



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de la expresión de algunos genes
que responden a cadmio en *Euglena gracilis*,
empleando la técnica de RT-PCR cuantitativa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Claudia Castillo Mercado



MÉXICO, D.F.

2008



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:

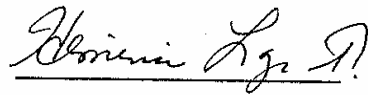
PRESIDENTE Profra. Herminia de Jesús Loza Tavera
VOCAL Prof. Francisco Ruiz Terán
SECRETARIO Profra. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. SUPLENTE Prof. Eleazar Martínez Barajas
2º SUPLENTE Profra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 105. Conjunto E
Departamento de Bioquímica.
Facultad de Química, UNAM.

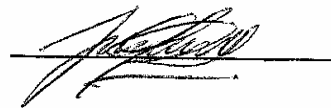
ASESOR:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



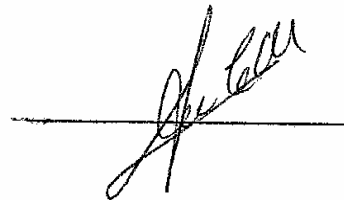
SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez



SUSTENTANTE:

Claudia Castillo Mercado



Agradecimientos

- ◆ A la Dra. Herminia Loza Tavera muchas gracias por su asesoría y paciencia brindada.
- ◆ Al Dr. Martín Vargas Suárez muchas gracias por su asesoría brindada, su paciencia y amistad.
- ◆ A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por su asesoría brindada y por abrirme las puertas de su laboratorio.
- ◆ Al Q.A. Abraham Itzcóatl Acatzi Silva por la asesoría en la realización de los experimentos y manejo del equipo de PCR en tiempo real.
- ◆ A la M. en C. Maria del Carmen Parra por sus consejos y amistad
- ◆ A la Dra. Irma Bernal Lugo por sus consejos.

Dedicatorias

- ◆ A mis padres Crisóforo y Olivia por todo el apoyo y comprensión brindada durante toda mi vida, no sé como podré agradecerles.
- ◆ A mis hermanos Mari, Isabel, Aída y David por soportarme y apoyarme.
- ◆ A mis tíos Héctor, Adrián, Lourdes, a mi abuelita Caridad y a mis primos Hugo y Alejandra por apoyarme y creer en mi.
- ◆ A mí cuñado Noé y mi sobrino Pepe por su apoyo y comprensión.
- ◆ A mi amiga Miroslava por su amistad y por ser todo oídos, mil gracias.
- ◆ Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su apoyo, asesoría y amistad Miriam, Julieta, Natalia, Ulises, Jazmín, Lorena, Karla, Jessica, Ignacio, Alex, Andrea, Leonardo, Diana, Laura, Héctor e Ixchel.
- ◆ Agradezco a mis amigos del grupo 18 y de la Facultad de química, también a los amigos que conocí durante toda la carrera ya que ellos también fueron parte de mi formación: Nadia, Dolores, Blanca, Jorge, Maria, Lucero, Olga, Jordi, Moncerrat, Zahira, Sergio, Tere, Tabata, Melissa, Nora, Carlos, Karina, Daniel, Ángel, Ariel, Ricardo, Víctor, Isao, Luis, Ana, Diana, Martín.
- ◆ Agradezco a todo lo que significa la UNAM y la Facultad de Química, los profesores, los amigos, las caídas y resbalones pero sobretodo la enseñanza.

Abreviaturas

18S rRNA	Subunidad ribosomal 18S
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cTPI	Triosa fosfato isomerasa citosolica (Triose phosphate isomerase)
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HMW	Alto peso molecular
HSP	Proteína de estrés por calor (Heat Shock protein)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IMAC	Cromatografía de afinidad (Immobilized Metal Affinity Chromatography)
MDR	Resistencia a múltiples drogas (Multidrug resistnace)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PABP	Proteína de unión a colas de poli A (Poly-A binding Protein)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCs	Filoquelatinas
PCS	Fitoquelatina sintetasa
qRT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
RT-PCR	Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

Contenido

	Página
Abreviaturas	
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Cadmio	3
2.2. <i>Euglena gracilis</i> como organismo modelo para el estudio de resistencia a Cd	4
2.3. Cambios bioquímicos y de expresión genética en respuesta a metales pesados en otros organismos	8
2.4. PCR en tiempo real	10
2.5. Antecedentes directos del trabajo	12
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	13
4.1. Objetivo General	13
4.2. Objetivos particulares	13
5. Estrategia Experimental	14
6. Materiales y métodos	15
6.1. Cultivo y cosecha de células	15
6.2. Extracción de RNA total	15
6.3. Cuantificación de RNA total	15
6.4. Integridad del RNA observado en una electroforesis en gel de agarosa	15
6.5. Purificación de RNA poli A+	16
6.5.1. Anclaje	16
6.5.2. Lavado de partículas magnéticas	16
6.5.3. Capturado y Lavado	16
6.5.4. Elusión del RNAm	16
6.6. Transcripción reversa	17
6.7. Diseño de iniciadores específicos	18
6.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final)	19
6.9. Plasmidos recombinantes	19
6.10. Clonación de los fragmentos de los genes empleados para las curvas estándar	20
6.10.1. Células competentes	20
6.10.2. Purificación de productos de PCR	20
6.10.3. Reacción de ligación	21
6.10.4. Transformación	21
6.10.5. Extracción de DNA	22
6.10.6. Cuantificación	23
6.10.7. Secuenciación	23
6.11. PCR en tiempo real	23
6.11.1. Curva estándar	23
6.11.2. Cuantificación de la expresión	23
7. Resultados	27
7.1. Cuantificación e integridad del RNA total	27

7.2. Diseño de iniciadores	28
7.3. PCR punto final	28
7.4. Plásmidos recombinantes	29
7.5. PCR en tiempo real	30
7.6. Cuantificación de cTPI empleando como gene de referencia a β -actina	47
7.7. Cuantificación de HSP70 empleando como gene de referencia a β -actina	50
8. Discusión	56
8.1. Importancia de la técnica de PCR cuantitativo	56
8.2. Complicaciones de la técnica	56
8.3. Importancia del gene de referencia (control interno)	57
8.4. Expresión de cTPI	59
8.5. Expresión de HSP70	61
8.6. PABP	62
9. Conclusiones	64
10. Apéndice	65
11. Bibliografía	80

1. Resumen

Las aguas continentales han sido contaminadas por cadmio como resultado de su empleo en diferentes actividades humanas. El Cd es un metal pesado tóxico para muchos organismos acuáticos y para el humano a través de la cadena alimenticia. El protozoo unicelular *Euglena gracilis* tiene la capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de Cd y almacenarlo intracelularmente, por lo cual ha surgido la idea de que podría ser utilizado como biorremediador para eliminar el Cd de los lechos acuáticos, por lo que diferentes aspectos bioquímicos y genéticos están siendo estudiados en relación con esta capacidad (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio hemos identificado genes de *E. gracilis* que incrementan su expresión en respuesta a Cd, empleando la técnica de AFLP. Entre estos genes se identificaron a la triosa fosfato isomerasa citosólica (cTPI), una proteína de respuesta a estrés por calor (HSP70) y una proteína de unión a colas de poli A (PABP) (Hernández-Navarro, 2003; Olin-Sandoval, 2006).

El objetivo de este trabajo fue cuantificar la expresión de estos genes en respuesta a Cd. Para esto se empleó la técnica de transcripción reversa del RNAm acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), con un termociclador que detecta el incremento de los productos amplificados en tiempo real, permitiéndonos una cuantificación precisa de los RNAm de los genes de interés (qRT-PCR) (Higuchi *et al.*, 1992). Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de los genes de interés, se realizaron varios ensayos para encontrar las condiciones adecuadas de amplificación de estos genes y el de referencia. El gene de referencia utilizado en este trabajo fue el de β -actina.

Al realizar la cuantificación cTPI se observó una mayor expresión a las 24 h con Cd, con un incremento de ocho veces con respecto a la medición anterior y con respecto al tratamiento sin Cd. Sin embargo, a las 30 h, se observó un incremento en la expresión de cTPI en el tratamiento sin Cd mientras que en el tratamiento con Cd hubo una disminución del 50% con respecto a lo observado a las 24 h. En el caso de HSP70 a las 24 h se observó un aumento de nueve veces más en el tratamiento con Cd en comparación con la medición a las 24 h sin Cd. A las 30 h se notó un ligero aumento en la expresión aunque no hay mucha diferencia entre las muestras sin y con Cd. Estos resultados hacen pensar que la expresión observada

de estos dos genes es regulada por el desarrollo, pero que la presencia de Cd adelanta la expresión de los genes.

En el caso de PABP no se pudieron encontrar las condiciones adecuadas de amplificación para la muestra y el plásmido o quizá también los iniciadores no eran los adecuados, por lo que no fue posible la cuantificación de la expresión de este gene.

2. Introducción

2.1. Cadmio

Por definición los metales pesados son aquellos que tienen una densidad mayor a 5 g/mL. En 1980, Nieboer y Richardson los clasificaron de acuerdo a su reactividad con oxígeno, nitrógeno y azufre como:

Clase A: (Al, Ca, Sr, Ba) los que reaccionan más con el oxígeno (O>N>S)

Clase B: (Cu, Hg, Ag) los que reaccionan más con el azufre (S>O>N)

Clase C: (Fe, Ni, Zn, Cd, Cu) los que tienen una afinidad intermedia.

Se calcula que la contaminación mundial anual por metales pesados excede a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos (Nriagu y Pacyna, 1988). Se han detectado valores tóxicos de metales pesados en las cercanías de sitios de desperdicio municipal e industrial y en diversos tipos de suelo, incluyendo los agrícolas. De las minas se obtienen diferentes tipos de metales que originan contaminación significativa de los suelos y aguas adyacentes. El Cd y otros metales pesados, por ejemplo Pb y Hg, son importantes contaminantes que amenazan la salud. Las actividades humanas, especialmente en los pasados 200 años, han generado la liberación masiva de metales pesados al medio ambiente (Nriagu y Pacyna, 1988). Las industrias que presentan mayores emisiones de Cd son: las procesadoras de baterías y acumuladores, de cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, así como de cloruro de polivinilo (Galvao y Corey, 1987). La distribución de micropartículas que contienen Cd es afectada por el viento prevaleciente y la precipitación (Little y Martin, 1972).

En México, la cantidad total permisible de algunos metales pesados en el agua es alta, 1.7, 1.93 y 300 μM para Cd, Pb y Zn, respectivamente (NOM-001-ECOL-1996; que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales (http://sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/semarnap_npm_001_ecol_1996.pdf). Vázquez-Alarcón *et al.*, (2001) reportaron valores de Cd de 0.2 a 1 μM (0.032 a 0.11 ppm) en aguas residuales de las industrias, esta agua es utilizada en los cultivos de riego para alimentos en el Valle del Mezquital. Estas observaciones sugieren que debería determinarse el retiro inmediato del flujo directo de

aguas residuales de las industrias al medio ambiente, ya que muchas contienen grandes cantidades de estos metales pesados ($> 20 \mu\text{M}$) que son desalojados en los cuerpos de agua y los suelos con el consiguiente riesgo para la salud humana. En un muestreo realizado entre marzo y agosto de 2004, se encontraron altos contenidos de Cd, Zn y Pb en el lago artificial de la ciudad de México, Lago de Chapultepec: Cd 5 a 17 μM , Zn 23 a 38 μM , Pb 18 a 49 μM . En otro muestreo realizado de julio a agosto de 2004 en Lago de Cuitzeo, un lago natural en el estado de Michoacán, se encontraron valores de Pb 18 a 31 μM , Zn 3.6 a 30 μM y Cd indetectable (Vázquez-Alarcón *et al.*, 2001).

El Cd es considerado un metal de transición no esencial puesto que hasta la fecha hay sólo un ejemplo documentado de una proteína que lo requiere como cofactor, una carboanhidrasa específica de Cd en la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii* (Lane *et al.*, 2005).

Los iones cadmio son relativamente móviles en la geósfera y la preocupación ha aumentado acerca de la acelerada acumulación de Cd en la cadena alimenticia humana. La captación en los cultivos de plantas es la principal vía de entrada en la alimentación humana y animal (Nriagu y Pacyna, 1988).

Los iones cadmio pueden interferir con pasos homeostáticos para iones metálicos esenciales, ya que muy probablemente pueden entrar en las células de las plantas por las vías de absorción para Ca, Fe, y Zn (Clemens *et al.*, 1998; Connolly *et al.*, 2002).

2.2. *Euglena gracilis* como organismo modelo para el estudio de resistencia a Cd

Euglena gracilis es un protista unicelular acuático de vida libre, con capacidad de ser fotosintético o heterótrofo. Ha sido ampliamente utilizado como modelo biológico para el estudio de los mecanismos bioquímicos relacionados con la resistencia a metales pesados tales como Hg, Cd, Cu, Cr y Pb (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006). *Euglena* exhibe características de plantas al igual que de animales (Briand *et al.*, 1993) y posee proteínas conservadas de ambos sistemas. Su atractivo como organismo modelo radica en la posibilidad de ser empleado en la biorremediación de metales pesados en cuerpos de agua contaminados (Palmer *et al.*, 2002; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2007).

Células fotosintéticas creciendo bajo ciclos de luz y oscuridad tienen una notable resistencia a Cd y una capacidad de acumulación intracelular del metal, mostrando una concentración inhibitoria del 50% de crecimiento (IC₅₀) de 100 µM (Devars *et al.*, 1998) mientras que células cultivadas bajo iluminación constante muestran una baja resistencia (IC₅₀)= 10.6 µM (Einicker-Lamas *et al.*, 1996).

La resistencia de *E. gracilis* a Cd ha sido evaluada bajo diferentes condiciones. Mendoza-Cózatl *et al.*, (2002) realizaron un estudio de la acumulación de Cd en el cloroplasto de *Euglena*, en donde fue cultivada en condiciones fotoheterotróficas. Después de tres días de cultivo con 0.2 mM de CdCl₂, 62% del Cd acumulado en las células fue distribuido entre el citosol y las fracciones cloroplásticas. Sin embargo, después de ocho días, el contenido del metal incrementó en la fracción cruda del cloroplasto a 40% del total y disminuyó al 19% en el citosol. Cuando *E. gracilis* crece en condiciones fotosintéticas, el Cd es principalmente acumulado en el cloroplasto (>60%), mientras que en *Euglena* cultivada en la oscuridad el Cd se encuentra principalmente en la mitocondria (60-80%) (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002; Avilés *et al.*, 2003).

Euglena es capaz de desarrollar resistencia a Cd al ser expuesta a un pretratamiento con Hg. Con este pretratamiento la resistencia aumentó a 0.2 mM, como es observado por el incremento al doble de la IC₅₀ en las células pretratadas. La IC₅₀ fue de 0.062 y 0.109 mM para células control y para células pretratadas con Hg, respectivamente. En un intervalo de 0.2-1 mM de ClCd₂, el crecimiento de células pretratadas con Hg fue 2-4 veces mayor que el de las células control. Este trabajo fue realizado con células incubadas en oscuridad. Estos cultivos de *E. gracilis* adaptados a la oscuridad pierden la capacidad de regenerar la clorofila y el cloroplasto. Por lo tanto estas células dependen sólo del metabolismo mitocondrial y la glicólisis (Avilés *et al.*, 2005).

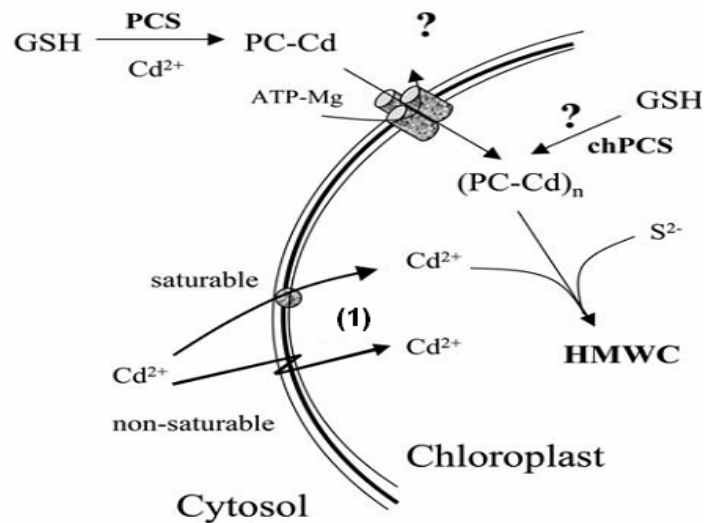
También Deloménie y col. (2007) establecieron una línea de células de *Euglena gracilis* resistente a Cd por un incremento progresivo de la concentración de Cd, de 500 µM a 2 mM en el medio de cultivo.

Las concentraciones usadas en estudios de resistencia a Cd en *E. gracilis* representan un amplio grado de toxicidad para otros organismos, por ejemplo *Chlamydomonas reinhardtii* es sensible a 1 µM de Cd, el cual inhibe la fotosíntesis

(Overnell, 1975). La toxicidad del Cd está en función de la concentración del ion metálico libre. En las algas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophyla*, *Scenedesmus obliquus*, *Skeletonema costatum*, *Chlorococcum* spp., *Navicula incerta*, *Ditylum brightwellii* y *Selenastrum* sp. se ha observado una reducción del crecimiento con concentraciones de Cd de 0.9-26.7 μM . En *Chlamydomonas reinhardtii*, *Selenastrum capri* y *Chlorella pyrenoidosa* el Cd a concentraciones de 0.71- 8.9 μM (0.08-1 ppm) inhibe la fotosíntesis (Hart y Scaife, 1977; Laegreid *et al.*, 1983; Overnell, 1975). Lozano-Rodríguez *et al.* (1997) demostraron inhibición del crecimiento en plantas de chícharo y maíz de 70% y 30% respectivamente, tratadas con 50 μM de Cd.

Varios trabajos han mostrado que la síntesis de glutatión (GSH) y fitoquelatinas (PCs), así como la asimilación de azufre, necesario para la síntesis de estos compuestos, están relacionadas con los mecanismos de resistencia a Cd en protistas (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005). Cuando las células de *E. gracilis* son expuestas a 0.2 mM de CdCl_2 , sus niveles celulares de cisteína, GSH y PCs incrementan, siendo 12 veces más grandes que en las células no expuestas. Esta variación de metabolitos ocurre en el citosol y más notablemente en el cloroplasto (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002). En este protista, las PCs son encontradas en el citosol, cloroplasto y en mitocondria después de la exposición a Cd (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002, Avilés *et al.*, 2003). Este mecanismo de respuesta a Cd también se presenta en plantas (Salt y Wagner, 1993; Salt y Rauser, 1995; Sánchez *et al.*, 2001).

Con base en la información que se conoce hasta el momento con respecto a los mecanismos de síntesis de PCs, estas observaciones pueden explicarse por lo siguiente: (1) las PCs son sintetizadas en el citosol, por la actividad de la fitoquelatina sintetasa, donde secuestran Cd, el complejo Cd-PCs es posteriormente transportado al cloroplasto y las mitocondrias, por un transportador de tipo ABC (ATP Binding Cassette) (2) las PCs se sintetizan en el interior de los organelos donde se unen al Cd, que se transportó al interior de los mismos como ion libre, y forman complejos de alto peso molecular (HMWC), en los que también participa el sulfuro, o (3) ambos procesos coexisten y las PCs se sintetizan en los tres compartimentos celulares de manera independiente (Figura 1) (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).



Euglena gracilis

Figura 1. Mecanismo propuesto para la resistencia a Cd en *Euglena gracilis*, en el cual la mayoría del Cd y PCs son localizados dentro del cloroplasto (Tomado de Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

La primera interrogante se refiere a la posibilidad de la existencia de un transportador que movilice Cd-PC o Cd-GS₂ hacia el interior de la mitocondria y del cloroplasto, similar al encontrado en *Schizosaccharomyces pombe* y vacuolas de plantas. Sin embargo, este tipo de transporte todavía no se ha descrito para cloroplasto o mitocondria.

La segunda interrogante se refiere a la posibilidad de la presencia de un transportador de Cd en la membrana organelar y una actividad de fitoquelatina sintetasa (PCS) dentro de los organelos. Los cloroplastos de *E. gracilis* son capaces de captar Cd en forma libre y el proceso implica al menos dos componentes, uno saturable y uno no saturable (Figura 1 reacción 1). Además, la purificación de una red de PCs con Cd empleando gradientes de Percoll, a partir de cloroplastos incubados con 0.5 mM CdCl₂, sugiere que muy probablemente una isoforma de PCS pudiera estar localizada dentro de los cloroplastos de *E. gracilis*. Además, se han detectado complejos HMW en cloroplastos aislados de *E. gracilis* expuestos a Cd lo cual apoya la existencia del segundo mecanismo en cloroplastos de *Euglena*, sin embargo, esto no excluye la primera posibilidad (Mendoza Cózatl *et al.*, 2005).

Otro mecanismo que presenta *E. gracilis* es una bomba de flujo similar a la P-glicoproteína, sugiriendo que un fenotipo MDR (resistencia a múltiples drogas) podría haber evolucionado en Euglena como uno de los mecanismos de desintoxicación de cadmio (Einicker-Lamas *et al.*, 2003).

La exposición de la cepa Z a 10-100 μ M de Cd indujo la síntesis de la proteína HSP70 (heat shock protein), una proteína de respuesta a estrés por calor, la cual es una chaperona relacionada con la protección de proteínas en tiempos de estrés. Interesantemente, la coexistencia de GSH y Cd definitivamente aceleró la inducción de HSP70 en mayor medida que GSH o Cd solos. Esto sugiere que el GSH extracelular y Cd podrían tener un papel sinérgico en el aumento de la producción de HSP70 (Watanabe y Suzuki, 2004).

Barque *et al* (1996) realizaron un estudio con *E. gracilis* sin clorofila resistente a Cd (2 mM de Cd) utilizando la técnica de electroforesis en gel bidimensional se encontró la sobreexpresión de al menos cuatro proteínas de estrés por calor con pesos moleculares de 90, 70, 55 y 40 kDa. Este mismo equipo previamente (Barque *et al.*, 1994), utilizando igualmente *E. gracilis* sin clorofila resistente a Cd empleando la misma técnica indican la síntesis de dos polipéptidos de 55 kDa y 40 kDa sobreexpresados en células de *E. gracilis* resistentes a Cd estos polipéptidos parecen ser proteínas de estrés por calor que tal vez en algunos pasos del proceso de resistencia contra Cd fueron adquiridas.

En *E. gracilis* sin clorofila resistente a Cd (2 mM) por medio de un análisis bidimensional inmunoblot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra diferentes isoformas citoplasmáticas de hsp70, se encontró que este anticuerpo detecto una proteína parecida a hsc73 en células resistentes a Cd (Barque *et al.*, 2000).

2.3. Cambios bioquímicos y de expresión genética en respuesta a metales pesados en otros organismos

Empleando la técnica de cDNA-AFLP (Amplified fragment length polymorfism) para identificar algunos de los genes regulados por Cd en *Brassica juncea* L., se observó el aumento en la transcripción de una HSP, lo cual sugiere que la desnaturalización de proteínas es uno de los efectos de la toxicidad del Cd. También se encontraron

incrementadas las expresiones de una aldehído deshidrogenasa y una proteína de unión a RNA (Fusco *et al.*, 2005).

En *Candida famata* adaptada a altas concentraciones de Cu (1.26 mM) se encontró que las actividades de la enolasa y la triosa fosfato isomerasa (TPI) bajaron como consecuencia de la exposición a Cu. Las actividades medidas en la fase estacionaria, fueron, para la TPI de 1.32 y 0.66 U/mg, y para la enolasa 0.81 y 0.42 U/mg en ausencia y presencia de Cu respectivamente. Asimismo, el Cu tuvo el efecto de retrasar el inicio de la fase estacionaria de los cultivos ya que, en ausencia de Cu, ésta se presentó a las 39 h, mientras que en presencia de Cu, la fase logarítmica se alarga y son necesarias 56 h para que se presente la fase estacionaria. Los niveles totales de glutatión incrementaron significativamente en el caso de las células cultivadas con Cu comparadas con las células en ausencia de Cu y el efecto fue dependiente de la sal de cobre usada en el tratamiento, siendo el efecto máximo con la sal de sulfato de Cu (5.13 µg GSH/mg proteína) en comparación con el control (1.48 µg GSH/mg proteína) (Manzano *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis thaliana* se detectó que la TPI recombinante fue inactivada por GSSG (Glutatión oxidado) y esta fue reactivada por GSH. Para este trabajo el gene de la TPI de *A. thaliana* fue expresado en *Escherichia coli* para obtener TPI recombinante. La actividad de TPI fue reducida a menos del 20% por 2.5 mM de GSSG después de incubar por 270 min, mientras ésta fue estable en la presencia de 2.5 mM de GSH. La adición de GSH al medio de reacción a los 270 min recobra la actividad, indicando que TPI es reversiblemente inactivada por GSSG (Ito *et al.*, 2003).

En un estudio proteómico realizado en *Thlaspi caerulescens* expuesta a Zn y Cd (2 µM) se obtuvieron 48 proteínas que incrementaban su intensidad en un gel bidimensional en respuesta a Zn y Cd. Entre ellas se encontraba la TPI citosólica (cTPI) (Tuomainen *et al.*, 2006), la cual es investigada en este proyecto.

La interacción de una proteína de unión a RNA (PABP, poly (A) binding protein), Pab1p, con el RNAm incluyendo el CUP1, producto requerido para la resistencia a cobre juega un papel muy importante en la expresión de los genes ya que la interacción de la cola de poli (A) con Pab1, estimula la unión de la subunidad ribosomal 40S . La

mutante Pab1 de *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene un eliminado un RRM (RNA recognition motifs) fue sensible a elevadas concentraciones de Cu en el medio de cultivo (Morrissey *et al.*, 1999).

En la ostra *Crassostrea virginica*, la exposición a 2 mM de Cd indujo una respuesta de proteínas a estrés por calor, donde los niveles de proteína HSP60 y HSP70 incrementaron de 1.5-2 veces en células de la branquia expuestas a Cd (Ivanina *et al.*, 2008).

2.4. PCR en tiempo real

La reacción de PCR permite amplificar un millón de veces un fragmento específico de DNA enmarcado por dos iniciadores (oligonucleótidos sintéticos, complementarios a ambas hebras de la secuencia blanco). La PCR es un proceso múltiple con ciclos consecutivos de tres diferentes temperaturas, donde el número de moléculas de secuencia blanco crece exponencialmente de acuerdo al número de ciclos. En cada ciclo las tres temperaturas corresponden a tres diferentes pasos en la reacción. En el primer paso el DNA molde, el cual sirve como un molde maestro para la DNA polimerasa, es separado en hebras individuales al calentar a 95 °C (desnaturalización). En el segundo paso la mezcla de la reacción es enfriada bajando la temperatura a 50-60 °C (dependiendo de la composición de los iniciadores usados), esto permite el alineamiento de los iniciadores a la secuencia blanco. La hibridación de iniciadores es favorecida sobre la hibridación DNA/DNA molde, por el exceso de moléculas de iniciadores. En el tercer paso, el alineamiento de los iniciadores es extendido usando una polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*) a temperatura óptima de 72 °C. Con el alargamiento de la molécula de DNA recién sintetizada a partir de los iniciadores, una copia de la secuencia blanco es generada. El ciclo de estas tres diferentes temperaturas es repetido de 20 a 50 veces, dependiendo de la cantidad de DNA presente y la longitud del amplicón (fragmento de DNA amplificado) (Lees, 2003).

