	384 pb 306 pb	una banda de aprox. 450 pb

Los resultados observados sugieren que los insertos fueron ligados en “tándem” en el vector pBS KSII, lo que explica por que la reacción de PCR sólo daba un producto de amplificación. La suma de los tamaños de los insertos restringidos más las 234 pb que se encuentran entre los iniciadores corresponde aproximadamente al tamaño obtenidos por PCR.

Esta ligación en “tándem” sólo pudo haber ocurrido si el plásmido estuviera cortado en un único sitio de restricción y no en dos (*Pst*I y *Eco*RI), como se planteó realizar. Sin embargo, dado que estos sitios de restricción se encuentran adyacentes en el sitio múltiple de clonación, podría ser posible que *Eco*RI no hubiera cortado ya que a pesar de que se comprobó, en ensayos independientes, que cada una de ellas era activa, y que *Eco*RI solo necesitaba 3 nt para sostenerse y cortar, la restricción pudo no haber sido eficiente. Esto produjo pBS cortado solamente con *Pst*I pero no con *Eco*RI. Esta falta de corte de *Eco*RI no fue posible observarlo en el gel de electroforesis después de la segunda restricción porque la diferencia no es notable. Por otro lado, los insertos si fueron digeridos por las dos enzimas en los dos sitios correspondientes. Esta restricción del plásmido en solo un sitio determinó que los insertos se unieran en sus sitios *Eco*RI formando el tándem invertido con los dos sitios *Pst*I en los extremos. Esta molécula fue la que se ligó en el único sitio restringido del vector, el sitio *Pst*I.

Para eliminar este problema se decidió aislar del gel los fragmentos obtenidos por ensayo de restricción y ligarlos en otro vector en el que se tuvieran los sitios *Pst*I y *Eco*RI suficientemente separados como para que pudieran ser restringidos adecuadamente. Se eligió el pGEM que se había preparado inicialmente. Con el producto de la ligación se transformaron células *E. coli* XL1 Blue. Las colonias con inserto se seleccionaron por α -complementación y se comprobó la presencia de inserto por PCR utilizando los iniciadores Reverse y T7 que producen una banda de 310 pb a partir de un vector sin inserto (Figura 12).

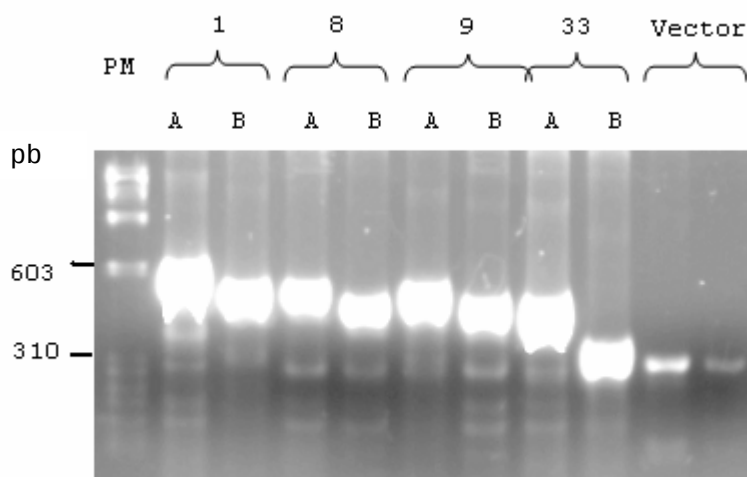


Figura 12. Amplificación por PCR con los iniciadores Reverse y T7 de los insertos clonados por separado. Los números en la parte superior indican los insertos clonados. Las letras representan las diferentes bandas obtenidas en cada preparación.

Los tamaños de cada uno de los insertos corresponden a la suma de su tamaño más 310 pb que es el producto de la amplificación de un plásmido sin inserto (vector).

Las colonias que contenían inserto fueron sembradas en medio líquido selectivo y se hizo una minipreparación para obtener el plásmido y mandarlo secuenciar. El inserto más pequeño de la clona 33 no fue secuenciado ya que su tamaño era de 72 pb del cual 54 pb eran solo los iniciadores universales con los que fue amplificado.

