



UNAM
CUAUTILÁN

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD ENTRE LA PROTEINA
CITOQUERATINA 18 (CK18) DE HIGADO Y EL OLIGONUCLEOTIDO
[5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG POR MEDIO DE ELECTROFORESIS CAPILAR
DE AFINIDAD**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

FABIOLA MORENO ZAVALA

ASESORAS:

DRA. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Determinación de la constante de afinidad entre la proteína
citoqueratina 18 (CK 18) y el oligonucleótido
(5'FMC)GGGTCTAGTACAAATCTGG por medio de electroforesis capilar
de afinidad
que presenta la pasante: Fabiola Moreno Zavala
con número de cuenta: 400051310 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Junio de 2008.

PRESIDENTE	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
VOCAL	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
SECRETARIO	QFB. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
PRIMER SUPLENTE	MC. Verónica Castro Bear	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Maritere Domínguez Rojas	

Los autores agradecen a la U.N.A.M., D.G.A.P.A. por el apoyo a los proyecto PAPIIT IN208608 y PAPIME PE203405, al CONACYT por los recursos del proyecto 52723, a la Cátedra de Investigación FESC IN-64, y al proyecto PAPIIT IN221007.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

DIOS: Todo esto es gracias a ti, a tu bondad, a tu gracia de rodearme de gente buena. Sin ti nada, contigo todo.

ABIGAIL: No te imaginas cuanto agradezco a dios por tenerte hoy entre nosotros, eres lo mejor de mi vida y la personita que mas amo en este mundo, sin ti ya nada seria hermoso, sin ti nada vale la pena, con tu presencia iluminaste mi camino y todo lo que hago y haré será para ti (Por los que vengan). TE AMO. SIGNIFICAS TODO EN MI VIDA.

JOSE LUIS: Quien iba a decir que la vida nos uniría, que nuestras vidas se cruzarían, eres el mejor hombre que dios y la vida me dio, sin ti nada de esto estaría pasando, sin ti seria muy normal todo y no hubiera conocido el amor verdadero. Aunque la vida nos separe jamás te sacaría de mi cabeza y de mi corazón, estas en ellos. Sin ti, sin tu confianza, sin tu presencia jamás hubiera valido tanto la pena esto. Te agradezco que me ames, que estés a mi lado alentando cada uno de mis pasos y los de Abi, sin ti no lo hubiera logrado. TE AMO CON TODO MI CORAZON.

MAMÁ: Gracias por siempre ponerme en mi lugar, gracias por ubicarme y querer lo mejor para tu nieta y para mi, te agradezco de todo corazón que siempre estés ahí, que siempre me hagas ver la realidad de las cosas. Tus ganas de superarte me dan fuerzas.

PAPÁ: Gracias por confiar siempre en mi. Tu ejemplo para mi siempre va estar en mi corazón y en mi vida, siempre supiste como crearme conciencia (aunque no lo creas), tal vez me tardé un poco para dar este paso, se que me falta mucho, pero con tu apoyo incondicional saldré adelante.

MAGIO, SARA Y ERICK: Gracias por siempre recordarme todo, gracias por ser como son, por ser parte importante en mi vida. Sus momentos de risa, enojo, gozo y de crítica me han ayudado y tal vez fastidiado, pero sin eso, yo no seria como soy. Gracias.

SUEGRAS OBDULIA y ADELA: Gracias por el apoyo que me brindan sin exigir nada a cambio, gracias por querer tanto a su nieta, gracias por siempre estar dispuestas a todo. Sobre todo gracias por aguantarme tanto tiempo.

FAMILIA: Gracias Abuelitos, tíos (todos) y tías (todas); en especial a ti, tía Tete. Gracias por estar al pendiente, por preguntar como vamos, por preocuparte por nuestro bienestar, gracias porque siempre estas dispuesta a abrimos las puertas de tu corazón. Tía Margarita gracias por estar presente, por estar a lado de mi mamá y porque con tus oraciones nos ayudas a todos. Gracias a todos mis primos (todos) y primas (todas); Vane siempre fuimos, somos y seremos amigas, y nuestras vidas unidas por ser mamás. Claudia, aunque casi no nos frecuentemos tu sentido del humor es impresionante, eres súper.

MARISOL: Sabes que seremos amigas antes que cuñadas, la verdad es grato para mi que confíes en mi, porque así las cosas funcionan mejor; ya sabes que puedes seguir confiando en mí. Gracias por estar siempre pendiente de tu sobrina.

EDGAR Y JACOBO: Gracias por su apoyo incondicional, sobretodo por querer a mi hija y por ser como son.

AMIGUIS: Sin ustedes hubiera sido aburrido estar sola en el laboratorio, gracias por esa amistad que sin pedir nada a cambio me brindaron. Martha, Sandy, Nydia y Victor. Solo espero que nos veamos mucho más seguido, para contarnos sobre nuestras vidas. A Licha gracias por brindarme tu amistad, fue super el tiempo que pasamos juntas. Norma eres y será siempre mi amiga, no lo olvides.

DRA. PATY: Gracias por darme la oportunidad de trabajar con usted, gracias por su apoyo a lo largo de todo el trabajo, usted es una persona digna de admirar e imitar. Espero que no sea la última vez que trabaje con usted.

DRA. ALMA: Gracias por el apoyo que me brindó cuando necesite de usted, gracias por hacer de su laboratorio un lugar en donde da gusto trabajar.

FES CUAUTITLAN: Gracias por darme la oportunidad de estudiar en tus aulas, gracias por que en tus jardines, jardineras y pasillos conocí la felicidad y aprendí el valor del amor y la amistad.

A todos y a cada uno de ustedes, por si se me olvido mencionar a alguien.

“GRACIAS, TOTALES”

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	12
INDICE DE TABLAS.....	14
ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN.....	17

CAPITULO I Entrecruzamientos DNA-proteína (DPC's)

1.1 Biomarcadores.....	19
1.2 Aductos.....	20
1.3 Formación de aductos con proteínas.....	22
1.4 Aductos DNA-proteína.....	25
1.6 Entrecruzamientos DNA-proteína inducidos por metales y sus efectos biológicos.....	26

CAPITULO II Proteínas involucradas en la formación de DPCs

2.1 Generalidades.....	30
2.2 Citoqueratinas.....	30
2.3 Funciones de las citoqueratinas.....	35
2.4 Citoqueratina 18.....	36

2.5 Histonas.....	37
-------------------	----

CAPITULO III Electroforesis capilar

3.1 Generalidades.....	40
3.2 Fundamentos de Electroforésis Capilar.....	42
3.3 Mecanismos de separación.....	43
3.4 Electromigración.....	44
3.5 Electroósmosis.....	45
3.6 Capilares.....	49
3.7 Tipos de electroforesis capilar.....	50

CAPITULO IV Electroforesis de proteínas

4.1 Generalidades.....	51
4.2 Factores que influyen en la separación electroforética.....	55

CAPITULO V Electroforesis capilar de afinidad

5.1 Generalidades.....	57
5.2 Estudio receptor-Ligando.....	59
5.3 Principios de Electroforesis capilar de Afinidad.....	60

5.4 Detección por medio de fluorescencia inducida por láser (LIF).....	63
--	----

CAPITULO VI Sonicación

6.1 Generalidades.....	65
6.2 Cavitación.....	67

CAPITULO VII Planteamiento del Problema

7.1 Hipótesis.....	68
7.2 Objetivo General.....	68
7.3 Objetivo Particular.....	69

CAPITULO VIII Estrategia Experimental

8.1 Materiales y reactivos.....	69
8.2 Obtención y Purificación de la proteína CK 18.....	70
8.3 Inmunoprecipitación de la proteína CK 18 (Técnica de de inmunoprecipitación).....	72
8.4 Sonicación para la separación de la proteína CK 18.....	73
8.5 Centrifugación para la obtención de la proteína CK 18.....	73
8.6 Identificación de la proteína CK18 por técnica electroforética	

SDS-PAGE.....	75
8.7 Preparación de la proteína CK 18 y el oligonucleótido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG para EC.....	77
8.8 Condiciones para EC.....	80

CAPITULO IX

Resultados.....	82
Análisis de Resultados.....	86
Conclusiones.....	92
Perspectivas.....	93
Referencias.....	94

INDICE DE FIGURAS

FIG.	NOMBRE DE LA FIGURA	PAG.
1	Grupos funcionales que reaccionan con algunas proteínas.	22
2	Reacciones entre proteínas y diferentes grupos funcionales.	23
3	Rutas tentativas de un carcinógeno.	24
4	Posible mecanismo de inducción de aductos oxidativos de DNA y entrecruzamientos DNA-proteína ocasionados por arsénico.	29
5	Fotografía de microscopia electrónica de los filamentos intermedios.	32
6	Estructura general de las citoqueratinas	32
7	Formas de interacción entre dímeros de citoqueratinas	33
8	Funciones de las citoqueratinas	36
9	Filamentos expuestos a diversas agresiones	37
10	Ensamblaje de las histonas nucleares en el nucleosoma	39
11	Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar	41
12	Capilar con reservorios de buffer en donde se muestra el ánodo (+) y el cátodo (-), en donde se observa el detector y posteriormente su interpretación por medio de una computadora, electroferograma	42
13	La migración de las cargas se da con respecto a la naturaleza de las mismas hacia el polo respectivo, a este fenómeno se le conoce como: Electromigración (μe)	44
14	Molécula de silanol cargada negativamente dentro del capilar	45
15	Interior de un capilar en donde se muestra la doble capa cargada positiva y negativamente, este crea un flujo electroosmótico que arrastra a cualquier partícula cargada (+/-) o no (partículas neutras)	46
16	Salida de cualquier particular influenciada por le flujo electroosmotico (μeo)	47

17	Representación de la movilidad aparente; fenómeno de Electromigración y fenómeno de electroósmosis estos dos integran el fenómeno de electrocinética	48
18	Representación del interior de un capilar neutro; en donde el EOF es casi cero	48
19	Comparación gráfica de la resolución entre (a) EC y (b) HPLC, basándose en la separación eléctrica y de presión	49
20	Representación gráfica de la unión de un ligando a su receptor	59
21	Electroforesis por técnica SDS-PAGE de la proteína citoqueratina 18	82
22	Electroferograma del oligonucleotido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG	83
23	Electroferogramas de Oligonucleotido + Proteína CK18	84
24	Grafica de la determinación de afinidad	86

INDICE DE TABLAS

TABLA	NOMBRE DE LA TABLA	PAG.
1	Parámetros que se varían para optimizar una separación electroforética	54
2	Relación de concentración de la Proteína CK18	77
3	Especificaciones de oligonucleotido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG	78
4	Determinación de la Constante de Afinidad	85

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
DPC	Aductos DNA-proteinas
CE	Electroforesis Capilar
ACE	Electroforésis Capilar de Afinidad
SDS-PAGE	Técnica electroforética
CK 18	Citoqueratina 18
FLC	Fluoresceína
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Cr ^{III}	Cromo trivalente
Cr ^{VI}	Cromo hexavalente
HClO	Ácido hipocloroso
NADH	Nicotinamida adenina en su forma reducida
OH	Grupo hidroxilo
As ³⁺	Arsénico trivalente
Ca ²⁺	Ión calcio
O ₂	Oxígeno
NO ₃	Oxido Nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Cl ⁻	Cloro
Fe ²⁺	Hierro

m-RNA	RNA mensajero
K18	Citoqueratina 18
H1, H2A	Tipos de Histonas
Arg	Arginina
Lys	Lisina
His	Histidina
Ser	Serina
Thr	Treonina
RPM	Revoluciones por minuto
KDa	Kilodaltones
λ	Longitud de onda
IgG	Inmunoglobulina G
NP-40	Nipagin 40
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
EDTA	Ácido etilendiamotetracético
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
μ_a	Movilidad aparente
μ_e	Movilidad electroforética efectiva
μ_{eo}	Movilidad electroosmótica
EOF	Flujo electroosmótico
IF	Filamentos Intermedios

RESUMEN

En México existen diversas fuentes de exposición que en algunos casos se han asociado con el desarrollo, mantenimiento y progresión de diversas enfermedades, como son: la contaminación del aire, suelo y agua. Esta contaminación ha traído consecuencias graves a la salud humana en varias poblaciones y desafortunadamente nuestro país no es la excepción, también los países desarrollados están expuestos. (Basu, 2001).

Por estas razones, se han estudiado diversos biomarcadores celulares y se han realizado estudios con objeto de entender su significado biológico y su asociación con ciertas enfermedades.

Dentro de estos biomarcadores, se destacan los aductos ADN-PROTEINAS (DPC); estos se forman a partir de la interacción entre proteínas con el DNA. Estas proteínas normalmente no se asocian fuertemente al material genético, en este sentido se han estudiado diversos agentes que propician la formación de los DPC's, por agentes tóxicos por ejemplo: los agentes metálicos como el arsenito de sodio, el nitrilotriacetato férrico, cromato, níquel, la luz UV, radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos (especialmente el formaldehído y el malondialdehído) (Costa y cols., Hughes, 2003). Dentro de las proteínas asociadas a este tipo de daño genético destacan por sus funciones hepatoprotectoras las citoqueratinas.

Al mismo tiempo se han estudiado algunas proteínas como las histonas (Fraga y cols. 2003), que también forman entrecruzamientos DNA-proteína POR EFECTO DE VARIOS AGENTES TOXICOS. A pesar del significado

biológico que pueden tener los DPC inducidos por agentes genotóxicos con potencial carcinógeno en humanos y de las consecuencias que este tipo de lesiones genéticas se pueden favorecer en la célula. Los estudios encaminados a dilucidar los mecanismos de formación de los DPC, la especificidad de agentes tóxicos sobre su formación, inducción del daño, las secuencias y las proteínas involucradas en los DPC, su afinidad, el tipo de enlace entre las dos biomoléculas involucradas, la sensibilidad del ADN y proteínas por interaccionar mediante enlaces fuertes, las bases y aminoácidos involucrados; entre otras características fundamentales aun son pocos.

Hasta el momento no existen datos acerca de la afinidad que tiene esta proteína estudiada ampliamente en el laboratorio con regiones del ADN. Se sabe que la secuencia y la afinidad entre estas macromoléculas esta relacionada con el punto isoeléctrico de las proteínas, para que se de la unión con determinada fuerza; ya sea covalente, puentes de hidrogeno, fuerzas de Wander-Valls etc.

En este trabajo se determinó la constante de afinidad con la que se une la proteína CK18 a la secuencia [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG (oligonucleotídica), por medio de la técnica de electroforesis capilar de afinidad, herramienta útil en la caracterización de diversas macromoléculas. (Fraga., y cols., 2003., Schmitz., y cols., 2002).

CAPITULO I

Los entrecruzamientos DNA-proteínas (DPC'S)

1.1 BIOMARCADORES

Los biomarcadores o marcadores biológicos son aquellas estructuras que sufren cambios; pueden ser moléculas de origen bioquímico, fisiológico o morfológico y que se asocian a la exposición a un xenobiótico.

Los marcadores pueden ser de varios tipos:

- Biomarcadores de exposición.
- Biomarcadores de efecto.
- Biomarcadores de susceptibilidad.