La PCR en tiempo real es una técnica que permite la colección continua de señal fluorescente de una o más reacciones en cadena de la polimerasa sobre un intervalo de ciclos. PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR) es la conversión de las señales

fluorescentes de cada reacción dentro de un valor numérico para cada muestra (Dorak, 2006), permitiendo la cuantificación del molde utilizado, de manera precisa.

Higuchi y colaboradores (1992) idearon una forma de hacer de la reacción en cadena de la polimerasa una técnica cuantitativa al agregar un fluorocromo que se intercala o enlaza proporcionalmente con la doble cadena del DNA que se sintetiza durante la reacción y así detectar el incremento de la fluorescencia con algún dispositivo fluorométrico. Debido a que es posible cuantificar la fluorescencia a lo largo de la PCR, particularmente en la fase exponencial de síntesis, se le llamó PCR en tiempo real (De la Rosa *et al.*, 2006).

El método en condiciones estándar puede emplear dos tipos de química, principalmente la sonda de tipo TaqMan o un fluorocromo, como el SYBR Green. En ambos casos se diseñan iniciadores altamente específicos para amplificar un fragmento de alrededor de 150 pb (De la Rosa *et al.*, 2006). Para llevar a cabo la PCR a tiempo real los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación (Costa *et al.*, 2004).

El reactivo SYBR Green I es una molécula pequeña que emite fluorescencia cuando se enlaza al surco menor del DNA. Este compuesto cumple con dos condiciones básicas que le permiten ser usados en los ensayos de qPCR: 1) la fluorescencia detectada es directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR y 2) esta molécula no inhibe la PCR ni disminuye su eficiencia de amplificación (De la Rosa *et al.*, 2006).

El software proporcionado con los instrumentos de PCR en tiempo real permite tres principales tipos de análisis de datos. 1) Medida del número de ciclos en el cual cualquier aumento en la fluorescencia dentro de cada vial de reacción alcanza un valor significativo 2) los datos son usados en conjunción con los resultados de estándares externos para estimar el número original de copias molde 3) curvas de disociación son transformadas que proporcionan gráficos de $-dF/dT$ contra T (F= fluorescencia y T= temperatura) en el cual un máximo (pico de disociación) ocurre a la temperatura de equilibrio para cada dúplex (Edwards, 2004).

2.5. Antecedentes directos del trabajo

En estudios previos en nuestro laboratorio, se analizó la expresión genética diferencial de *E. gracilis* expuestas y no expuestas a Cd empleando la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), la cual amplifica segmentos de cDNA a partir de RNAm empleando pares de cebadores o primers de manera aleatoria. Mediante este método se lograron amplificar, aislar y secuenciar tres fragmentos de cDNA con mayor expresión en células tratadas con Cd. Las secuencias de los cDNAs identificados mostraron semejanza con las proteínas HSP70 (proteína de respuesta a estrés por calor), Triosa Fosfato Isomerasa citosólica (cTPI) y proteína que se une a colas de poli-A (PABP, poly A binding protein) (Hernández-Navarro, 2003, Olin Sandoval, 2006). Estos resultados sugieren que estos genes incrementan su expresión en respuesta a Cd. Sin embargo, la validez de estas observaciones radica en la comprobación de esta respuesta, empleando alguna técnica específica, que permita cuantificar los niveles de RNAm de estos genes en respuesta a Cd. Para hacer esta determinación podría emplearse Northern blot. Sin embargo, empleando la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR, quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), la cuantificación puede realizarse de manera más precisa. La técnica de PCR se basa en la amplificación de un segmento de DNA de secuencia conocida, utilizando dos cebadores específicos, uno para el comienzo y otro para el final de la región a amplificar. En el caso del RT-PCR, el DNA molde se obtiene por la actividad de la transcriptasa reversa (RT) sobre el RNA mensajero, obtenido de las muestras de interés. Para llevar a cabo esta técnica es necesario establecer las condiciones ideales para la amplificación específica de los segmentos de los genes en estudio. Esto requiere de conocer detalladamente los fundamentos de la técnica, realizar el diseño de los iniciadores para amplificar estos tres genes, así como para amplificar los genes de expresión constitutiva que servirá como control para demostrar que la cantidad de cDNA molde que se emplea por reacción es equivalente en cada caso. Asimismo, es necesario probar estas condiciones en un PCR punto final para determinar que los iniciadores sólo amplifican el segmento de DNA correspondiente.

3. Hipótesis

Empleando la técnica de AFLP se determinó que los genes cTPI, PABP y HSP70 aumentan su expresión en *Euglena gracilis* expuesta a 170 μM de Cd, entonces al utilizar una técnica más específica y precisa como el PCR cuantitativo se podrá comprobar si la observación anterior es correcta.

4. Objetivos

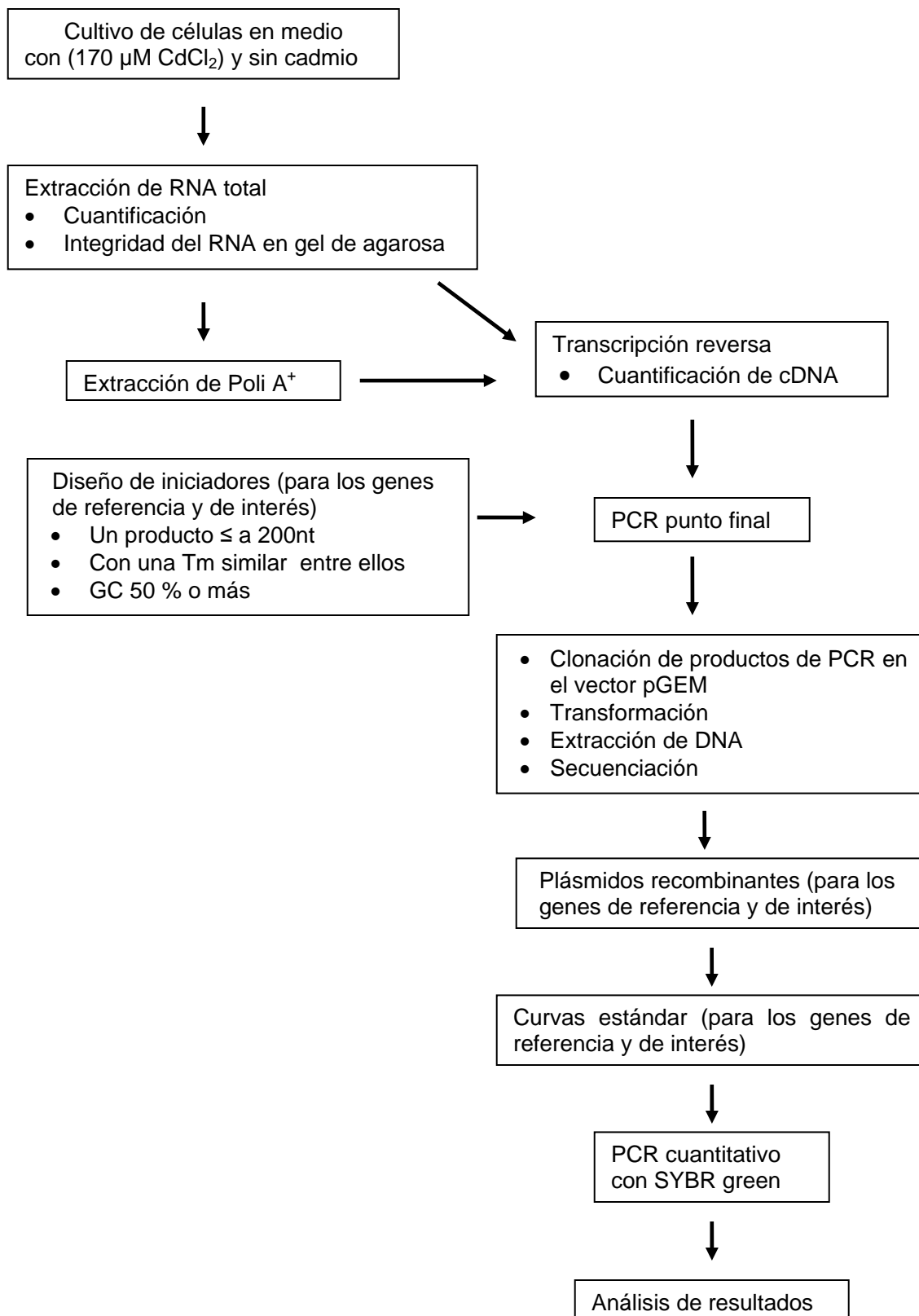
4.1. Objetivo general

Cuantificar la expresión de los genes cTPI, PABP y HSP70 de *Euglena gracilis* durante las primeras horas (6 a 30 h) de cultivos expuestos a 170 μM Cd.

4.2. Objetivos particulares

- Sintetizar cDNA a partir de muestras de mRNA extraído de *E.gracilis* cultivada en ausencia y presencia de Cd (170 μM) a diferentes tiempos (6, 9, 12, 24 y 30 h).
- Diseñar iniciadores apropiados de los genes de interés y los de referencia para la reacción de qPCR.
- Estandarizar condiciones de amplificación para los productos de PCR de los de los genes de interés y los de referencia.
- Ligar los insertos obtenidos de PCR punto final, correspondientes a los genes en estudio, dentro del vector pGEM-T Easy, para producir los plásmidos necesarios para realizar las curvas estándar.
- Determinar las condiciones y concentraciones adecuadas para las curvas estándar correspondientes que permitan llevar a cabo la cuantificación de los cDNA molde.
- Llevar a cabo la cuantificación de cada gen normalizando contra un gen de referencia (18S rRNA y β -actina).
- Comparar la expresión de los genes cTPI, PABP y HSP70 en células de *Euglena gracilis* en presencia de Cd (170 μM) contra células control (en ausencia de Cd).

5. Estrategia Experimental



6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivo y cosecha de células

Células de *Euglena gracilis* fueron cultivadas en medio de glutamato/malato sin y con Cd (170 μ M), y cosechadas a las 6, 9, 12, 24 y 30 h. Las células fueron lavadas y centrifugadas, y la pastilla fue pesada y se guardó a -70 °C (apéndice).

6.2. Extracción de RNA total

El RNA total fue aislado de cada una de estas muestras de acuerdo al método de Tiocianato de Guanidina/Fenol Cloroformo (apéndice). Esta parte del trabajo fue realizado por Myriam Villalpando Muñoz como parte de su Servicio Social.

6.3. Cuantificación de RNA total

La cuantificación de RNA se llevó a cabo empleando un espectrofotómetro (Ultrospec 2000) tomando las lecturas a 260 nm. Se hizo una dilución de 1:100 μ L en agua desionizada. La fórmula utilizada para calcular la concentración de RNA fue: μ g/ μ L = (factor de dilución) x (40) x (Absorbancia) /1000.

6.4. Integridad del RNA observado en una electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo para observar la integridad del RNA total utilizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

1. Se pesaron 0.3 g de agarosa (Gibco BRL) y se disolvieron en 25 mL de Buffer SB 1X (ver apéndice) (preparado con agua tratada con DEPC) y 2 μ L de bromuro de etidio.
2. Una alícuota de RNA se mezcló con Buffer de carga (ver apéndice) y se cargó en los pozos.
3. La electroforesis se corrió a 100 V en una cámara (MINNIE Submarine Agarose Gel Unit Model HE33, Hoefer Scientific Instruments), empleando una fuente de poder (Power Pac 200; Biorad).
4. El RNA resuelto se analizó empleando el Flour-S Multilmager (BIO RAD) utilizando el Programa Quantity One.

6.5. Purificación de RNA poli A⁺

Se hizo de acuerdo a las indicaciones descritas en el sistema Poly ATtract mRNA Isolation System IV (Promega).

6.5.1. Anclaje

1. En un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL libre de RNAsas se colocó de 0.1 a 1.0 mg de RNA total y se llevó a un volumen final de 500 μ L con agua libre de RNAsas.
2. Se calentó a 65 °C por 10 min.
3. Se adicionaron 3 μ L de Oligo(dT) y 13 μ L de buffer SSC 20 X. Se mezcló suavemente y se dejó a temperatura ambiente hasta que el tubo se enfrió.

6.5.2. Lavado de partículas magnéticas

1. Se resuspendió con vortex un tubo de partículas magnéticas hasta que estuvieron completamente dispersas. Se capturaron las partículas magnéticas colocándolas en la barra magnética. Cuidadosamente se retiró el sobrenadante.
2. Las partículas magnéticas se lavaron tres veces con buffer SSC 0.5 X (300 μ L por lavado). Después de cada lavado se capturaron las partículas magnéticas y cuidadosamente se removió el sobrenadante.
3. Se resuspendieron las partículas magnéticas en 100 μ L de buffer SSC 0.5 X.

6.5.3. Captura y Lavado

1. Se adicionó el contenido de la reacción de anclaje al tubo que contenía las partículas magnéticas lavadas.
2. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se mezcló suavemente por inversión cada 1- 2 min.
3. Se capturaron las partículas magnéticas y se removió cuidadosamente el sobrenadante.
4. Las partículas fueron lavadas 4 veces con buffer SSC 0.1 X (300 μ L por lavado). Después del último lavado se removió el sobrenadante.

6.5.4. Elusión del RNAm

1. Se resuspendió el pellet de partículas magnéticas en 100 μ L de agua libre de RNAsas.
2. Se capturaron las partículas magnéticas y el RNAm eluído se transfirió a un tubo estéril libre de RNAsas.

- Se repitió el paso de la elusión resuspendiendo el pellet de partículas magnéticas en 150 μL de agua libre de RNAsas. Se capturaron las partículas, y se colocó el eluato con el RNAm eluído en el paso 2 (volumen total 250 μL).
- Para su uso posterior el eluato se concentró en una liofilizadora (Labconco Freeze dry System Lyph Lock 6) y el Centrivap Concentrador (Labconco). Se almaceno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.6. Transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa del RNA total y poli A⁺ de los genes se realizó de acuerdo al Kit SuperScript 1st Strand System de Invitrogen. Se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Byosystems.

- Se prepararon las mezclas de RNA/iniciador en tubos estériles de 0.2 - 0.5 mL como sigue:

Componente	Volumen (μL)		
	Muestra	Control (no RT)	Control RNA
Hasta 5 μg de RNA total	n	n	-
Control RNA	-	-	1
10 mM dNTP mix	1	1	1
Oligo dT	1	1	1
Agua DEPC	a 10	a 10	a 10

- Se incubó cada muestra a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, entonces se colocó en hielo por al menos 1 min.
- Se preparó la siguiente mezcla de reacción.

Componente	Volumen (μL)
1 rxn	
10 X buffer	2
25 mM MgCl_2	4
0.1 M DTT	2
RNase OUT	1

- Se adicionaron 9 μL de la mezcla de reacción a cada mezcla de RNA/iniciador, se mezcló suavemente y se centrifugó brevemente. Se incubó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min.
- Se adicionó 1 μL (50 unidades) de SuperScript RT a cada tubo, excepto al control (no RT), se mezcló e incubó a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 50 min.
- Se terminaron las reacciones a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Se enfrió en hielo.

7. Las reacciones se centrifugaron brevemente. Se adicionó 1 μL de RNase H a cada tubo y se incubó por 20 min a 37 °C. Se almaceno a -20 °C hasta su uso.

Se llevó a cabo la cuantificación del cDNA con Nano Drop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. La concentración del cDNA medida colocando 2 μL de cada muestra en el Nano Drop, posteriormente el programa dió los resultados de concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$, la absorbancia a 260 y 280 nm, la relación de 260/280 y la relación 260/230.

6.7. Diseño de iniciadores específicos

Para llevar a cabo la PCR, para amplificar los fragmentos de los genes de interés fue necesario diseñar iniciadores específicos para cada uno de ellos (Tabla 1). Esto se realizó empleando el programa PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) donde se proporciona la secuencia de interés y el programa sugiere algunos pares de iniciadores indicando además la temperatura de alineamiento, porcentaje de guanina y citosina, la longitud, probabilidad de formación de dímeros, etc. Los iniciadores fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 1. Características de los iniciadores

Gene	Tamaño esperado del producto (nt)	Longitud (nt)	Tm (°C)	%GC	Primer	Secuencia (5' - 3')
cTPI	192	20	60.06	50	S	AAGAGGTGCACGAGCAAGTT
			59.92	45	AS	CGGCAACGATATCCAAGAAT
HSP70	182	20	59.95	40	S	TCGTTTGGGGAAAAACAAAG
			59.93	50	AS	TCAACGTATCCCCTTTCGTC
PABP	218	20	60.07	50	S	CCATGATGATGCAGTGAAGG
			59.97	50	AS	CGTCATCAACGTTGTCATCC
rRNA 18S	193	20	59.94	55	S	CTTAGATCGCTGCCAGATCC
			60.05	50	AS	GATTTCTCGTTGTGGGAGGA
β -actina (constitutivo)	212	20	59.94	45	S	ATGAAGCCTTCCATGATTGG
			59.97	50	AS	GGTGCAACCACCTTGATCTT

Tabla 1. Características de los iniciadores seleccionados para la PCR. **%GC**: porcentaje de guanina y citosina, **Tm**: temperatura de desnaturalización, **S**: Sentido, **AS**: Anti-sentido. Los iniciadores para amplificar el gene del rRNA 18S se diseñaron con base en una secuencia conservada de varios genes de *Euglena gracilis* reportados en el GenBank.

6.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR punto final)

La amplificación de los genes se realizó de acuerdo al kit Platinum Taq I DNA Polymerase de Invitrogen. Se utilizó el termociclador Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.

1. Se adicionó lo siguiente a un tubo de PCR 0.2-0.5 mL

	Volumen (μL)
Componente	1 rxn
10X PCR buffer	5
50 mM MgCl ₂	1.5
10 mM dNTPmix	1
10 μM iniciador en sentido	1
10 μM iniciador antisentido	1
cDNA	0.4
Agua destilada estéril	2
Platinum Taq DNA Polimerasa	38.1
Vol. Final	50

2. Se mezcló suavemente y se incubó a 94 °C por 2 min. Se llevaron a cabo las condiciones necesarias para la amplificación (Figura 2).

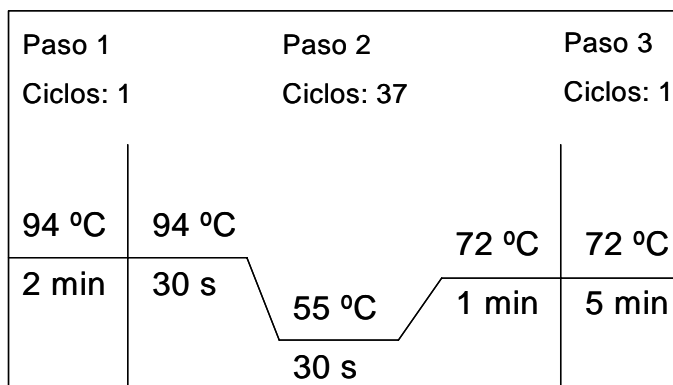


Figura 2. Condiciones de amplificación para la PCR punto final. Se incluyen temperaturas, tiempos y ciclos.

Paso 1: Desnaturalización

Paso 2: Desnaturalización
Alineamiento
Extensión

Paso 3: Extensión final

3. Se analizaron 10 μL de la muestra amplificada usando electroforesis en gel de agarosa.

6.9. Plásmidos recombinantes

Se realizó una curva estándar para poder cuantificar el número de copias de un gene que hay en la muestra de interés. Para ello se requiere tener los genes de interés

y los de referencia, o al menos la parte que se va a amplificar, clonados en un plásmido que servirá como molde para amplificar por PCR para tenerlo en cantidades conocidas. Se realizan los PCR utilizando los mismos iniciadores que se utilizarían para el ensayo de la cuantificación y así se obtuvieron los insertos que fueron ligados en el vector pGEM-T Easy. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* con este plásmido recombinante y se realizó una minipreparación.

6.10. Clonación de los fragmentos de los genes empleados para las curvas estándar

6.10.1. Células competentes

1. Con una colonia aislada de *E. coli* de la cepa XL1-Blue se inocularon 5 mL de medio LB (ver apéndice) (en un tubo 13 x 100 mm) y se incubó a 37 °C con agitación constante (250 rpm) toda la noche.
2. Del cultivo anterior se preparó un nuevo cultivo, tomando 1 mL y colocándolo en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio fresco en una dilución 1:50, se incubó a 37 °C con agitación constante (250 rpm)
3. Cuando el cultivo tuvo una D.O. de 0.55-0.6 a 600 nm (aproximadamente a las 3 horas) se cosecharon las células centrifugando a 1075 x *g* (en un rotor de ángulo fijo, empleando una centrífuga Sorvall RB-X) durante 10 min a 4 °C.
4. Se obtuvo una pastilla que se resuspendió en ½ del volumen inicial (25 mL) de una solución de CaCl₂ 50 mM helado.
5. Se incubó en hielo durante 5 min; se centrifugó de nuevo a 1075 x *g* durante 10 min a 4 °C.
6. La pastilla se volvió a resuspender, esta vez en 1/15 del volumen original (3.3 mL) en la misma solución de CaCl₂ 50 mM helado.
7. Se hicieron alícuotas de las células en tubos eppendorf con 100 µL cada uno, con glicerol al 15%, congelándose a -70 °C hasta su uso.

6.10.2. Purificación de productos de PCR

Se hizo de acuerdo a las indicaciones descritas en el sistema Rapid PCR Purification de Marligen. Se realizó PCR punto final sólo para los genes cTPI, rRNA 18S y β-actina ya que los genes HSP70 y PABP ya estaban clonados por un trabajo previo de Hernández-Navarro (2003).

1. Preparación de la muestra: se adicionaron 400 μL de la solución de unión (H1) a la reacción de amplificación y se mezcló completamente.
2. Carga del cartucho: se colocó un cartucho de carga dentro de un tubo de lavado de 2 mL. Se cargó la muestra del paso anterior dentro del cartucho. Se centrifugó la mezcla a 12,000 x g por 1 min.
3. Lavado: se colocó el cartucho anterior dentro de un tubo de lavado de 2 mL. Se adicionó al cartucho 700 μL de Buffer de lavado (H2). Se centrifugó a 12,000 x g por 1min. Se centrifugo de nuevo a 12,000 x g por 1min se removieron todos los residuos del Buffer de lavado.
4. Elusión de DNA: se colocó el cartucho dentro de un tubo de 1.5 mL. Se adicionaron 50 μL de buffer TE caliente (65 °C) directamente o al centro del cartucho. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min entonces se centrifugó a 12,000 x g por 2 min.

6.10.3. Reacción de ligación

Se realizó de acuerdo a las indicaciones descritas en el sistema pGEM-T Easy Vector System I.

Reactivo	Reacción estándar (μL)
2 X rapid ligation buffer, T4 DNA ligase	5
pGEM-T Easy	1
Producto de PCR	3
T4 DNA ligase	1
Agua desionizada estéril a un volumen final de	10

Se mezcló la reacción con la pipeta. Se incubó la reacción a 4 °C por 16 h.

6.10.4. Transformación

1. A 100 μL de células competentes de *E.coli* XL1-Blue se añadieron de 5 a 10 μL de la reacción de ligación y se incubó en hielo durante 30 min.
2. Los tubos se sacaron del hielo y se colocaron en un baño de 42 °C por 3 min e inmediatamente se pasaron a hielo por 1 min.
3. Se añadieron 4 volúmenes (400 μL) de medio A (ver apéndice) a las células y se incubaron a 37 °C durante 1 ó 2 h.
4. Después de la incubación, las células se sembraron en cajas con agar LB que contenían ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar colonias con el plásmido pGEM.

También se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la transcripción del promotor del operón de lactosa y X-gal a una concentración final 80 µg/mL que daría coloración azul al reaccionar con las colonias que expresaran a la β-galactosidasa y que muy probablemente no contendrían inserto clonado en pGEM.

5. Se incubaron a 37 °C por 12 h.

6.10.5. Extracción de DNA

1. Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en la caja con ampicilina, IPTG y X-gal, y se sembraron en 5 mL de medio líquido LB.

2. Se incubaron 12 h a 37 °C con agitación.

Posteriormente se siguieron los pasos de acuerdo a las indicaciones descritas en el sistema Rapid Plasmid Purification de Marligen Bioscience.

1. Cosecha de células: se removió el medio centrifugando a 15,000 x g 30 s.

2. Células en suspensión: se adicionaron 250 µL Buffer de suspensión de células de (G1) al pellet y se homogenizo.

3. Lisis de la célula: se adicionaron 250 µL de la solución de lisis (G2). Se mezcló suavemente por inversión del tubo 5 veces. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min.

4. Neutralización: se adicionaron 350 µL de buffer de Neutralización (M3) y mezcló inmediatamente por inversión del tubo 5 veces. Se centrifugó la mezcla a 12,000 x g por 10 min.

5. Carga del cartucho: se colocó un cartucho de centrifuga en un tubo de lavado de 2 mL. Se cargó el sobrenadante del paso 4 en el cartucho. Se centrifugó a 12,000 x g por 1 min. Se descartó el sobrenadante.

6. Lavado del Cartucho: se colocó el cartucho dentro del tubo de lavado y posteriormente se le adicionaron 700 µL de buffer de lavado (G4). Se centrifugó a 12,000 x g por 1 min. Se descartó el sobrenadante. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 1 min.

7. Elusión del plásmido: se colocó el cartucho dentro de un tubo de 1.5 mL. Se adicionaron 75 µL de buffer TE a 65 °C directamente en el centro del cartucho. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min, entonces se centrifugó a 12,000 x g por 2 min.

6.10.6. Cuantificación

Se llevó a cabo la cuantificación del DNA plasmídico con Nano Drop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer. La concentración del DNA plasmídico fue medida colocando 2 μL de cada plásmido recombinante en el Nano Drop, posteriormente el programa dió los resultados de concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$, la absorbancia a 260 y 280 nm, la relación de 260/280 y la relación 260/230.

6.10.7. Secuenciación

Se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se llevó a una concentración de 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$. La secuenciación se hizo utilizando el cebador T7 y fue realizada 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 obtenidas fueron analizadas y comparadas con el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.11. PCR en tiempo real

La reacción de amplificación de los fragmentos específicos de los genes se realizó con SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems. Se utilizó el termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Los resultados fueron analizados por el software con el mismo nombre.

6.11.1. Curva estándar

Para poder obtener las curvas estándar fue necesario realizar diluciones de cada plásmido recombinante buscando que estas curvas al amplificar abarcaran un determinado número de ciclos (11 a 25 ciclos aproximadamente) dentro de los cuales pudiera caer la amplificación de la muestra. Para lo cual se tuvieron que realizar varios ensayos amplificando algunas muestras al mismo tiempo que las diluciones de los plásmidos. Al mismo tiempo que se realizaba esto se estandarizaban condiciones.

6.11.2. Cuantificación de la expresión.

Ya que se estandarizaron las condiciones se prosiguió a realizar la cuantificación. Cada reacción contenía lo siguiente:

	Volumen (μL)
Componente	1 rxn
Master mix	7
10 μM iniciador en sentido	0.4
10 μM iniciador antisentido	0.4
cDNA (700 ng/ μL)	1
Agua destilada estéril	11.2
Vol. Final	20

Nota: para el blanco sólo no se adiciona cDNA.