Secuenciación y análisis

Los insertos fueron secuenciados y analizados con el programa tBlastx y se comparó el resultado con las secuencias registradas en el Banco de Genes (GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). También se hizo un alineamiento utilizando el método Clustal W en el programa Workbench (<http://www.workbench.sdsc.edu>) para ver qué tan parecidas eran las secuencias encontradas traducidas, con las secuencias de la proteína contra la que fue identificada de varios organismos. Con este análisis se obtuvo la siguiente información:

a. Clona 1A de 169 pb

Este cDNA (Figura 13) que aumenta su expresión en presencia de Cd^{2+} tiene una identidad del 100% con la Triosa Fosfato Isomerasa (TPI) citosólica de *Euglena gracilis* (Figura 14). La triosa fosfato isomerasa (TPI) participa en la glucólisis catalizando la formación de gliceraldehído-3-fosfato a partir de dihidroxiacetona fosfato. Este cDNA ya había sido identificado previamente en un trabajo similar realizado en nuestro laboratorio (Hernández-Navarro, 2003) por lo que el haber obtenido nuevamente este resultado puede considerarse una confirmación del resultado anterior. En ese trabajo se encontró, mediante la técnica de AFLP, y posteriormente corroborado por Northern Blot, que los transcritos de la TPI aumentaban su expresión en respuesta a 3, 6 y 9 hrs de exposición a Cd^{2+} (Hernández-Navarro, 2003). En la literatura no hay reportes que indiquen el efecto del Cd^{2+} en la expresión de la TPI, aunque se ha visto que esta enzima incrementa su expresión en presencia de otro tipo de estrés como son la hipoxia, temperaturas altas, estrés osmótico y desecación (Minhas *et al.*, 1999; Yamaji *et al.*, 2004; Dihazi *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha reportado que en *Saccharomyces cerevisiae* los genes de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, como la enolasa y la hexocinasa, aumentan su expresión en presencia de H_2O_2 (Godon *et al.*, 1998) y de Cd^{2+} (Vido *et al.*, 2001). Esto nos lleva a pensar que no sería extraño que la TPI también estuviera modificando su expresión en presencia de Cd^{2+} . Godon *et al.* (1998) explican que el estrés por H_2O_2 modifica la expresión de varias enzimas del

metabolismo de carbohidratos probablemente para regenerar NADPH el cual es un cofactor de enzimas relacionadas con respuesta a estrés oxidativo como la glutatión reductasa. Se sabe que el Cd^{2+} , al igual que el H_2O_2 , también provoca estrés oxidativo lo que permite sugerir que esta enzima del metabolismo de carbohidratos, la TPI, podría modificar su expresión en presencia de Cd^{2+} para proporcionar metabolitos que ayuden a contender con el estrés oxidativo ocasionado por el metal.

```
AACAAGGGTCCTTCGGTGGCCGATGCTGACGTTGAGGTTGTAATTGGATGCCCATTTG
TTTATGCCGATTACACCAGAGAAAAGTTGAGACAAGATTGGGCATTGTCTGTTCAAAA
CTGTTGGATCGGGAAGGGTGGTGCCTTCACTGGTGAGATTTACAGCGGAGATGA
```

Figura 13. Secuencia nucleotídica de la clona 1A. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

Clona 1A	NKGPSVADADVEVVIGCPFVYADYTREKLQDWALSVQNCWIG
Euglena gracilis (cit.)	NKGPSVADADVEVVIGCPFVYADYTREKLQDWALSVQNCWIG
<i>Euglena longa</i> (cit.)	NKGPSVADADVEVVIGVPFVYADFTQEKLKDWKLSVQNCWIG
<i>Euglena gracilis</i> (clo.)	NAGESTIGSGVDVVVAPPMLYGDYARGLLRSDFGVAFQNCWVG
<i>Spinacia oleracea</i> (clo.)	N--SATLEADVDDVVAPPFVYIDQVKSSLTGRVEISAQNCWIG
Clona 1A	KGGAFTGEISAEM
<i>Euglena gracilis</i> (cit.)	KGGAFTGEISAEM
Euglena longa (cit.)	KGGAFTGEVSAEM
<i>Euglena gracilis</i> (clo.)	GNGAFTGEVSADM
<i>Spinacia oleracea</i> (clo.)	KGGAFTGEISVEQ

Figura 14. Alineamiento de la TPI (Clona 1A). Se presenta solo la parte de la secuencia donde alinea el fragmento obtenido. Cit: citoplásmica; Clo: cloroplástica.