Los biomarcadores de exposición consisten en la medición de la sustancia xenobiótica o un metabolito de la misma, también puede ser un efecto directamente atribuible al xenobiótico que se encuentra dentro del organismo. (Minko et al. 2001). Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales. (Manahan, 2003).

Los biomarcadores de efecto son alteraciones en la fisiología, bioquímica o causa directa atribuida a la exposición a sustancias tóxicas. En el caso del arsénico se puede considerar dentro de esta categoría; puesto que el marcador sería el DPC; ya que se une el DNA a las proteínas, formando así el

entrecruzamiento. La exposición a sustancias como los gases que afectan el sistema nervioso central como, organofosfatos e insecticidas como carbamatos y organofosfatos pueden inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa la cual puede ser medida fácilmente. (Costa, 1997).

Los biomarcadores de susceptibilidad pueden ser un indicativo de vulnerabilidad del organismo a cambios celulares que pongan en riesgo la funcionalidad celular, tisular u orgánica por efecto de la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos. De esta forma los organismos son más vulnerables a la presencia de signos y síntomas característicos de diversas patologías y de enfermedades como el cáncer, enfermedades. (Manahan, 2003; Ramírez y cols., 2000; López, 2004).

Los biomarcadores se utilizan para:

- Detectar la presencia de una exposición a agentes xenobióticos.
- Determinar las consecuencias biológicas de la exposición.
- Detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico.
- Identificar a los individuos susceptibles de una población.
- Fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

1.2 ADUCTOS

INDUCTORES DE DAÑO CELULAR

Los aductos son el resultado de la contracción entre las palabras adición y producto; y se refiere a una entidad química que se produce por la unión de dos moléculas mediante un enlace covalente. Esta unión es de naturaleza

reversible, es decir, los elementos pueden retornar a su forma libre en algún momento dependiendo de lo afines que sean entre sus enlaces. (Moncada, 2002).

La formación de aductos requiere la existencia de grupos electrofílicos (deficientes de electrones) en un xenobiótico o carcinógeno y de centros nucleofílicos (ricos en electrones) tales como grupos amino, sulfhídrico, hidroxilo, presentes en otras moléculas como proteínas, DNA y RNA. Estos aductos distorsionan la estructura de las proteínas y/o ácidos nucleicos y, por tanto, se función o replicación en su caso. En el caso del DNA, normalmente el daño producido puede ser reparado, pero si no lo es, se introduce una base inapropiada en la nueva cadena de DNA. Lo que originaría una mutación. (Zavaleta y cols. 2006)

Entre los tipos de aductos que se han estudiado están:

1. DNA-proteína.
2. Proteína-proteína.
3. Péptido-péptido.
4. Péptido-carbohidrato.
5. Carbohidrato-fármaco.
6. Anticuerpo-antígeno.
7. Proteína -fármaco.
8. Medicamento-DNA.

1.3 FORMACION DE ADUCTOS CON PROTEÍNAS

Entre los intermediarios reactivos o grupos funcionales que pueden unirse de forma covalente o iónicamente a las proteínas se muestran en la figura 1:

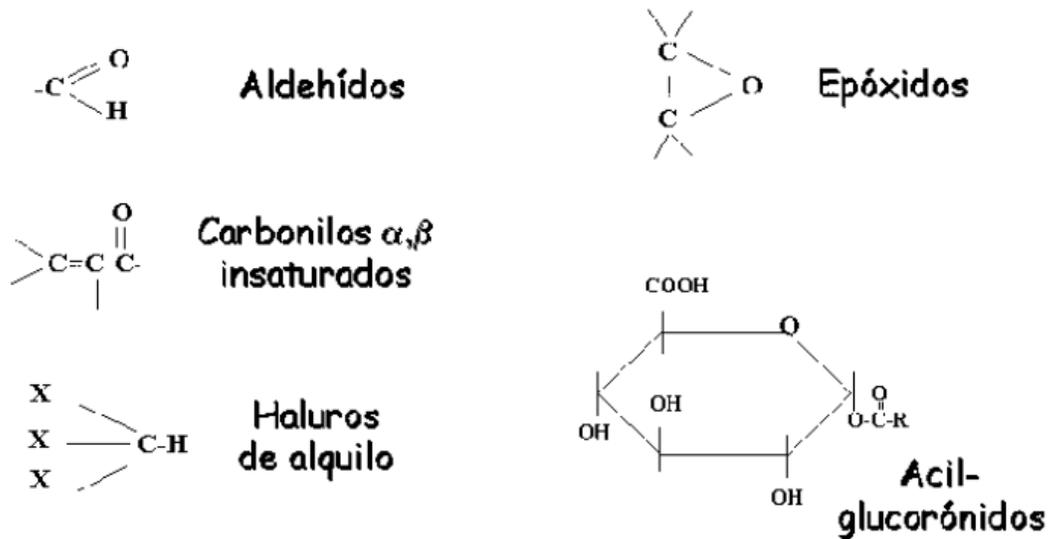


Figura 1. Grupos funcionales que reaccionan con algunas proteínas.

1.4 REACCIONES CON PROTEINAS

Cuando las proteínas reaccionan con los diferentes grupos funcionales se obtienen diferentes especies reactivas como aductos oxidativos, DPC's, o se

pueden producir especies reactivas de OH y Oxígeno. (Barker, 2005). En la figura 2 se muestran la resultante de la reacción:

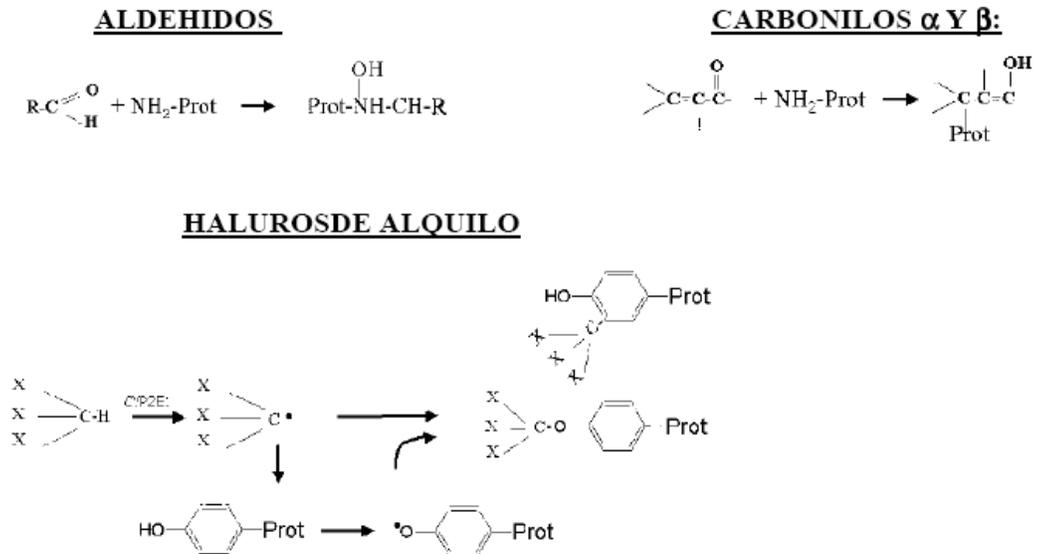


Figura 2. Reacciones entre proteínas y diferentes grupos funcionales.

En el siguiente esquema se muestran las rutas tentativas de la conversión de un carcinógeno en un aducto de DNA y las posibles consecuencias:

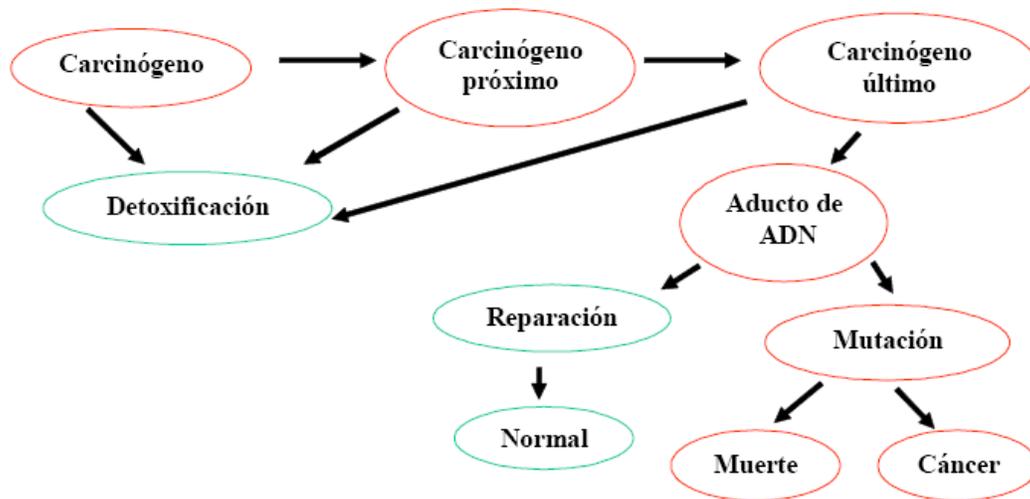


Figura 3 Esquema de rutas tentativas de un carcinógeno.

Existen 4 grandes clases de compuestos que ejercen sus efectos mediante la formación de aductos covalentes con bases del DNA (carcinógenos genotóxicos) los cuales son:

- a) hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)
- b) aminas aromáticas
- c) nitrosaminas
- d) otros agentes alquilantes.

Todos ellos tienen grupos electrofílicos o grupos que se pueden convertir en especies electrofílicas metabólicamente hablando, algunas de estas son: los epóxidos o las hidroxilaciones. Estos grupos forman enlaces covalentes con agentes nucleofílicos presentes en el DNA, lo que origina la acción cancerígena.

1.5 Aductos DNA-proteína

El DNA se asocia generalmente a diversas proteínas las cuales le ayudan a mantener su organización estructural y facilitan la conservación del material genético, cuantitativamente y cualitativamente hablando; como procesos importantes como lo son: la replicación, la reparación, la recombinación y la transcripción. Existen compuestos endógenos como los metabolitos de la lipoperoxidación que reaccionan tanto con el DNA, así como con proteínas produciendo muchas veces uniones covalentes entre las proteínas y el DNA. Los aductos DNA-proteínas representan un tipo de daño temprano al DNA incrementándose sobre todo por la exposición a diversos agentes como la luz UV, la radiación ionizante, β -propiolactona, aldehídos (especialmente el formaldehído y el malondialdehído), el arsenito de sodio, el nitrilotriacetato férrico, cromato, níquel y otros, además de algunos agentes quimioterapéuticos como el cis y trans platino y la neocarzinostatina.(Millar, 1991; López, 2004; Voitkun, 1999; Quievryn, 2000; Ramírez et al.,2000).

Estos daños reciben el nombre de DPC's (DNA-Protein crosslinks) los cuales son inducidos, cuando una proteína se une al DNA. Esta asociación se

induce después de la exposición de las células a una gran variedad de agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinógenos. Las proteínas se pueden entrecruzar con el DNA directamente a través de mecanismos que involucran radicales libres oxidativos o se pueden entrecruzar indirectamente a través de un enlace químico o por medio de la coordinación con un átomo metálico. Es posible que los diferentes tipos de entrecruzamiento DNA-proteína sean susceptibles a ser revertidos (por ejemplo: por hidrólisis) y por reparación catalizada por enzimas de acuerdo a las diferentes estructuras químicas y conformaciones físicas. (Barker, 2005).

1.6 Entrecruzamientos DNA-proteína inducidos por metales y sus efectos biológicos.

Los agentes inductores de DPC comúnmente encontrados en el ambiente y en los sitios de trabajo se encuentran un gran número de compuestos metálicos.

El análisis de los entrecruzamientos inducidos por iones metálicos demuestra que no todos los DPCs se unen de manera covalente y que un agente puede inducir más de un tipo de entrecruzamiento químico (Ramírez y colaboradores). Los aminoácidos comúnmente más involucrados en estos complejos son: la cisteína, histidina y ácido glutámico. Por ejemplo las reacciones de la cisteína o la histidina con el cromo trivalente o hexavalente ha demostrado que el Cr(VI) es reducido a Cr(III) y que el Cr(III) forma un complejo con un aminoácido antes de reaccionar con el DNA para formar el entrecruzamiento. Otro ejemplo es el que esta relacionado con los iones de

níquel; ya que tienen una alta afinidad por las proteínas especialmente por las que contienen residuos histidina, cisteína y de ácido aspártico. (Barker, 2005; Farmer, 2004).

En trabajos previos se demostró que el arsénico es un agente poderosamente inductor de DPC's en células hepáticas, los autores reportan una relación dosis efecto en esta capacidad. (Ramírez y cols. 2000). Dentro de las proteínas involucradas para formar los entrecruzamientos están las citoqueratinas que son de suma importancia.

Los DPC's formados por la exposición al arsénito de sodio tienen diferentes consecuencias biológicas como: alteraciones en la reparación, estrés oxidativo, aberraciones cromosómicas, modificación de la proliferación celular, alteración en la metilación del DNA y la expresión génica, transformación celular o cáncer.

Cabe destacar que no en todas las asociaciones de algunas proteínas con el DNA van a formar DPC's o entrecruzamientos; por ejemplo las histonas se unen al DNA para formar juntos la cromatina; por lo tanto esta unión es normal y favorece la replicación, reparación, recombinación y transcripción celular para un adecuado funcionamiento. (Minko y cols, 2002).

Se ha propuesto que cuando sucede un entrecruzamiento covalente o iónico de las proteínas al DNA, se interrumpen los procesos metabólicos del DNA como: la replicación, la reparación, la recombinación, la transcripción, la remodelación de la cromatina, etc. Se ha propuesto que los DPCs actúan como un aducto voluminoso que distorsiona la hélice y por lo tanto probablemente bloquea físicamente la replicación o complejo de transcripción

o se puede detener el acceso de las proteínas requeridas para la síntesis de la cadena temprana, para la transcripción o para reconocer el sitio a reparar. (Barker, 2005).

El arsénico está involucrado en la inducción de cáncer de piel, pulmón, vejiga e hígado. Es carcinogénico, pero también puede ser mutagénico. En algunos estudios se dice que el arsénico sólo induce daño al DNA en altas concentraciones; pero esto depende de que tan afín sean las proteínas (en este caso las citoqueratinas) al arsénico; ya que depende de la afinidad con la que se unan el DNA a las citoqueratinas; ya sea covalente o iónicamente, dependiendo de la naturaleza de la unión. (Hugues, 2005., Barrer, 2005).

El arsénico induce daño al DNA en concentraciones biológicamente relevantes, el daño más grande al DNA inducido por arsénico son los aductos oxidativos en el DNA y DPC's (**Figura 4**). En este caso se han propuesto muchas rutas para la inducción de Citotoxicidad por arsénico. El tratamiento con arsenito puede causar daño al DNA a través de la producción de HClO porque ésta es una activación de la NADH oxidasa y un incremento en la producción de superóxido después de la adición de NADH en las células musculares lisas humanas tratadas con arsenito. Esta ruta puede dañar al DNA porque la óxidasa es convertida a peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa y el peróxido de hidrógeno podría reaccionar con los iones cloruro o Hierro que forman el HClO o con los iones metálicos de transición para producir OH^\cdot . (Barker, 2005).