1. Todo el material utilizado (tubos, pipetas, guantes, puntas y agua desionizada) fue irradiado por 15 min con UV, previamente a su uso.
2. Se preparó la mezcla de iniciadores (en sentido y antisentido) para cada gene por separado dando un volumen final de 38.4 μL cada una (mezcla 2 (M2) y mezcla 3 (M3)), tanto el de interés como el constitutivo por separado.
3. Posteriormente se preparó una mezcla para 96 reacciones tanto para muestras, curva estándar y blancos para ambos genes (mezcla uno (M1)), la cual incluyó 1,075.2 μL de agua desionizada estéril y 672 μL de Master mix (SYBR Green PCR Master mix (No cat. 4309155 Applied Biosystems) conteniendo Amplitaq Gold DNA polimerasa, dNTPs con dUTP y componentes del buffer.
4. Se adicionó en 10 tubos eppendorf un volumen de 109.2 μL de la M1 estos fueron utilizados sólo para las muestras de cada gene. En otros 12 tubos se adicionó a cada uno un volumen de 54.6 μL de M1 estos fueron utilizados para los puntos de la curva estándar y blancos.
5. A los 10 tubos de las muestras se les adicionó 6 μL de cDNA, para ambos genes. Se mezclaron y se recolectaron por medio de un pulso, posteriormente cada uno de los 10 tubos se dividieron en 2 quedando un volumen de 57.6 μL . A los 8 tubos para la curva estándar se les adicionaron 3 μL de DNA plasmídico de cada gene y a 4 tubos se le adicionaron 3 μL de agua desionizada estéril para los blancos.
6. A los 20 tubos para las muestras (10 de cada gene), los 8 tubos de las curvas estándar (4 de cada gene) y para los 4 tubos de los blancos (2 de cada gene) se les adicionó 2.4 μL de la M2 y M3 respectivamente

7. Las mezclas de cada tubo se dividieron en tres y se pasaron a la placa para qPCR, la placa se cubrió con cinta adhesiva óptica.
8. Se metió al termociclador bajo las siguientes condiciones:

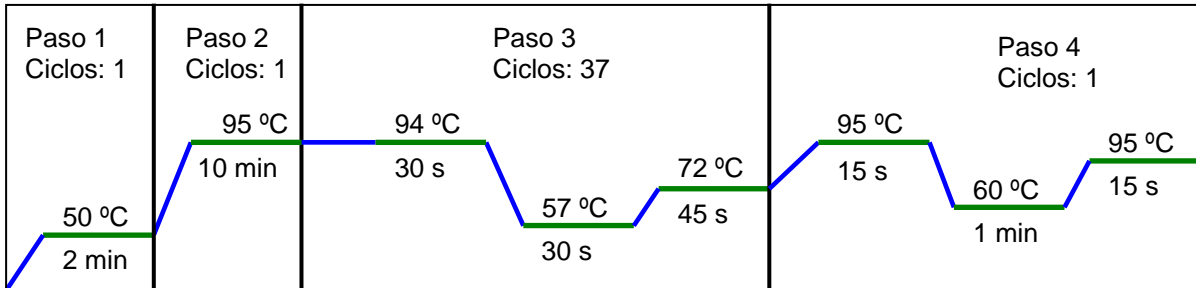


Figura 3. Condiciones de la qPCR, incluyendo Temperaturas en grados centígrados y tiempo en minutos además de el número de ciclos de cada paso.

9. Se analizaron los resultados obtenidos por el software del equipo.
10. El paso 4 de la Figura 3 se realiza para determinar la temperatura de disociación de los productos amplificados (curva de disociación), en la cual la temperatura aumenta a una velocidad de 1.75 °C/min, en un rango de 60 a 95 °C.

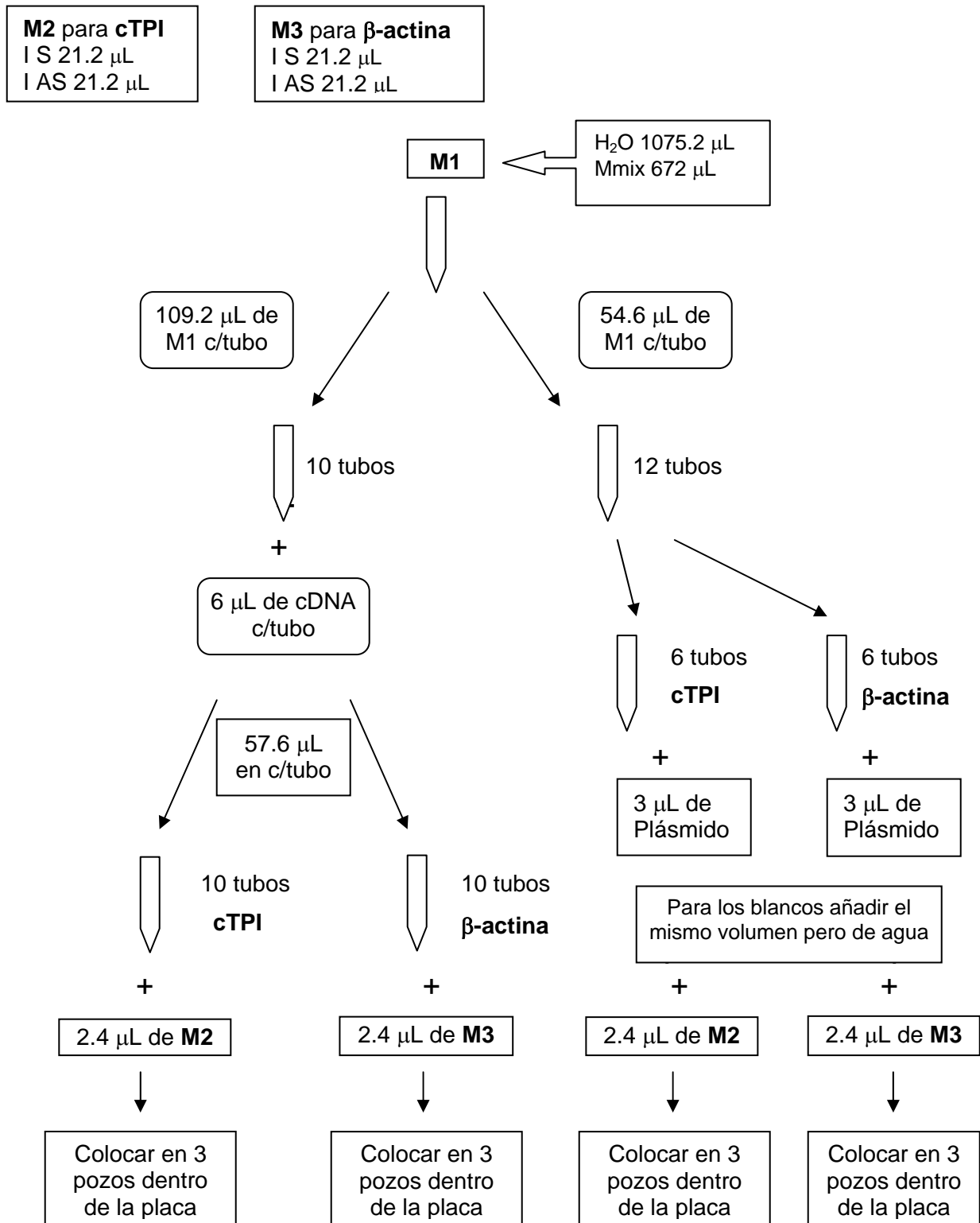


Figura 4. Diagrama experimental para la cuantificación de la expresión de cTPI. Este experimento se diseñó de esta manera para evitar la variación que pudiera producirse por la adición independiente del molde.

7. Resultados

7.1. Cuantificación e integridad del RNA total

RNA total fue extraído de cultivos de *E. gracilis* no expuesta y expuesta a 170 μM a Cd^{2+} , de muestras tomadas a las 6, 9, 12, 24 y 30 h (trabajo de Servicio Social realizado por la alumna Myriam Villalpando). Estas muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 2. Cuantificación de RNA total

Muestra	6 h s/Cd ¹	6 h c/Cd	9 h s/Cd	9 h c/Cd	12 h s/Cd	12 h c/Cd	24 h s/Cd	24 h c/Cd	30 h s/Cd	30 h c/Cd
RNA total [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	15.57	14.4	22.11	20.55	11.06	11.23	8.27	4.73	14.42	8.19

Tabla 2. Cuantificación de RNA total obtenido por el método de Tiocianato de guanidina /fenol cloroformo. ¹ s/Cd: cultivos sin Cadmio. c/Cd: cultivos con Cd

La integridad del RNA total obtenido previamente, fue analizada por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 5). La electroforesis mostró que el RNA total estaba en buen estado y no presentaba degradación. Por lo tanto era posible utilizarlo para hacer la purificación de poli A⁺.

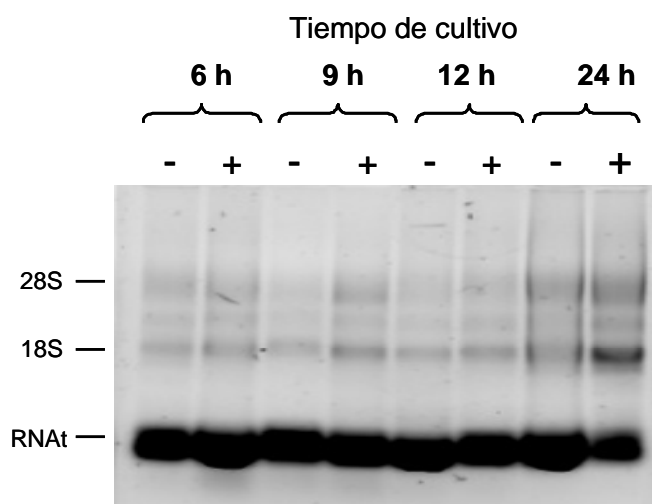


Figura 5. Alícuotas de 5 μg de RNA total obtenidas de diferentes tiempos de cultivo en medio sin (-) y con (+) 170 μM Cd^{2+} fueron resueltas en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **28S**: Subunidad ribosomal 28S, **18S**: Subunidad ribosomal 18S, **RNA_t**: RNA de transferencia.

7.2. Diseño de iniciadores

Se procedió a realizar el diseño de los iniciadores para cada gene de interés. Una vez que se conocen las condiciones para elegir el par de iniciadores para amplificar el gene de interés, el fragmento a amplificar debe ser de aproximadamente 200 nt y los pares de iniciadores deben tener temperaturas de desnaturalización cercanas a 60 °C. En la Tabla 2 se presentan los pares de iniciadores seleccionados con estos criterios.

7.3. PCR punto final

Se realizó transcripción reversa de RNA total y de poli A⁺ y posteriormente la PCR con el cDNA sintetizado con los diferentes pares de iniciadores para obtener fragmentos específicos de los genes correspondientes, por lo que fue necesario establecer las condiciones de temperatura y tiempo adecuadas para una amplificación exitosa (Figura 2). También se metió un control (no RNA) que no mostró ninguna banda de amplificación (datos no mostrados). Después de la amplificación los resultados fueron analizados en un gel de agarosa al 1.2 % (Figura 6).

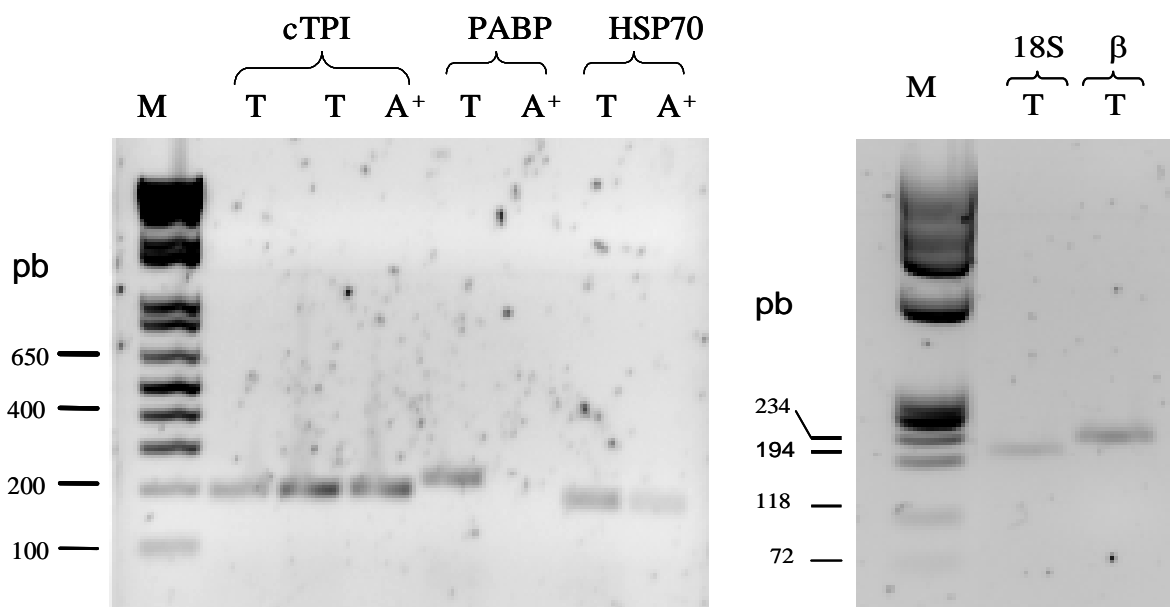


Figura 6. Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando como molde cDNA obtenido a partir de RNA total (T) o RNA poliA⁺ (A⁺) de la muestra de 24 h sin Cd. Se emplearon los pares de iniciadores correspondientes a los genes estudiados: **cTPI**: Triosa fosfato isomerasa citosólica, **PABP**: Proteína de unión a colas de poli A, **HSP70**: Proteína de respuesta a estrés por calor de 70 kDa, **18S**: Subunidad ribosomal 18S, **β**: Beta actina. Los productos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.2%. **M**: marcador de peso molecular, **pb**: pares de bases.

En este gel se pudo observar que tanto con RNA total como con RNA poli A⁺ fue posible amplificar un solo amplicón ya que se observan bandas únicas en cada reacción y del tamaño esperado, calculado con base en la secuencia a amplificar. Estos resultados indican que los iniciadores son adecuados para el objetivo planteado. Debido a que los resultados de la PCR empleando cDNA sintetizado a partir de RNA total o a partir de poli A⁺ produjeron resultados semejantes (una sola banda), se decidió que la RT-PCR se haría con RNA total para no correr riesgos de perder las muestras en el proceso de purificación de RNA poli A⁺ por ejemplo en el carril de PABP A⁺ de la Figura 6 que no apareció banda probablemente por esta razón.

7.4. Plásmidos recombinantes

En el laboratorio se tenían clonados en plásmidos, secuencias de los genes cTPI, PABP y HSP70, que habían sido obtenidos al identificarlos como genes que aumentaban su expresión en presencia de Cd, en un estudio de AFLP (Hernández Navarro, 2003). Sin embargo, fue necesario volver a clonar un fragmento de cTPI debido a que el fragmento que se tenía clonado previamente era una secuencia de nucleótidos muy pequeña (170 pb) y además porque no fue posible encontrar un par de iniciadores que tuvieran las características adecuadas para amplificar esa región. Por lo tanto nos basamos en la secuencia reportada en el GenBank para diseñar los iniciadores que sirvieron para amplificar y clonar un fragmento con las características adecuadas. Además por requerimientos de la técnica, es decir la necesidad de medir la expresión de genes constitutivos, se amplificaron y clonaron segmentos para los genes rRNA 18S y β -actina.

Los plásmidos recombinantes resultantes de la ligación de los fragmentos correspondientes se secuenciaron para corroborar que se había ligado correctamente el producto de la PCR dentro del vector pGEM. Los insertos fueron secuenciados y analizados con el Equipo: Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 Método: Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Las secuencias mostraron 100% de identidad con las secuencias reportadas en el GeneBank (Figura 7).

7.5. PCR en tiempo real

En este punto se realizaron varios ensayos para estandarizar condiciones y poder llevar a cabo la cuantificación de los genes de interés, para lo cual se modificaron varios parámetros de amplificación del paso tres (Figura 3).

TPI citosólica (192 pb) AN: AY342150

```
AAGAGGTGCACCAGCAAGTTCGTGCCTGGGTTGCCAGCAATGTCAGCCCTTCAGTTGC
CGCTGAGGTTTCAATTCTGTATGGTGGTTCAGTGACAGCAAAGAACAGTGCGGAGCTG
GCAGGAAAGCCTGATGTGGATGGTTTCTTGGTTGGTGGAGCCTCTTTGAAGCCCGAATT
CTTGATATCGTTGCCG
```

rRNA 18S (193 pb) (secuencia conservada) AN: AF283308.1, AJ532426.1, AJ532425.1, AF283309.1 y AY029409.1

```
CTTAGATCGCTGCCAGATCCACTGCAGCGAAGGCGTTCTGCAAGTGCACGTCCGTCGA
TCAAGAATGAGAGTTCGGGGAGCAAAGATGATCAGACACCGTCGTAGTCCGGCCACTG
TAAACGATGCCGGCCAGGCCTTGGCAGAGCAAGAATCCTAGACTCTGTCAGGGCCACT
CCTCCACAACGAGAAATC
```

β -actina (212 pb) AN: AF057161

```
ATGAAGCCTTCCATGATTGGCCTTGAAGCCTGTGGTGTCCATGAAACCACCTTCAACTC
CATCAACAAGTGCGACATTGATGTTTCGCAAGGATTTGTAAGTCCAACATTGTGCTGTCTG
GTGGCACCACGATGTATGAGGGGCTTCCAGAGCGCATGTCCAAGGAGATCACGAACCT
TGCGCCCAACAGCATGAAGATCAAGGTGTTGCACC
```

Figura 7. Secuencias de los insertos de los diferentes genes dentro del vector pGEM. A.N. Acceso number para el GeneBank.

Establecimiento de las condiciones para realizar las curvas estándar.

Ensayo 1. HSP70 de 1 a 1,000 ng.

Para la PCR cuantitativa se tuvieron que estandarizar condiciones de amplificación, lo primero que se realizó fue obtener la curva estándar. Para esto se realizaron diluciones de plásmido con inserto del gene de HSP70 de a 1000, 100, 10 y 1 ng y posteriormente se amplificaron con las siguientes condiciones:

Desnaturalización 94 °C 30 s

Alineamiento 55 °C 30 s

Extensión 72 °C 1 min

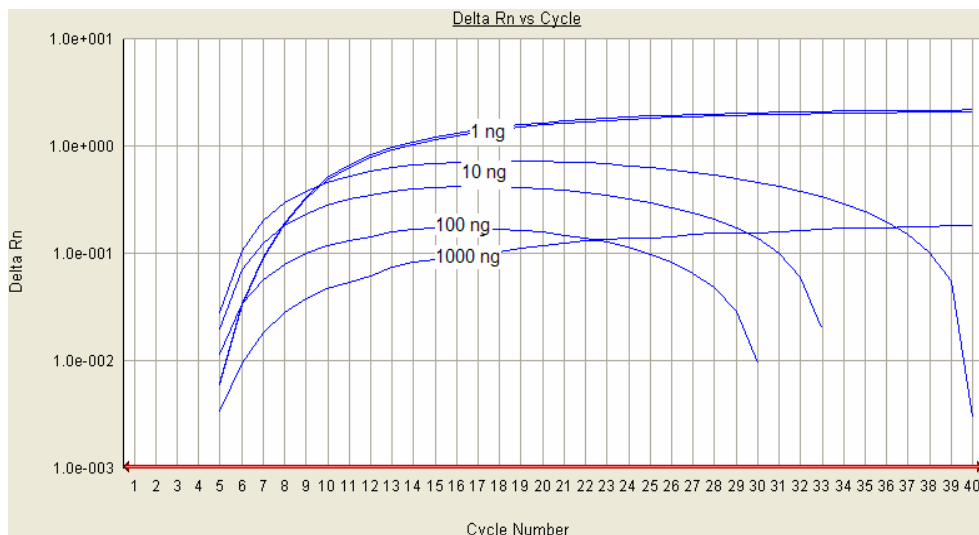


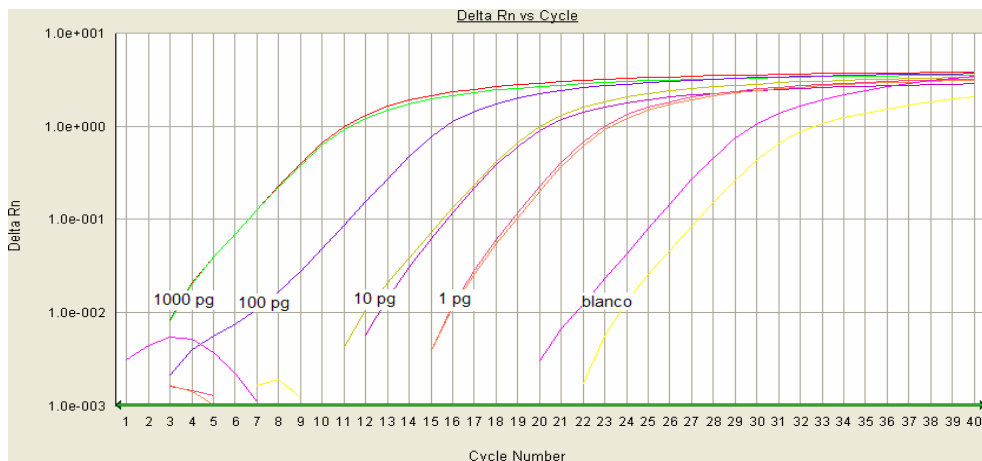
Figura 8. Amplificación de curva estándar de HSP70 de 1000 a 1 ng de plásmido recombinante. Las reacciones para cada dilución se realizaron por duplicado, pero en el caso de 100 y 1,000 ng se eliminaron sus repeticiones ya que no se amplificaron correctamente.

Como se puede ver en la Figura 8, la amplificación se dió en ciclos muy tempranos ya que en 1 ng de DNA plasmídico recombinante de HSP70 hay aproximadamente 304'700, 000 copias (ver apéndice).

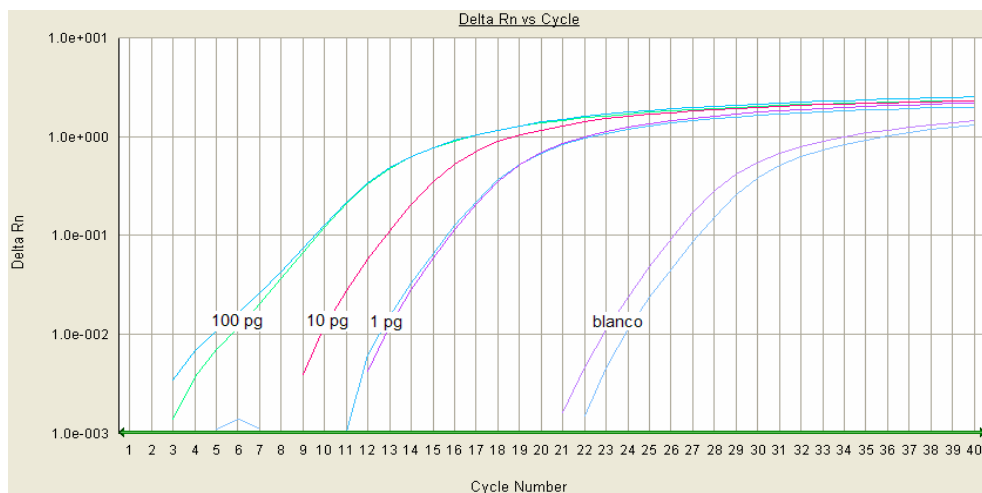
Ensayo 2. HSP70 y PABP de 1 a 1,000 pg.

En este ensayo se prosiguió con diluciones de los plásmidos recombinantes de PABP y HSP70 probando diluciones de 1000 pg a 1 pg (Figura 9). Se utilizaron las mismas condiciones que en el ensayo 1.

En esta prueba se cubrió un amplio intervalo de diluciones observándose amplificación en ciclos muy tempranos. Esto implicaría que la concentración de muestra a utilizar tendría que ser alta. Por lo que se decidió realizar las curvas estándar con diluciones menores a 10 pg de DNA plasmídico recombinante ya que los resultados de la amplificación serían en ciclos más avanzados y así se abarcarían los ciclos centrales para la curva estándar. En un ensayo preliminar con la muestra se observó amplificación para el rRNA 18S en el ciclo 14 y para cTPI en el ciclo 26 (datos no mostrados). Un problema que se pudo observar aquí es que los blancos amplificaron lo cual nos indicaba una contaminación.



PABP

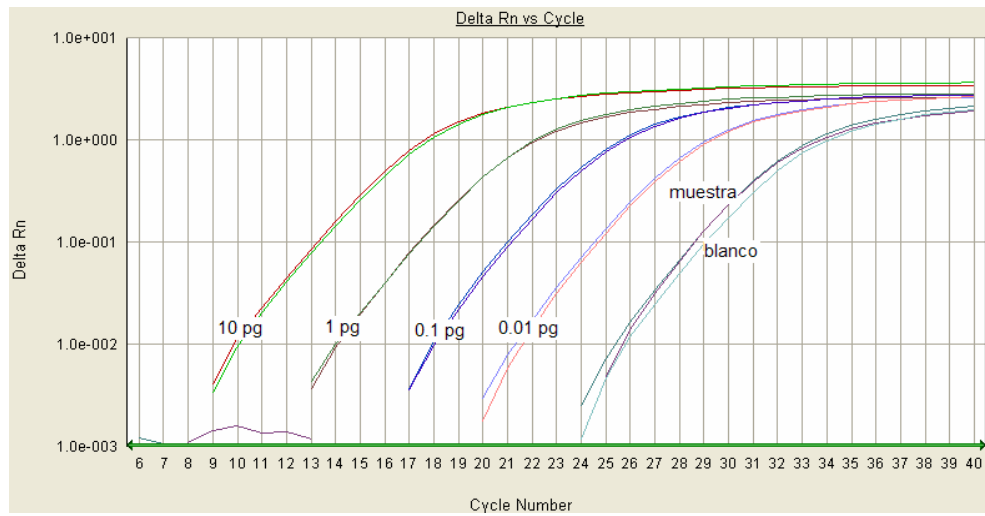


HSP70

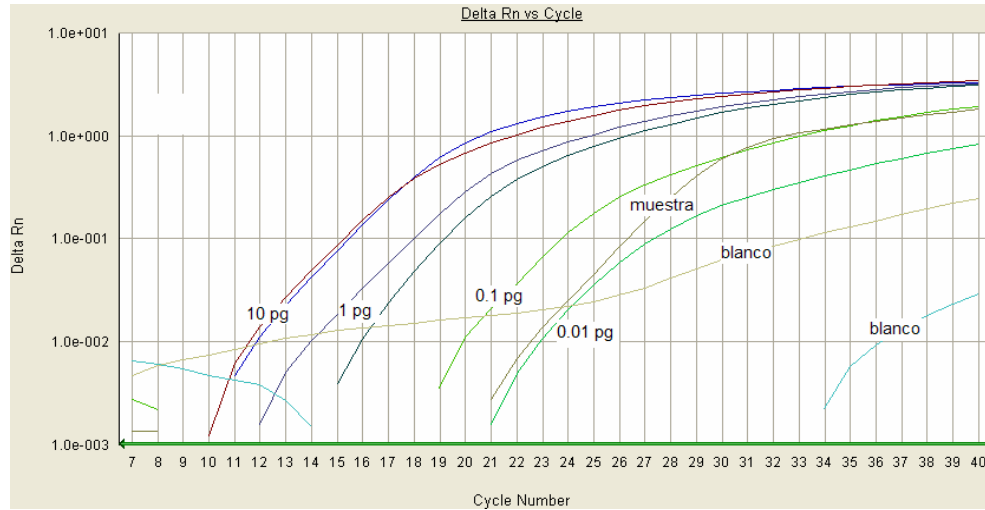
Figura 9. Amplificación de curva estándar y blanco de PABP y HSP70. Para cada dilución se realizó un duplicado, pero en algunos casos éste se eliminó ya que se tuvo problemas con su amplificación.