b. Clona 1B de 115 pb

Este cDNA (Figura 15), el cual también aumenta su expresión en presencia de Cd^{2+} , tiene un 36% de identidad con una proteína de procesamiento de rRNA con dominios WD40, de *Debaromyces hansenii* (Figura 16). No existen reportes acerca de la

inducción de la expresión de estas proteínas en presencia de Cd^{2+} . Sin embargo, un estudio en células de hámster resistente a calor reportó que la proteína de procesamiento de rRNA nucleolar (snoRNA) U14, la cual es codificada por uno de los intrones del gen de la proteína HSC 70 (forma constitutiva de la proteína de respuesta a estrés por calor HSP 70), es inducida por calor junto con la HSC 70, al parecer para reparar complejos moleculares que participan en la síntesis y el procesamiento de rRNA que fueron dañados por el calor (Chen *et al.*, 2002). La proteína U14 no tiene dominios WD40, sin embargo, tiene función parecida a la de la proteína encontrada lo que sugiere que este tipo de proteínas pueden modificar su expresión ante el estrés ambiental. Además Hernández-Navarro (2003) encontró que una HSP 70 se expresaba diferencialmente en presencia de Cd^{2+} , aunque no pudo corroborarlo por Northern Blot. Sin embargo, ese resultado junto con el obtenido en este trabajo acerca del aumento en la expresión de esta proteína de procesamiento de RNA ribosomal en presencia de Cd^{2+} , lleva a pensar que tal vez el estrés por Cd^{2+} provoca el mismo efecto sobre estas proteínas que el estrés por calor.

```
AACATAATGCGGGTATGCAAGGCCACCGTTGCAGTCTGGGAGATCTTGA
GGTCCACCACCGGGTTGGGGCTGTGGTACGAGTGGACCGCCTCGTACTTG
CGAAGGTCCCACACC
```

Figura 15. Secuencia nucleotídica de la clona 1B. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

Clona 1B	VWDLRKYEA VHSYHSPNPVVDLKISQTATVGLAY-PHYV
<i>Debaromyces hansenii</i>	IWDLRK FKEID SYTPTPASSLDISDTGLLSVSWGPHVT
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	VWDLR TYKELHSYYTPTPAQRLTSLDRGLLAVGWGPHAT

Figura 16. Alineación de la proteína de procesamiento de rRNA con dominios WD40 (Clona 1B). Solo se presenta el fragmento de secuencia donde alineó.

c. Clonas 8A y 9A de 117 pb

Este cDNA (Figura 17) que aumenta su expresión en presencia de Cd^{2+} tiene una secuencia con 70% de identidad con una proteína S23 de *Xenopus laevis* (Figura 18) la cual se encuentra formando la subunidad 40S del ribosoma de organismos eucariontes (similar a la S12), la cual parece estar involucrada en la iniciación de la traducción (McMahon y Landau, 1984; Kitaoka *et al.*, 1994; Nelson y Cox, 2000). Un análisis de expresión diferencial en *Caenorhabditis elegans*, un estudio proteómico en *Saccharomyes cerevisiae* y un estudio de AFLP en *Brassica juncea* reportan un aumento en la expresión de proteínas ribosomales en presencia de Cd^{2+} (Liao *et al.*, 1998; Vido *et al.*, 2001; Fusco *et al.*, 2005). Sin embargo, un análisis transcriptómico en el hongo *Paxillus involutus* reporta que la proteína ribosomal L8, que pertenece a la subunidad 60S, similar a la de *S. pombe* y una S12, que pertenece a la subunidad 40S, similar a la de *Oreochromis niloticus* disminuyen su expresión en presencia de Cd^{2+} (Jacob *et al.*, 2004). De esto se puede concluir que algunas proteínas ribosomales modifican su expresión en presencia de Cd^{2+} y que tal vez la diferencia en si aumentan o disminuyen su expresión radica en que los organismos son diferentes y de diferente complejidad, o que la función o estructura de estas proteínas hace que el mecanismo de respuesta al metal pueda variar.

```
GGACAGCCCGGAAGCTGCGTTCTCATCGGCGTGAACAGCGATGGGCAGA
TAAGGACTACAACAAGCGCAACCTTGGAACCACCCTGAAGTGCAGTCCG
```

Figura 17. Secuencia nucleotídica de 8A y 9A. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

Clona 9A y 8A	TARKLRSHRREQRWADKDYNKRNLGTTLKCSPPFGGTSH
<i>Xenopus laevis</i>	TARKLRNHRREQKWHDKQYKKANLGTALKANPFGGASH
<i>Pan troglodytes</i>	TARKLRSHRRDQKWHDKQYKKAHLGTALKANPFGGASH
<i>Homo sapiens</i>	TARKLRSHRRDQKWHDKQYKKAHLGTALKANPFGGASH

Figura 18. Alineamiento con la proteína ribosomal S23 (Clona 8A y 9A). Solo se presenta el fragmento donde alineó la secuencia obtenida.