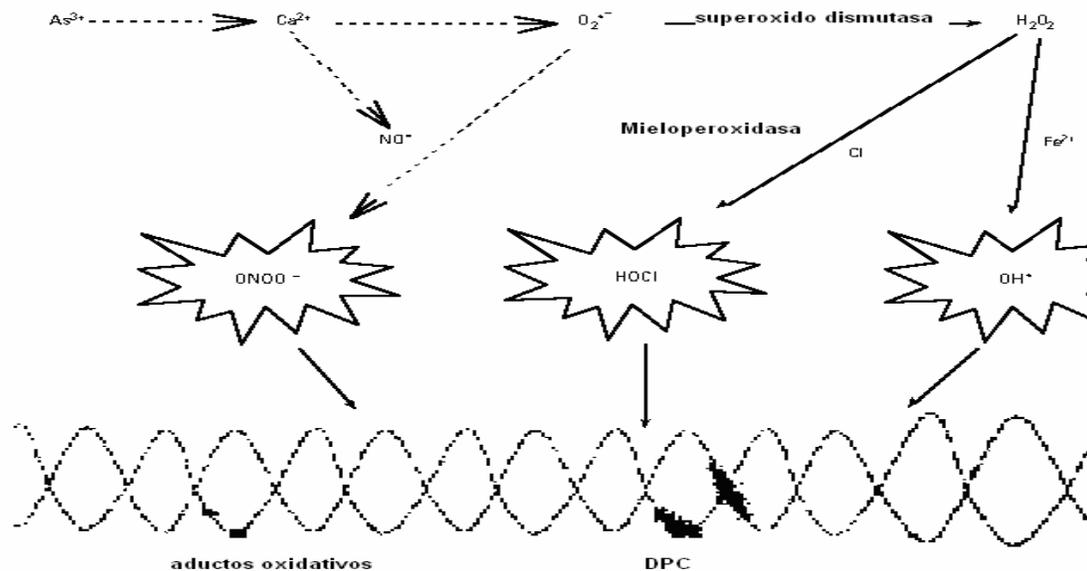


Figura. 4 Posible mecanismo de inducción de aductos oxidativos de DNA y entrecruzamientos DNA-proteína ocasionados por arsénico, las líneas indican las rutas bien establecidas. Las líneas quebradas indican las rutas tentativas. (www.ehp.niehs.nih.gov)

En algunos estudios se dice que estos daños (DPCs), pueden repararse enzimáticamente, pero esta reparación puede ser parcial, esto implica que existen alteraciones permanentes en el DNA con serias consecuencias para la replicación, transcripción y procesos de reparación. Sin embargo, la mayoría de los DPCs inducidos por agentes exógenos son removidos del genoma con el tiempo. Tanto los entrecruzamientos intercadenas como los DPCs presentan cambios en el ciclo de reparación del DNA debido a que son grandes y/o están involucradas uniones locales covalentes en ambas cadenas de DNA. (Barker, 2005; Mourón, 2005).

CAPITULO II

Proteínas involucradas en la formación de DPC's

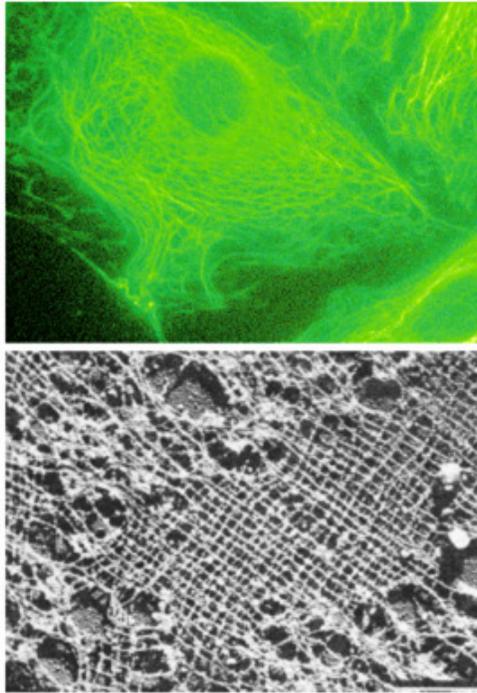
Existen tres filamentos proteicos de las redes del citoesqueleto que mantienen la estructura celular: los microfilamentos de actina (MFs), los microtúbulos de tubulina (MTs) y los filamentos intermedios (IF) las funciones de estos filamentos incluyen: división celular, motilidad, plasticidad, mantenimiento de la integridad mecánica, respuestas al estrés y transporte de vesículas (Ku, 1999). Los filamentos intermedios son las proteínas menos comprendidas de las 3 familias, son proteínas tejido-específicas asociadas con una extensa variedad de enfermedades humanas que reflejan su diversidad. El nombre de filamentos intermedios viene de su diámetro (10-12nm) a comparación de los diámetros de los microfilamentos de actina (25nm) y los microtúbulos de tubulina (7-10nm). Los IFs funcionan en cercana interacción con componentes asociados al citoesqueleto como proteínas motoras y proteínas de unión cruzada (Herrmann, 2000; Yoon, 2001).

2.1 Citoqueratinas

Una de las proteínas involucradas que es en este trabajo objeto de estudio, son las citoqueratinas, las cuales constituyen el componente principal del citoesqueleto de las células epiteliales, donde forman un gran grupo de filamentos intermedios cuyo diámetro oscila entre 8 y 10 nm. (Crewther y

cols, 1983; Steinert y cols.1988). En la especie humana forman una compleja familia codificada por, al menos, 20 genes diferentes, cuyo peso molecular varía entre 40 y 70 kDa y su punto isoeléctrico oscila entre 5.2 a 7.8. Las citoqueratinas corresponden a un grupo de 19 proteínas que se caracterizan por su estabilidad y su baja solubilidad en tampones fisiológicos. Mediante métodos electroforéticos e inmunológicos con anticuerpos monoclonales, se han clasificado en 2 subfamilias: la primera comprende proteínas básicas relativamente grandes (56 a 67 kDa), (Sawaf y cols, 1991), numeradas del 1 al 8; mientras que la segunda está constituida por proteínas más pequeñas, más ácidas y son numeradas del 9 al 19.

Los dos grupos de citoqueratinas se comportan como heteropolímeros obligados, es decir, que se requiere un miembro de cada grupo para la formación de un filamento de queratina, con excepción de la citoqueratina 19. Como consecuencia de esto, cada epitelio expresa por lo menos dos citoqueratinas diferentes. Por ejemplo, las queratinas 5 y 14 se encuentran juntas en todos los queratinocitos, la 1 y 10 están en los epitelios queratinizados, la 4 y 13 en epitelios estratificados no queratinizados y la 8 y 18 en epitelios simples. La queratina 19 aparece sola, en epitelios simples. (Fig. 5).



Filamentos Intermedios

Figura 5 Fotografía de microscopía electrónica de filamentos intermedios. (Ramírez y cols., 2000)

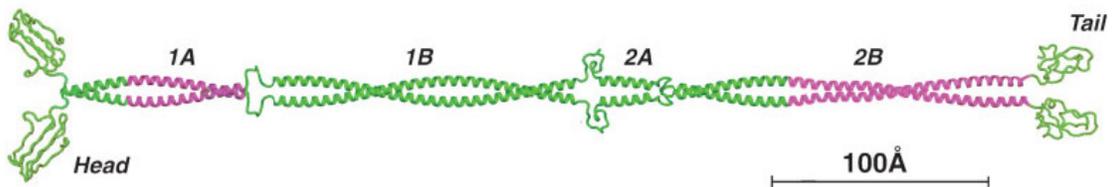
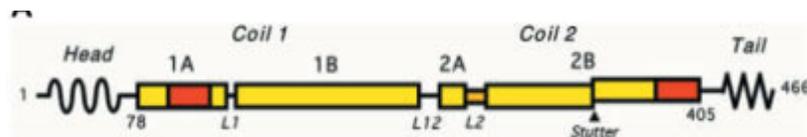


Figura. 6 Estructura general de las citoqueratinas. (Strelkov, 2003)

La mayoría de las proteínas IF se ensamblan en homodímeros, pero las queratinas son heterodímeros obligados formados por una cadena ácida (como la citoqueratina 18) y una cadena básica o neutra (como la citoqueratina 8). Los pasos de ensamblaje varían entre los diferentes tipos de IF y entre los diferentes IF. La asociación lateral de los dímeros se describe mediante tres formas de interacción, llamadas A_{11} , A_{22} y A_{12} (Figura No.5)

- La forma A_{11} corresponde a una asociación antiparalela, escalonada a la mitad, de dos dímeros con sus segmentos 1B alineados.
- La forma A_{22} corresponde a una asociación parecida a la anterior, pero los segmentos alineados en este caso, son los segmentos 2B
- La forma A_{12} se ha establecido como una asociación antiparalela solamente

Se ha encontrado en la mayoría de los IF maduros un solapamiento entre las partes amino y carboxilo terminal de los dímeros alineados longitudinalmente, denotado como la forma A_{CN} (Herrmann, 1998a; Geisler, 1992; Steinert, 1993).

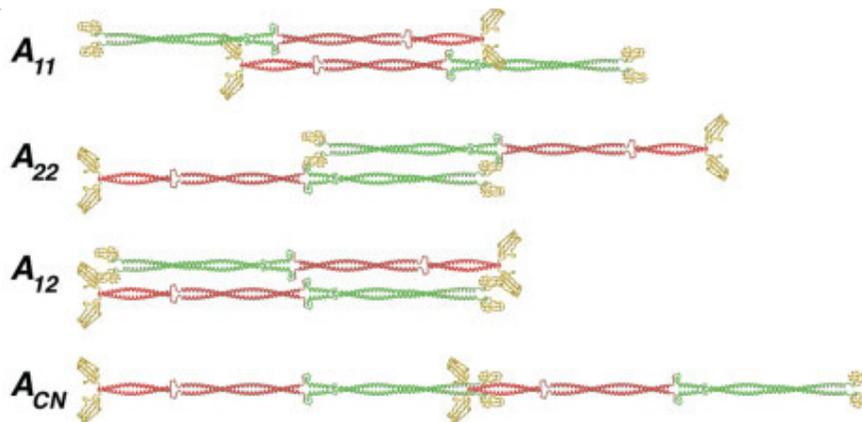


Figura 7 Formas de interacción entre dímeros de citoqueratinas. (Strelkov, 2003)

La formación de tetrámeros es el primer paso de ensamblaje más allá de los dímeros, los tetrámeros son los oligómeros solubles más pequeños detectables in vivo. Los tetrámeros se convierten en unas estructuras llamadas filamentos de longitud única (ULFs), resultado de una asociación lateral de dímeros (Hermann y cols., 1998a). Una vez formados, los ULFs comienzan a alinearse longitudinalmente en filamentos de gran extensión. Posteriormente, los filamentos sufren algún rearrreglo interno de sus subunidades llevándolas a una compactación radial (Herrmann y cols., 1998). Una formación lineal de tetrámeros dentro de un IF maduro corresponde a un protofilamento, es decir, una estructura que contiene dos dímeros por sección transversal.

El empaquetamiento de dímeros individuales dentro de un filamento maduro es muy denso, por lo que podría esperarse que las barras superenrolladas realicen amplias interacciones dentro de la región de traslape de los 3 tipos de interacción de dímeros (A_{11} , A_{22} y A_{12}). Se ha establecido la hipótesis de que dos superenrollamientos hacia la izquierda, orientados al contrario están sucesivamente entrelazadas una con otra en una “superhélice” enrollada hacia la izquierda. (Strelkov, 2003).

La inclinación de esta superhélice es muy cercana a la inclinación del superenrollamiento. Las interacciones intermoleculares dentro del tetrámero pueden presentarse de dos formas como se observa en la Figura 5: por un lado, es factible que los núcleos hidrofóbicos de los dímeros se encuentren preservados, mientras que las interacciones entre los dímeros estén mediadas

por los grupos polares localizados principalmente en el “exterior” del superenrollamiento. La otra opción posible es que la asociación de los dímeros podría resultar, al menos en algunas regiones, en la formación de un superenrollamiento de cuatro hebras antiparalelas, esta opción requeriría rearrreglos significativos dentro de las estructuras de los dímeros, creando un núcleo hidrofóbico (Strelkov, 2003).

2.2 Funciones de las citoqueratinas

Las funciones de las citoqueratinas se dividen en dos categorías: mecánicas y no mecánicas; ya que un órgano interno el mecanismo natural de estres que sufren los hepatocitos es un cambio hemodinámico que ocurre en asociación con daño hepático. La estabilidad mecánica es realizada por la citoqueratinas y esta probablemente relacionado con interacciones con desmosomas y hemidesmosomas, otros elementos del citoesqueleto. La importancia de las citoqueratinas reside en la ayuda que prestan a las células con stress o formas no mecánicas de stress y es evidenciado por numerosos modelos de daño hepático. El mecanismo de citoprotección que es realizado por las citoqueratinas del hepatocito permanece sin ser definido pero la fosforilación de las citoqueratinas específicas probablemente sea un contribuidor importante. Otras funciones de las citoqueratinas en el hígado incluyen la protección contra apoptosis, su regulación de proteínas asociadas a citoqueratinas y un posible rol en proteínas blanco específicas de comportamientos subcelulares. (Omary, 2002)



Figura 8 Funciones de las citoqueratinas (Omary, 2002)

2.3 Citoqueratina 18

La citoqueratina 18 se encuentra; tanto en hepatocitos adultos, como en hepatocitos embrionarios, también se encuentra en células vástago. Esta citoqueratina detecta y degrada productos del cáncer de seno, también esta relacionada con algunas enfermedades del hígado como cirrosis biliar primaria, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis idiopática, hepatitis alcohólica y carcinoma en el humano (**Figura 9**). Las citoqueratinas participan en varias funciones como en la división celular, motilidad, mantenimiento de la integridad celular mecánica, respuesta ante el estrés oxidativo en el hígado. (Omary, 1998; Stumptner, 2000).

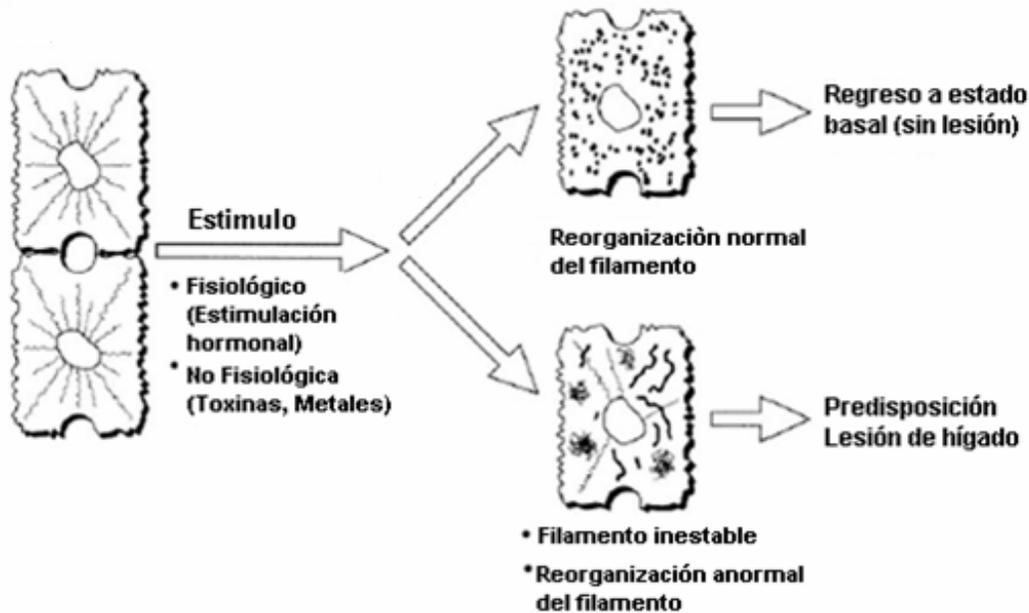


Figura 9 Filamentos expuestos a diversas agresiones, arriba una célula con filamentos normales (sin lesión), abajo célula con filamentos inestables, desorganizados (Con lesión). (Omary, 2002).