Ensayo 3. Pruebas con una muestra y establecimiento de las condiciones para un blanco correcto.

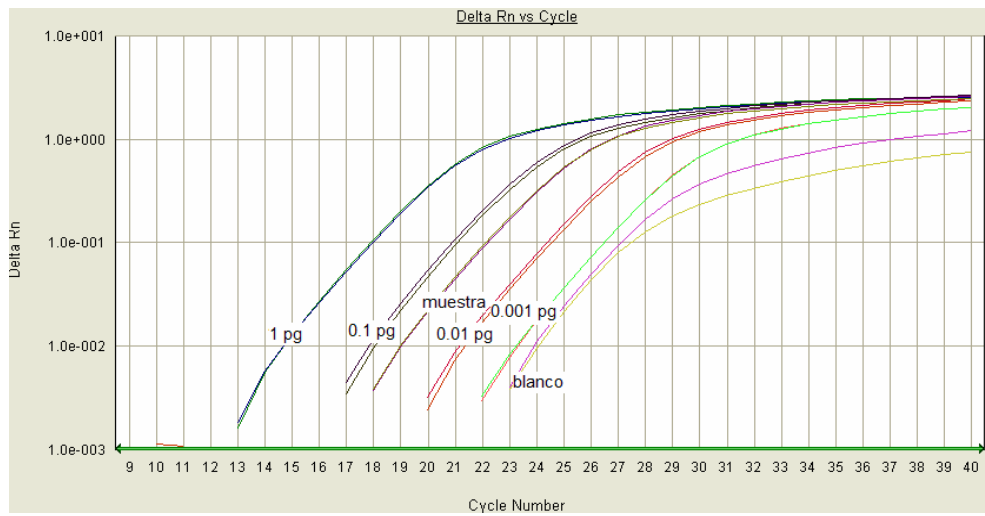
El objetivo de este ensayo fue comenzar a trabajar con las muestras. Para ello se utilizó solo una muestra para amplificar todos los genes. Para eliminar la contaminación del blanco todo el procedimiento de mezclas se realizó en una campana de flujo laminar (Figura 10). Las condiciones de amplificación siguieron siendo las mismas del ensayo 1.



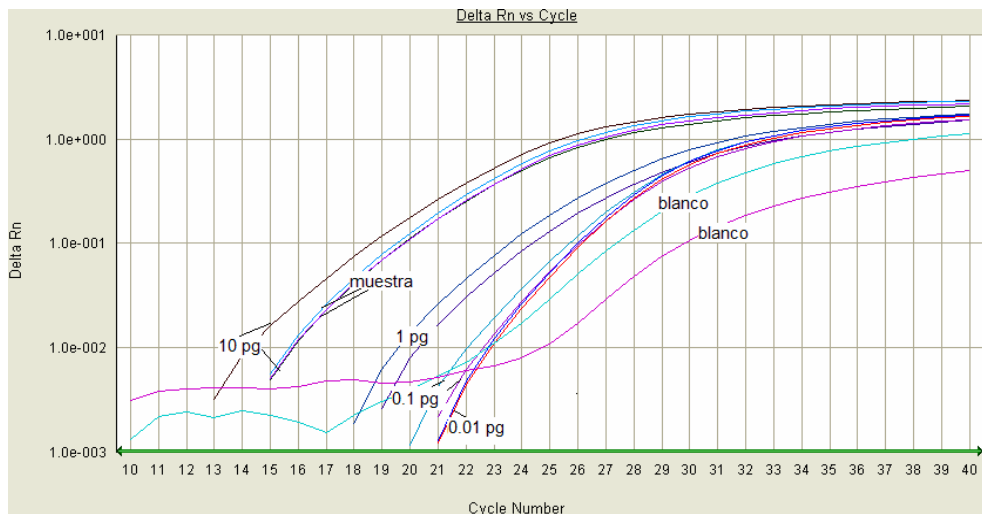
cTPI



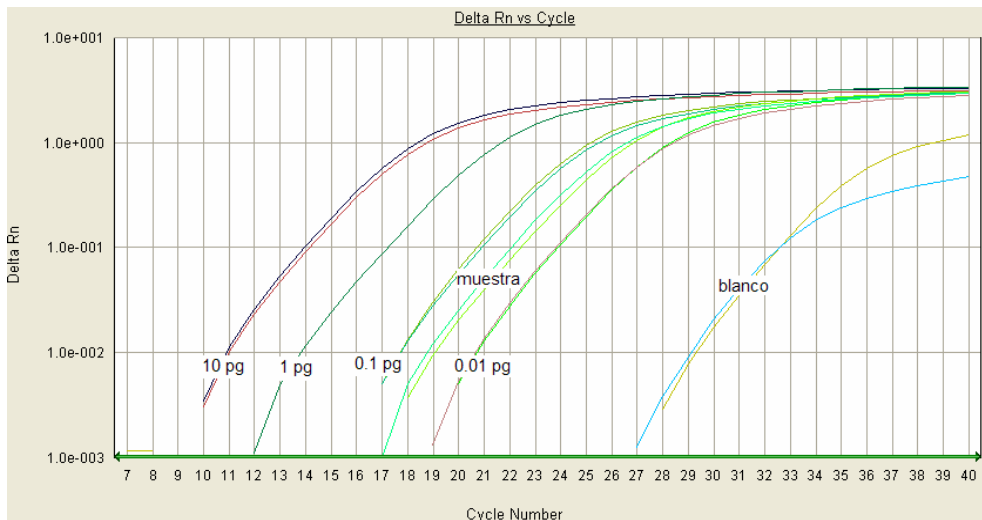
PABP



HSP70



rRNA 18S



β -actina

Figura 10. Amplificaciones de cTPI, PABP, HSP70, rRNA 18S y β -actina. Para cada ensayo se incluyó su curva estándar, muestra y un blanco. Cada reacción se llevó a cabo por duplicado, pero en algunos casos fue necesaria la eliminación de alguno de ellos ya que presentó problemas en su amplificación. En todos los casos la curva estándar empieza en 10 pg excepto en el caso de HSP70 en donde inicia con 1 pg ya que debajo de esta concentración es donde cae la muestra.

En estas figuras se observa que hay complicaciones con las curvas estándar de PABP y rRNA 18S, ya que su amplificación fue dispersa y no cada 3.3 ciclos como se esperaba.

En estas reacciones también se verificó que la amplificación de la muestra y las curvas estándar dieran un solo producto de amplificación. En la Figura 11 se presentan las curvas de disociación para cada producto.

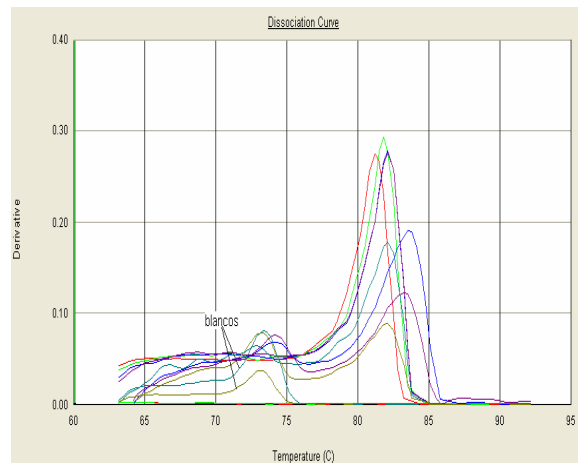
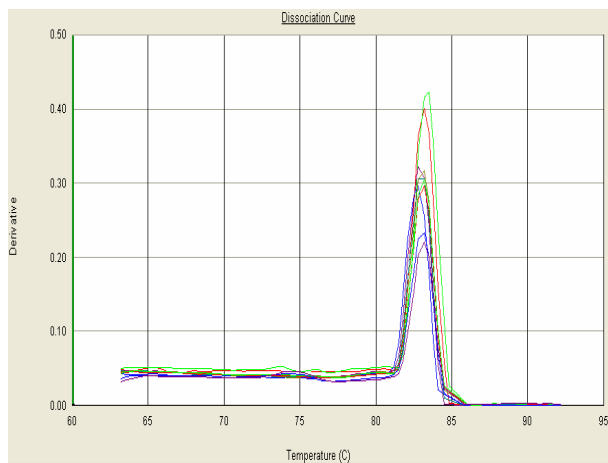
Como podemos ver en las curvas de disociación se obtuvo un solo producto de amplificación a excepción de PABP y rRNA 18S que muestran picos muy amplios y con hombros o varios picos, lo cual indica que hay formación de un producto inespecífico en las reacciones de amplificación para estos genes. Los puntos de la curva estándar de PABP mostraron un hombro en la base del lado izquierdo, la muestra presentó dos hombros uno con una T_m de 73 °C y otro de 83 °C aproximadamente. En el caso de rRNA 18S se observó que se presentan dos productos uno con T_m de aproximadamente de 73 °C y otro a 84 °C, se observó que cuando el plásmido está a una mayor concentración el producto dominante es el de una T_m de 84 °C y a una concentración baja presenta una T_m de 73 °C y en la muestra, a pesar de mostrar dos productos, el mayoritario tiene una T_m de 84 °C.

Un problema que persistió fue la amplificación de los blancos a pesar de haber tomado precauciones utilizando la campana de flujo laminar. Esto hizo pensar que la contaminación podría estar en uno de los reactivos o soluciones que se estaban empleando para la reacción, por ejemplo en cTPI el blanco amplificó casi a la misma altura que la muestra (Figura 10) y en la curva de disociación muestra un pico máximo igual que la muestra (Figura 11).

Ensayo 4. Eliminación de la amplificación en el blanco.

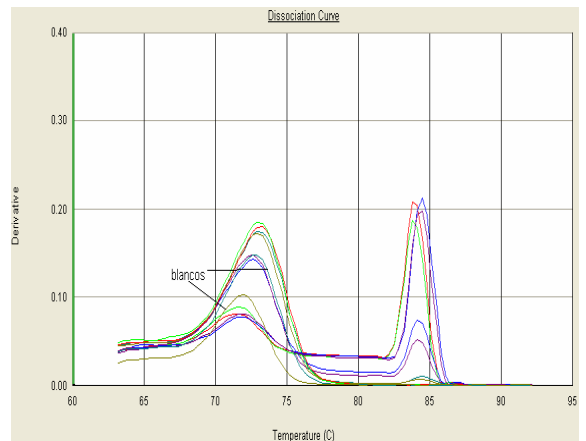
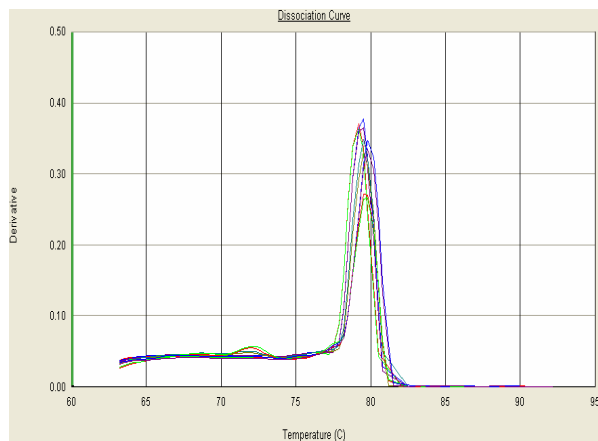
Para impedir la amplificación del blanco se tomaron más medidas preventivas como la filtración del agua desionizada por filtros Millipore de 0.22 μ la cual posteriormente se repartió en alícuotas de 500 y 1,000 μ L en tubos eppendorf estériles de 0.6 mL y 1.5 mL. Estas alícuotas fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C por 15 min y antes de utilizar el agua se irradió con luz UV por 15 min. Posteriormente fue preparada la mezcla por duplicado para cTPI con esta agua tratada y se procedió a amplificar (Figura 12).

En esta figura se puede ver que no hay amplificación del blanco como anteriormente se había dado, logrando así nuestro objetivo de eliminar algún DNA contaminante.



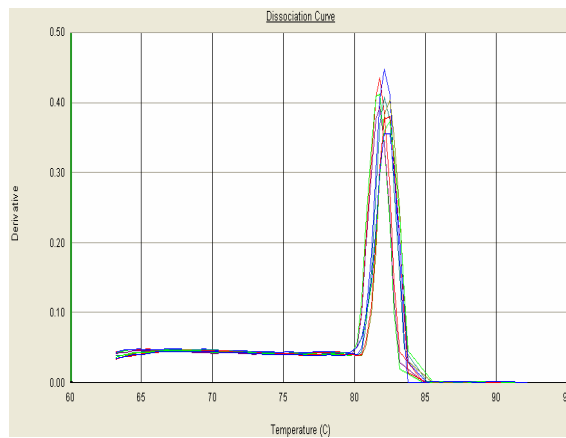
TPI

PABP



HSP70

rRNA 18S



β -actina

Figura 11. Curvas de disociación de cTPI, PABP, HSP70, rRNA 18S y β -actina de curva estándar, muestra y blanco. La temperatura de alineamiento empleada fue de 55°C en todos los casos.

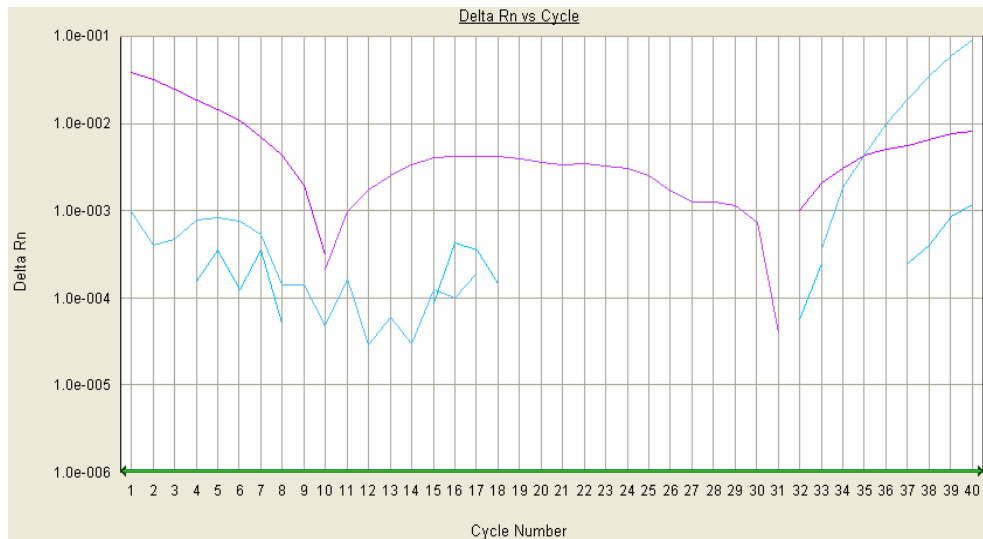
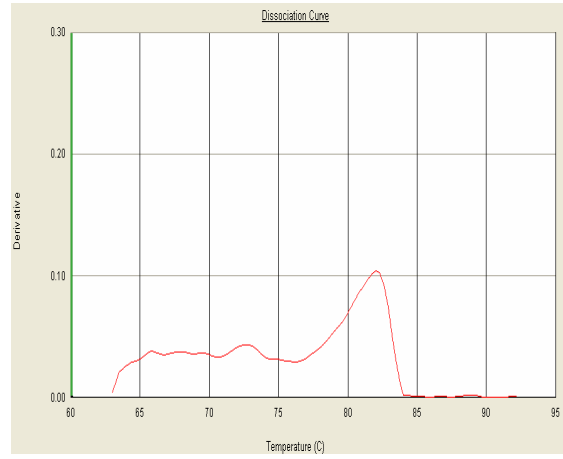
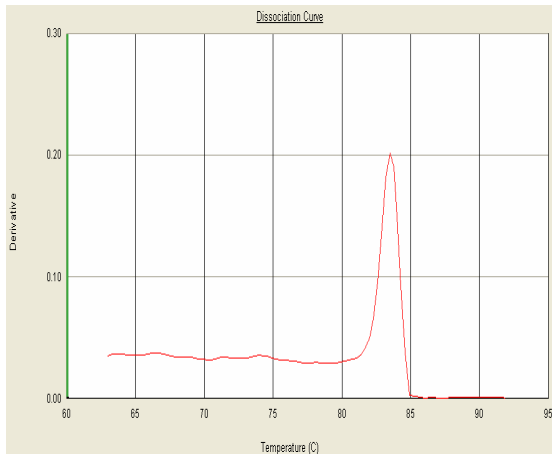


Figura 12. Amplificación de blancos de cTPI.

Ensayo 5. Cambio de condiciones para evitar los productos inespecíficos en la qPCR de PABP y rRNA 18S: aumento de la temperatura de hibridación.

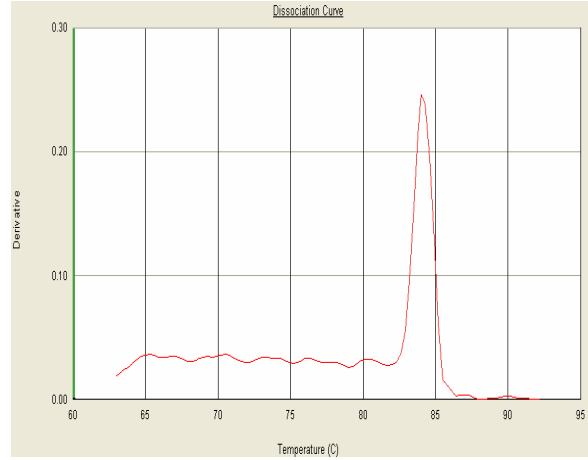
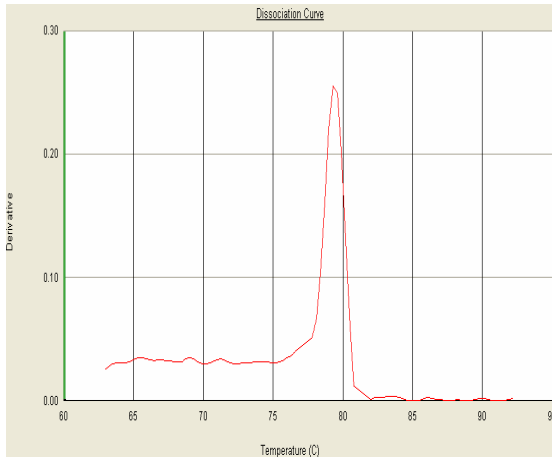
Ya que en el caso de las curvas de disociación de PABP y rRNA 18S presentaron amplificación inespecífica (Figura 7) lo siguiente fue probar con una muestra una temperatura de hibridación mayor (57 °C) para hacer más específica la reacción, las demás condiciones se mantuvieron iguales. Este aumento en la temperatura de alineamiento se aplicó a las reacciones de amplificación de todos los genes (Figura 13).

Las amplificaciones de los genes cTPI y β -actina no mostraron ninguna variación, siguieron teniendo un sólo producto de amplificación. En el caso de la muestra de rRNA 18S que había presentado dos productos, en este ensayo sólo presentó uno con una T_m de aproximadamente 84 °C. La muestra de PABP siguió presentando una amplificación inespecífica.



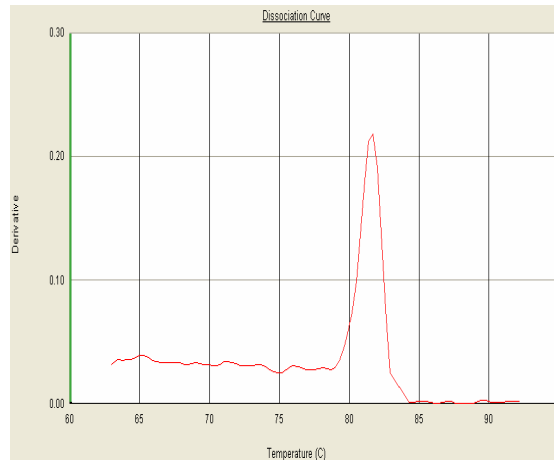
cTPI

PABP



HSP70

rRNA 18S



β -actina

Figura 13. Curva de disociación de la muestra para cTPI, PABP, HSP70, rRNA 18S y β -actina empleando temperaturas de alineamiento de 57 °C

Ensayo 6. Cambio de condiciones para evitar la amplificación de productos inespecíficos en las qPCR para PABP y rRNA: disminución en el período de extensión.

Se prosiguió a cambiar algunos parámetros como la extensión a 72 °C por 45 s (antes 1 min), para poder obtener un sólo producto de amplificación de PABP y rRNA 18S. Estas condiciones fueron probadas para todos los genes. Se utilizó una muestra en varias concentraciones y los plásmidos recombinantes de cada gene para la curva estándar, por duplicado en todos los casos.

En el caso de PABP la disociación de la curva estándar presentó un solo pico (comparar con la Figura 7), tal vez la disminución en el tiempo de extensión mejoró la especificidad de la reacción al disminuir la producción de amplicones inespecíficos. La amplificación de la curva estándar fue lo esperado. Sin embargo, la muestra siguió presentando varios hombros (Figura 14).

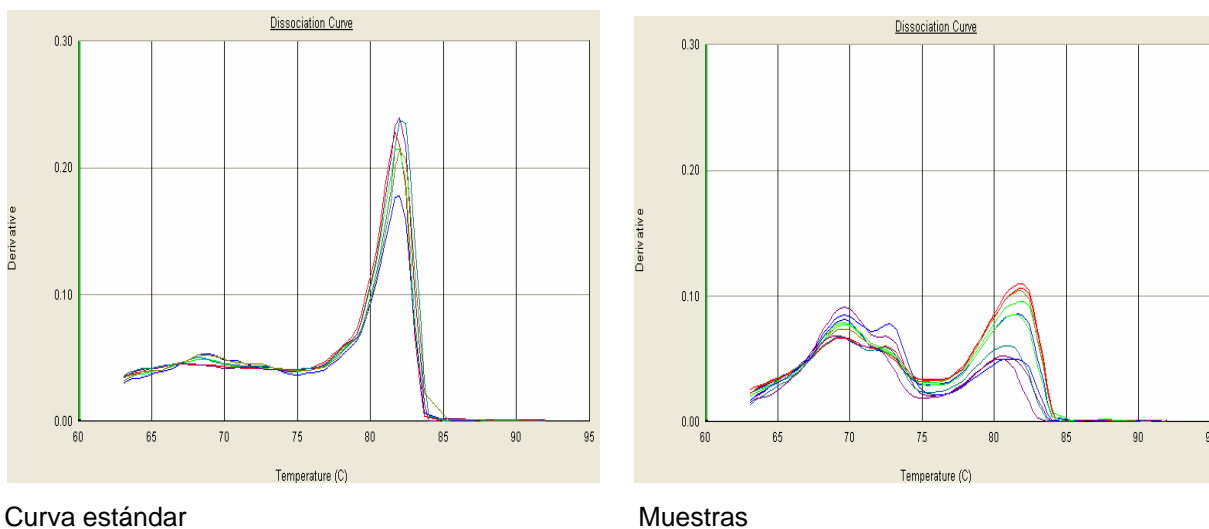


Figura 14. Curvas de disociación de PABP. Temperatura de alineamiento 57 °C, condiciones de extensión 72 °C, 45 s.

En la curva de disociación de rRNA 18S tanto para curva estándar como para la muestra probada sólo se obtuvo un solo producto de amplificación con una Tm de aproximadamente de 84 °C (Figura 15), pero en la amplificación de la curva estándar mostró una amplificación dispersa ya que no aparecen las curvas de amplificación de cada dilución de una manera regular (cada 3.3 ciclos) como era de esperarse de

acuerdo a la concentración de molde analizada (diluciones sucesivas de 1:10) (Figura 16). Esto podría ser debido a errores de manipulación.

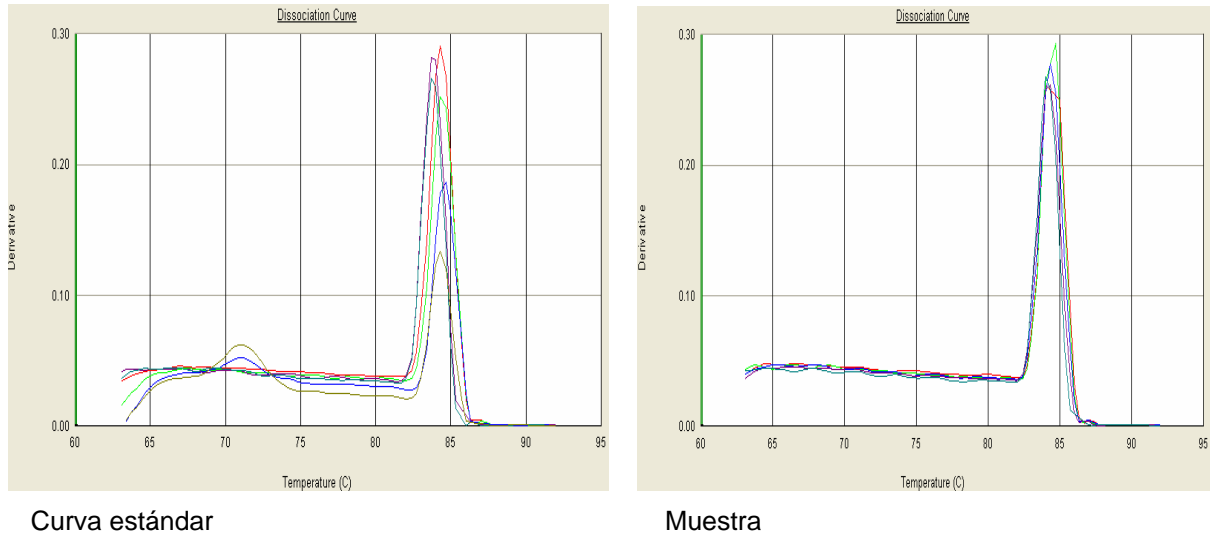


Figura 15. Curvas de disociación de rRNA 18S. Condiciones descritas en la Figura 3 paso 4.

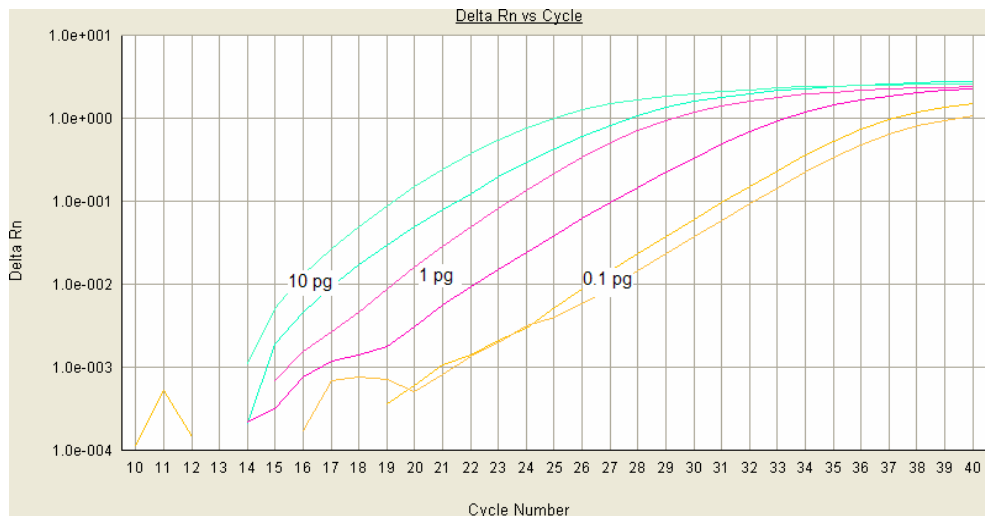


Figura 16. Amplificación de curva estándar de rRNA 18S, cada dilución de DNA plasmídico recombinante por duplicado.