d. Clona 8B y 9B de 108 pb

Este cDNA (Figura 19) que aumenta su expresión en presencia de Cd^{2+} , sólo alineó con clonas del cromosoma 5 y 7 de *H. sapiens* y con una clona del pez cebra. Es posible que esta alineación poco significativa se deba a que estas secuencias corresponden a genes no identificados o a que son secuencias de los extremos 3' no traducibles del transcrito las cuales generalmente son las menos conservadas entre los diferentes organismos (Fusco *et al.*, 2005). Otra razón puede ser, que tiene un tamaño pequeño, por lo que la posibilidad de que esta secuencia alinee con alguna secuencia de algún genoma es alta.

```
AAGGTGCAGGGGCATTATTTTGAATGCAGGTTCGAAAATCGTCCACAACGTGTTTCGCAT
TCAGGTCGACCATAGCAAGCCTTCACTTTTTCTGCCATGTCTCTGCAAT
```

Figura 19. Secuencia nucleotídica de 8B y 9B. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

e. Clona 23 de 70 pb

Este cDNA (Figura 20) que deja de expresarse en presencia de Cd^{2+} tiene una secuencia con 57% de identidad con una proteína de *Pseudomonas fluorescens* similar a las DUF877 (Figura 21) la cual es una proteína de función desconocida que ha sido detectada en diferentes proyectos de secuenciación de genomas bacterianos. No existen reportes acerca de la modificación de la expresión de estas proteínas ante ningún tipo de estrés.

```
CACCAGCGAGTGTGCGGCAGTGTGCGTTGTGGCGGCTGTACTCCAGCCCAGCGACGGGA
GGCTCTGGGTT
```

Figura 20. Secuencia nucleotídica de la clona 23. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

Clona 23	PRASRRWAGVQPPQPTLPHTR
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PRRGVRWRGGKPPGPHLPHRR
<i>Xantomonas oryzae</i>	PRCGRRWPGRRPADPHLPHRR

Figura 21. Alineamiento con la proteína DUF877 (Clona 23). Solo se encuentra el fragmento de la proteína donde alineó la secuencia obtenida.

f. Clona 33 de 150 pb

Este cDNA que deja de expresarse tiene una secuencia con 97% de identidad a un segmento del fago Phi 0153. A pesar de que se verificó la presencia del inserto, no se logró secuenciar de manera adecuada ya que la secuencia contenía muchos nucleótidos que no se lograron identificar (N). La figura 22 presenta una parte de la secuencia que no contenía una gran cantidad de N y que fue aquella que se analizó con el programa tBlastx obteniéndose un segmento del fago Phi 0153.

```

NGNTCTGCGCATCAGAAATTGCCCCCAGAAGTGGNATGAATCCCACAATATTTTATTGT
GCGTAATCCACGGACTCTTCCATCTGCCGGACACATAGAAGGAAACTCATCAGATGCC
ATTCTGGCAACTCGCGATGCATGATGATGACAATTCAGTATTAATGCCACGCTTCCCAG
AATTGCATTAATGCTTCCAAAAGAAATTCTTCCTACACGAACAGAGTCTTGTCCATGAT
AGTCAGGCAGGACGCTACTCAACCTTCCCCAGTTCAATGTAAGATCAACATCTTCAGCA
GCTAAACNNTTNAAGAAACGAA

```

Figura 22. Secuencia nucleotídica de la clona 33. Esta secuencia fue analizada con el programa tBlastx.

Dadas las dificultades de la técnica no fue posible realizar un estudio más exhaustivo ni la clonación de todos los fragmentos diferenciales observados. Sin embargo, Fusco *et al.* (2005) realizaron un análisis de expresión diferencial de genes regulados por Cd^{2+} en *Brassica juncea* por la técnica de cDNA-AFLP y posteriormente comprobaron la expresión diferencial de algunos de los transcritos obtenidos mediante Northern Blot obteniéndose sólo 3 falsos positivos de 9 fragmentos estudiados demostrando con esto que esta técnica es confiable y es una buen herramienta para

este tipo de estudios. Dado lo anterior, es necesario el estudio de los fragmentos encontrados. En un inicio se debe de realizar un análisis por Northern Blot para comprobar la expresión diferencial de estos en presencia de Cd^{2+} . Posteriormente se puede buscar el gen completo en una biblioteca de cDNA para así sobre-expresar la proteína y caracterizarla. Por otro lado, conociendo que un fragmento del gen de esta proteína está modificando su expresión en presencia de Cd^{2+} , se puede aislar la proteína de las células y por medio de Western Blot observar si la modificación en la expresión del gen implica una modificación en la cantidad de proteína, además se puede caracterizar cinéticamente para así observar si también existen cambio en su actividad.