En estudios recientes, tanto *in vivo*, como *in Vitro* presumen que el incremento de citoqueratina CK18 puede ser considerada como un indicador temprano de toxicidad en el hígado por exposición al arsénico, también se considerada que su posible expresión puede ser tomado como biomarcador temprano de estrés oxidativo; así como daño inducido por arsénico. El arsénico incrementa la síntesis de CK18 y altera su distribución y estructura. (Ramírez y cols., 2000).

2.4 HISTONAS

Otras proteínas involucradas para la formación de aductos DNA-proteína son las histonas estas proteínas son responsables del empaquetamiento del ADN. Forman la cromatina junto con el ADN, sobre la base de unas unidades

conocidas como nucleosomas. Existen 5 clases principales de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4, todas ellas contienen una gran cantidad de residuos cargados positivamente (Arg y Lys). Las histonas, se unen iónicamente a los grupos fosfato del ADN cargados negativamente. Las cuatro histonas nucleares, forman un octámero (paquetes de 8 moléculas) alrededor del cual se enrolla el ADN (**Figura 10**), en una longitud variable en función del organismo. Este octámero se ensambla a partir de un tetrámero de las histonas llamadas H3 y H4, al que se agregan dos heterodímeros de las histonas denominadas H2A y H2B. Las histonas externas, H1 interaccionan con el ADN internucleosomal. El conjunto del ADN enrollado alrededor del octámero de histonas, junto con la histona H1 y una cierta longitud de ADN internucleosomal constituye lo que se conoce como nucleosoma. Las histonas nucleares desarrollan un papel decisivo en el primer nivel de compactación del ADN dentro del núcleo, en la estructura conocida como nucleosoma. Las histonas externas, por otro lado, producen un empaquetamiento de orden superior de los nucleosomas. (Murray, Granner, Mayes, }rodwell, Bioquímica de Harper, Editorial Manual Moderno, 15ª Edición, pp., 844 y 845).

Las histonas son objeto de modificaciones postraduccionales como metilaciones, acetilaciones y fosforilaciones en residuo específicos (Arg, His, Lys, Ser y Thr). La mayoría son revertidos al alterarse la carga de la proteína, lo que se refleja en su unión con el DNA. Aunque están conservadas evolutivamente, las modificaciones son diferentes dependiendo el tejido o el estado del ciclo celular. Por ejemplo, el 10% de la H2A tiene unido en el grupo ϵ de la Lys 119 en el carboxilo terminal a la proteína ubiquitina. En

general, esta señal en el citoplasma resulta en la degradación de la proteína. (Murria y cols 2001).

Existen estudios a cerca de la estimación de la constante de afinidad de estas proteínas, Fraga y colaboradores indican que la constante de afinidad de las histonas (H4 y H2B) al DNA son $1.09 \mu\text{M}$ y $2.43 \mu\text{M}$, respectivamente; por lo tanto aseveran que la histona H4 es mas afín al DNA que la histona H2B esto indica la relevancia fisiológica en la diferencia de la afinidad entre estas dos histonas; ya que para facilitar la transcripción los tetrameros H3-H4 permanecen unidos al DNA después de la liberación de los dimeros H2A-H2B.

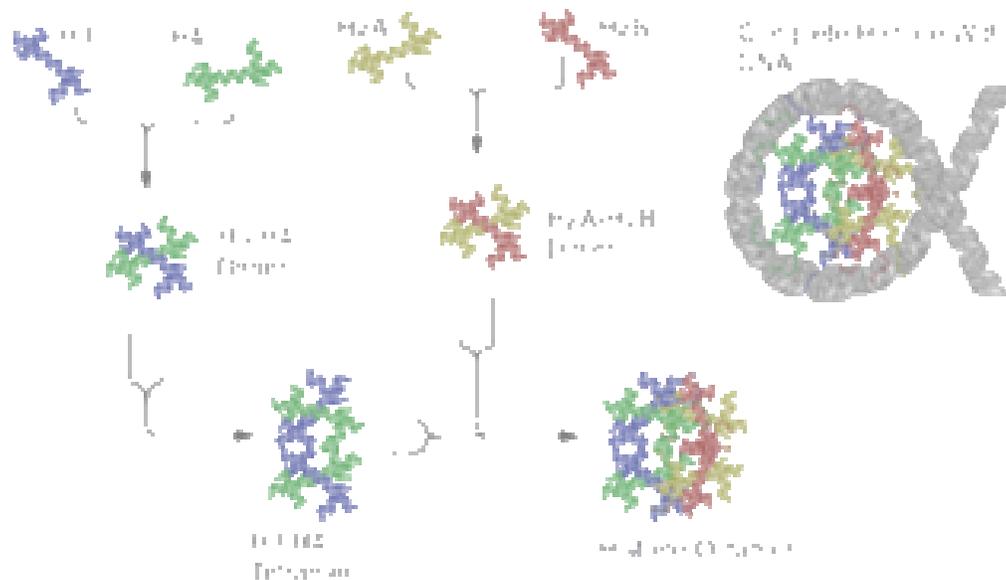


Figura 10 Ensamblaje de las histonas nucleares en el nucleosoma. (http://es.wikipedia.org/wiki/Imagen:Nucleosome_structure.png).

CAPITULO III

ELECTROFORESIS CAPILAR

3.1 Generalidades

El término electroforesis se utiliza para describir la separación que se basa en la diferencia entre la movilidad o velocidad de migración de partículas cargadas debido a la acción de un campo eléctrico; la migración de una partícula cargada a través de un medio de dispersión se da, bajo la influencia de un campo eléctrico. Los métodos electroforéticos son usados, fundamentalmente con fines analíticos donde son considerados los de mayor sensibilidad y poder de resolución. (Skoog, 2001).

La técnica de electroforesis SDS-PAGE ha sido y continúa siendo de gran utilidad; sin embargo este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa y difícil de automatizar, y además no proporciona resultados cuantitativos precisos. La investigación y la aplicación de la electroforesis llevada a cabo en capilares han tenido un visible crecimiento en los últimos años. La denominada electroforesis capilar da lugar a separaciones con volúmenes de muestra pequeños (de 0,1 a 10 nL), en contraste con la electroforesis clásica, en la cual se emplean volúmenes de muestra del orden de los ml o μ l, en contraste con una elevada resolución y rapidez que tiene la electroforesis capilar. Además, las especies separadas eluyen de uno de los extremos del capilar, pudiendo utilizarse detectores cuantitativos como los empleados en

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), en lugar de las técnicas de coloración de la técnica electroforética SDS-PAGE. (Skoog, 2001).

En las siguientes figuras 11 y 12 se muestran esquemas de los componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar, en donde se observa las partes más importantes, como el capilar en donde se lleva a cabo la separación de los analitos.

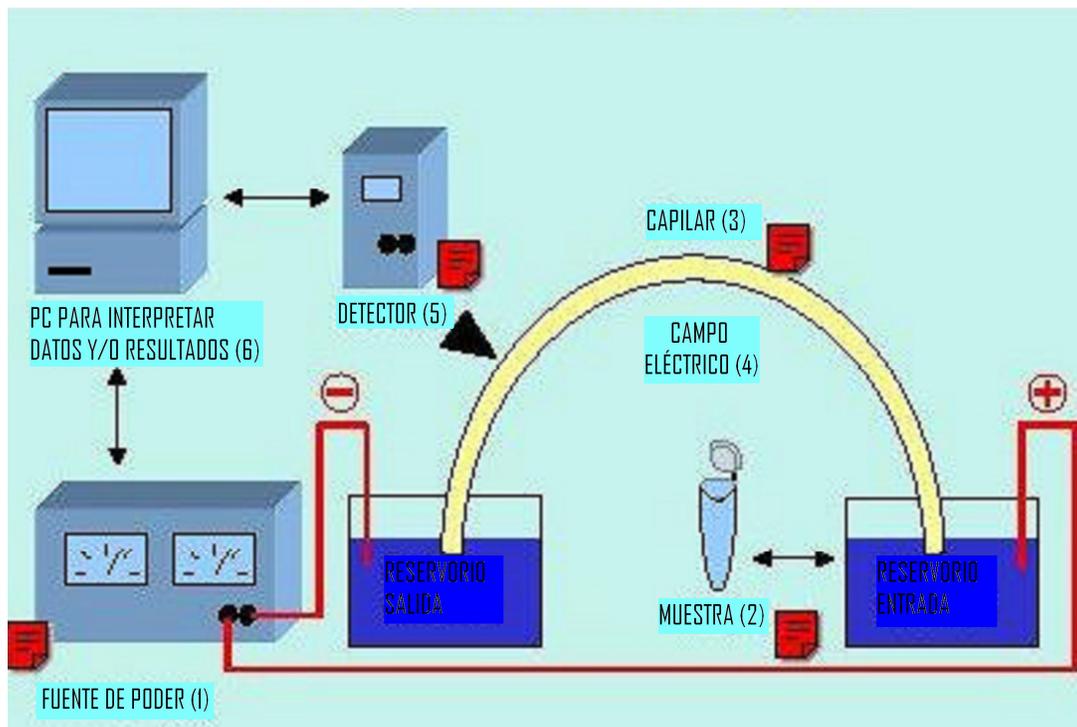


Figura 11 Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar. Se muestra la fuente de poder (1), reservorio de muestra (2), capilar (3), campo eléctrico (4), detector (5), Computadora para interpretación de los datos obtenidos (6). http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

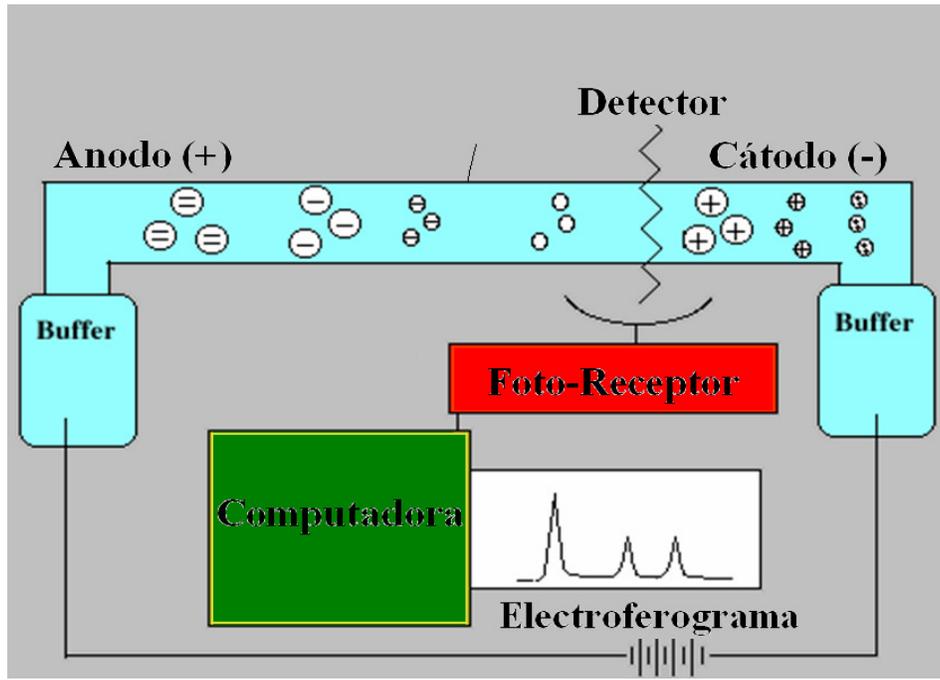


Figura 12 Capilar con reservorios de buffer en donde se muestra el ánodo (+) y el cátodo (-), en donde se observa el detector y posteriormente su interpretación por medio de una computadora, electroferograma.
<http://www.qb.fcen.uba.ar/quimicabiologica/cEtaira.ppt>.

3.2 FUNDAMENTOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La velocidad de un ion sometido a la acción de un campo eléctrico viene dada por la expresión: $V = \mu_{ep} E$.

Donde μ_{ep} es la movilidad electroforética del ión, y E es el campo eléctrico aplicado. μ_{ep} depende a su vez de la carga del ión (q), de su radio R y de la viscosidad de la solución (η), según la expresión:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

La velocidad con la que viaja un determinado ión es mayor cuando mayor es su carga y menor es su radio. Si la sustancia está presente en solución en diferentes formas en equilibrio dinámico (por ejemplo, debido a un equilibrio ácido-base), la movilidad electroforética es una combinación de las movilidades de las i posibles especies en equilibrio ponderada por la fricción molar de cada i especie (α_i).

$$\mu_{ep} = \sum_{i=0}^n \alpha_i \mu_i$$

No obstante la movilidad electroforética real no coincide con lo mencionado anteriormente en la ecuación 2, debido a la existencia del flujo electroosmótico (EOF). El EOF es el flujo de líquido en el interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de capilares de sílice fundida esta superficie de carga es generada por la ionización de los grupos silanol. (Skoog, 2001).

MECANISMOS DE SEPARACION

Estos mecanismos se dividen en 2, estos son:

- Fenómenos de Electromigración
- Fenómenos de Electroósmosis.

3.3 ELECTROMIGRACION

Se refieren a que dependiendo de cual sea la carga de las partículas a separar, estas migraran al ánodo o al cátodo según sea su carga neta; ya que debido al arreglo del equipo, en fase normal el ánodo (+) es donde se introduce la muestra y el cátodo (-) está colocado después del detector, entonces, las partículas cargadas positivamente migraran primero al cátodo por atracción. Este fenómeno nos da una movilidad electroforética efectiva llamada μ_e . (Skoog, 2001).