Dado que todos los genes analizados debían correrse en una misma reacción, era necesario establecer si estas nuevas condiciones afectaban los resultados observados anteriormente para los otros tres genes. En el caso de cTPI, HSP70 y β -

actina tanto la curva de disociación como la amplificación no se afectaron con estas nuevas condiciones.

Ensayo 7. Cambio de condiciones para evitar la amplificación de productos inespecíficos en la qPCR para PABP: aumento de la temperatura de alineamiento.

Para esto se prosiguió a aumentar la temperatura de hibridación a 58 °C, y las demás condiciones continuaron iguales, utilizando plásmido recombinante y muestra (Figura 17)

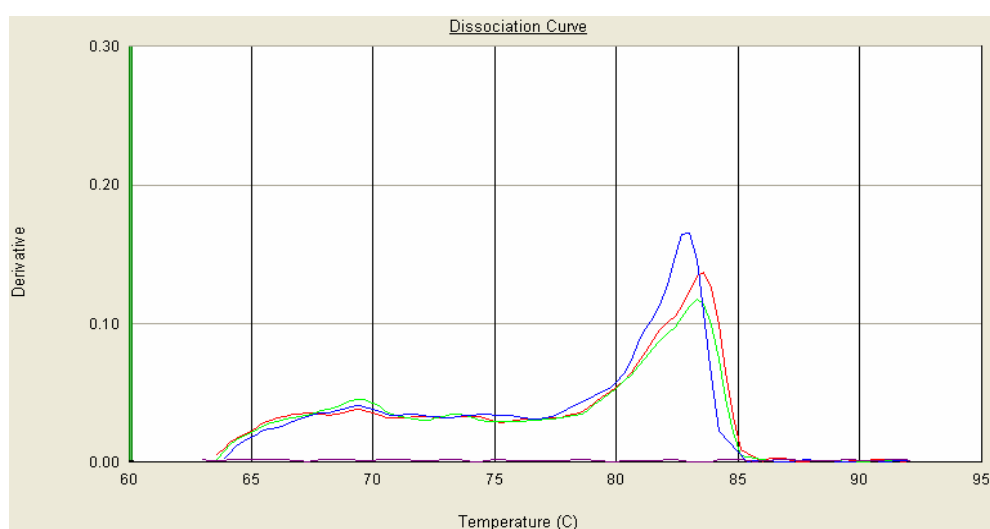


Figura 17. Curva de disociación de muestra y plásmido de PABP. Para cada uno se realizó por duplicado, pero en el caso de la muestra se tuvo que eliminar una repetición por problemas de amplificación.

A pesar de estas pruebas para tratar de mejorar el resultado de la reacción, se siguió observando un hombro muy pronunciado en las curvas de disociación tanto para muestra como para el plásmido. En el caso del plásmido la temperatura le afectó ya que empeoró (se hace más amplia en la base) en comparación del ensayo anterior. Debido a estos resultados ya no se trabajó con este gene.

Ensayo 8. Cuantificación de la expresión de HSP70 utilizando la expresión del rRNA 18S como constitutivo.

Se realizó un ensayo de cuantificación de HSP70 empleando la amplificación del rRNA 18S como gene de referencia, con todas las muestras y con la curva estándar de estos dos genes todo por triplicado, con las mismas condiciones. Los resultados de la

amplificación de la curva estándar para el rRNA 18S mostraron ciclos muy continuos (Figura 18). En teoría, en cada ciclo de PCR el material se duplica, entonces, con cada ciclo de amplificación se obtendría el doble de material del ciclo anterior. Así, el número de ciclos entre cada dilución estará determinado por la ecuación:

$$2^n = \text{Factor de dilución}$$

En donde n es el número de ciclos entre curvas (o el número de ciclos cuando la amplificación alcanza la línea basal (Ct), generalmente el aparato la ubica en 1^{-1}). Por lo tanto para un factor de dilución de 10, $n = \log_2 10$, por lo tanto $n = 3.32$ (Dorak, 2006).

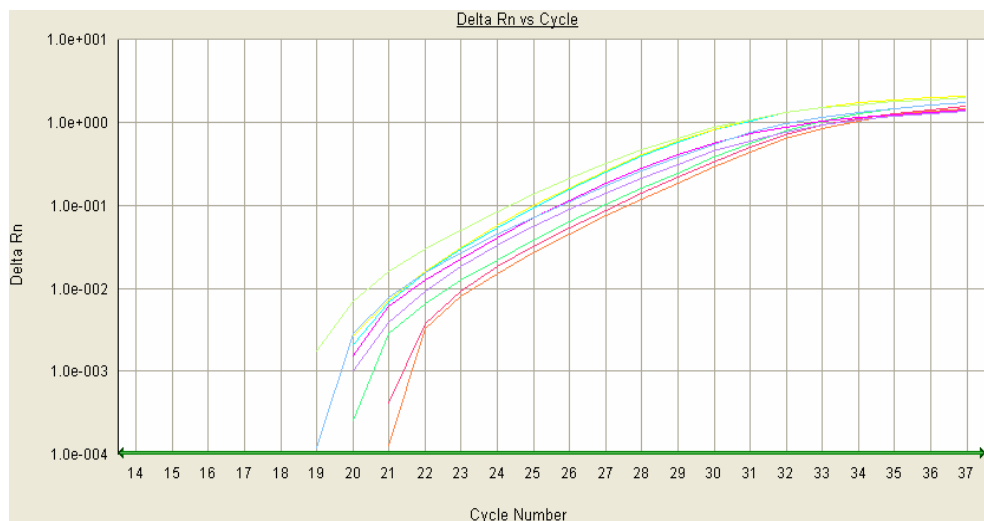


Figura 18. Amplificación de curva estándar de rRNA 18S.

Las curvas de disociación para las muestras y la curva estándar dieron un solo producto con una T_m de aproximadamente $84\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 19). Por lo tanto los defectos en la amplificación de la curva estándar fueron probablemente debido a que las condiciones de amplificación, concentración de iniciadores, temperatura de hibridación o alineamiento, etc., no fueron las adecuadas.

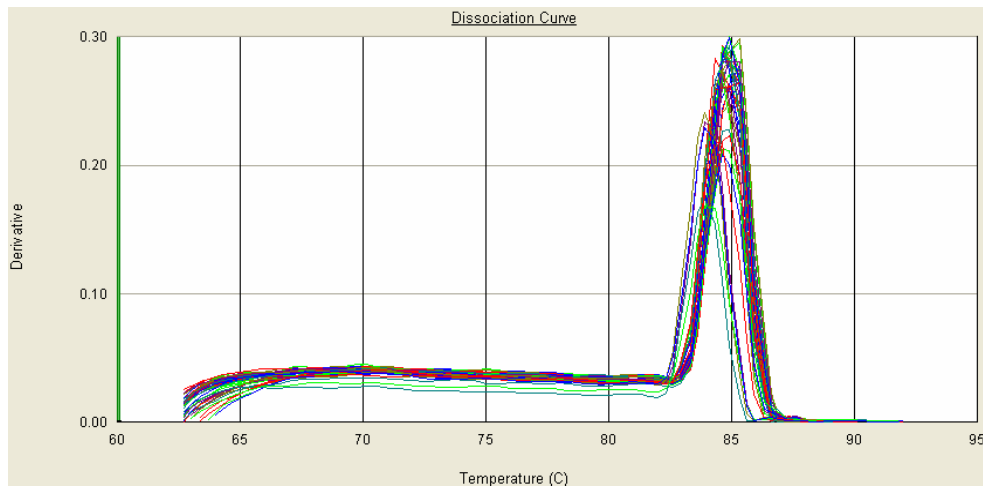


Figura 19. Curva de disociación de rRNA 18S, muestras y curva estándar.

Ensayo 9. Revisión de curva estándar rRNA 18S.

Este ensayo se repitió con las mismas condiciones para ver si los resultados anteriores podrían haber sido por algún error en la manipulación. Para ello se utilizaron los plásmidos recombinantes para este gene y las mismas diluciones (Figura 20). Este ensayo se realizó por duplicado.

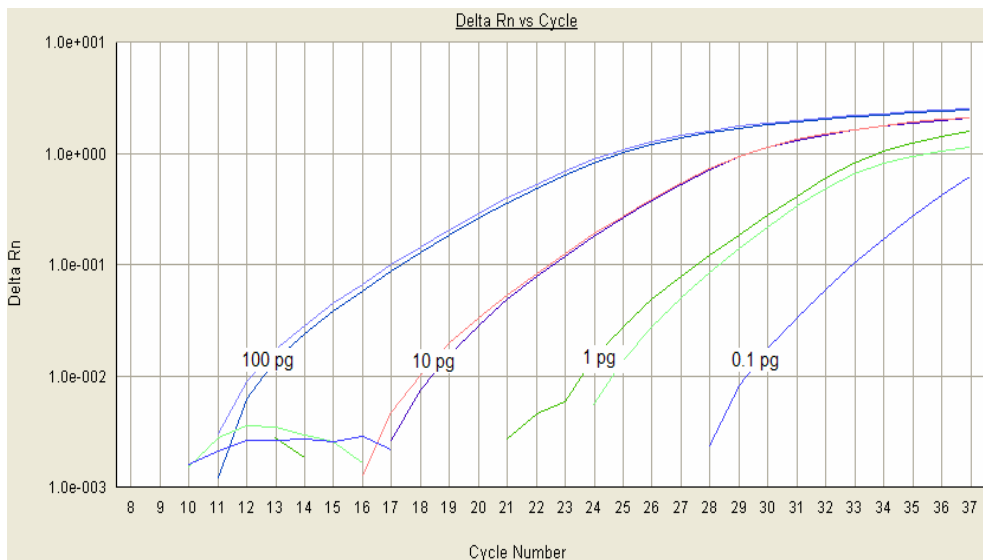


Figura 20. Amplificación de curva estándar de rRNA 18S. El ensayo se realizó por duplicado, en el caso de 0.1 pg fue necesario eliminar su repetición por problemas en su amplificación.

En esta figura se observa la amplificación de la curva estándar para rRNA 18S que muestra ciclos muy dispersos (aproximadamente cada 4 ciclos). Además la eficiencia fue 68.3% (Figura 21) calculada a partir de la fórmula:

$$E = 10^{1/m} - 1$$

Donde m es la pendiente de graficar el Log de la concentración contra Ct.

Se considera que una eficiencia de amplificación menor al 90% no es buena y por lo tanto esta curva estándar no puede ser utilizada como referencia.

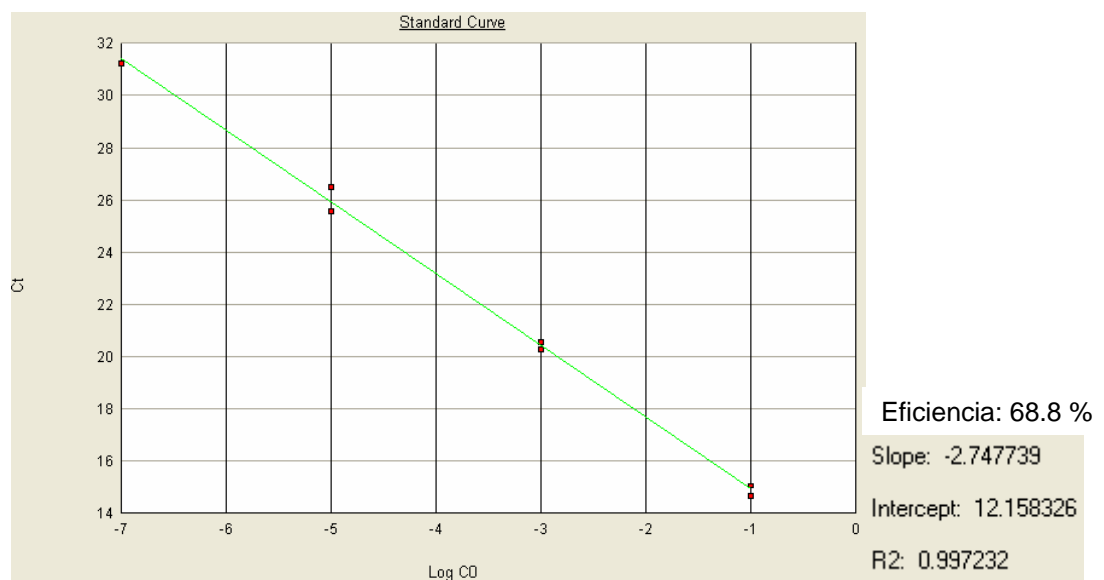


Figura 21. Curva estándar de rRNA 18S.

Ensayo 10. Aumento de la concentración de molde para la curva estándar de rRNA 18S.

Pensando en que aumentado la concentración de plásmido la curva mejoraría se realizó un ensayo con concentraciones de 1,000 a 1 pg del plásmido, para ver si así podía amplificar cada 3.3 ciclos (Figura 22). Este ensayo se realizó por duplicado.

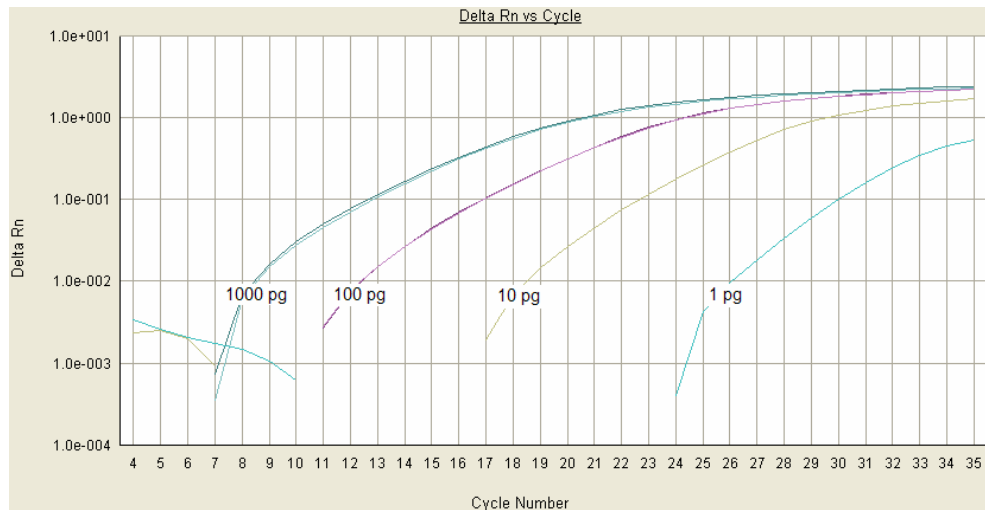


Figura 22. Amplificación de curva estándar de rRNA 18S, diluciones de 1000 a 1 pg.

La amplificación de la curva estándar para el rRNA 18S siguió siendo muy dispersa. La eficiencia fue de 50.52%, que es muy baja.

Se aumentó aún más la cantidad de molde, de 5,000 pg a 5 pg (Figura 23) pero igualmente se observó una amplificación muy dispersa y por tanto una eficiencia baja 48.54%.

Después de estos ensayos decidimos no continuar trabajando con este gene pues no pudimos definir las condiciones adecuadas para que pudiera ser utilizado como gene de referencia en este estudio.

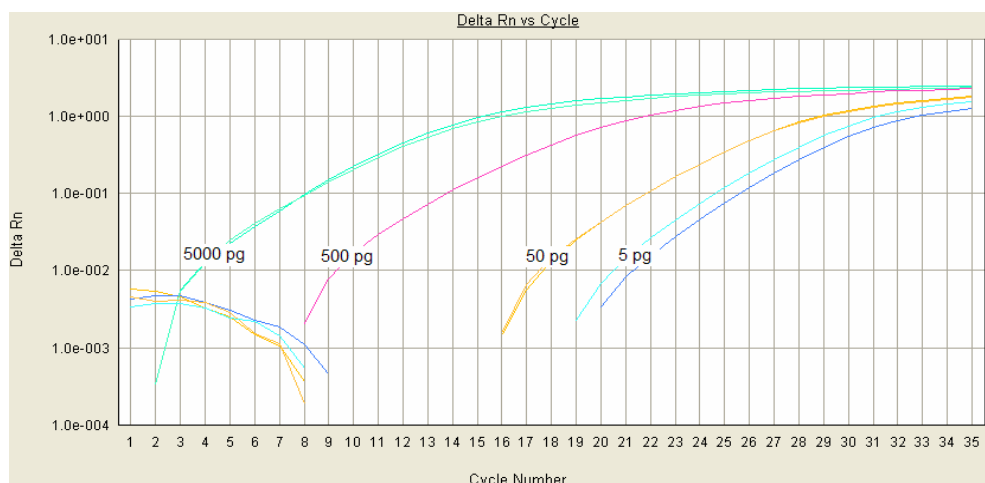


Figura 23. Amplificación de rRNA 18S de 5,000 pg a 5 pg

Ensayo 11. Curvas estándar realizadas con una cuantificación más precisa del DNA molde.

Se realizó la transcripción reversa de las distintas muestras de RNA total empleando 5 µg como molde. El cDNA obtenido fue cuantificado primeramente a 260 nm en espectrofotómetro pero al ver que había muchas variaciones en esta medición, se midió la concentración con Nano Drop. Los datos obtenidos con este aparato son presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de cDNA

Muestra	ng/µl	Absorbancia 260	Absorbancia 280	260/280	260/230
6h sin Cd	191.69	3.834	2.088	1.84	1.90
6h con Cd	114.32	2.286	1.327	1.72	1.70
9h sin Cd	207.72	4.154	2.337	1.78	1.74
9h con Cd	285.85	5.517	3.017	1.90	1.89
12h sin Cd	183.32	3.666	2.006	1.83	1.74
12h con Cd	203.44	4.069	2.194	1.85	1.81
24h sin Cd	279.83	5.588	2.900	1.93	1.90
24h con Cd	171.45	3.429	1.932	1.77	1.66
30h sin Cd	439.26	8.785	4.655	1.89	1.91
30h con Cd	355.55	7.111	3.864	1.84	1.82

Tabla 3. Cuantificación de cDNA obtenido de la transcripción reversa de cada muestra.

La cuantificación del DNA plasmídico para las curvas estándar también se llevó a cabo con ayuda del Nano Drop (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de plásmidos recombinantes

Gene	ng/µl	Absorbancia 260	Absorbancia 280	260/280	260/230
cTPI	138.06	2.761	1.669	1.65	1.03
PABP	138.98	2.780	1.431	1.94	1.30
HSP70	179.98	3.600	1.889	1.91	1.64
rRNA 18S	191.07	3.821	2.014	1.90	1.44
β-actina	125.37	2.507	1.364	1.84	1.16

Tabla 4. Concentración de los plásmidos recombinantes, obtenidos de la reacción ligación de los productos de PCR (purificados) de los genes con el vector pGEM.

Con estas mediciones más precisas de las diferentes muestras y DNAs plasmídicos que se emplearían como molde para la amplificación se realizaron nuevamente las curvas estándar de cada gene (Figura 24) con las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización 94 °C 30 s

Alineamiento 57 °C 30 s

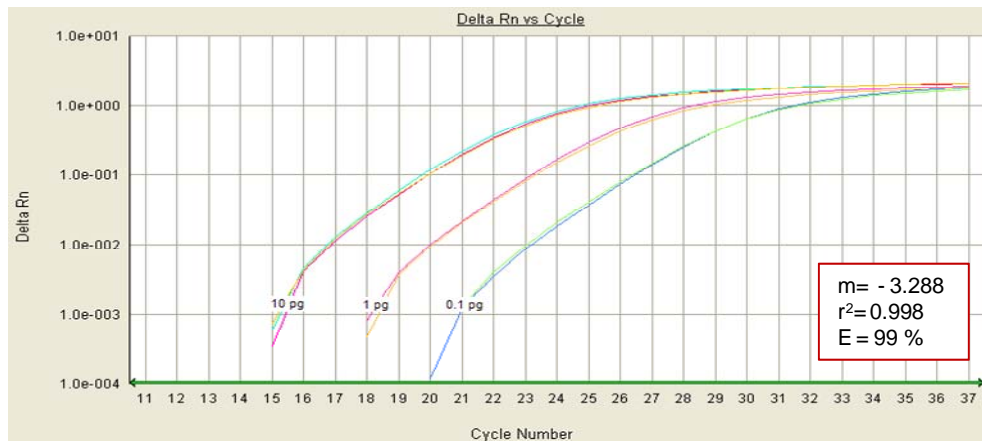
Extensión 72 °C 45 s

Estas condiciones fueron las que se emplearon para la cuantificación final de la cantidad de mRNA expresado en cada condición.

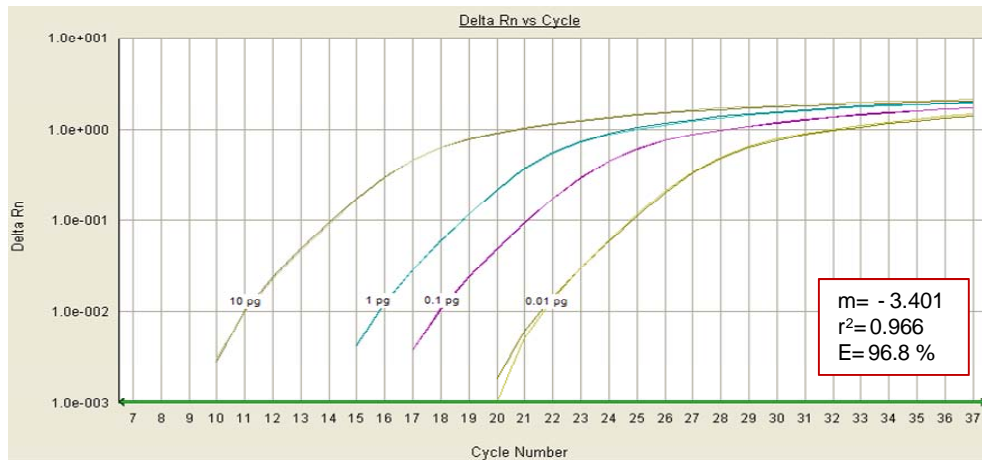
Se buscó que las diluciones hechas para realizar las curvas estándar, al amplificar tuvieran una eficiencia de 90% o más, como se puede ver en la Figura 24 (recuadro inferior derecho de cada grafica) la eficiencia de estas curvas estándar fue mayor a 90%. Por lo cual si sirvieron para realizar la cuantificación.

7.6. Cuantificación de cTPI empleando como gene de referencia a β -actina

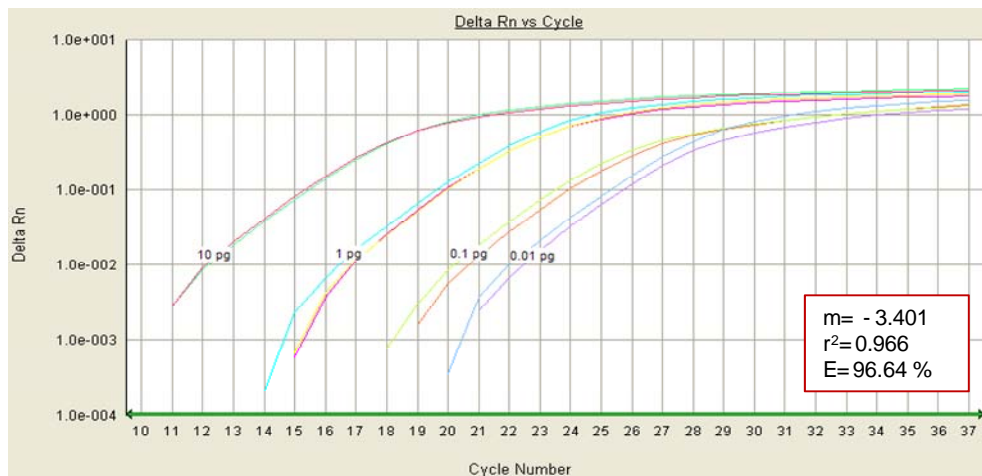
Se realizó la cuantificación de cTPI normalizando contra β -actina con las condiciones y diluciones mencionadas en el ensayo 11. Se utilizaron todas las muestras y las curvas estándar de cada gene. Para este ensayo las mezclas para cada muestra y cada dilución para la curva estándar se realizaron por triplicado. Además este ensayo se repitió tres veces. Los resultados se muestran en la Figura 25.



cTPI



HSP70



β -actina

Figura 24. Amplificación de curvas estándar de cTPI, HSP70 y β -actina. Este ensayo se realizó por duplicado para cada uno de los puntos de las curvas de estos tres genes.

La cantidad de cTPI observada a las 6 h fue de aproximadamente 0.1 pg de cDNA por 700 ng de cDNA molde utilizado para la amplificación, esto equivale a 4.18×10^4 copias mientras que a las 9 y 12 h las cantidades fueron mucho menores, aproximadamente de 0.04 y 0.05 pg de cDNA por 700 ng de cDNA molde utilizado para la amplificación, estos valores equivalen a aproximadamente a 1.14×10^4 y 8.65×10^3 copias respectivamente. Se puede observar que durante los primeros tres muestreos, hasta las 12 h, no se aprecia diferencia entre los tratamientos con y sin Cd. A las 24 h con Cd se observó un incremento en la expresión de cTPI con respecto a la medición anterior y con respecto al tratamiento sin Cd. Sin embargo, a las 30 h, en el tratamiento con Cd hubo una disminución del 50% con respecto a lo observado a las 24 h con Cd mientras que se observó un incremento similar en la expresión de cTPI en el tratamiento sin Cd a las 30 h.

Los valores numéricos obtenidos en el PCR por el software 7500 se muestran en el apéndice.