CONCLUSIONES

- La técnica de cDNA-AFLP es una buena herramienta para identificar fragmentos de genes de *Euglena gracilis* que se expresan diferencialmente en ausencia y presencia de Cd^{2+} . Aunque el proceso de obtención de las bandas diferenciales a partir del gel es complejo ya que limita la clonación de las bandas resultantes dando un rendimiento bajo. En este trabajo, de las 30 bandas con expresión diferencial que recortamos y eluimos del gel AFLP para clonar, sólo se lograron clonar 7.
- Los fragmentos de genes obtenidos, que aumentan su expresión en presencia de Cd^{2+} , correspondieron a una proteína de procesamiento de rRNA con dominios WD40 de levadura, una proteína ribosomal S23 y la triosa fosfato isomerasa de *Euglena gracilis*.
- La proteína correspondiente al fragmento de cDNA que deja de expresarse en presencia de Cd^{2+} es similar a una proteína de función desconocida DUF877 de bacterias.

APÉNDICE

Medio de cultivo glutamato / malato

Minerales traza

M	MgSO ₄	5 g en 20 mL
N	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g en 10 mL
K	KH ₂ PO ₄	2 g en 10 mL

A

ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.2 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.0 g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.040 g
Disolver en HCL y aforar a 50 mL	

B (1x)

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.078 g
H ₃ BO ₃	0.057 g
NaI	0.023 g

Aforar a 100 mL

Vitaminas (100 mL)

Tiamina (B ₁)	0.1 g
Vitamina B ₁₂	2 x 10 ⁻⁶ g (a partir de un stock de 0.02%)
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.05 g

Disolver en 10 mL de agua y esterilizar por filtración, aforar a 100 mL con agua estéril.

Para 4 L de medio glutamato / malato

Glutamato	22.2 g
Malato	8.8 g
CaCO ₃	0.88 g
Disolver y añadir los siguientes minerales traza:	

A 8.88 mL

B (5x) 1.0 mL

M 8.88 mL

N 8.88 mL

K 17.7 mL

Ajustar a pH 3.5 y aforar a 4 L. Esterilizar 45 min a 15 lb/121 °C.

Medio KME pH 7.2

KCl	120 mM
MOPS	20 mM
EGTA	2 mM

Solución D para extracción de RNA

Tiocianato de Guanidina	4 M
Citrato de sodio pH 7.0	25 mM
Sarcosyl	0.5 %
β -mercaptoetanol	0.1 M

Para preparar esta solución, pesar 250 g de tiocianato de guanidina y disolver en 293 mL de agua con DEPC, añadir 17.6 mL de una solución stock de citrato de sodio 0.75 M y 26.4 mL de una solución stock de Sarcosyl 10%. Esta solución puede ser almacenada por tres meses a temperatura ambiente. Esterilizar en autoclave a 121 °C/15 lb durante 20 min. Antes de utilizar, añadir 0.36 mL de β -mercaptoetanol por cada 50 mL de solución D. Una vez que se ha añadido el β -mercaptoetanol, la solución se puede guardar un mes.

Amortiguador para la síntesis de segunda cadena de cDNA 5x

Tris HCl pH 7.4	175 mM
MgCl ₂	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
DTT	15 mM

Amortiguador para digestión-ligación de adaptadores (AFLP)

Tris acetato pH 7.5	50 mM
Acetato de Mg	50 mM
Acetato de K	250 mM

Acrilamida 5 % / Bis acrilamida / Urea

Para 100 mL

Acrilamida	4.75 g
Bis acrilamida	0.25 g
Urea 7.5 M	45.0 g
TBE 10X	10.0 mL

Buffer de carga desnaturizante 2X

Formamida	98 %
EDTA	100 mM

Xilen cianol	0.025 %
Azul de Bromofenol	0.05 %

Buffer de carga para muestras en geles de agarosa

Azul de bromofenol	0.25 %
Xilencianol	0.25 %
Glicerol en agua	30.0 %

Almacenar a 4°C

Gel de agarosa 2 %

Disolver 0.5 g de agarosa en 25 mL de TBE 0.5X o en el mismo volumen de SB 1X.

GTE

Glucosa	50 mM
Tris pH 8	25 mM
EDTA	10 mM

Medio LB

Para 1L

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Si se requiere preparar medio sólido, agregar 15 g de agar antes de esterilizar. No intentar disolverlo en frío. Agitar al sacar del autoclave.

Medio SOC

Medio LB más glucosa esterilizada por filtración a una concentración final de 20 mM.