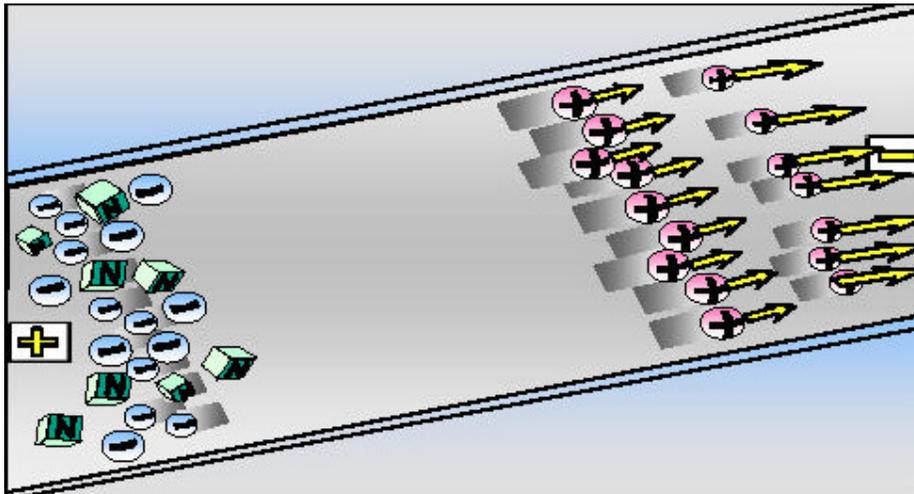


Figura 13 La migración de las cargas se da con respecto a la naturaleza de las mismas hacia el polo respectivo, a este fenómeno se le conoce como: Electromigración (μ_e). http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

3.4 ELECTROOSMOSIS

Este fenómeno es muy común en el interior de los capilares; ya que estos están rellenos de sílice fundida, los grupos silanol pueden cargarse (Figura 14) a valores de pH mayores a 6.

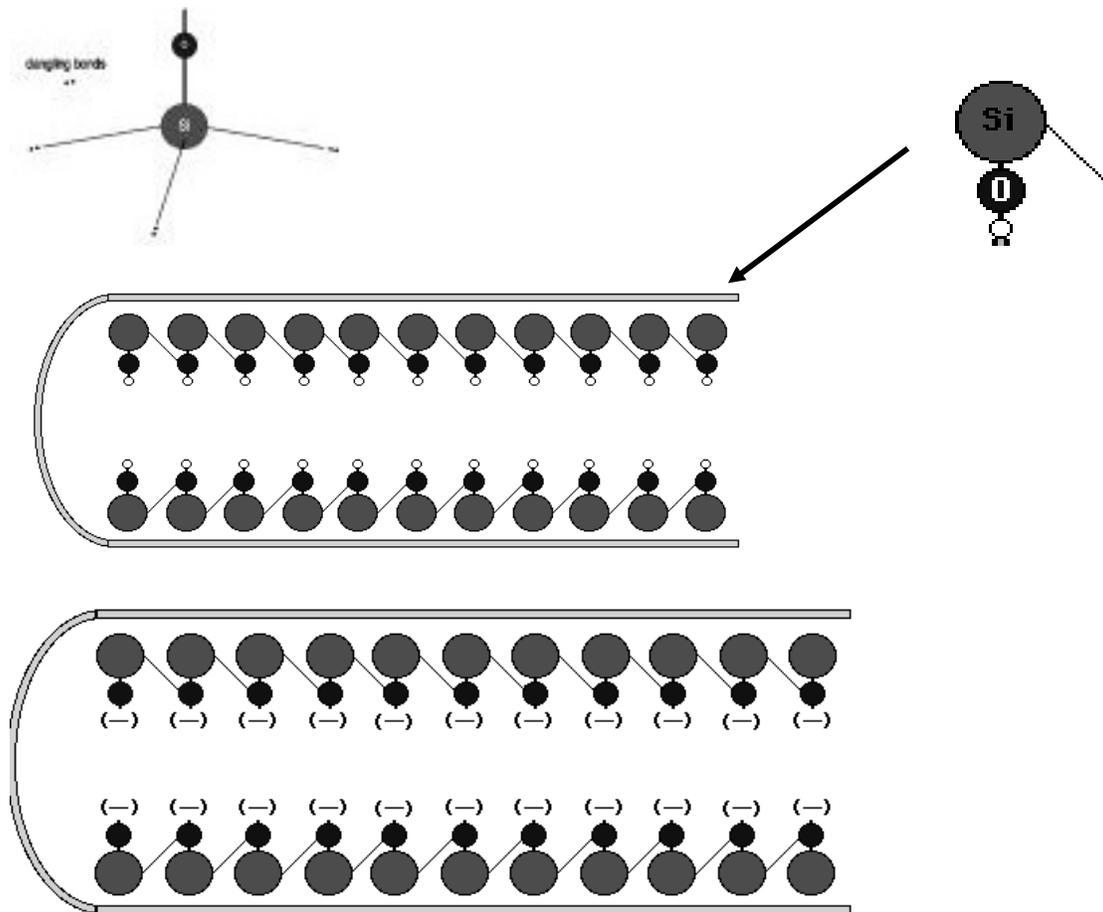


Figura 14 Molécula de silanol cargada negativamente dentro del capilar.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

De acuerdo a la Figura 14 la carga de la molécula silanol provoca que

exista un flujo negativo, este al entrar en contacto con el buffer de separación tienden a tener una doble capa cargada positivamente como lo indica la Figura 15. (Skoog, 2001).

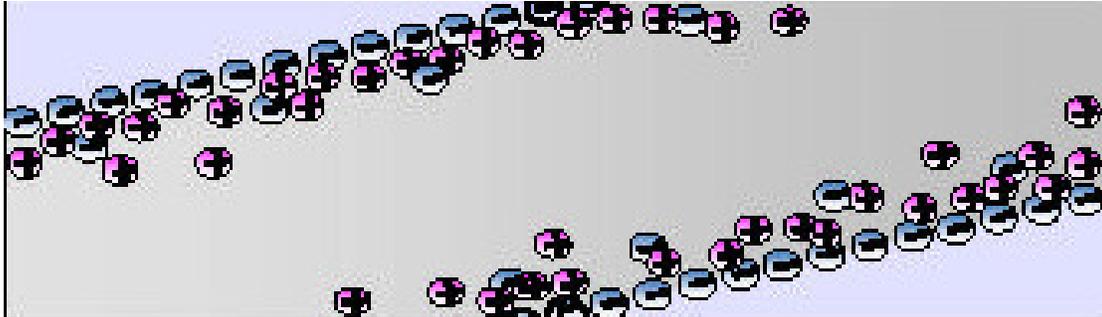


Figura 15 Interior de un capilar en donde se muestra la doble capa cargada positiva y negativamente, este crea un flujo electroosmótico que arrastra a cualquier partícula cargada (+/-) o no (partículas neutras). http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Análisis/EC-2005-2006.pdf.

La carga en la superficie interna del capilar atrae hacia los iones positivos que forman una capa adyacente fija por adsorción (Capa Stern), y una capa difusa y móvil, también positiva (capa de Gouy-Chapman). Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, estos iones, al estar solvatados, generan un movimiento del fluido hacia el cátodo. Este movimiento del fluido constituye el EOF. (Skoog, 2001).

Al aplicar campo eléctrico el resto de las cargas (+) se mueven hacia el polo (-) y con este se genera un flujo del buffer que arrastra todo lo que hay en el interior del capilar, este es el fenómeno electroosmótico, como lo muestra la Figura 16. A este fenómeno se le conoce como flujo electroosmótico el cual se relaciona con la movilidad electroosmótica representada como μ_{eo} .

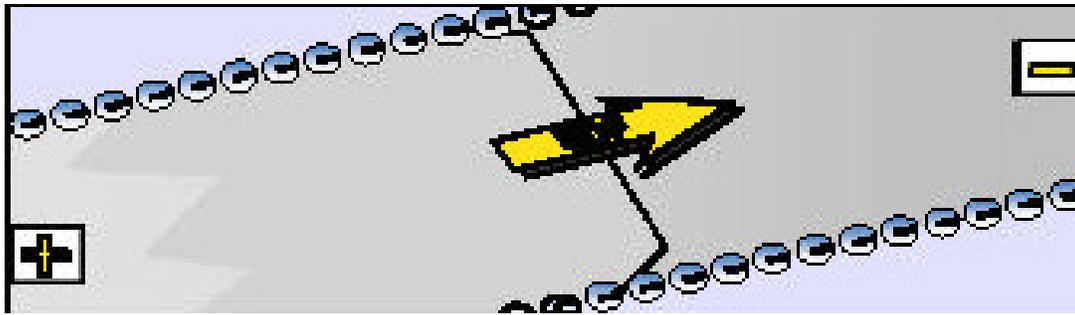


Figura 16 Salida de cualquier particular influenciada por el flujo electroosmótico (μ_{eo}). http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

Los dos fenómenos anteriores nos dan una movilidad aparente de las partículas en el capilar, esto se representa por: $\mu_a = \mu_{eo} \pm \mu_e$, como se representa en la Figura 16.

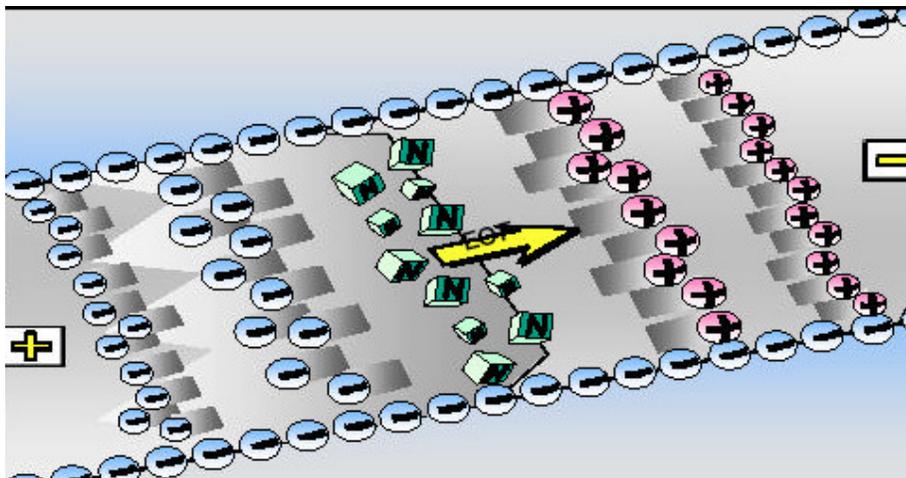


Figura 17 Representación de la movilidad aparente; fenómeno de Electromigración y fenómeno de electroósmosis estos dos integran el fenómeno de electrocinética. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

En las figuras anteriores se muestra la existencia de flujo electroosmótico, pero también hay condiciones de ausencia de éste. Esto pasa cuando el capilar

tiene desactivados los grupos silanol (Figura No.14), o bien, que los grupos silanol están unidos covalentemente a ciertos grupos, como es el alcohol polivinilico, por lo que el flujo electroosmótico es casi cero. En la figura 18 se muestra el interior de un capilar neutro. En este trabajo se utilizó este tipo de capilar porque hace más sencillo el trabajo; ya que al no haber carga en las paredes del capilar, no se presenta adsorción de las proteínas a las paredes del capilar. (Skoog, 2001).

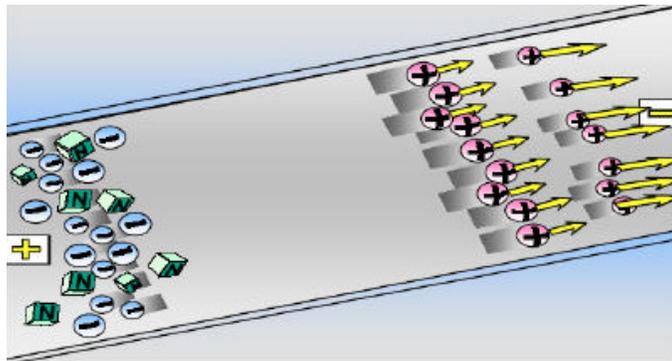


Figura 18 Representación del interior de un capilar neutro; en donde el EOF es casi cero.
http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.

El perfil del Flujo electroosmótico es plano como consecuencia de que la doble capa es muy delgada y la fuerza conductora está uniformemente distribuida a lo largo de todo el capilar. El ensanchamiento de banda es debido a la transferencia de masa es mínimo lo que permite obtener altas resoluciones en la separación. En los sistemas conducidos por presión (HPLC), el perfil es parabólico, dando lugar a picos más anchos, como se muestra en la figura 18.

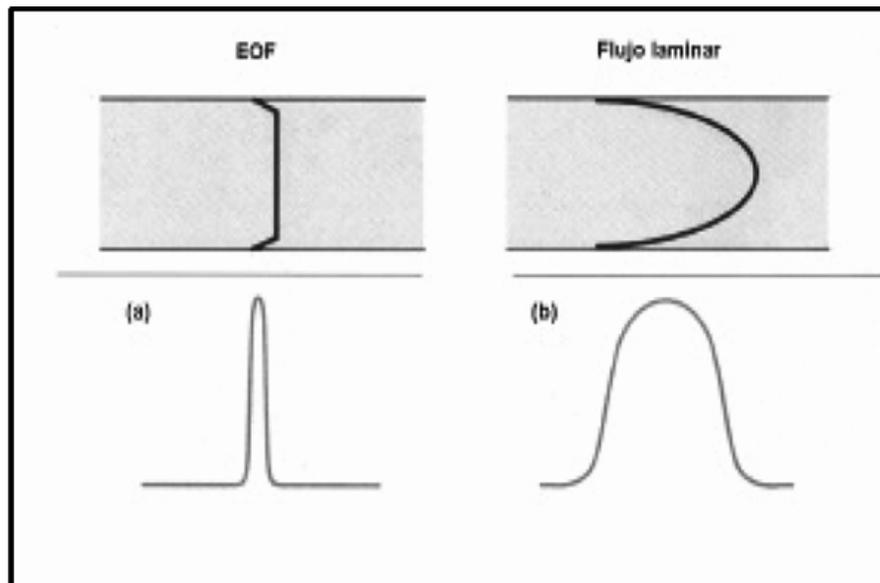


Figura 19 Comparación gráfica de la resolución entre (a) EC y (b) HPLC, basándose en la separación eléctrica y de presión.

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf

3.5 CAPILARES

Los capilares deben disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV-VIS, ya que facilitan la detección, deben de ser flexibles, robustos y económicos. Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones y por ello son los más ampliamente utilizados. Para aumentar su flexibilidad y resistencia son recubiertos de una capa eterna de poliamida. Una pequeña sección del capilar es cilíndrica y sus dimensiones oscilan entre 50 y 100 cm. de longitud y entre 10 y 200 μm de diámetro interno. Algunos capilares se derivatizan, funcionalizando las paredes internas con polímeros como el polivinilalcohol (PVA). Este recubrimiento reduce la adsorción de compuestos catiónicos (Figura 18). El

análisis de aminos o proteínas en este tipo de capilares esta libre de las colas de pico que aparecen en los capilares sin tratar químicamente. Además se suprime el EOF con lo que se mejora la reproducibilidad de los tiempos de migración. No obstante, hay que tomar en cuenta que no se puede utilizar el rango de pH útil como los capilares convencionales, se tiene que checar las condiciones de uso. También se utiliza el teflón y el vidrio. (Skoog, 2001).

3.6 TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR

- ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA
- ISOTACOFORESIS
- ISOELECTROENFOQUE
- ELECTROFORESIS CAPILAR EN GELES O REDES POLIMÉRICAS
- CROMATOGRAFIA ELECTROKINÉTICA MICELAR
- ELECTROFORESIS CAPILAR DE AFINIDAD

El tipo de electroforesis que se utiliza en este trabajo es el de electroforesis capilar de afinidad, para comprender mejor se hablara a continuación de la electroforesis de proteínas.