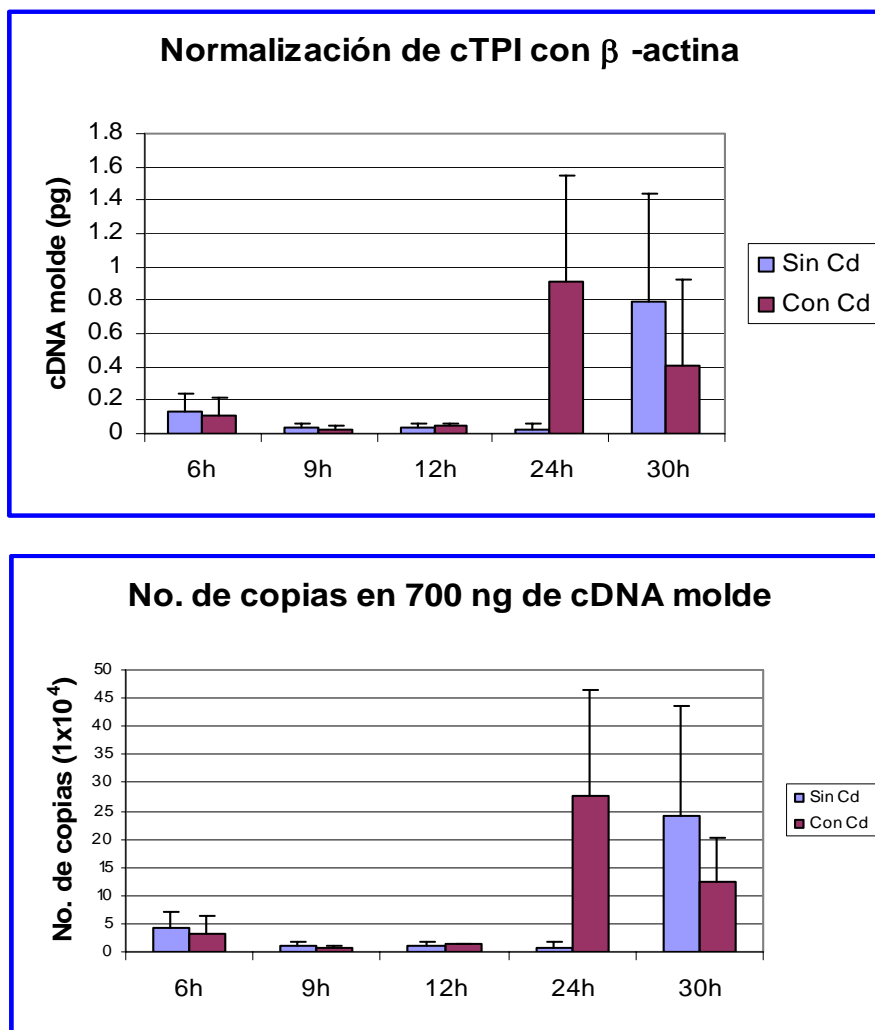


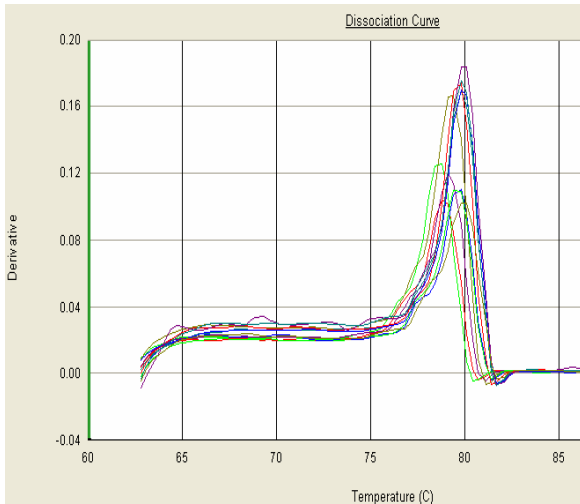
Figura 25. Niveles de expresión de cTPI promedio de tres repeticiones por triplicado. Además del número de copias en las muestras.

7.7. Cuantificación de HSP70 empleando como gene de referencia a β -actina

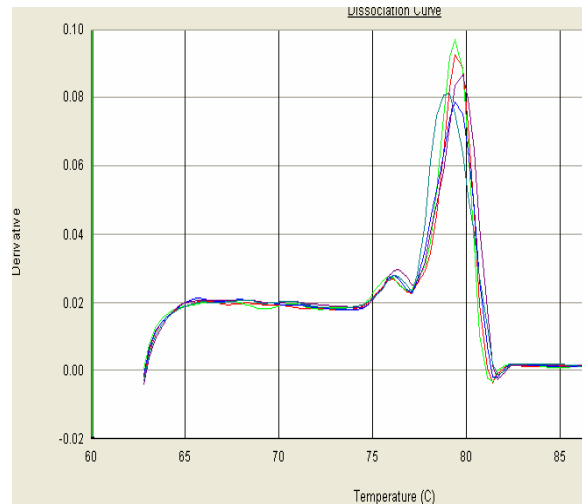
Se realizó la cuantificación de HSP70 normalizando contra β -actina con las condiciones y diluciones mencionadas en el ensayo 11. Se utilizaron todas las muestras y las curvas estándar de los dos genes (Figura 26). Para este ensayo las mezclas para cada muestra y cada dilución para la curva estándar se realizaron por triplicado. Además este ensayo se repitió tres veces.

Al realizar la cuantificación se observó un problema en la curva de disociación del producto de HSP70 para la muestra, ya que mostró un hombro en el lado izquierdo de la base. Por lo tanto, con el fin de tratar de eliminar ese hombro que sugiere existe una

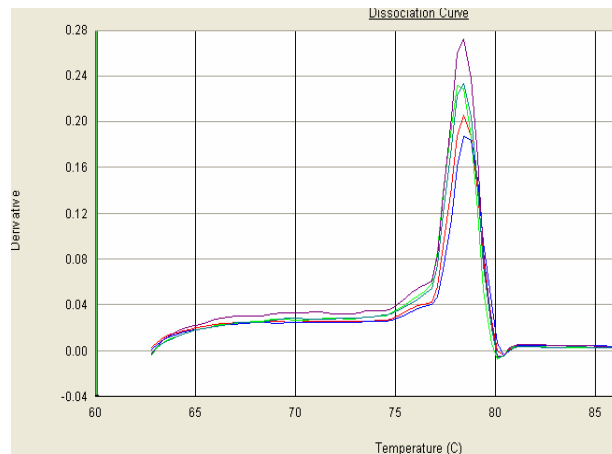
amplificación inespecífica, fue necesario diseñar nuevos iniciadores que tuvieran una T_m más alta con lo cual se esperaba hacerlos más específicos al molde.



6 y 9 h sin y con Cd y 12 h sin Cd



12 h con Cd y 24 h sin Cd



24 h con Cd y 30 h sin y con Cd

Figura 26. Curva de disociación de muestras HSP70 (por triplicado).

Ensayo 14. Reacción de amplificación de HSP70 con nuevos iniciadores para eliminar producto inespecífico en las muestras.

Las secuencias que se eligieron fueron sobre el mismo fragmento que ya se había clonado previamente, es decir se diseñaron iniciadores anidados. Los nuevos iniciadores tuvieron una T_m más alta (Tabla 6) por lo cual la reacción de PCR se llevó a cabo a 58 °C. La reacción anterior se llevaba a cabo a 57 °C

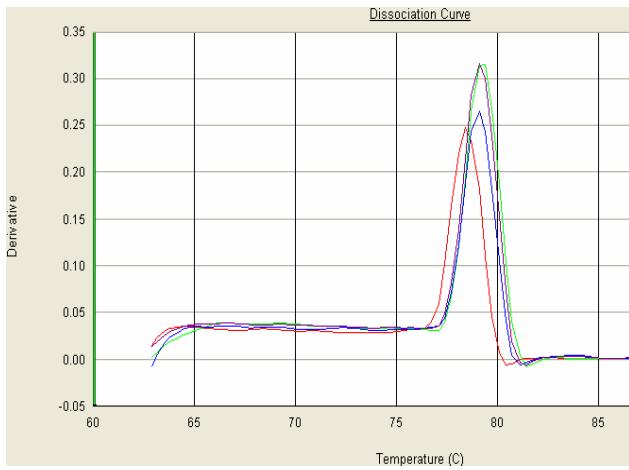
Tabla 6. Diseño de nuevos iniciadores para amplificar HSP70.

Gene	Tamaño esperado del producto (nt)	Longitud (nt)	Tm (°C)	%GC	Primer	Secuencia (5' – 3')
2HSP70	142	24	68.04	50	S	AATTTGGGTGAGAAGGCGCTGGAT
2HSP70		21	69.74	61.9	AS	CCGGCCGGGTCTTGTCTTCA

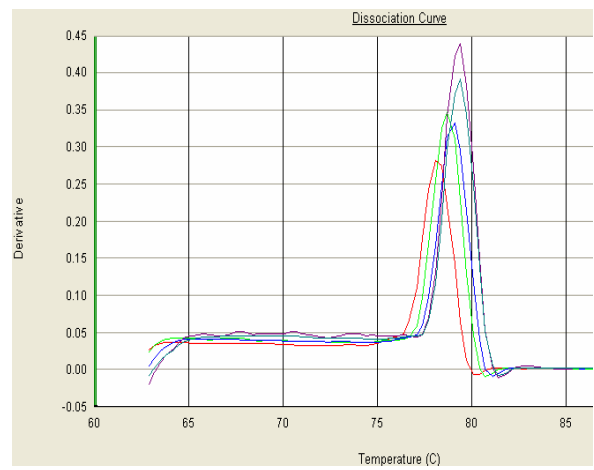
Tabla 6. Diseño de iniciadores para amplificar producto de HSP70. Iniciadores seleccionados con una Tm mayor a 60 °C.

Al analizar las curvas de disociación de los amplicones producidos con estos nuevos iniciadores para las muestras se observó que en los primeros muestreos se obtenía un producto con una Tm aproximada de 79 °C y en los últimos muestreos uno con una Tm de 77 °C. Estos resultados sugieren que se están amplificando dos productos diferentes (Figura 27).

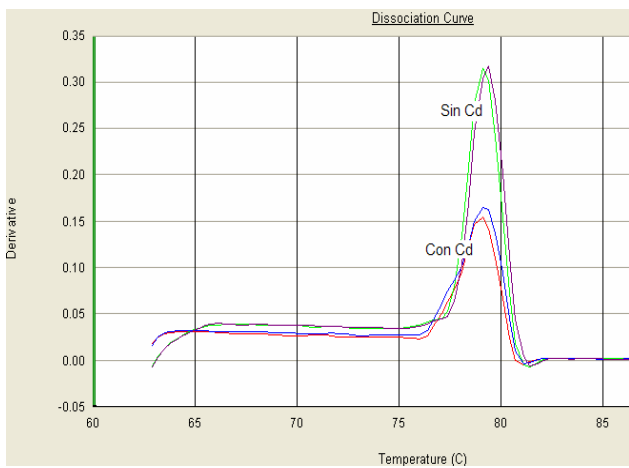
Para confirmar esta posibilidad se corrieron alícuotas de las reacciones obtenidas del PCR en tiempo real en un gel de agarosa al 1.8 % (Figura 28). En este gel se pudo observar el amplicón esperado de 142 pb en las muestras de 6 y 9 h con y sin Cd y 12 h sin Cd, y otro amplicón de aproximadamente 194 pb que empezó a aparecer a las 12 h en las muestras con Cd y a las 24 h en las muestras sin Cd. Este producto de mayor tamaño es el que se mantiene en los siguientes tiempos analizados en ambos tratamientos. Para conocer a qué correspondía esta banda fue enviada a secuenciar. Los resultados se presentan en la Figura 29.



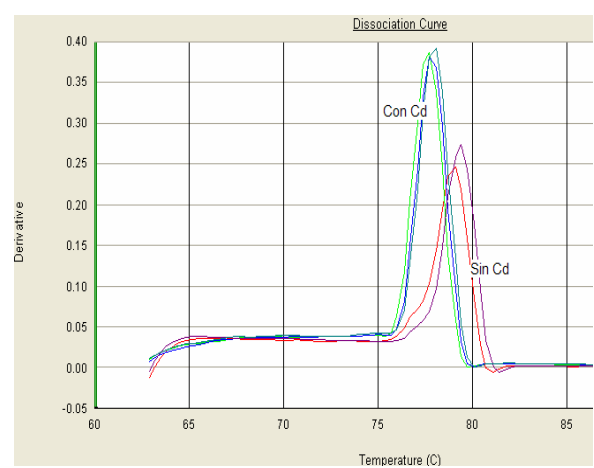
6 h con y sin Cd



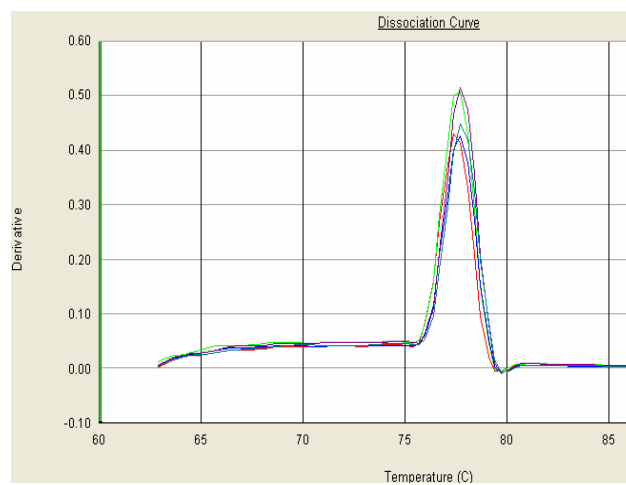
9 h con sin Cd



12 h con y sin Cd



24 h con y sin Cd



30 h con y sin Cd

Figura 27. Curva de disociación de HSP70. Muestras (por triplicado).

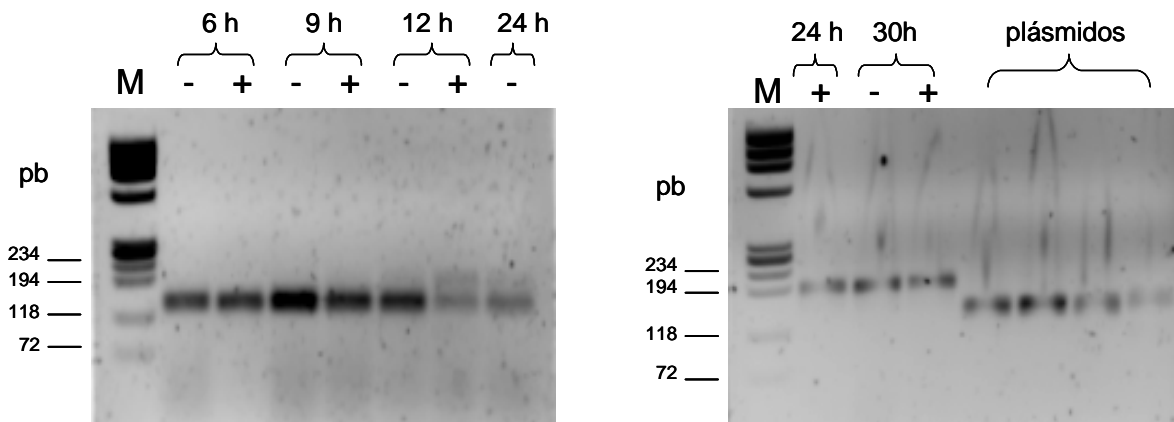


Figura 28. Reacciones de amplificación qPCR de las muestras expuestas (+) y no expuestas (-) a Cd, además de los plásmidos recombinantes de HSP70. Gel de agarosa al 1.8%. **M**: marcador.

Secuencia esperada de HSP70

```
GAGGTCAGTAAAAGAGAAACAAGCTGCCTTGTTCGTTTGGGGAAAAACAAAGGAATTTG
GGTGAGAAGGCGCTGGATCAGGCTGTACGGAATTGGAAAAATACTGTTGGTGCATTGAA
GAGATTGATTGGTGTGAAATATGACTCCGAAGCTTTCAG*ACATGAAGCGAAGTTCATGA
AGAACAAGACCCGGCCGGACGAAAGGGGATACGTTGAATTGGTACG
```

Producto de aproximadamente 194 pb

```
GTACGGAATTGGAAAAATACTGTTGGTGCATTGAAGAGATTGATTGGTGTGAAATATGAC
TCCGAAGCTTTCAGGTTTTTCCCCCATTTCCCCCCTATTCCTTCTTTGGGAAAAAAT
TCAGACATGAAGCGAAGTTCATGAAGAACAAGACCCGGCCGGA
```

Figura 29. La secuencia esperada de HSP70 corresponde a la obtenida por Hernández-Navarro (2003) y que fue confirmada por secuenciación del amplicón de 142 pb obtenido en la reacción de PCR punto final. La secuencia inferior corresponde a la segunda banda de 194 pb obtenida en el qPCR. Las partes sombreadas son correspondientes. La secuencia en negritas es un inserto no reportado previamente. El asterisco en la secuencia superior indica el posible sitio de inserción. El tamaño de la inserción fue de 45 nt.

La secuencia del producto de mayor tamaño corresponde a una inserción de 45 nt en la secuencia del gene que considerábamos silvestre.

Con el propósito de cuantificar la expresión de HSP70 se decidió sumar los resultados de ambas bandas, la de 142 y la de 194 y normalizarlo contra β -actina (Figura 30). A los primeros tiempos (6, 9 y 12 h) no hubo diferencia significativa entre la expresión de los genes en presencia o ausencia de Cd. Sin embargo, a las 24 h se

observó un aumento de nueve veces más en el tratamiento con Cd en comparación con las 24 h sin Cd. Este incremento correspondió a 4.75×10^4 copias del gene. A las 30 h se nota un ligero aumento aunque no hay mucha diferencia entre las muestras sin y con Cd. Este aumento correspondió a 5.09×10^4 y 5.89×10^4 copias del gene respectivamente.

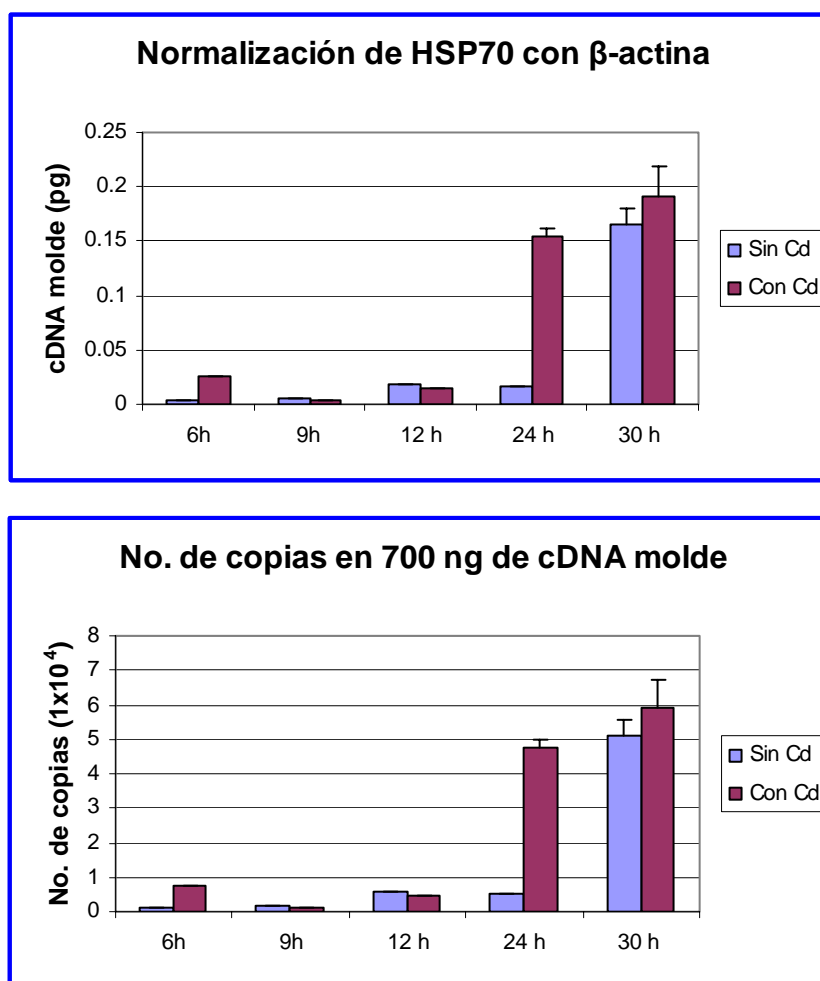


Figura 30. Expresión total de HSP70 considerando ambas bandas (figura 26) Normalizado con β -actina. Resultados de una repetición por triplicado. Además del número de copias de las muestras. Para el cálculo de número de copias no se tomó en cuenta la inserción (figura 27).

8. Discusión

8.1. Importancia de la técnica de PCR cuantitativo

El PCR cuantitativo (qPCR) se desarrolla, ejecutando ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, pero a diferencia de la PCR punto final, donde se analiza el resultado en el punto final, el qPCR no requiere de una electroforesis para conocer el resultado, sino que al final de los ciclos de amplificación se construye una gráfica de la segunda derivada en función de la fluorescencia contra la temperatura, donde queda representada la temperatura de fusión como un pico definido a la temperatura detectada por el sistema. Este pico definido indica que se amplificó un solo producto (De la Rosa *et al.*, 2006).

Uno de los inconvenientes de los formatos de PCR estándar es que se basan en el análisis del producto final, el cual no es cuantificable porque el rendimiento final del producto no es dependiente de la concentración de la secuencia blanco en la muestra. El PCR en tiempo real supera esta limitación (Edwards, 2004). Esta técnica es cuantitativa debido a que se genera una curva estándar con la cual se sabe la concentración inicial de los diferentes puntos y al ser amplificados se obtiene una gráfica en donde en el eje de las "x" se tienen el número de ciclos en el cual apareció cada punto de la curva estándar y en el eje de las "y" el log de la concentración de cada punto de la curva estándar, entonces al ser amplificada la muestra se obtiene un determinado número de ciclo que es extrapolado dentro de la curva estándar y así se obtiene la concentración de DNA molde presente en la muestra (Edwards, 2004).

8.2. Complicaciones de la técnica

SYBR Green es un fluorocromo que se une al surco menor de la doble cadena de DNA pero no a un DNA de cadena sencilla. La señal de SYBR Green es detectable sólo después de una amplificación significativa (> 15 ciclos para la mayoría de los cDNAs). Debido a que el SYBR Green se une a DNA de doble cadena (dsDNA), todo el dsDNA presente en la reacción, incluyendo el producto de la reacción así como dímeros de iniciadores o productos de amplificación no específicos, pueden ser detectados (Edwards, 2004).

Debido a la gran sensibilidad de la técnica es importante evitar contaminaciones cruzadas, por ejemplo en este trabajo se presentó un problema con unos blancos ya que había productos de amplificación a pesar de que no se había agregado molde. Este problema se mantuvo aún después de utilizar agua estéril y de emplear la campana de flujo laminar para preparar las reacciones. La contaminación en este caso provenía de las preparaciones de iniciadores que contenían algún DNA molde, por lo que al utilizar una nueva alícuota de iniciadores ya no se presentó amplificación inespecífica.

Otra complicación fue el encontrar las condiciones adecuadas de amplificación para cada gene, éstas tenían que ser adecuadas tanto para el gene de referencia como para el gene de interés, ya que ambos se correrían al mismo tiempo. Para esto, se probaron varias condiciones, como se explica en la sección de resultados, hasta que encontramos las condiciones adecuadas para dos de los genes de interés y uno de referencia. No fue posible determinar las condiciones para amplificar adecuadamente el gene de referencia del rRNA, ni el gene de interés de la PABP.

La precisión de la cuantificación por PCR en tiempo real depende de la calidad de la curva estándar. El intervalo correspondiente al número de copias de la curva estándar debe siempre abarcar el intervalo esperado para las muestras experimentales (Edwards, 2004). Este es un punto importante ya que en nuestro caso fue difícil encontrar las condiciones adecuadas de amplificación de la curva estándar ya que se buscaba que la eficiencia de ésta fuera igual o mayor a 90%. Además de buscar que las muestras cayeran dentro de la curva estándar. Sin embargo, después de varias pruebas se logró encontrar las condiciones adecuadas para obtener curvas estándar que fueran útiles para la cuantificación de las muestras de interés (desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 57 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 45 s).

8.3. Importancia del gene de referencia (control interno)

El análisis de la expresión genética de un gene, es decir la determinación de la cantidad de RNA mensajero, es un factor importante que permite conocer el grado de actividad de un determinado gene. El Northern blot es la técnica que se ha empleado ampliamente para obtener esta información. Sin embargo, la posibilidad de realizar una cuantificación de los mensajeros de un gene empleando esta técnica es complicada, ya

que la cuantificación es por determinación de la intensidad de una mancha, lo cual se realiza midiendo la cantidad de puntos en una determinada superficie (manchas por pulgada cuadrada) y además muchas de las veces la respuesta no es lineal. Con la transcripción reversa acoplada a la técnica de PCR (RT-PCR) ha sido posible realizar cuantificación de los mensajeros de una manera mas precisa, convirtiéndose en el método de elección de alto rendimiento y precisión del perfil de expresión de determinados genes. Dado el incremento de sensibilidad, reproducibilidad y el amplio intervalo dinámico de esta metodología, los requisitos para un buen gene de control interno para la normalización ha llegado a ser cada vez más estricto (Vandesompele *et al.*, 2002). La expresión de un gene, contenido en las muestras en cantidades relativamente constantes, tales como β -actina, puede ser usada para normalizar la eficiencia de amplificación de la muestra (Heid *et al.*, 1996).

Los genes de referencia representan el método para la normalización de datos de qRT-PCR. El objetivo de esta estrategia es el empleo de RNAs que se asume son, universal y constitutivamente expresados, y cuya expresión no difiere entre el grupo experimental y el control, para reportar alguna variación que ocurra no debida al error experimental. Teóricamente, los genes de referencia son ideales ya que están sujetos a todas las variaciones que afectan al gene de interés (Dorak, 2006).

Los genes de referencia (anteriormente llamados constitutivos) tales como el Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) son muy usados en técnicas para medir RNA que generan resultados más cualitativos (Northern blot, ensayo de protección de RNasa). Estos genes se consideran esenciales para el metabolismo celular y, siempre están activos (Dorak, 2006).

Idealmente los genes de referencia pueden no ser influenciados o regulados por el procedimiento experimental. La cuantificación exacta de un verdadero gene de referencia permite la normalización de las diferencias en la cantidad de RNA o cDNA amplificado en muestras individuales generado por: (1) diferentes cantidades de material inicial, (2) la calidad de material inicial y (3) diferencias en la preparación de RNA y síntesis de cDNA, desde que el gene de referencia es expuesto a los mismos pasos de preparación que el gene de interés (Radonic *et al.*, 2004). Sin embargo,

Nielsen y Boye (2005) concluyen que no existen los genes de referencia ideales y universales.

En este trabajo se intentó utilizar dos genes de referencia, el del rRNA 18S y el que codifica la β -actina, ya que estos son dos de los genes de referencia más utilizados en diferentes organismos (Goidin *et al.*, 2006; Ingerslev *et al.*, 2006; Schmittgen and Zakrajsek, 2000; Bas *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2006). El gene rRNA 18S se utilizó como gene de referencia empleando la técnica transcripción reversa-PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) para medir la eficiencia de una droga en el patógeno *Cryptosporidium parvum* (Cai *et al.*, 2005). El gene de β -actina ya había sido utilizado como gene de referencia para la qRT-PCR en un estudio en *E. gracilis* expuesta a Cd (Deloménie *et al.*, 2007). Si fue posible definir las condiciones experimentales para poder emplear el gene β -actina, sin embargo este no tuvo un comportamiento constitutivo, en el caso de rRNA 18S no encontramos las condiciones adecuadas de amplificación para la curva estándar, por lo que no fue posible utilizar este gene de referencia.

8.4. Expresión de cTPI

La triosa fosfato isomerasa (TPI) es una enzima glicolítica que cataliza la interconversión entre hidroxiacetona fosfato y D-gliceraldehído 3-fosfato. Esto ocurre ubicuamente en procariotes, en el citosol de células eucarióticas (cTPI) y en cloroplasto y mitocondria de células eucariotas (Keeling y Doolittle 1997). *E. gracilis* posee dos isoenzimas de TPI activas, una glicolítica (cTPI) y una del ciclo de Calvin (pTIM). La más ácida (pI=4.4) tipo A, predomina cuando las células crecen fotoautotroficamente y es localizada en el cloroplasto. La isoenzima tipo B exhibe un punto isoeléctrico más básico (pI= 4.8), predomina bajo condiciones de crecimiento heterotrófico y es de origen citoplasmático. Las dos isoenzimas exhiben pesos moleculares similares (56-60 KDa) (Mo *et al.*, 1973).