SB 20X

NaOH	200 mM
------	--------

Ajustar a pH 8 con ácido bórico

Solución NaOH/SDS

NaOH	0.2 N
SDS	1 %

TBE 10X

Tris base	108 g
-----------	-------

Ácido bórico 55 g
Stock de EDTA 0.5M pH 8 40 mL

Oligonucleótidos disponibles para AFLP

Clave	Nombre	Secuencia
ML33	MseI adapter.1	GACGATGAGTCCTGAG
ML34	MseI adapter.2	TACTCAGGACTCAT
ML35	EcoRI adapter.1	CTCGTAGACTGCGTACC
ML36	EcoRI adapter.2	AATTGGTACGCAGTC
ML37	MseI Core + adapter	GACGATGAGTCCTGAGTAA
ML38	EcoRI Core + adapter	CTCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML39	U-EcoRI (EcoRI)	GCGGAATTCCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML40	U-Mse.1(PstI)	GCGCTGCAGGACGATGAGTCCTGAGTAA
ML41	U-Mse.2 (SacII)	GCGCCGCGGGACGATGAGTCCTGAGTAA
ML42	Eco+1.1	AGACTGCGTACCAATTCA
ML43	Eco+1.2	AGACTGCGTACCAATTCT
ML44	Eco+1.3	AGACTGCGTACCAATTCTG
ML45	Eco+1.4	AGACTGCGTACCAATTCC
ML46	Eco+2.1	AGACTGCGTACCAATTCAA
ML47	Eco+2.2	AGACTGCGTACCAATTCAT
ML48	Eco+2.3	AGACTGCGTACCAATTCAG
ML49	Eco+2.4	AGACTGCGTACCAATTCAC
ML50	Eco+2.5	AGACTGCGTACCAATTCTA
ML51	Eco+2.6	AGACTGCGTACCAATTCTT
ML52	Eco+2.7	AGACTGCGTACCAATTCTG
ML53	Eco+2.8	AGACTGCGTACCAATTCTC
ML54	Eco+2.9	AGACTGCGTACCAATTCGA
ML55	Eco+2.10	AGACTGCGTACCAATTCGT
ML56	Eco+2.11	AGACTGCGTACCAATTCGG
ML57	Eco+2.12	AGACTGCGTACCAATTCGC
ML58	Eco+2.13	AGACTGCGTACCAATTCCA
ML59	Eco+2.14	AGACTGCGTACCAATTCTT
ML60	Eco+2.15	AGACTGCGTACCAATTCCG
ML61	Eco+2.16	AGACTGCGTACCAATTCCC
ML62	Mse+1.1	GATGAGTCCTGAGTAAA
ML63	Mse+1.2	GATGAGTCCTGAGTAAT
ML64	Mse+1.3	GATGAGTCCTGAGTAAG
ML65	Mse+1.4	GATGAGTCCTGAGTAAC
ML66	Mse+2.1	GATGAGTCCTGAGTAAAA
ML67	Mse+2.2	GATGAGTCCTGAGTAAAT
ML68	Mse+2.3	GATGAGTCCTGAGTAAAG
ML69	Mse+2.4	GATGAGTCCTGAGTAAAC
ML70	Mse+2.5	GATGAGTCCTGAGTAATA
ML71	Mse+2.6	GATGAGTCCTGAGTAATT
ML72	Mse+2.7	GATGAGTCCTGAGTAATG
ML73	Mse+2.8	GATGAGTCCTGAGTAATC
ML74	Mse+2.9	GATGAGTCCTGAGTAAGA
ML75	Mse+2.10	GATGAGTCCTGAGTAAGT
ML76	Mse+2.11	GATGAGTCCTGAGTAAGG
ML77	Mse+2.12	GATGAGTCCTGAGTAAGC
ML78	Mse+2.13	GATGAGTCCTGAGTAACA
ML79	Mse+2.14	GATGAGTCCTGAGTAACT
ML80	Mse+2.15	GATGAGTCCTGAGTAACG
ML81	Mse+2.16	GATGAGTCCTGAGTAACC