CAPITULO IV

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

4.1 GENERALIDADES

La gran mayoría de las macromoléculas presentan carga eléctrica. Las proteínas pueden ser consideradas como polianfolitos débiles. Las cargas derivan de los aminoácidos con grupos laterales ionizables. Estos son: los residuos básicos de asparagina, lisina e histidina y los residuos ácidos del ácido glutámico y aspártico. Las cadenas laterales de tirosina también contribuyen a la carga total de la proteína. Debido a que estos grupos presentan diferentes grados de ionización la carga neta de las proteínas es muy dependiente del pH del medio. (Kyte J., 2007).

Al someter moléculas cargadas en un campo eléctrico, producido por el paso de corriente eléctrica a través de una solución, estas se desplazan. Este fenómeno se conoce como electroforesis. La velocidad de migración depende de la carga, tamaño y forma de las partículas. Esto permite separar componentes de una mezcla compleja, siempre y cuando, presenten velocidades de migración lo suficientemente diferentes. La separación de macromoléculas ocurre en soluciones acuosas que además, de la macromolécula, los iones constituyentes del buffer y sales. En este caso, no se estudia la macromolécula sola sino en presencia de otras especies cargadas que influenciaran el campo local además de interaccionar con la macromolécula generando una capa de contraiones y dificultando su análisis. En consecuencia, la movilidad electroforética, para el caso de una partícula

cargada, en solución diluida en un solvente no conductor, es solo una aproximación al comportamiento de una macromolécula en condiciones reales. (Kyte J., 2007).

Existen diversos tipos de electroforesis, las cuales son: no desnaturizante o nativa, desnaturizante, el isoelectroenfoque (se fraccionan compuestos anfóteros de acuerdo a su punto isoeléctrico PI a lo largo de un pH continuo), bidimensional y capilar (utilizada en este trabajo); comúnmente se utiliza la electroforesis desnaturizante. En la Tabla No.1 se describen los parámetros que se varían para optimizar una separación electroforética. (Kyte J., 2007).

El parámetro que caracteriza esta técnica es la movilidad electroforética (U) que define el comportamiento de una molécula en un campo eléctrico.

$$V = \frac{E \times Z}{6\pi r \eta}$$

donde:

E : Fuerza del campo eléctrico

Z : Carga de la partícula

r : Radio de la partícula

η : Viscosidad

V : Velocidad de migración

Cuando la fuerza del campo eléctrico es unitaria (E=1 V/cm) V = U, entonces:

$$U = \frac{Z}{6\pi r \eta}$$

La movilidad depende entonces de la relación carga/masa:

- A mayor carga mayor movilidad.
- A menor masa mayor movilidad.

Por tanto la velocidad de migración es directamente proporcional a la fuerza del campo eléctrico y la movilidad electroforética.

$$V \text{ (cm/h)} = E \text{ (V/cm}^2\text{)} \times U \text{ (cm /Vh)}$$

Ventajas prácticas de la electroforesis

- Relativamente simple y equipamiento barato.
- Alta resolución.
- Análisis de muestras múltiples.
- Alta sensibilidad.
- Fácil detección específica.

Tabla 1 Parámetros que se varían para optimizar una separación electroforética.

DEPENDIENTES DEL CAMPO ELECTRICO	DEPENDIENTES DE LA MUESTRA
<p>VOLTAJE:</p> <p>El gradiente de potencial es V/d si la separación de los electrodos es d (cm) y la diferencia de potencial entre ellos es V (volts). La fuerza sobre un ión que tiene una carga q es por tanto Vq/d y por tanto la velocidad de migración es proporcional a Vq/d. Un aumento en el gradiente de potencial aumenta proporcionalmente la velocidad de migración.</p>	<p>CARGA:</p> <p>La velocidad de migración aumenta al aumentar la carga neta. La magnitud de la carga es en general dependiente del pH y por tanto dependiente del sistema de buffers utilizado.</p>
<p>CORRIENTE:</p> <p>Cuando se aplica una diferencia de potencial entre electrodos, se genera una corriente. La magnitud de esta corriente esta determinada por la resistencia del medio y es proporcional al voltaje. La corriente es conducida en la solución entre los electrodos, principalmente por los iones del buffer y en una pequeña proporción por los iones de la muestra. El aumento del voltaje aumentara la carga total / segundo que converge al electrodo. La distancia migrada por los iones será proporcional a la corriente aplicada y al tiempo.</p>	<p>DEPENDIENTES DEL SOPORTE</p> <p>TAMIZ MOLECULAR:</p> <p>Este efecto se presenta en geles de almidón, azarosa y poliacrilamida. El movimiento de las moléculas es frenado al tener que pasar a través de los poros. Dependiendo del radio de las proteínas a separar se debe seleccionar el tipo de gel y tamaño de poro adecuado para que exista un efecto tamiz del soporte.</p>

4.2 Factores que influyen en la electroforesis

En general existen 4 factores que influyen en la electroforesis. Ellos son:

- Muestra
- Soporte
- Tampón o Buffer
- Campo eléctrico

La movilidad electroforética no solo está influenciada por factores internos como la carga y el tamaño de la molécula, sino también por un número de factores externos que son:

- pH y fuerza iónica del buffer.
- Campo eléctrico.
- Características del soporte.
- Temperatura.

Como la mayoría de las grandes biomoléculas presentan grupos aniónicos y catiónicos como parte de su estructura, la carga neta dependerá del pH del medio. Por otra parte la fuerza iónica reduce la carga neta de los grupos con cargas efectivas. Se ha encontrado que a baja fuerza iónica, se eleva la velocidad de migración y es mayor la difusión, de manera que la zona de separación es más ancha y mayor la resolución.

La velocidad de migración es una función del voltaje aplicado. A mayor voltaje mayor es la velocidad de migración, lo que genera un excesivo calor que

puede traer como consecuencia la evaporación del buffer y esto puede crear deformaciones de la zona de migración debido a cambios locales en la fuerza iónica del medio. Incluso puede ocurrir destrucción total del soporte empleado así como la desnaturalización de la proteína. Por el contrario bajos voltajes evitaría cualquier problema de evaporación pero podría ocurrir una pobre separación y tiempos de corridas muy prolongados. Por ello se recomienda usar fuentes de poder regulables y cámaras electroforéticas con sistema de enfriamiento acoplado.

Las características del soporte también pueden afectar la movilidad. Los soportes se clasifican en dos clases:

- a) Soportes no restrictivos
- b) Soportes restrictivos

En ambos casos se trata de un material poroso (entramado) con características hidrofílicas y un tamaño de poro que permita la entrada del tampón. Este soporte debe estar embebido en el tampón.

En los soportes no restrictivos el tamaño de poro es mucho mayor que el tamaño de la partícula, por tanto no hay restricción y la fuerza del campo eléctrico, solo depende de la relación carga/masa. Entre ellos tenemos la agarosa, agar, almidón y papel.

En los soportes restrictivos el tamaño de poro está en el mismo rango o muy cercano al de las partículas que se van a separar, o sea que U depende de la carga y de la masa. (Kyte J., 2007).

Incrementos en la temperatura, como ya fue mencionado, puede traer aparejado evaporación del buffer y con ello destrucción del gel y desnaturalización de la proteína.

En general los métodos electroforéticos son valiosos para la separación de macromoléculas lábiles como las proteínas, ya que se llevan a cabo en medios acuosos, bajo condiciones suaves de pH, fuerza iónica y generalmente a bajas temperaturas.

CAPITULO V

ELECTROFORESIS CAPILAR DE AFINIDAD

5.1 GENERALIDADES

La electroforésis capilar de afinidad ACE (Affinity Capillary Electrophoresis, por sus siglas en inglés) es una técnica reciente, que en los últimos años ha sido empleada como una herramienta útil y eficiente para el estudio de la caracterización de biomoléculas y para el análisis de interacciones específicas con biomoléculas con afinidad a ciertos receptores y otras biomoléculas, como determinación de constantes de afinidad y

constantes de disociación de complejos formados con biomoléculas, tales como: proteínas, carbohidratos, péptidos, DNA, etc.; así como también de algunos aductos como DNA-proteína, Proteína-proteína, Proteína –fármaco, DNA-fármaco. También es una técnica que se refiere a la separación de compuestos que participan en las interacciones de afinidad. Existen tres modos en ACE:

1. La mezcla del receptor-ligando puede realizarse fuera del capilar. En donde la reacción de unión es independiente del capilar.
2. El buffer de corrida puede contener cualquier de los dos; ya sea al receptor o al ligando.
3. El receptor o el ligando puede ser inmovilizado dentro del capilar.

ACE es una técnica que utiliza cambios en las movilidades electroforéticas del receptor en asociación con el ligando para medir las constantes de afinidad. ACE es especialmente utilizada en estudios o análisis de interacciones entre proteínas y DNA porque se requiere pequeñas cantidades de proteína y provee información termodinámica y cinética a cerca de los complejos bajo condiciones fisiológicas. ACE mide cambios en la movilidad electrtoforética de una proteína soluble en función de la concentración de un ligando cargado y soluble en el buffer o fuera de este. (Gao y cols, 1998)

5.2 ESTUDIO RECEPTOR-LIGANDO

La unión de un ligando (proteína, péptido, etc.), a un receptor (típicamente a otra proteína, DNA, péptido) se muestra en la figura No.17.

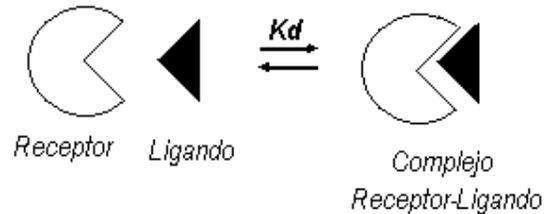


Figura No. 20 Representación gráfica de la unión de un ligando a su receptor. Chu y cols., (1992)

El complejo proteína-ligando tiene características diferentes de relación carga-masa que la proteína no unida, lo cual permite su separación por electroforesis capilar. Chu y cols., 1992., comenta que el tiempo de migración esta en función de la concentración del ligando; por lo tanto se puede medir el equilibrio de constante de afinidad (K_d).

ACE tiene muchas ventajas como:

- Alta resolución.
- Fácil automatización.
- Los capilares son baratos.
- Se puede utilizar estándares internos para medir el flujo electroosmótico (EOF) haciendo muy reproducible la medición de movilidades.
- Solo se necesitan pequeñas cantidades de proteína y ligandos.
- Las movilidades se pueden medir aún con muestras impuras.

- Se puede utilizar muchos tipos de buffers.
- Los buffers pueden simular condiciones fisiológicas relevantes.
- La separación se puede basar en carga o masa.
- Tiene tiempos cortos de corrida y es preciso en la cuantificación.

Como todas las técnicas tiene desventajas, aunque son muy pocas pueden ocasionar problemas si no se conocen como:

- Puede haber adsorción de proteínas con valores altos de Punto isoelectrico o alto peso molecular en las paredes del capilar (conviene utilizar capilares neutros).
- La detección con UV puede ser problemático.

5.3 PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR DE AFINIDAD

La velocidad con que una proteína migra en un campo eléctrico en una unidad de campo de fuerza es definido como movilidad electroforética (μ en $\text{cm}^2 \text{KV}^{-1}\text{S}^{-1}$). El valor de μ para una proteína es relacionado linealmente con la fuerza en el campo eléctrico, e inversamente con el arrastre hidrodinámico:

$$\mu \approx C_p (Z/M_\alpha)$$

La fuerza eléctrica es proporcional a la carga Z de una proteína, esta carga es la suma de las cargas que son acarreadas por los componentes electrostáticos, incluyendo el tamaño de las cadenas de la proteína, ligandos asociados, sacáridos unidos covalentemente, cofactores y iones metálicos. El arrastre hidrodinámico está relacionado con la masa (M) (o por el volumen o la forma) de una proteína en solución. C_p es una constante electroforética y esta depende de la forma de la proteína, así como de la estructura y de las condiciones del experimento; α está definida como una constante del peso molecular, el cual es inversamente proporcional a la movilidad electroforética. (Gao y cols., 1998).

Los experimentos en ACE requieren que la movilidad electroforética del complejo proteína-ligando sea diferente que la μ de la proteína sola. Cuando ocurre un rápido equilibrio entre la proteína unida y no unida, la medición de la movilidad electroforética es el promedio de las movilidades electroforéticas de la proteína unida y no unida:

$$\mu = \theta \mu_{P,L} + (1-\theta) \mu_P$$

La ecuación describe un sistema de unión monovalente, en donde θ es la fracción mol de la proteína unida con el ligando, $\mu_{P,L}$ y μ_P son las movilidades electroforéticas del complejo proteína-ligando y de la proteína no complejada, respectivamente. En un análisis del cambio en la movilidad electroforética ($\Delta\mu_{P,L} = \mu - \mu_P$) en una función de la concentración del ligando $[L]$ en solución es la constante de unión (K_b).

$$\Delta\mu_{P,L} / (L) = K_b \Delta\mu_{P,L}^{\max} - K_b \Delta\mu_{P,L}$$

El análisis basado en la ecuación anterior dice: El equilibrio se establece entre las especies unidas y no unidas; la determinación de la constante de disociación del complejo proteína-ligando es rápido con respecto al tiempo del experimento; la concentración del ligando en el buffer es suficientemente alta con respecto a la proteína en la muestra que la concentración total cambia negativamente en la unión a la proteína; la interacción del ligando y el receptor con la pared del capilar no altera significativamente la unión del ligando al receptor; y el campo eléctrico no afecta la unión. (Gao y cols., 1998). En experimentos donde hay cambios en el EOF con altas concentraciones de ligando [L], son mucho mas pequeñas que el cambio en $\mu_{P,L}$, se puede utilizar la siguiente ecuación para determinar la afinidad de unión del complejo proteína-ligando.

$$\Delta t_{P,L}/(L) = K_b \Delta t_{P,L}^{\max} - K_b \Delta t_{P,L}$$

La asociación del ligando puede cambiar la movilidad electroforética de una proteína en tres vías:

1. Por el cambio del arrastre hidrodinámico, mientras se deja sin cambios la carga (unión de ligandos largos y neutros).
2. Por el cambio de la carga, mientras se deja sin cambios el arrastre hidrodinámico (unión de ligandos pequeños y cargados).
3. Por cambios de ambos, tanto la carga como el arrastre hidrodinámico (unión de ligandos largos y cargados, interacciones proteína-proteína).

Con la electroforesis capilar de afinidad se puede utilizar para la determinación de la constante de afinidad de varias utilidades como:

- Ligandos cargados positivamente.
- Estudio de Ligandos pequeños neutros a su receptor.
- Unión de proteínas a dos ligandos.
- Determinación simultanea de la constante de afinidad relativa a muchas isozimas a un ligando cargado.
- Determinación simultanea de la constante de afinidad relativa a muchos ligandos a un receptor.
- Interacciones proteína-proteína.
- Determinación de parámetros cinéticos para la unión.
- Utilizar ACE para la medición de la carga efectiva de una proteína.
- Determinación de la estequiometría de la unión.

5.4 DETECCIÓN POR MEDIO DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR LASER (LIF)

De acuerdo a la figura No. 15 se necesita un detector para interpretar los resultados obtenidos de las movilidades electroforéticas, en este trabajo se utilizo un detector de fluorescencia inducida por láser (LIF).