En este trabajo se pudo observar un incremento en el RNAm a las 24 h con Cd así como a las 30 h sin Cd. Esto podría significar que la expresión observada de este gene es regulada por el desarrollo, siendo las 30 h un periodo normal de expresión, pero que la presencia de Cd adelanta la expresión del gene a las 24 h. Sin embargo por

la desviación estándar obtenida a partir de las 24 h con Cd, no podemos dar un resultado concluyente.

Se ha reportado que la TPI puede ser regulada a nivel transcripcional en levadura, bacterias y plantas ante diferentes tipos de estrés tales como frío, calor, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de glucosa y estrés osmótico (Umeda *et al.*, 1994; Minhas y Grover, 1999; Rodríguez-Vargas *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2003). No se sabe el mecanismo mediante el cual se regula la expresión de este gene bajo estrés. Pero el hecho de que su expresión cambie en diferentes situaciones sugiere que se trata de una respuesta general de adaptación tal vez relacionada con cambios en los niveles energéticos (ATP) (Plaxton, 1996).

Por otra parte, Krieger y Ernest (1994) reportaron que el mRNA de la TPI de *S. cerevisiae* es estabilizado por Fe. Aunque no se estudió el mecanismo implicado, el Cd podría ocupar el lugar del Fe en este proceso por el hecho de ser metales divalentes.

En otros estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* se observó que la TPI fue activada con GSH (Ito *et al.*, 2003). Aunque no existe información de si la activación puede ser a nivel transcripcional, el incremento de GSH observado en presencia de Cd podría tener algún efecto inductor en la expresión del gene de la TPI. Incrementos de aproximadamente el doble con respecto al control (células cultivadas sin Cd) en las concentraciones de GSH son observadas a las 9 h de exposición a Cd en *Euglena* fotoheterótrofa (Hernández-Navarro, 2003), mientras que en *Euglena* cultivada en la oscuridad se observa un incremento de la concentración de GSH de aproximadamente 5 veces con respecto al control a las 96 h de exposición a Cd (Avilés *et al.*, 2005).

En un estudio con *Thlaspi caerulescens* expuesta a Zn y Cd, empleando geles bidimensionales y midiendo la intensidad de las manchas, encontraron un incremento de expresión diferencial de la proteína cTPI, en retoños (Tuomainen *et al.*, 2006). Aunque este estudio es a nivel de proteína, el incremento de cTPI observado en presencia de Cd podría ser el reflejo de un incremento en la expresión del gene, lo cual sería semejante a lo observado en *E. gracilis* expuesta a Cd en este trabajo.

8.5. Expresión de HSP70

La respuesta de células eucarióticas a un choque térmico es caracterizada por la síntesis rápida de varias proteínas conocidas como proteínas de respuesta a estrés por calor (HSP). Se ha observado que diferentes tipos de tratamientos además del calor, que incluyen drogas, agentes oxidantes y exposición a metales pesados, pueden inducir la síntesis de HSP (Barque *et al.*, 2000). Además, la inducción de HSPs se ha observado como una amplia respuesta conservada en muchos organismos, permitiendo la tentativa extrapolación de resultados a otras especies (Boorstein *et al.*, 1994; Rensing y Maier, 1994).

Al analizar la expresión de este gene en respuesta a Cd en *E. gracili* se encontró que a partir de las 12 h en el tratamiento con Cd y 24 h en el tratamiento sin Cd, se amplificaba una segunda banda ligeramente más grande que la banda esperada (187 nt). Esta banda fue extraída de los geles y secuenciada encontrándose que correspondía a la misma secuencia de un gene de HSP pero conteniendo una inserción de 45 nt. Se decidió, para cuantificar la expresión de este gene, sumar las cantidades de productos amplificados correspondientes a las dos bandas. Los valores obtenidos mostraron un incremento significativo a las 24 h con Cd seguido de un aumento en el tratamiento a las 30 h sin Cd, siendo este último, mayor que el observado con Cd en el mismo tiempo. Al igual que en la expresión de la cTPI, este incremento a las 24 h con Cd observado en HSP, tal vez sea un comportamiento normal que en presencia de Cd se adelanta. De manera interesante, la presencia de la segunda banda aparece más temprano en el tratamiento con Cd que en el sin Cd, para luego, a las 30 h, sólo presentarse la banda con la inserción (figura 26). Estos resultados hacen pensar que la presencia de la banda con la inserción no es debida a algún problema técnico, sino que parecería que la expresión de este gene con la inserción es regulada por el desarrollo, pero que la presencia de Cd adelanta la expresión del gene con la inserción.

Watanabe y Suzuki (2004) encontraron que al exponer a la cepa Z de *E. gracilis* a 10-100 μM de Cd se indujo la proteína HSP70, resultados similares, fueron encontrados en la cepa SMZ por exposición a 100 μM de Cd.

En otro estudio hecho en *E. gracilis* se demostró la presencia de una proteína de 70 KDa cuya síntesis incrementó rápidamente cuando a las células se les aplicó un choque térmico, incrementando la temperatura de 23 °C (temperatura normal de crecimiento) a 35 °C. En *E. gracilis* derivada de células resistentes a Cd, una proteína con la misma movilidad electroforética fue encontrada siendo sobre-expresada a 23 °C. Su hipótesis es que la sobreexpresión de las proteínas HSP70 puede ocurrir en células resistentes a Cd (Barque *et al.*, 1996).

Ya que en el trabajo previo realizado por Hernández-Navarro sólo se aisló un fragmento del cDNA, y que las proteínas HSC y las HSP tienen un 90% de identidad (Hung *et al.*, 1998), no sabemos si en este trabajo se analizó el gene de hsc73 o de otro miembro de las HSP70 ya que dentro de *E. gracilis* existen otras proteínas de esta familia (HSP60 y HSP90 (GenBank número de acceso X95992.1 y AY288511.1 respectivamente).

En *Caenorhabditis elegans* expuesta a Cd (100 µM), empleando la técnica de “differential display”, se identificaron genes que incrementaron en presencia de Cd. La identificación de estas secuencias permitió la identificación de la HSP70 que aumentó al doble a las 24 h en presencia de Cd (Liao *et al.*, 1996).

En la identificación de genes sensibles a Cd en el pez antártico *Chionodraco hamtus* por la técnica de “differential display” se encontró un gene que codifica la HSP70, éste incrementó cuatro veces en 7 días con CdCl₂ inyectado intramuscularmente (Carginale *et al.*, 2002).

8.6. PABP

Las proteínas de unión a Poli A (PABPs) son proteínas de unión a RNA presentes en todos los eucariontes. Están implicadas en la estabilización del RNAm y promueven la traducción.

No existen reportes de sobreexpresión de PABP o proteína de unión a RNA en *E. gracilis* expuesta a Cd. Sin embargo, en la levadura *S. cerevisiae*, la mutante *pab1*, la cual acumula poco RNAm, incluyendo CUP1 el cual es requerido por el Cu, es sensible a elevadas concentraciones de Cu (Morrissey *et al.*, 1999). Dado que el Cd al igual que el Cu es un metal divalente, es posible proponer que también podría afectar la

expresión de alguna PABP en *Euglena*. Desafortunadamente, en este trabajo no fue posible cuantificar los niveles de expresión del gene que codifica a PABP de *Euglena* debido a no poder tener una curva estándar. Dos posibilidades pudieran explicar este resultado negativo: que los iniciadores no fueron los adecuados y/o que no se encontraron las condiciones adecuadas para la amplificación, a pesar de que se hicieron varios intentos. El resultado, fue que desistimos de lograr este objetivo.

Una consideración que también nos hizo desistir de este objetivo fue el hecho de que de manera general existen varias PABPs en cada organismo y son proteínas muy conservadas. Esto complicaría mucho el estudio al analizar la expresión en las muestras de interés. No existe información con respecto a que si en *Euglena* existan varias PABPs, pero creemos que si dado que en *Trypanosoma cruzi*, especie filogenéticamente emparentada a *E. gracilis*, se han reportado dos proteínas de unión a RNA (TcUBP-1 y TcUBP-2) (D'Orso y Frasch, 2002).

9. Conclusiones

- ❖ El gen de β -actina fue el que se pudo amplificar de mejor manera, por lo que se eligió para realizar la normalización de los niveles de expresión de los genes cTPI y HSP70.
- ❖ Sin embargo, su expresión no fue constante durante el periodo de experimentación por lo que su papel como gene de referencia no fue bueno.
- ❖ Se observó un aumento en la expresión de cTPI a partir de las 24 h en células en presencia de Cd. Se observó un incremento semejante a las 30 h en el tratamiento sin Cd.
- ❖ Se observó que hubo un aumento en la expresión de HSP70 de 6 veces con respecto al control a partir de las 24 h en células en presencia de Cd. Se observó un incremento semejante a las 30 h en el tratamiento sin Cd.

10. Apéndice

Cultivo y cosecha de células

a) Cultivo fresco

Se sembraron 0.2×10^6 células/mL en un medio glutamato/malato como fuente de carbono. Se cultivaron durante cinco 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 6 matraces con 1 L de medio de cultivo cada uno, a una concentración de 1.5×10^6 células/mL.
5. A 3 de los 6 matraces, se les agregó CdCl_2 170 μM a partir de un stock de 50 mM.
6. Luego de 6, 9, 12, 24 y 30 horas de haber sembrado, se recolectaron aproximadamente 1.3 L de células centrifugando en frascos limpios a 5000 rpm. Se lavaron con medio KME. Las células se pasaron a tubos de plástico de 50 mL y se volvieron a centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. El paquete celular se congeló inmediatamente con N_2 líquido.

Extracción de RNA total (Chomczynski & Sacchi, 1987)

Método de Tiocianato de Guanidina / Fenol Cloroformo

1. Se cosecharon células de *E. gracilis* como se describió anteriormente.
2. Se tomaron 1.5 g (peso fresco) de células y se trituraron con N_2 líquido en un mortero previamente enfriado hasta obtener un polvo fino.
3. Se añadieron 5 mL de solución D con β -mercaptoetanol sobre las células congeladas en el mortero y se mezcló bien con ayuda del pistilo.

4. La pasta que se formó, se pasó a un tubo de vidrio estéril (Corex) con tapa y se adicionaron 10 mL de la solución D, mezclando perfectamente.
5. La mezcla se separó en dos partes iguales, que se trataron de igual forma.
6. Se adicionó secuencialmente 1 mL de acetato de sodio 2 M, 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 se incubó en hielo por 15 min.
7. Se centrifugó a 10 000 x g por 20 min a 4 °C en un rotor de ángulo fijo en una centrífuga Sorvall RB-X.
8. 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).
9. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se mezcló con 10 mL de isopropanol helado, se incubó a -20 °C por 1 h.
10. Se centrifugó a 10 000 x g por 20 min, a 4 °C.
11. La pastilla de RNA se resuspendió en 3 mL de solución D (por cada gramo de muestra inicial) y se precipitó con un volumen (con respecto a la solución D agregada) de isopropanol helado incubando a -20 °C por 1 h.
12. Se centrifugó a 10 000 x g por 20 min, a 4 °C.
13. La pastilla se lavó dos veces con 10 mL de etanol al 75% y se centrifugó 15 min después de cada lavado.
14. 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. En este caso deberá utilizarse un protocolo alternativo (Cheng y Seeman, 1998). Los cultivos de *E. gracilis* de más de tres días contienen muchos polisacáridos.

Solución D con β -mercaptoetanol

Tiocianato de guanidina 4 M
Citrato de Sodio pH 7.0 25 mM
Sarcosil 0.5 %
 β -mercaptoetanol 0.1 M

SB 20X

NaOH 200 mM
Ajustar a pH 8 con ácido bórico

Para tener al 1X solo se realizan diluciones.

Buffer de carga para RNA

50% de glicerol
1 mM EDTA (pH 8.0)
0.25% azul de bromofenol
0.25% Xilencianol

Medio LB

Para 1L
Peptona de caseina 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 A

Triptona 2%
Extracto de Levadura 0.5%
MgSO₄ 0.4%
KCl pH 7.6 (con KOH) 10 mM

Número de copias en 1ng de Vector recombinante

182 pb del inserto HSP70 + 3015 pb del Vector pGEM T easy = 3197 pb

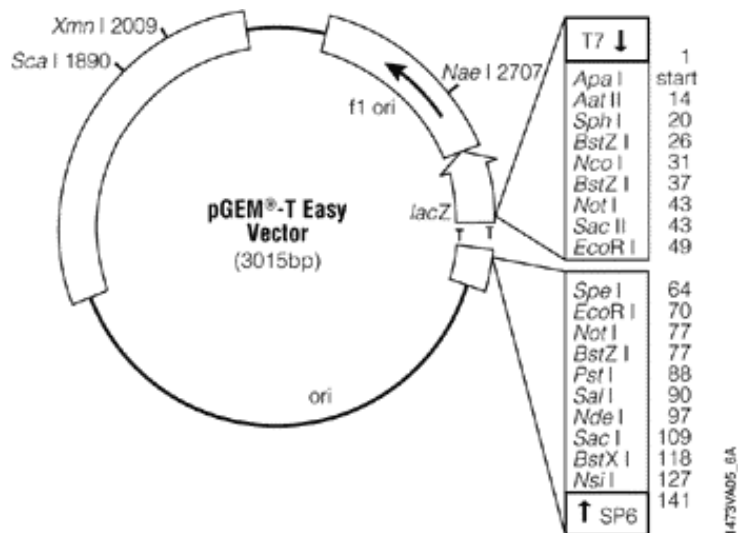
1 pb ----- 618 g/mol

3197pb ----- x= 1'975,746 g/mol

$(1, 975,746 \text{ g/mol}) \times (1 \text{ mol}/6.02 \times 10^{23} \text{ No. de Avogadro}) = 3.28 \times 10^{-18} \text{ g}$

$1 \text{ ng} / 3.28 \times 10^{-9} \text{ ng} = 304'695,036.7 \text{ copias} \approx 304'700, 000.0 \text{ copias.}$

Vector pGEM (Promega)



Vector utilizado para clonar los insertos de los genes de interés y de referencia (cTPI, PABP, HSP70, rRNA 18S y β -actina). Este vector es un plásmido lineal que contiene timinas en sus extremos en las bases 49 y 64. Este vector facilita la clonación de productos de PCR.

Datos obtenidos por el software 7500 Applied Biosystem

Document Name: Cuantificacion TPI con Beta 2 11ene08
 Plate Type: Absolute Quantification
 User: Admin

Document Information

Operator: Admin
 Run Date: Friday January 11 2008 13:20:46
 Last Modified: Friday January 11 2008 16:32:38
 Instrument Type: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Comments:
 SDS v1.3.1

Thermal Cycler Profile

Stage	Repetitions	Temperature	Time	Ramp Rate	Auto Increment
1	1	50.0 °C	02:00	100	
2	1	95.0 °C	10:00	100	
3	37	94.0 °C	00:30	100	
		57.0 °C	00:30	100	
		72.0 °C	00:45	100	
4 (Dissociation)	1	95.0 °C	00:15	Auto	
		60.0 °C	01:00	Auto	
		95.0 °C	00:15	Auto	

Standard 7500 Mode

Data Collection : Stage 3 Step 1
 PCR Volume: 20 µL

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	Beta 0.0001 ng	beta	Standard	22.32	0.185	1.00E-04				81.9
A2	Beta 0.0001 ng	beta	Standard	22.59	0.185	1.00E-04				82.5
A3	Beta 0.0001 ng	beta	Standard	22.23	0.185	1.00E-04				82.5
A5	Beta 0.1 ng	beta	Standard	11.17	0.058	1.00E-01				82.2
A6	Beta 0.1 ng	beta	Standard	11.25	0.058	1.00E-01				81.9
A7	TPI 0.00001 ng	TPI	Standard	27.06	0.056	1.00E-05				82.8

A9	TPI 0.00001 ng	TPI	Standard	27.13	0.056	1.00E-05	82.8
A10	TPI 0.001 ng	TPI	Standard	20.62	0.201	1.00E-03	83.1
A11	TPI 0.001 ng	TPI	Standard	20.72	0.201	1.00E-03	83.1
A12	TPI 0.001 ng	TPI	Standard	20.33	0.201	1.00E-03	82.5
B1	Beta 0.001 ng	beta	Standard	18.87	0.259	1.00E-03	81.3
B2	Beta 0.001 ng	beta	Standard	18.6	0.259	1.00E-03	82.5
B3	Beta 0.001 ng	beta	Standard	18.35	0.259	1.00E-03	82.5
B4	Beta 0.01 ng	beta	Standard	15.15	0.079	1.00E-02	82.5
B5	Beta 0.01 ng	beta	Standard	15.06	0.079	1.00E-02	82.8
B6	Beta 0.01 ng	beta	Standard	14.99	0.079	1.00E-02	82.8
B7	TPI 0.0001 ng	TPI	Standard	24.04	0.179	1.00E-04	83.5
B8	TPI 0.0001 ng	TPI	Standard	24.38	0.179	1.00E-04	83.5
B9	TPI 0.0001 ng	TPI	Standard	24.13	0.179	1.00E-04	83.5
B10	TPI 0.01 ng	TPI	Standard	16.55	0.13	1.00E-02	83.5
B11	TPI 0.01 ng	TPI	Standard	16.8	0.13	1.00E-02	83.5
B12	TPI 0.01 ng	TPI	Standard	16.71	0.13	1.00E-02	82.5
C1	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined			65.6
C2	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined			65.6
C3	30h Cd	beta	Unknown	21.05	0.289	2.27E-04	81.9
C4	30 h WT	beta	Unknown	Undetermined			65.6
C5	24 h Cd	beta	Unknown	22	0.257	1.26E-04	82.2
C6	24 h WT	beta	Unknown	27.57	0.576	3.93E-06	82.5
C7	12h Cd	beta	Unknown	28.12	0.168	2.80E-06	82.8
C8	12h WT	beta	Unknown	25.35	0.092	1.56E-05	82.5
C9	9 h Cd	beta	Unknown	23.04	0.043	6.61E-05	82.5
C10	9 h WT	beta	Unknown	21.28	0.482	1.97E-04	82.5
C11	6 h Cd	beta	Unknown	22.84	0.218	7.47E-05	82.5
C12	6 h WT	beta	Unknown	24.31	0.401	2.99E-05	82.2
D1	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined			65.6
D2	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined			65.6
D3	30h Cd	beta	Unknown	20.54	0.289	3.12E-04	81.9
D4	30 h WT	beta	Unknown	19.51	1.164	5.95E-04	81.6
D5	24 h Cd	beta	Unknown	21.77	0.257	1.45E-04	82.2
D6	24 h WT	beta	Unknown	26.43	0.576	7.99E-06	82.5
D7	12h Cd	beta	Unknown	28.45	0.168	2.27E-06	82.5
						2.56E-04	4.83E-05
						1.48E-04	2.38E-05
						5.69E-06	2.08E-06
						2.51E-06	2.66E-07
						1.67E-05	9.39E-07
						6.46E-05	1.74E-06
						1.47E-04	4.54E-05
						7.93E-05	1.11E-05
						3.04E-05	7.48E-06
						2.56E-04	4.83E-05
						4.04E-04	2.69E-04
						1.48E-04	2.38E-05
						5.69E-06	2.08E-06
						2.51E-06	2.66E-07

D8	12h WT	beta	Unknown	25.21	0.092	1.70E-05	1.67E-05	9.39E-07	82.5
D9	9 h Cd	beta	Unknown	23.06	0.043	6.51E-05	6.46E-05	1.74E-06	82.5
D10	9 h WT	beta	Unknown	21.89	0.482	1.35E-04	1.47E-04	4.54E-05	82.5
D11	6 h Cd	beta	Unknown	22.91	0.218	7.12E-05	7.93E-05	1.11E-05	82.2
D12	6 h WT	beta	Unknown	24.72	0.401	2.31E-05	3.04E-05	7.48E-06	82.2
E1	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined					65.6
E2	Blanco Beta	beta	NTC	Undetermined					65.6
E3	30h Cd	beta	Unknown	21.03	0.289	2.30E-04	2.56E-04	4.83E-05	82.2
E4	30 h WT	beta	Unknown	21.15	1.164	2.13E-04	4.04E-04	2.69E-04	82.2
E5	24 h Cd	beta	Unknown	21.49	0.257	1.73E-04	1.48E-04	2.38E-05	82.2
E6	24 h WT	beta	Unknown	27.13	0.576	5.16E-06	5.69E-06	2.08E-06	82.8
E7	12h Cd	beta	Unknown	28.32	0.168	2.46E-06	2.51E-06	2.66E-07	82.8
E8	12h WT	beta	Unknown	25.18	0.092	1.74E-05	1.67E-05	9.39E-07	82.5
E9	9 h Cd	beta	Unknown	23.12	0.043	6.27E-05	6.46E-05	1.74E-06	82.5
E10	9 h WT	beta	Unknown	22.23	0.482	1.09E-04	1.47E-04	4.54E-05	82.5
E11	6 h Cd	beta	Unknown	22.5	0.218	9.19E-05	7.93E-05	1.11E-05	82.2
E12	6 h WT	beta	Unknown	23.92	0.401	3.81E-05	3.04E-05	7.48E-06	81.9
F1	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					72.1
F2	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					65.9
F3	30h Cd	TPI	Unknown	25.01	0.404	4.91E-05	6.79E-05	1.66E-05	83.1
F4	30 h WT	TPI	Unknown	25.17	0.634	4.42E-05	5.98E-05	2.69E-05	83.1
F5	24 h Cd	TPI	Unknown	24.25	0.231	8.06E-05	7.28E-05	1.10E-05	83.1
F6	24 h WT	TPI	Unknown	35.94	0.363	3.83E-08	3.57E-08	7.95E-09	83.8
F7	12h Cd	TPI	Unknown	33	0.208	2.63E-07	2.90E-07	3.94E-08	83.8
F8	12h WT	TPI	Unknown	30.22	0.23	1.62E-06	1.46E-06	2.10E-07	83.8
F9	9 h Cd	TPI	Unknown	28.96	0.009	3.68E-06	3.67E-06	2.08E-08	83.8
F10	9 h WT	TPI	Unknown	28.27	0.546	5.80E-06	7.71E-06	2.70E-06	83.8
F11	6 h Cd	TPI	Unknown	27.05	0.01	1.29E-05	1.29E-05	8.23E-08	83.1
F12	6 h WT	TPI	Unknown	28.94	0.575	3.75E-06	5.94E-06	2.05E-06	83.1
G1	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					Noisy BL 71.8
G2	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					77.2
G3	30h Cd	TPI	Unknown	24.37	0.404	7.43E-05	6.79E-05	1.66E-05	83.1
G4	30 h WT	TPI	Unknown	25.16	0.634	4.44E-05	5.98E-05	2.69E-05	83.1
G5	24 h Cd	TPI	Unknown	24.58	0.231	6.50E-05	7.28E-05	1.10E-05	83.1
G6	24 h WT	TPI	Unknown	35.8	0.363	4.21E-08	3.57E-08	7.95E-09	83.5

G7	12h Cd	TPI	Unknown	32.71	0.208	3.18E-07	2.90E-07	3.94E-08	83.8
G8	12h WT	TPI	Unknown	30.65	0.23	1.22E-06	1.46E-06	2.10E-07	83.5
G9	9 h Cd	TPI	Unknown	28.98	0.009	3.65E-06	3.67E-06	2.08E-08	83.5
G10	9 h WT	TPI	Unknown	27.5	0.546	9.62E-06	7.71E-06	2.70E-06	83.1
G12	6 h WT	TPI	Unknown	28.16	0.575	6.24E-06	5.94E-06	2.05E-06	82.8
H1	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					67.5
H2	Blanco TPI	TPI	NTC	Undetermined					66.2
H3	30h Cd	TPI	Unknown	24.25	0.404	8.03E-05	6.79E-05	1.66E-05	82.8
H4	30 h WT	TPI	Unknown	24.06	0.634	9.09E-05	5.98E-05	2.69E-05	82.8
H6	24 h WT	TPI	Unknown	36.49	0.363	2.68E-08	3.57E-08	7.95E-09	83.5
H8	12h WT	TPI	Unknown	30.31	0.23	1.53E-06	1.46E-06	2.10E-07	83.5
H10	9 h WT	TPI	Unknown	Undetermined					69.9
H11	6 h Cd	TPI	Unknown	27.04	0.01	1.30E-05	1.29E-05	8.23E-08	82.5
H12	6 h WT	TPI	Unknown	27.81	0.575	7.82E-06	5.94E-06	2.05E-06	82.5

Document Name: Cuantificacion TPI con Beta 16 ene 08

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A1	6h WT	TPI	Unknown	28.42	0.881	2.14E-05	1.52E-05	8.80E-06		82.1
A2	6h Cd	TPI	Unknown	28.56	0.31	1.94E-05	1.68E-05	3.63E-06		82.4
A3	9h WT	TPI	Unknown	29.54	0.049	9.74E-06	9.51E-06	3.27E-07		82.4
A4	9h Cd	TPI	Unknown	31.56	0.536	2.37E-06	3.57E-06	1.34E-06		83.5
A5	12h WT	TPI	Unknown	32.17	0.542	1.54E-06	1.22E-06	4.53E-07		83.5
A7	24h WT	TPI	Unknown	35.76	0.112	1.25E-07	1.27E-07	1.00E-08		83.1
A8	30h WT	TPI	Unknown	23.16	0.453	8.50E-04	6.96E-04	2.17E-04		82.4
A10	30h Cd	TPI	Unknown	24.41	0.311	3.55E-04	3.08E-04	6.66E-05		82.7
A11	Blanco	TPI	Unknown	Undetermined						65.9
A12	Blanco	TPI	Unknown	Undetermined						65.9
B1	6h WT	TPI	Unknown	29.67	0.881	8.93E-06	1.52E-05	8.80E-06		82.1
B3	9h WT	TPI	Unknown	29.61	0.049	9.28E-06	9.51E-06	3.27E-07		82.7
B4	9h Cd	TPI	Unknown	30.49	0.536	5.02E-06	3.57E-06	1.34E-06		83.5
B6	12h Cd	TPI	Unknown	34.06	1.152	4.12E-07	2.72E-07	1.98E-07		83.5
B7	24h WT	TPI	Unknown	35.85	0.112	1.18E-07	1.27E-07	1.00E-08		83.5
B9	24h Cd	TPI	Unknown	23.6	0.04	6.24E-04	6.12E-04	1.69E-05		82.7
B10	30h Cd	TPI	Unknown	24.85	0.311	2.61E-04	3.08E-04	6.66E-05		82.7