BIBLIOGRAFÍA

- Avilés C., Loza-Tavera H., Terry N., Moreno-Sánchez R. (2003) Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch. Microbiol. 180:1-10.
- ATSDR: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.html: ToxFAQs para Cadmio.
- Barque J.P., Abahamid A., Chacun H., Bonaly J. (1996) Different heat-shock proteins are constitutively overexpressed in cadmium and pentachlorophenol adapted *Euglena gracilis* cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 223:7-11.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Ac. Res. 7:1513-1523.
- Brawerman G., Mendecki J., Lee S.Y. (1972) A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. Biochemistry 11:637-641.
- Brzóśka M.M., Monsiuszko-Jakoniuk J. (2001) Interactions between cadmium and zinc in the organism. Food and Chem. Toxicol. 39:967-680.
- Chen M.S., Goswami P.C., Laszlo A. (2002) Differential accumulation of U14 snoRNA and hsc70 mRNA in Chinese hamster cells after exposure to various stress conditions. Cell Stress Chaperones. 7:65-72.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Annal. Biochem. 162: 156-159.
- Cobbett C.S. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxification. Plant Physiol. 123: 825-832.
- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. 53:159-182.
- De Fillips L.F., Hampp R., Ziegler H. (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. Arch. Microbiol. 128:407-411.
- Devars S., Hernández R., Moreno-Sánchez R. (1998) Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34:128-135.
- Díaz-Barriga F., Carrizales L., Calderón J., Batres L., Yáñez L., Tabor M.W., Castelo J. (1995) Measurement of placental levels of arsenic, lead and cadmium as a biomarker of exposure to mixtures. Bitors and Biomarkers as indicators of Enviromental change: A handbook (Butterworth FM, Corkum LD y Guzmán Rincón, Eds.) Plenum Pub. Co. pp. 139-148.
- Dihazi H., Asif A.R., Agarwal N., Doncheva Y., Müller G. (2005) Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in TALH-cells. Biochem. Mol. Biol. Manuscript M400184-MCP200.
- Einicker-Lamas M., Morales M.M., Miranda K., García-Abreu J., Oliveira A.J.F., Silva F.L.S., Oliveira M.M. (2003) P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. J. Comp. Physiol. 173:559-564.

- Fauchon M., Lagniel G., Aude J.C., Lombardia I., Soularue P., Petat C., Marguerie G., Sentenac A., Werner M., Labarre J. (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in respond to sulfur demand. *Mol. Cell.* 9:713-723.
- Fusco N., Micheletto L., Dal Corso G., borgato L., Furini A. (2005) Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *J. Exp. Bot.* 56:3017-3027.
- Galvao A.C., Corey G. (1987) Cadmio, serie Vigilancia No. 4. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS. Metepec, Estado de México.1-5.
- Gekeler W., grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988) Algae sequester heavy metals via sunthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150:197-202.
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H.,Toledano M.B., Labarre J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:22480-22489.
- Granovsky L.: www.jornada.unam.mx/2005/08/22/6n1sec.html: Ponte las Pilas.
- Hadjeb N., Berkowitz G.A. (1996) Preparation of T-overhang vectors with high PCR product cloning efficiency. *BioTechniques* 20:20-22.
- Hall J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Harada E., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 159:445-448.
- Hargreaves J.W., Lloyd E.J.H., Witton B.A. (1975) Chemistry and vegetation of highly acidic streams. *Freshwat. Biol.* 5:563-576.
- Hernández Navarro A.E. (2003) Expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a cadmio: análisis diferencial por la técnica de AFLP. Tesis de Maestría. Fac. de Química, UNAM.
- Horwitz J.P., Chua J., Curby R.J., Tomson A.J., DaRooge B.E., Fisher B.E., Mauricio J., Klundt I. (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides. *J. Med. Chem.* 7:574-575.
- Hughes K., Meek M.E., Newhook R., Chan P.K.L. (1995) Speciation in health risk assessments of metals: evaluation of effects associated with forms present in the enviroment. *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* 22: 213 – 220.
- Instituto Nacional de Ecología:
<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/459/cap2.html>.
- Ish-Horowicz D., Burke J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9:2989-2998.
- Jacob C., Courbot M., Martin F., Brun A., Chalot M. (2004) Transcriptomic responses to cadmium in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *FEBS Letters.* 576:423-427.
- Kitaoka Y., Olvera J., Wool I.G. (1994) The primary structure of rat ribosomal protein S23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:314-320.