La fluorescencia inducida por láser (LIF, laser induced fluorescence) es el segundo método más usado después de la detección por espectrofotometría UV-Vis, y es además uno de los detectores que más sensibilidad aporta. En principio, parece ser mucho más selectivo, ya que en conjunto existen pocos analitos con propiedades fluorescentes naturales, y además, es necesario que la longitud de onda de excitación del analito coincida con la del haz de luz

emitido por los láseres disponibles. Sin embargo, se puede recurrir a la derivatización de las sustancias a analizar con reactivos que tengan algún grupo fluoróforo o bien que al reaccionar con los compuestos de interés, el producto pueda emitir fluorescencia. (Alfano y cols, 1989).

Conviene hacer una revisión de los fluorocromos que son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. Se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser y de la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos. El espectro de excitación y emisión varía con los diferentes fluorocromos. Si disponemos de un láser con una longitud de onda de 488 nm los fluorocromos que utilizemos deberán ser capaces de ser excitados a esta longitud de onda y además emitir en longitudes lo mas lejanas posibles entre ellas. Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando captan (son excitados) por un fotón incidente de una longitud de onda característica. Por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína tiene un máximo de absorción a 490 nm y un máximo de emisión a 520 nm.

Hay dos modos de uso de los fluorocromos: (1) unión covalente del fluorocromo a moléculas que se unen específicamente a componentes celulares, y (2) fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea. (<http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/fluor.htm>).

Las propiedades ideales de un fluorocromo son: (1) alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación (probabilidad de absorber la luz),

(2) alto rendimiento cuántico (emisión de luz), (3) elevada fotoestabilidad, (4) corto estado de excitación. Si el fluorocromo va a estar unido a algo, éste debe de ser insensible a cambios de pH, polaridad y microambiente; ya que la fluoresceína cumple con estos requisitos, con excepción del punto 3, se eligió como marcador del oligonucleotido empleado en este trabajo. (<http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/fluor.htm>).

La fluoresceína es sensible al microambiente que le rodea, de acuerdo al punto 3 anterior puede ser empleado para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentra, puesto que varía su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que le rodea. Esta se emplea para la determinación de diversos estados funcionales celulares como el pH se puede utilizar la 6-carboxi-fluoresceína y para el potencial red-ox la diclorofluoresceína. (<http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/fluor.htm>)

CAPITULO VI SONICACION

6.1 GENERALIDADES

La sonicación es una técnica para el fraccionamiento y/o separación de componentes celulares como orgánulos, una fracción de membrana o complejos multiproteicos (citoesqueleto de actina, microtúbulos, poros nucleares, anticuerpos de proteínas, etc.). (<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/fraccionamiento.htm>).

Esta consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.

Se transmite una corriente eléctrica a un sistema mecánico que la convierte en vibraciones de alta intensidad generando ondas ultrasónicas que forman millones de micro burbujas que se expanden y colapsan contra las células esto se llama cavitación. (Darnel, J y cols., 1993).

6.2 CAVITACION

La cavitación es el choque de ondas que rompe membranas y aún enlaces covalentes. El sonicador tiene dos formas de operar, por pulsos: Las vibraciones de ultrasonido pueden transmitirse en una solución en un rango de 0,1 a 0,9 pulsos por segundo, permitiendo una adecuada sonicación sin generación importante de calor; y continuo: Puede ser usado de forma continua por hasta 15 minutos. Presenta los siguientes inconvenientes: alta generación de calor de las muestras que se mantienen en congelamiento, los tejidos duros (piel o tendón) se deben macerar previamente; se pueden generar radicales libres, el daño por oxidación de radicales libres puede minimizarse adicionando cisteína, ditiotreitól o algún otro componente -SH en el medio. (Darnel, J y cols., 1993).

CAPITULO VII

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día existen diversos estudios acerca de los entrecruzamientos entre el DNA y algunas proteínas (DPC's) (Ramirez y cols., 2000, Gonsebatt y cols, Millar y cols, 1991., López y cols, 2004., Voitkun y cols, 1999), también se sabe que algunos entrecruzamientos se unen covalentemente o iónicamente, pero no existen estudios acerca de la afinidad que tiene la proteína CK18 por el DNA; ya que el estudio de la afinidad entre estas dos moléculas es importante porque algunos estudios proponen a los DPC's como

biomarcadores de daño temprano al DNA por exposición a agentes tóxicos (Schmitz y cols, 1979), como por ejemplo el arsénico, el cual puede contribuir a la citotoxicidad, mutagenicidad y efectos carcinogénicos; ya que los procesos de bioactivación y detoxificación de algunos agentes tóxicos como el arsénico ocurren en el hígado. (Ramírez, 2000; Barker, 2005).

En estudios anteriores se observó que el DNA forma entrecruzamientos específicamente con la proteína CK18 y la intención de este trabajo es saber con que afinidad se da este entrecruzamiento entre el DNA y la proteína, ya mencionada. (Ramírez y cols, 2000).

Para este trabajo se necesito aislar y purificar a la proteína CK18 para tenerla en las condiciones de máxima pureza y de esta manera enfrentar a la proteína CK18 con el oligonucleótido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG para saber cual es la afinidad de la unión entre ambas moléculas.

HIPOTESIS

Si la unión entre la CK18 (obtenida a partir del hígado de ratones de la cepa BALB/C) y el DNA es del tipo iónico, entonces la constante de afinidad podrá ser determinada por medio de la electroforesis capilar de afinidad.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la constante de afinidad de la proteína CK18 y el oligonucleótido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG, mediante la técnica de electroforésis capilar de afinidad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Aislar la proteína CK18 a partir del hígado de ratón de la cepa BALB/C, por medio de la técnica de inmunoprecipitación.
- 2.-Caracterizar la CK18 aislada de ratones BALB/C por medio de SDS-PAGE.
- 3.-Separar y purificar la proteína CK18 mediante ultrafiltración.
- 4.-Determinar las constantes de afinidad entre la proteína CK18 y el oligonucleótido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG.

CAPITULO VIII

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

8.1 MATERIALES Y REACTIVOS

Material biológico: Ratones hembra de la cepa BALB/C, Anticuerpo monoclonal de ratón (IgG₁) anti-CK18, [200 µg/ml] (Santa Cruz Biotechnology), proteína A Sefarosa de *Staphylococcus aureus* (Sigma Aldrich), albúmina bovina sérica (SBA), albúmina de huevo, proteína CK18, Oligonucleotido [5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG (Sigma-Aldrich).

Reactivos: PBS pH 7.4, SDS (10%), cloruro de potasio, PMSF, Tris-HCl, alcohol etílico al 70%, EDTA, ácido bórico, agua desionizada, acrilamida, bis acrilamida, azul de Coomasie, azul bromofenol al 1%, tritón al 1%, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, NP-40, Dithiotreitol, glicerol, persulfato, kit para la determinación de proteínas por el método de Bradford (Biorad).

Equipo: pHmetro (Oakton), balanza analítica (Sartorius), micropipetas (Eppendorf), mecheros de gas, cámaras para electroforesis (Bio-Rad), espectrofotómetro, centrifuga, vortex (Genie 2), procesador ultrasónico (Cole Parmer), equipo para electroforesis capilar (Beckman Coulter).

Material en general: Capilar neutro (eCAP, Beckman), cartucho porta capilar, puntas para micropipetas, celdas para espectrofotómetro, estuche de disección, rotor para inmunoprecipitación, vasos de precipitado, tubos Eppendorff, agitador magnético, matraces aforados, probetas, papel filtro, filtros de 0.2 μm .

8.2 OBTENCION Y PURIFICACION DE LA PROTEINA CK 18

8.2.1 INMUNOPRECIPITACION DE LA PROTEINA CK 18

Se sacrificó un ratón hembra a la cual se le extrajo el hígado, posteriormente se cortó en trozos pequeños, estos se colocaron en tubos Eppendorf estériles, con la ayuda de un Vortex pequeño se homogenizó el

hígado agregando 300 μ l de PBS pH 7.4, después se determinó la concentración total de proteínas con reactivo de Bradford. (Cuantificación total de proteínas).

8.2.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS TOTALES

Del homogenado anterior se determino la concentración de proteínas totales con el método de Bradford como sigue:

- En tubos Eppendorf se agrego: 10 μ l de muestra + 790 μ l de Agua + 200 μ l de reactivo de Bradford.
- Se hizo un blanco como sigue: 800 μ l de agua + 200 μ l de Bradford.
- Se agito con vortex.
- Las muestras se leyeron a una $\lambda=595$.
- Las absorbancias obtenidas se relacionaron con una curva de calibración de albúmina y se determino la concentración total con los 300 μ l de volumen.

8.3 INMUNOPRECIPITACION DE LA PROTEINA CK18. (TECNICA DE INMUNOPRECIPITACION)

1. Preparar la proteína A sefarosa en una concentración al 50 % en PBS pH 7.4
2. Hacer una solución de anticuerpo CK 18. La cual consistió en agregar 2 µg del anticuerpo en 40 µl de buffer de inmunoprecipitación a pH 7.4
3. Las soluciones anteriores se mezclan, la cual consiste en: 30 µl de la solución al 50% de proteína A sefarosa, 40 µl de la solución del anticuerpo de CK 18 diluido + 430 µl del buffer de inmunoprecipitación.
4. La mezcla anterior se incuba por 2 hrs. a 4° C con agitación constante.
5. Una vez que termino la incubación centrifugar a 12,000 rpm por 3 minutos.
6. Retirar el sobrenadante con “mucho cuidado” y se agregar 500 µl de buffer de inmunoprecipitación. (Lavado 1).
7. Centrifugar nuevamente, retirar el sobrenadante y se agregar 500 µl de buffer. (Lavado 2).
8. Hacer un tercer lavado.
9. Al lavado3 se le retira el sobrenadante, se agregan 500 µl de buffer + las cantidades necesarias de proteína (homogenada de hígado); cuyo equivalente sea de 200 µg.
10. Agitar en vortex muy cuidadosamente e incubar con agitación constante por 2 hrs. A 4° C.

11. Una vez terminada la incubación, centrifugar a 2000 RPM por 3 minutos, retirar el sobrenadante y la nata que se formó en los tubos.
12. Agregar 500 µl de buffer de inmunoprecipitación y se centrifugar a 2000 RPM por 2 minutos (Lavado 1).
13. Realizar 2 lavados más.
14. Al último lavado, agregar 500 µl de buffer.

NOTA: Si no se iba a realizar sonicado o electroforesis en ese momento, las muestras se congelan a -20° C.

8.4 SONICACION PARA LA OBTENCION DE LA PROTEINA CK 18

Después de la inmunoprecipitación fue necesario sonicar las muestras para obtener a la proteína CK18 en las condiciones de máxima pureza; debido a que dicha proteína se encontraba unida al anticuerpo IgG y la proteína A sefárosa de staphylococo en el momento de la inmunoprecipitación, por lo tanto se realizó la sonicación en las siguientes condiciones:

- Colocar los tubos en un baño de hielo. (Cambiarlo constantemente).
- Ajustar el sonicador en una intensidad de 8000 Hgz.
- La sonda del Sonicador se coloca dentro del tubo. (La sonda no debe de tocar las paredes ni el fondo del tubo).
- Sonicaron las muestras en intervalos de 5 minutos x 5 min. De descanso.
- Completar 15 minutos de sonicado de la muestra.

- Al terminar el sonicado se centrifugan las muestras a 4000 RPM.
- Guardar las muestras a -20° C.

NOTA: El sonicado no debió de pasar del tiempo establecido; ya que si se aumentaba se pudo desnaturalizar la proteína.

Las muestras estuvieron sumergidas en hielo todo el tiempo de sonicado para evitar su degradación.

8.5 CENTRIFUGACION PARA LA OBTENCION DE LA PROTEÍNA CK 18

Después del sonicado, las muestras se centrifugaron para separar a la proteína CK18, del anticuerpo IgG anti-CK18 de ratón y de la proteína A sefarosa.

Las muestras se centrifugaron a 4,000 RPM a 4° C por 5 minutos, esto para sedimentar a la proteína A sefarosa de la proteína CK18 y del anticuerpo IgG. (porque estos dos últimos quedaban juntos).

Para la separación de estas dos moléculas (proteína CK18 y Anticuerpo IgG) se utilizaron filtros Microcon de Millipore con membrana de corte molecular de 50 KDa; ya que la proteína CK18 tiene un peso molecular de 45 KDa esta se queda en el filtrado, (atravesando el filtro) mientras que el anticuerpo IgG tiene un peso molecular de 150 KDa este se queda en el sobrenadante del filtro (sin atravesar el filtro).

Las muestras se centrifugaron a 12,000 RPM a 4° C por 10 minutos.

NOTA: Cada muestra se centrifugo tres veces, invirtiendo cada vez el filtro para su recuperación a 3000 RPM por 3 minutos y así obtener una mejor separación de la proteína CK18 del anticuerpo IgG, (según manual del filtro).

8.6 IDENTIFICACION DE LA PROTEINA CK 18 POR TECNICA ELECTROFORÉTICA SDS-PAGE.

Para hacer la debida identificación de la proteína CK 18 se realizo SDS-PAGE de las muestras como sigue:

- Las muestras se descongelaron a 37° C, y se mantuvieron en un baño de hielo.
- Se agitaron en vortex y se volvieron a centrifugar a 4000 RPM.
- En un tubo aparte, se agregaron 20 µl de la muestra (Con cuidado de NO tomar la proteína A sefarosa).
- Se agregaron 30 µl de buffer muestra (colorante).
- Se les agito en vortex muy cuidadosamente.
- Las muestras se colocaron en baño maría a 60° C x 5 min.
- Transcurrido el tiempo las muestras se agregaron en sus respectivos carriles en un gel para electroforesis de acrilamida (Preparado previamente).
- Se agrego el buffer de corrida (frío).
- Se conecto a la corriente con las siguientes especificaciones:
- Voltaje = 80, Amperaje ≈ 6 mA.

- Tiempo de 2:00 a 2:30 hrs.
- Después de transcurrido el tiempo se desconecto y desmonto el aparato
- Se tomo el gel de acrilamida y se sumergió en una solución de azul de Coomassie (para teñir las proteínas presentes en el gel).
- Se dejo en esta solución por lo menos 4 hrs.
- Transcurrido el tiempo se sumergió el gel en una solución desteñidora en agitación constante para desteñir el gel y solo evidenciar las proteínas que se tiñeron.
- Se hicieron las respectivas observaciones.

NOTA

- Se utilizó ovoalbúmina como marcador de peso molecular (PM=46 Kda), porque tiene un peso molecular similar al PM de la CK 18 (PM = 45 KDa).
- La técnica electroforética SDS-PAGE se realizo después de la inmunoprecipitacion, después de sonicar las muestras, así como después de la centrifugación para hacer evidente que la proteína se encontraba en las muestras respectivas, así como evidenciar que se encontraba en condiciones de pureza.

8.7 PREPARACION DE LA PROTEINA CK18 Y EL OLIGONUCLEOTIDO

[5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG PARA EC.