B10	30h Cd	TPI	Unknown	24.85	0.311	2.61E-04	3.08E-04	6.66E-05	82.7
B11	Blanco	TPI	Unknown	32.91	9.396	9.19E-07	5.06E-03	7.15E-03	83.1
B12	Blanco	TPI	Unknown	Undetermined					65.9
C2	6h Cd	TPI	Unknown	29	0.31	1.43E-05	1.68E-05	3.63E-06	82.1
C4	9h Cd	TPI	Unknown	31.08	0.536	3.33E-06	3.57E-06	1.34E-06	83.5
C5	12h WT	TPI	Unknown	32.94	0.542	9.03E-07	1.22E-06	4.53E-07	83.8
C6	12h Cd	TPI	Unknown	35.69	1.152	1.32E-07	2.72E-07	1.98E-07	83.5
C7	24h WT	TPI	Unknown	35.63	0.112	1.38E-07	1.27E-07	1.00E-08	83.5
C8	30h WT	TPI	Unknown	23.8	0.453	5.42E-04	6.96E-04	2.17E-04	82.7
C9	24h Cd	TPI	Unknown	23.66	0.04	6.00E-04	6.12E-04	1.69E-05	82.4
C11	Blanco	TPI	Unknown	19.63	9.396	1.01E-02	5.06E-03	7.15E-03	78.6
C12	Blanco	TPI	Unknown	Undetermined					84.5
D1	6h WT	beta	Unknown	22.24	0.213	1.05E-04	9.03E-05	1.33E-05	82.1
D2	6h Cd	beta	Unknown	20.91	0.042	2.59E-04	2.54E-04	7.25E-06	82.7
D3	9h WT	beta	Unknown	21.8	0.045	1.42E-04	1.43E-04	4.39E-06	82.7
D4	9h Cd	beta	Unknown	23.2	0.176	5.50E-05	5.90E-05	7.24E-06	82.7
D5	12h WT	beta	Unknown	24.85	0.181	1.81E-05	1.59E-05	1.98E-06	82.7
D6	12h Cd	beta	Unknown	27.53	0.057	2.93E-06	3.06E-06	1.17E-07	82.7
D8	30h WT	beta	Unknown	20.4	0.217	3.68E-04	3.29E-04	4.67E-05	82.1
D9	24h Cd	beta	Unknown	20.78	0.394	2.84E-04	2.39E-04	6.31E-05	81.7
D10	30h Cd	beta	Unknown	20.69	0.3	3.01E-04	2.64E-04	5.32E-05	81.7
D11	Blanco	beta	Unknown	36.63	10.298	6.19E-09	5.92E-05	8.38E-05	82.4
D12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					82.4
E1	6h WT	beta	Unknown	22.66	0.213	7.94E-05	9.03E-05	1.33E-05	82.4
E2	6h Cd	beta	Unknown	20.97	0.042	2.48E-04	2.54E-04	7.25E-06	82.7
E3	9h WT	beta	Unknown	21.83	0.045	1.39E-04	1.43E-04	4.39E-06	82.7
E4	9h Cd	beta	Unknown	22.9	0.176	6.73E-05	5.90E-05	7.24E-06	82.7
E5	12h WT	beta	Unknown	25.09	0.181	1.53E-05	1.59E-05	1.98E-06	82.4
E6	12h Cd	beta	Unknown	27.46	0.057	3.08E-06	3.06E-06	1.17E-07	82.7
E7	24h WT	beta	Unknown	26.79	0.283	4.85E-06	4.27E-06	8.14E-07	82.7
E8	30h WT	beta	Unknown	20.5	0.217	3.42E-04	3.29E-04	4.67E-05	82.1
E11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					75.5
E12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.9
F1	6h WT	beta	Unknown	22.53	0.213	8.65E-05	9.03E-05	1.33E-05	81.4
F3	9h WT	beta	Unknown	21.74	0.045	1.48E-04	1.43E-04	4.39E-06	82.7

F4	9h Cd	beta	Unknown	23.21	0.176	5.46E-05	5.90E-05	7.24E-06	82.7
F5	12h WT	beta	Unknown	25.2	0.181	1.42E-05	1.59E-05	1.98E-06	82.7
F6	12h Cd	beta	Unknown	27.42	0.057	3.16E-06	3.06E-06	1.17E-07	82.7
F7	24h WT	beta	Unknown	27.19	0.283	3.69E-06	4.27E-06	8.14E-07	82.7
F8	30h WT	beta	Unknown	20.81	0.217	2.77E-04	3.29E-04	4.67E-05	82.1
F9	24h Cd	beta	Unknown	21.33	0.394	1.95E-04	2.39E-04	6.31E-05	81.7
F10	30h Cd	beta	Unknown	21.11	0.3	2.26E-04	2.64E-04	5.32E-05	81.7
F11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					68.6
F12	Blanco	beta	Unknown	22.07	10.298	1.18E-04	5.92E-05	8.38E-05	77.6
G1		TPI	Standard	19.49		1.00E-02			83.1
G2		TPI	Standard	19.67		1.00E-02			83.5
G3		TPI	Standard	19.67		1.00E-02			83.5
G4		TPI	Standard	26.21		1.00E-04			83.5
G6		TPI	Standard	26.12		1.00E-04			83.5
G7		beta	Standard	14.94		1.00E-02			82.7
G8		beta	Standard	14.78		1.00E-02			82.4
G9		beta	Standard	23.37		1.00E-04			82.7
G12		beta	Standard	23		1.00E-04			82.1
H2		TPI	Standard	22.98		1.00E-03			83.1
H3		TPI	Standard	23.09		1.00E-03			83.5
H7		beta	Standard	19.11		1.00E-03			82.1
H8		beta	Standard	19.35		1.00E-03			81.7
H9		beta	Standard	19.39		1.00E-03			81.4
H10		beta	Standard	24.76		1.00E-05			81.7
H11		beta	Standard	25.15		1.00E-05			82.1

Document Name: Cuantificacion TPI con Bet 18 ene 08

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A2	6h Cd	TPI	Unknown	28.51	0.029	3.41E-05	3.36E-05	7.27E-07		82.3
A3	9h WT	TPI	Unknown	28.55	0.135	3.31E-05	3.57E-05	3.58E-06		82.3
A5	12h WT	TPI	Unknown	31.59	0.069	3.43E-06	3.54E-06	1.84E-07		83.6
A6	12 Cd	TPI	Unknown	34.9	1.08	2.91E-07	4.49E-07	3.72E-07		83.6
A7	24h WT	TPI	Unknown	32.5	0.351	1.73E-06	1.47E-06	3.79E-07		83.3
A10	30h Cd	TPI	Unknown	24.38	0.171	7.39E-04	7.42E-04	9.43E-05		82.6

E1	6h WT	beta	Unknown	24.63	0.344	1.38E-04	1.80E-04	3.84E-05	82.6
E2	6h Cd	beta	Unknown	24.37	0.125	1.64E-04	1.66E-04	1.37E-05	82.6
E3	9h WT	beta	Unknown	22.44	0.088	5.77E-04	6.17E-04	3.47E-05	82.6
E4	9h Cd	beta	Unknown	23.44	0.022	3.01E-04	3.04E-04	4.37E-06	82.6
E5	12h WT	beta	Unknown	25.95	0.248	5.85E-05	6.95E-05	1.11E-05	82.6
E6	12 Cd	beta	Unknown	28.61	0.076	1.03E-05	1.05E-05	5.23E-07	82.6
E7	24h WT	beta	Unknown	27.21	0.238	2.57E-05	2.45E-05	3.66E-06	82.6
E8	24h Cd	beta	Unknown	21.48	0.082	1.08E-03	1.12E-03	6.09E-05	81.9
E10	30h Cd	beta	Unknown	20.99	0.348	1.48E-03	1.21E-03	2.70E-04	81.9
E11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined	Undetermined				Noisy BL 65.6
E12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined	Undetermined				65.6
F1	6h WT	beta	Unknown	24.15	0.344	1.89E-04	1.80E-04	3.84E-05	82.3
F2	6h Cd	beta	Unknown	24.47	0.125	1.54E-04	1.66E-04	1.37E-05	82.6
F3	9h WT	beta	Unknown	22.28	0.088	6.42E-04	6.17E-04	3.47E-05	82.6
F4	9h Cd	beta	Unknown	23.44	0.022	3.01E-04	3.04E-04	4.37E-06	82.6
F5	12h WT	beta	Unknown	25.69	0.248	6.92E-05	6.95E-05	1.11E-05	82.6
F6	12 Cd	beta	Unknown	28.5	0.076	1.11E-05	1.05E-05	5.23E-07	82.6
F7	24h WT	beta	Unknown	27.56	0.238	2.04E-05	2.45E-05	3.66E-06	82.6
F8	24h Cd	beta	Unknown	21.33	0.082	1.19E-03	1.12E-03	6.09E-05	81.9
F9	30h WT	beta	Unknown	21.87	0.055	8.39E-04	8.61E-04	3.11E-05	81.9
F10	30h Cd	beta	Unknown	21.69	0.348	9.43E-04	1.21E-03	2.70E-04	81.9
F11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined	Undetermined				Noisy BL 65.6
F12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined	Undetermined				65.6
G1		TPI	Standard	20.94		1.00E-02			83.3
G3		TPI	Standard	20.89		1.00E-02			83.6
G4		TPI	Standard	27.22		1.00E-04			83.6
G5		TPI	Standard	26.96		1.00E-04			83.6
G7		beta	Standard	18.3		1.00E-02			82.6
G8		beta	Standard	18.52		1.00E-02			82.6
G9		beta	Standard	18.52		1.00E-02			82.6
G10		beta	Standard	25.5		1.00E-04			82.6
G11		beta	Standard	26		1.00E-04			82.6
G12		beta	Standard	25.04		1.00E-04			81.9
H1		TPI	Standard	24.01		1.00E-03			82.9
H2		TPI	Standard	Undetermined					87.9

H3	TPI	Standard	23.85	1.00E-03	83.3
H7	beta	Standard	20.92	1.00E-03	81.9
H8	beta	Standard	20.78	1.00E-03	81.6
H9	beta	Standard	20.8	1.00E-03	81.6

Document Name: cuan HSP70 vs B 200208

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A4	9 Cd	HSP70	Unknown	30.18	0.254	9.14E-07	1.08E-06	1.92E-07		78.1
A5	12 WT	HSP70	Unknown	30.55	0.426	7.10E-07	9.94E-07	2.81E-07		79.1
A6	12 Cd	HSP70	Unknown	34.05	0.792	6.34E-08	1.15E-07	6.40E-08		79.1
A7	24 WT	HSP70	Unknown	31.85	0.573	2.89E-07	2.47E-07	8.49E-08		79.1
A8	24 Cd	HSP70	Unknown	22.4	0.066	1.93E-04	2.00E-04	9.15E-06		77.7
A10	30 Cd	HSP70	Unknown	22.36	0.298	1.99E-04	1.91E-04	3.73E-05		77.4
A11	Blanco	HSP70	Unknown	35.12	1.195	3.04E-08	3.84E-08	2.44E-08		76.7
A12	Blanco	HSP70	Unknown	34.24	1.195	5.56E-08	3.84E-08	2.44E-08		76.4
B1	6 WT	HSP70	Unknown	31.05	0.221	5.01E-07	4.52E-07	6.85E-08		78.4
B2	6 Cd	HSP70	Unknown	27.87	0.162	4.49E-06	4.87E-06	5.41E-07		79.4
B3	9 WT	HSP70	Unknown	29.09	0.078	1.94E-06	2.01E-06	1.08E-07		78.7
B4	9 Cd	HSP70	Unknown	30	0.254	1.04E-06	1.08E-06	1.92E-07		79.1
B5	12 WT	HSP70	Unknown	29.7	0.426	1.27E-06	9.94E-07	2.81E-07		79.1
B6	12 Cd	HSP70	Unknown	33.45	0.792	9.58E-08	1.15E-07	6.40E-08		79.1
B7	24 WT	HSP70	Unknown	32.81	0.573	1.50E-07	2.47E-07	8.49E-08		79.1
B8	24 Cd	HSP70	Unknown	22.38	0.066	1.97E-04	2.00E-04	9.15E-06		77.7
B9	30 WT	HSP70	Unknown	21.89	0.102	2.76E-04	2.91E-04	2.04E-05		77.7
B10	30 Cd	HSP70	Unknown	22.77	0.298	1.50E-04	1.91E-04	3.73E-05		77.7
B11	Blanco	HSP70	Unknown	36.25	1.195	1.40E-08	3.84E-08	2.44E-08		77.4
B12	Blanco	HSP70	Unknown	36.87	1.195	9.14E-09	3.84E-08	2.44E-08		77.4
C1	6 WT	HSP70	Unknown	31.36	0.221	4.04E-07	4.52E-07	6.85E-08		79.1
C2	6 Cd	HSP70	Unknown	27.64	0.162	5.25E-06	4.87E-06	5.41E-07		79.1
C3	9 WT	HSP70	Unknown	28.98	0.078	2.09E-06	2.01E-06	1.08E-07		79.4
C4	9 Cd	HSP70	Unknown	29.68	0.254	1.29E-06	1.08E-06	1.92E-07		79.4
C5	12 WT	HSP70	Unknown	30.05	0.426	9.99E-07	9.94E-07	2.81E-07		79.4
C6	12 Cd	HSP70	Unknown	32.48	0.792	1.87E-07	1.15E-07	6.40E-08		79.4
C7	24 WT	HSP70	Unknown	31.78	0.573	3.03E-07	2.47E-07	8.49E-08		79.4

C8	24 Cd	HSP70	Unknown	22.28	0.066	2.11E-04	2.00E-04	9.15E-06	78.1
C9	30 WT	HSP70	Unknown	21.74	0.102	3.05E-04	2.91E-04	2.04E-05	77.7
C10	30 Cd	HSP70	Unknown	22.2	0.298	2.23E-04	1.91E-04	3.73E-05	77.7
C11	Blanco	HSP70	Unknown	33.92	1.195	6.95E-08	3.84E-08	2.44E-08	79.4
C12	Blanco	HSP70	Unknown	34.34	1.195	5.21E-08	3.84E-08	2.44E-08	79.1
D1	6 WT	beta	Unknown	24.12	0.188	5.55E-04	4.84E-04	6.74E-05	82.8
D2	6 Cd	beta	Unknown	23.83	0.065	6.89E-04	7.02E-04	3.40E-05	82.8
D3	9 WT	beta	Unknown	22.94	0.033	1.33E-03	1.36E-03	3.31E-05	82.8
D4	9 Cd	beta	Unknown	23.36	0.021	9.78E-04	9.67E-04	1.51E-05	82.8
D5	12 WT	beta	Unknown	25.64	0.161	1.80E-04	1.95E-04	2.38E-05	82.8
D6	12 Cd	beta	Unknown	28.19	0.125	2.75E-05	2.91E-05	2.75E-06	82.8
D7	24 WT	beta	Unknown	27.29	0.082	5.33E-05	5.35E-05	3.24E-06	82.8
D8	24 Cd	beta	Unknown	21.35	0.105	4.30E-03	4.66E-03	3.60E-04	82.1
D10	30 Cd	beta	Unknown	21.59	0.008	3.60E-03	3.59E-03	2.11E-05	82.1
D11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
D12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
E1	6 WT	beta	Unknown	24.33	0.188	4.77E-04	4.84E-04	6.74E-05	82.4
E2	6 Cd	beta	Unknown	23.85	0.065	6.77E-04	7.02E-04	3.40E-05	82.8
E3	9 WT	beta	Unknown	22.88	0.033	1.39E-03	1.36E-03	3.31E-05	82.8
E5	12 WT	beta	Unknown	25.36	0.161	2.22E-04	1.95E-04	2.38E-05	82.8
E6	12 Cd	beta	Unknown	28.19	0.125	2.75E-05	2.91E-05	2.75E-06	82.8
E7	24 WT	beta	Unknown	27.21	0.082	5.68E-05	5.35E-05	3.24E-06	82.8
E8	24 Cd	beta	Unknown	21.14	0.105	5.02E-03	4.66E-03	3.60E-04	82.1
E9	30 WT	beta	Unknown	20.3	1.001	9.36E-03	6.33E-03	4.29E-03	81.8
E11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
E12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
F1	6 WT	beta	Unknown	24.5	0.188	4.21E-04	4.84E-04	6.74E-05	82.4
F2	6 Cd	beta	Unknown	23.73	0.065	7.41E-04	7.02E-04	3.40E-05	82.8
F3	9 WT	beta	Unknown	22.93	0.033	1.34E-03	1.36E-03	3.31E-05	82.8
F4	9 Cd	beta	Unknown	23.39	0.021	9.56E-04	9.67E-04	1.51E-05	82.8
F5	12 WT	beta	Unknown	25.63	0.161	1.82E-04	1.95E-04	2.38E-05	82.8
F6	12 Cd	beta	Unknown	27.97	0.125	3.23E-05	2.91E-05	2.75E-06	82.8
F7	24 WT	beta	Unknown	27.37	0.082	5.03E-05	5.35E-05	3.24E-06	82.8
F8	24 Cd	beta	Unknown	21.24	0.105	4.65E-03	4.66E-03	3.60E-04	82.1
F9	30 WT	beta	Unknown	21.71	1.001	3.29E-03	6.33E-03	4.29E-03	81.8

F10	30 Cd	beta	Unknown	21.6	0.008	3.57E-03	3.59E-03	2.11E-05	81.8
F11	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
F12	Blanco	beta	Unknown	Undetermined					65.8
G1		HSP70	Standard	16.51		1.00E-02			79.1
G2		HSP70	Standard	16.8		1.00E-02			79.1
G3		HSP70	Standard	16.35		1.00E-02			79.4
G4		HSP70	Standard	23.32		1.00E-04			79.4
G5		HSP70	Standard	23.22		1.00E-04			79.4
G6		HSP70	Standard	23.19		1.00E-04			79.4
G7		beta	Standard	20.17		1.00E-02			82.8
G8		beta	Standard	20.24		1.00E-02			82.8
G9		beta	Standard	20.58		1.00E-02			82.8
G10		beta	Standard	26.95		1.00E-04			82.8
G11		beta	Standard	27.16		1.00E-04			82.4
G12		beta	Standard	27.04		1.00E-04			81.8
H1		HSP70	Standard	20.28		1.00E-03			78.7
H2		HSP70	Standard	20.34		1.00E-03			78.7
H3		HSP70	Standard	20.14		1.00E-03			79.1
H7		beta	Standard	23.3		1.00E-03			81.1
H8		beta	Standard	22.65		1.00E-03			81.4
H9		beta	Standard	22.57		1.00E-03			81.8
H10		beta	Standard	29.29		1.00E-05			81.8
H11		beta	Standard	29.49		1.00E-05			82.4
H12		beta	Standard	29.17		1.00E-05			81.8

11. 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.
- Avilés C., Torres-Marquez M.E., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R. (2005) Time-course development of the Cd hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch Microbiol 184:83-92.
- Barque J.P., Abahamid A., Chacun H., and Bonaly J. (1996) Different heat-shock Proteins Are Constitutively Overexpressed in Cadmium and Pentachlorophenol Adapted *Euglena gracilis* Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:7-11.
- Barque J.P., Chacun H., Marouby S., Bonaly J. (1994) Cadmium resistance of achlorophyllous *Euglena gracilis* cells: constitutive overexpression of two heat-shock proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:540-544.
- Barque J.P., Schedler P., Floch E., Bonaly J. (2000) In *Euglena gracilis*, a Heat-Shock Protein Related to hsc73 is constitutive and stress inducible. Arch. Biochem. Biophys. 387:1-5.
- Bas A., Forsberg G., Hammarstrom S., Hammarstrom M.L. (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. Scand. J. Immunol. 59:566-573.
- Boorstein W.R., Ziegelhouer T., Craig E.A. (1994) Molecular evolution of the HSP70 multigene family. J Mol Evol 38:1-17.
- Briand J., Julistiono H., Beaune P., Flinois J.P, de Waziers I., Leroux J.P. (1993) Presence of proteins recognized by mammalian cytochrome P-450 antibodies in *Euglena gracilis*. Biochim. Biophys. Acta 1203 199-204.
- Cai X., Woods K.M., Upton S.J., Zhu G. (2005) Application of quantitative real-time reverse transcription-PCR in assessing drug efficacy against the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum* in vitro. Antimicrob Agents Chemother. 49:4437-4442
- Carginale V., Capasso C., Scudiero R., Parisi E. (2002) Identification of cadmium-sensitive genes in the Antarctic fish *Chionodraco hamatus* by Messenger RNA differential display. Gene 299:117-124.
- Cheng S.H., Seeman J.R. (1998) Extraction and purification of RNA from plant tissue enriched in polysaccharides. En Repley R., Manning D. L. (Editores) Methods in molecular biology. Vol. 86 RNA isolation and characterization protocols. p 27-32. Humana Press Inc. Totowa N.J.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162. 156-159
- Clemens S., Antosiewicz D.M., Ward J.M., Schachtman D.P., Schroeder J.I. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 12043-12048.

- Connolly E.L., Fett J.P., Guerinot M.L. (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *The Plant Cell* 14, 1347-1357. 3, 675-691.
- Costa J. (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbol. Clin.* 22(5): 299-305.
- Couillard D., Zhu S. (1992) Bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge for agricultural application. *Water Air Soil Pollut.* 63:67-80.
- De la Rosa-Vélez J. y Bonomi J.R. (2006) Detección molecular de Enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón. *Hidrobiologica* 16: 275-293.
- Deloménie C., Foti E., Floch E., Diderot V., Porquet D., Dupuy C., Bonaly J. (2007) A new homolog of FocA transporters identified in cadmium-resistant *Euglena gracilis*. *Biochem and Biophys Res Commun* 358:455-461.
- 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.
- Dorak Tevfik. (2006) Real-time PCR. Taylor & Francis Group.
- D'Orso I., Frasch A.C. (2002) TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 277(52):50520-50528.
- Dos Santos Ferreira V, Rocchetta I., Conforti V., Bench S., Feldman R., Levin M.J. (2007) Gene expression patterns in *Euglena gracilis*: insights into the cellular response to environmental stress, *Gene* 389:136-145.
- Edwards Kirtin., Logan J., Saunders N. (2004) Real-Time an essential guide. Horizon Bioscience.
- Einicker-Lamas M., Soares M.J., Soares M.S., Oliveira M.M. (1996) Effects of cadmium on *Euglena gracilis* membrane lipids. *Braz J Med Biol Res* 29:941-948.
- Fusco N., Micheletto L., Corso G.D., Borgato L. y 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.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. (2006) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal. Biochem.* 295:17–21.
- Hart B.A., Scaife B.D. (1977) Toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Res.* 14:401-413.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) Real Time Quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
- Hernández-Navarro A. (2003) Expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a Cd: análisis diferencial por la técnica de AFLP. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM. México D.F.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. & Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* 10:413-417.

- Hung J.J., Cheng T.J., Chang M.D., Chen K.D., Huang H.L., Lai Y.K. (1998) Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-Kda heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell. Biochem.* 71:21-35.
- Ingerslev HC, Pettersen EF, Jakobsen RA, Petersen CB, Wergeland HI. (2006) Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Mol. Immunol.* 43:1194–1201.
- Ito H., Iwabuchi M., Ogawa K. (2003) The Sugar-Metabolic Enzymes Aldolase and Triosephosphate isomerase are Targets of Glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: Detection using Biotinylated Glutathione. *Plant. Cell. Physiol.* 44:655-660.
- Ivanina A.V., Cherkasov A.S., Sokolova I.M. (2008) Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *The J. of Exp. Biol.* 211:577-586.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345:646–651.
- Keeling, P.J., Doolittle, W. F. (1997) Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:1270-1275.
- Krieger K., Ernest J.F. (1994) Iron regulation of triosephosphate isomerase transcript stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 140:1079-1084.
- Laegreid M.J., Alstad J., Klaveness D., Seip H.M. (1983) Seasonal variation of cadmium toxicity toward the alga *Selenastrum capricornutum* in two lakes with different humus content. *Environ. Sci. Technol.* 17:357-361.
- Lane T.W., Saito M.A., George G.N., Pickering I.J., Prince R.C., Morel F.M. (2005) Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435, 42.
- Lees M. (2003) Food authenticity and Traceability. Humber Institute of food and Fisheries. CRC Press.
- Liao V.H.C., Freedman J.H. (1996) Cadmium- regulated genes from the Nematode *Caenorhabditis elegans* identification and cloning of new cadmium-responsive genes by differential display. *J. Biol. Chem.* 48:31962-31970.
- Little P., Martin M.H. (1972) A survey of zinc, lead and cadmium in soil and natural vegetation around a smelting complex. *Environ. Pollut.* 3: 241-254.
- Lozano-Rodriguez E., Hernandez L.E., Bonay P., Carpena-Ruiz R.O. (1997) Of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J. Exp. Bot.* 48:123-128.
- Manzano M., Cocolin L., Citterio B., Conte L., De Bertoldi M., Comi G., Santovito G., Beltramini M., Salvato B. (2000) Biochemical responses in a *Candida famata* strain adapted to high copper concentrations. *Biometals* 13:251-259.
- 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. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protist and plants. *FEMS Microbiol. Reviews* 29:653-671.

- Mendoza-Cózatl D.G., Moreno-Sánchez R. (2005) Cd transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biophys. Acta.* 1706:88-97.
- Mendoza-Cózatl D.G., Rangel-González E., Moreno-Sánchez R. (2006) Simultaneous Cd, Zn y Pb Uptake and Accumulation by Photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environ. Contam. Toxicol.* 51:521-528.
- Minhas D., Grover A. (1999) Transcripts levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Sci.* 146:41-51.
- Mo, Y., Harris, B. G. & Gracy, R. W. (1973) Triosephosphate isomerase and aldolases from light- and dark-grown *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 157:580-587.
- Morrissey J.P., Deardorff J.A., Hebron C., Sachs A.B. (1999) Decapping of Stabilized, Polyadenylated mRNA in Yeast *pab1* Mutants. *Yeast* 15:687-702.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. (1980) The replacement of the non descript term "heavy metal" by biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1:3-8.
- Nielsen K.K. y Boye M. (2005) Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Analysis of Expression Stability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Housekeeping Genes during In Vitro Growth under Iron-Depleted Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 71(6):2949-54.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. *Nature* 333:134-139.
- Olin Sandoval, M.V. (2006) Obtención e identificación de fragmentos de cDNA de genes de *Euglena gracilis* que se expresan diferencialmente en presencia de cadmio. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. México D.F.
- Overnell J. (1975) The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine alga, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaedactylum tricorutum*. *Mar. Biol.* 29:99-203.
- Palmer H., Ohta M., Watanabe M., Suzuki T. (2002) Oxidative stress induced cellular damage caused by UV and methyl viologen in *Euglena gracilis* and its suppression with rutin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 67:116-129.
- Plaxton W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185-214.
- Prasad J., Mc Jarrow P., Gopal P. (2003) Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001(DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:917-925.
- Radonic A. Thulke S., Mackay I.M., Landt O., Siegert W., Nitsche A. (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 313(4):856-62.
- Rensing S.A., Maier U.G. (1994) Philogenetic análisis of the stress-70 protein family. *J Mol Evol* 39:80-86.
- Rodríguez-Vargas S., Estruch F., Randez-Gil F. (2002) Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3024-3030.
- Salt D.E., Rauser W.E. (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant. Physiol.* 107:1293-1301.
- Salt D.E., Wagner G.J. (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. *J. Biol. Chem.* 17:12297-12302.

- Sanchez-Fernandez R., Davies T.G., Coleman J.O., Rea P.A. (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276:30231-30244.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA. (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* 46:69–81.
- Toumainen M.H., Nunan N., Lehesranta S.J., Tervahauta A.I., Hassinen V.H., Schat H., Koistinen K.M., Aureola S., McNicol J., Kärenlampi S.O. (2006) Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 6:3696-3706.
- Umeda M., Hara C., Matsubayashi Y., Li H.H., Liu Q., Tadokoro F., Aotsuka S., Uchimiyama H. (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol. Biol.* 25:469-478.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002, 3(7) research 0034.1-0034.11
- Vázquez-Alarcón A, Justin-Cajuste L, Siebe-Grabach C, Alcántar-González G, de la Isla de Bauer ML. (2001) Cadmium, nickel and lead concentrations in waste water, soil and crops in the Mexquital valley, Hidalgo, Mexico. *Agrociencia* 35:276-274.
- Watanabe M., Suzuki T. (2004) Cadmium-induced synthesis of HSP70 and role of glutathione in *Euglena gracilis*. *Redox Report* Vol. 9, No. 6
- Wilde E.W., Beneman J.R. (1993) Biorremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotech. Adv.* 11:781-812.