- Kovalchuk I., Titov V., Hohn B., Kovalchuk O. (2005) Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mut. Res.* 540:149-161.
- Li Z., Lu Y., Zhen R., Szczypka M., Thiele D.J., Rea P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1 – catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 42 – 47.
- Liao V.H.C., Freedman J.H. (1998) Cadmium-regulated genes form the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 273: 31962-31970.
- Liao V.H., Dong J., Freedman J.H. (2002) Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *J. Biol. Chem.* 277:42049-42059.
- Liscum E. (1998) AFLP: studies on plant development. Academic press. 1-22.
- Martinez J.P. (2005) Efecto del cadmio sobre el metabolismo del glutatión en *Euglena gracilis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- McMahon G., Landau J.V. (1982) Effect of S12 ribosomal mutations on peptide chain elongation in *Escherichia coli*: A hydrostatic pressure study. *J. Bacteriol.* 151:516-520.
- Mendoza-Cózatl D.G., Devars S., Loza-Tavera H., Moreno-Sánchez R. (2002) Cadmium accumulation in chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115:276-283.
- Mendoza-Cózatl D.G., Loza-Tavera H., Hernández-Navarro A., Moreno-Sánchez R. (2004) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:653-671.
- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sánchez R. (2005) Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1706:88-97.
- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sánchez R. (2005) Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J. Theo. Biol.* Disponible en www.elsevier.com/locate/yjtbi.
- Mendoza-Cózatl D.G., Rangel-González E., Moreno-Sánchez R. Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. Artículo en revisión.
- Minhas D., Grover A. (1999) Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Sci.* 146:41-51.
- Navarro L., Torres-Márquez M.E., González-Moreno S., Devars S., Hernández R., Moreno-Sánchez R. (1997) Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:265-272.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. (1980) The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Eviron. Pollut.* 1:3-26.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2000) *Lehninger principles of biochemistry*. Worth Publishers. 3rd edition. New York, USA.

- Norma Oficial Mexicana NOM – 127 – SSA1 – 1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros en agua residual para uso en riego agrícola.
- Norma Técnica Ecológica NTE-CCA-017/88, que establece los límites máximos permisibles y el procedimiento para la determinación de contaminantes en las descargas de aguas residuales en cuerpos de agua, provenientes de la industria de acabados metálicos.
- Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270:4721-4728.
- Promega (2003) pGem – T and pGem-T Easy vector systems. Technical Manual. USA. 1-30.
- Rausser, W.E. (1990) Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59:61-86.
- Reijans M., Lascaris R., Groeneger A.O., Wittenberg A., Wesselink E., Van Oeveren J., De Wit E., Boorsma A., Voetdijk B., Ven der Spek H., Grivell L.a., Simons G. (2003) Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and genechip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics.* 82:606-618.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1990) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Book 1. Cold spring harbor laboratory press.
- Schäfer H.J., Haag-Kerwer A., Rausch T. (1998) cDna cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol. Biol.* 37:87-97.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, <http://www.semarnat.gob.mx/regiones/chapala/problematika.shtml>: Problemática del Lago de Chapala.
- Sgaramella V., Ehrlich S.D. (1978) Use of the T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* 86:531-537.
- Sgaramella V., Khorana H.G. (1972) Studies on polynucleotides. CXII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer RNA from yeast. Enzymic joining of the chemically synthesized polydeoxynucleotides to form the DNA duplex representing nucleotide sequence 1 to 20. *J. Mol. Biol.* 72:427-444.
- Shingú Vázquez M.A. (2005) Identificación de los genes de *Euglena gracilis* que incrementan su expresión en respuesta a cadmio. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM.
- Sillen L.G., Martell A.E. (1971) Stability constants of metal-ion complexes . The Chemical Society. Special Publication No. 25.
- Steffens J.C. (1990) The Heavy Metal-Binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:553-575.

- Travieso L., Cañizares R.O., Borja R., Benítez A., Domínguez A., Dupeyrón R., Valiente V. (1999) Heavy metal removal by microalgae. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62: 144 –151.
- Ullmann A., Jacob F., Monod J. (1967) Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. Molec. Biol. 24:339-343.
- Vahter M., Berglund M., Akesson A., Lidén C. (2002) Metals and women's health. Environ. Res. Sec. A. 88: 145-155.
- Valle B.L., Ulmer D.D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Annu. Rev. Biochem. 41:91-128.
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y., Rea P.A. (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. J. Biol.Chem. 275: 31451-31459.
- Vido K., Spector D., Lagniel G., Lopez S., Toledano M.B. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 276: 8469-8474.
- World Health Organization WHO (1992). Environmental health programme. No. 134- Cadmium. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, Switzerland.
- Yamaji R., Fujita K., Nakanishi I., Nagao K., Naito M., Tsuruo T., Inui H., Nakano Y. (2004). Hypoxic up-regulation of triose phosphate isomerase expression in mouse brain capillary endothelial cells. Arch. Biochem. Biophys. 423:332-342.
- Yan G., Viraraghavan T. (2003) Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. Water Res. 37: 4486 – 4496.
- Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S. Weber S.U., Jouanin L., Terry N. (1999) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. Plant Physiol. 121:1169-1177.