PREPARACION DE LA PROTEINA CK18

La proteína CK 18 de hígado se preparó de la siguiente manera:

- La proteína estaba en buffer de inmunoprecipitación pH = 7.4, de concentración 0.778 nM. (La concentración se obtuvo por la elaboración de una curva de calibración de albúmina, por técnica de Bradford)
- Debido a la concentración encontrada de la proteína CK 18, se hicieron diluciones de la misma, obteniendo las siguientes concentraciones. (Tabla No. 2).

Tabla 2 Relación de concentración de la Proteína CK18

Tubo	Concentración nM
1	0.778
2	0.389
3	0.195
4	0.097
5	0.049
6	0.026

RECONSTITUCION DEL OLIGONUCLEOTIDO

Tabla 3 Especificaciones de oligonucleotido

[5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG

NOMBRE	OLIGO 20-5F
SECUENCIA	[5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG
PARES DE BASE	20 PARES GUANINAS = 6, ADENINAS = 5, TIMINAS = 5, CITOCINAS = 4
TEMPERATURA MEDIA (T_m)	55.2
PESO MOLECULAR	6,694.4 g/mol
DENSIDAD OPTICA	14.2
µg/OD	34.2
µg	484.6
NANOMOLES	79.6
MARCADOR	FLUORESCEINA EN 5'
PUREZA	HPLC

El oligonucleotido se encontraba desalado y seco; este se reconstituyo con buffer TE 1X (10mM de Tris-HCl y 1mM de EDTA, pH = 7.5 - 8.0) de acuerdo a los nmoles marcados en la tabla 3; por 10 veces como sigue: $79.6 \times 10 = 796 \mu\text{l}$ de buffer TE se agrego al tubo para reconstituir al oligonucleotido, teniendo una concentración de 100 nM, después se separo en

alícuotas, esto con el fin de conservar por mas tiempo la fluorescencia del oligonucleotido. Posteriormente se hizo una dilución del oligonucleotido para obtener una concentración de 23 nM , de acuerdo a los siguientes cálculos:

$$\frac{3 \text{ ml soln.} \times 0.023 \text{ } \mu\text{mol}}{1000 \text{ ml}} = 6.9 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{moles de oligo}$$

$$\frac{6.9 \times 10^{-5} \text{ } \mu\text{mol Oligo}}{100 \text{ } \mu\text{mol Oligo}} \times \text{-----} \times \text{-----} \quad x = 6.9 \times 10^{-7} \text{ Litros de Oligo}$$

$$\text{-----} \quad \text{-----} \quad \text{1 Litro}$$

$$6.9 \times 10^{-7} \text{ L Oligo} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} = 0.69 \text{ } \mu\text{l de Oligo}$$

Ya que no se contaba con micropipetas que midan un volumen de 0.69 μl se uso un volumen de 0.7 μl , agregando 2999.3 μl de buffer TE. Por lo tanto, esta es la concentración real, de acuerdo con los siguientes cálculos:

$$\frac{23 \text{ nM de Oligo}}{x} \times \frac{0.69 \text{ } \mu\text{l de Oligo}}{\text{-----}} \times \frac{\text{-----}}{0.7 \text{ } \mu\text{l de Oligo}}$$

$$x = 23.33 \text{ nM de Oligo (concentración real).}$$

Condiciones para EC

Después de la dilución del oligonucleotido se llevo a cabo la electroforésis capilar de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Se hizo un buffer de corrida de TRIS-Boratos 40 mM pH=7
- La corrida se realizo en un capilar neutro de alcohol polivinilo de rango de pH entre 6 a 9.
- El capilar se lavo con Agua desionizada con presión de 20 psi por 20 minutos.
- Posteriormente se lavo con buffer de corrida Tris-Boratos pH=7 por 20 psi por 10 min.
- Las condiciones de separación fueron:
 - INYECCION de la muestra con presión de 5psi por 5 segundos.
 - CORRIDA DE LA MUESTRA con voltaje de 30 μ A por 10 a 15 minutos.
- Después de realizada la separación se obtuvo el electroferograma correspondiente de la muestra y se realizo su interpretación.
- Posteriormente se realizo la corrida del oligonucleotido + la proteína CK18 de acuerdo con las siguientes condiciones:
 - En un tubo Eppendorf se agregaron 150 μ l de oligonucleotido de concentración 23.3 nM.
 - En el tubo se agregaron 10 μ l de proteína CK18 diluida (Todas las concentraciones diferentes, respectivamente Tabla 2).

- Finalmente se agregaron 90 μ l de buffer de unión (buffer para favorecer la unión entre el oligonucleotido y la proteína), obteniéndose un volumen final de 250 μ l.
- Para propiciar la unión del oligonucleotido con la proteína CK18 se incubo por 15 minutos a 37° C en un baño María.
- Trascurrido el tiempo se realizo la corrida de la muestra con las condiciones anteriores ya mencionadas.

CAPITULO IX

RESULTADOS

Con objeto de iniciar los estudios para la caracterización de las interacciones citoqueratina 18-oligonucleótido se obtuvo mediante inmunoprecipitación la CK18 a partir de homogenados crudos de hígado de ratones BALB/c. El extracto, se caracterizó mediante electroforésis convencional SDS-PAGE. Los resultados mostraron que con la estrategia experimental empleada logramos aislar convenientemente la proteína. En el gel correspondiente (Fig. 20) observamos una banda única con un PM aproximado de 45 kDa en comparación de Ovoalbúmina 46 kDa.



Figura 21 Electroforésis del producto de la inmunoprecipitación electroforesis SDS-PAGE.

Para verificar la pureza del oligonucleotido (R.A.), se realizó el análisis del mismo por electroforesis capilar (Figura 21).

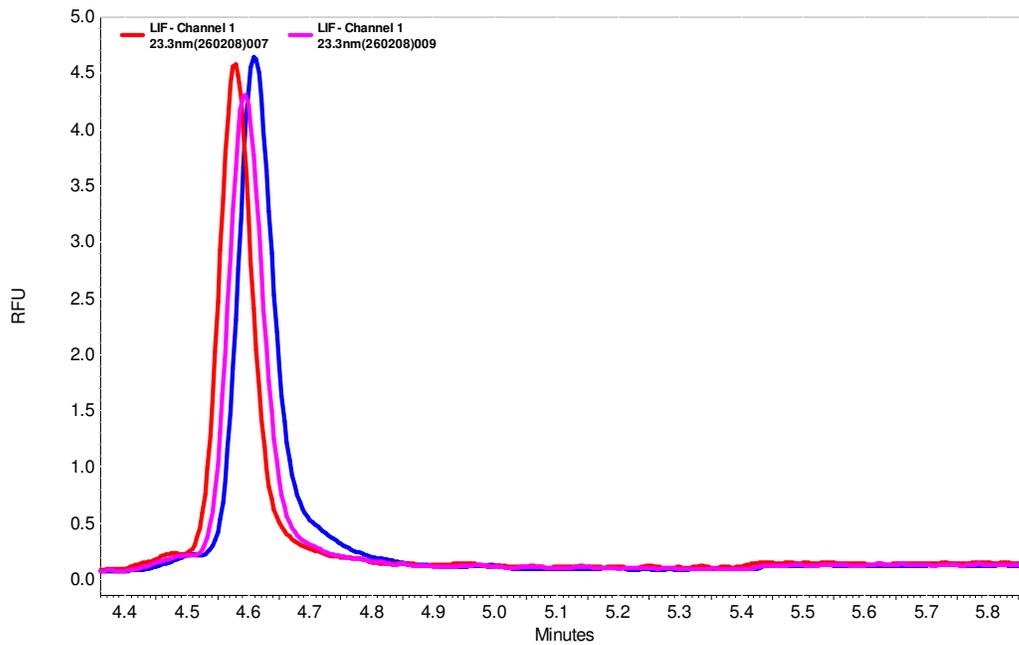


Figura 22. Electroferograma del oligonucleotido
[5FLC]GGGTCTAGTACAAACTCTGG

Posteriormente se incubo el oligonucleótido y la proteína CK18 obteniendo los siguientes electroferogramas (Figura No. 22).

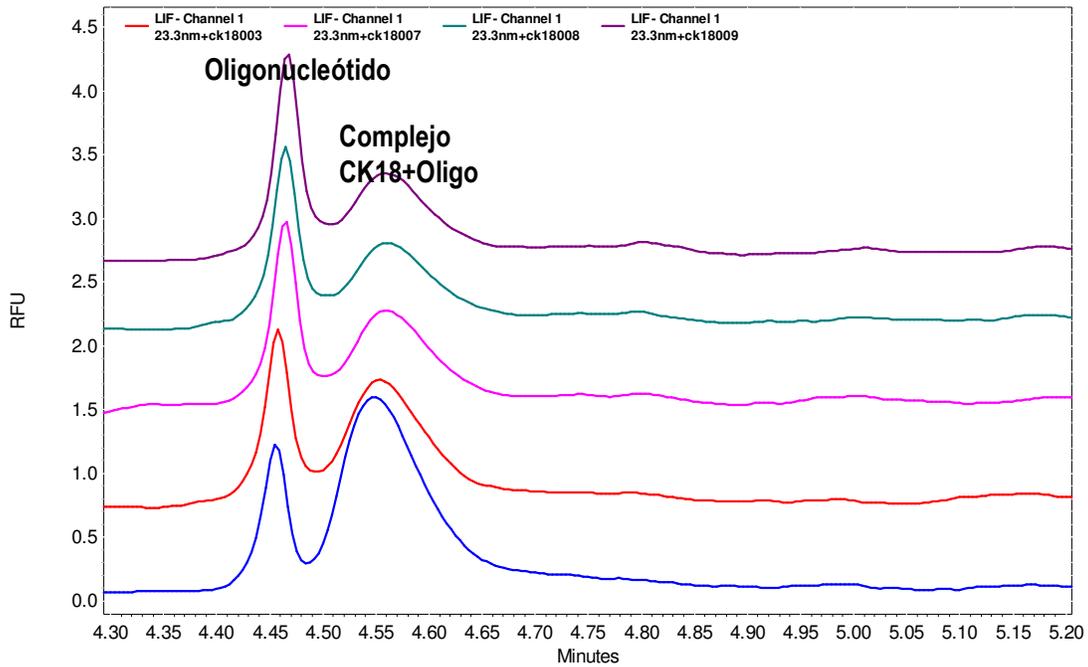


Figura No.23 Electroferogramas de Oligonucleotido + Proteína CK18

Una vez obtenidos los electroferogramas de Oligonucleotido + Proteína CK18 se integraron los picos de los gráficos con el programa computacional Karat 32., obteniéndose las áreas de los diferentes picos, después se utilizó la siguiente ecuación para determinar la afinidad relativa o $R_{1/2}$.

$$R = \frac{\text{(Área del pico del complejo)}}{\text{(Área del pico del complejo)} + \text{(Área del pico del oligonucleotido)}}$$

En donde R es la saturación del oligonucleotido que se representa gráficamente en función del incremento de las cantidades de Proteína CK18.

Fraga y cols. 2000, argumentan que “ $R \frac{1}{2}$ ” es un estimado de la constante de afinidad. Por lo tanto para calcular la constante de afinidad (Kd), fue necesario tomar en cuenta la siguiente ecuación:

$$Kd = \frac{L}{L + R}$$

En donde “L” es la concentración de la proteína y “R” es la saturación del oligonucleotido. En la tabla No.2 se muestran los resultados, tanto para R como $R \frac{1}{2}$ y Kd, respectivamente.

Tabla 4 Determinación de la Constante de Afinidad

nanomoles de oligo	[prot] nanoMolar	A complejo	A oligo	R	Kd
0.003495	0	0	0	0	0
0.003495	0.026	365388	232177	0.61146151	0.04078678
0.003495	0.049	388290	244115	0.61398945	0.07390766
0.003495	0.097	535660	297179	0.64317353	0.13105035
0.003495	0.195	639830	333960	0.65705131	0.22885946
0.003495	0.389	606879	290678	0.67614536	0.36520837
0.003495	0.778	675219	247527	0.73174958	0.51531725
			R =	3.93357074	Kd Total
			R 1/2 =	1.96678537	1.35512987

ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados de la Tabla No.4 muestran para “R ½ “ un valor de 1.966 nM de CK18, de acuerdo con Fraga y cols. “R ½ “ solo es un estimado de la constante de afinidad; ya que al obtener Kd (Constante de Afinidad), esta es de 1.355 nM de CK18, lo que indica que los valores son cercanos y que con “R ½ “. Se puede obtener una estimación de la constante de afinidad de algunos aductos ADN-proteína, incluso para otro tipo de interacciones ADN-proteínas naturales o inducidas.

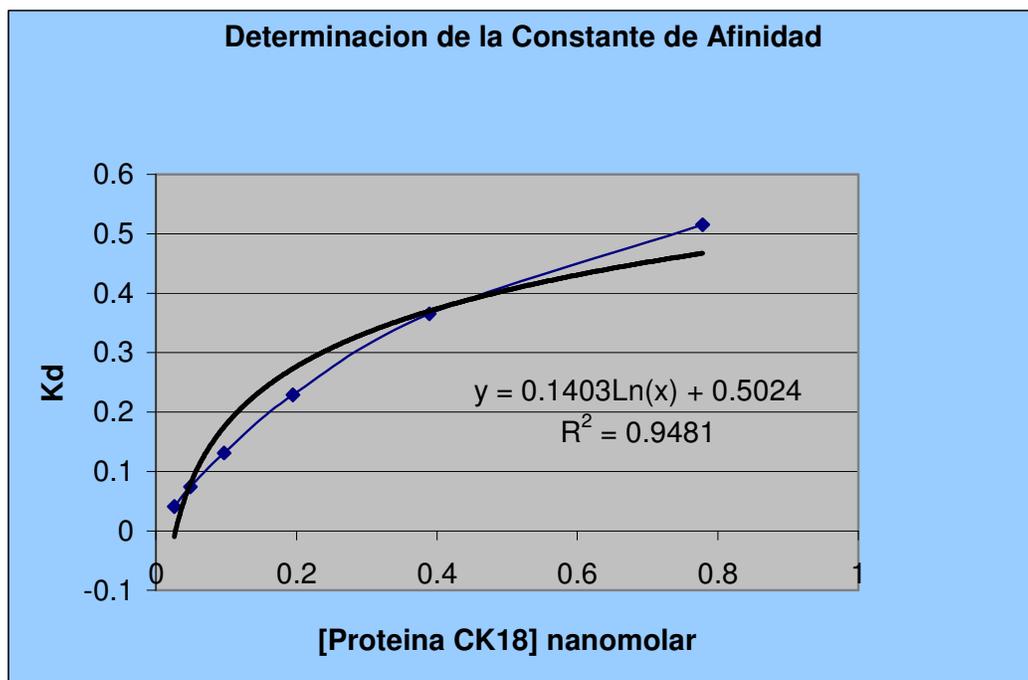


Figura No.24 Grafico de la determinación de afinidad

La figura No.24 muestra la curva de constantes de afinidad de acuerdo a la segunda ecuación utilizada, este grafico muestra una tendencia logarítmica lo que indica que la concentración de la proteína estuvo en exceso por encima del oligonucleotido en todo el experimento.

El valor de “ $R_{1/2}$ ” y K_d nos indican que se forman los aductos ADN-proteína, en este caso entre el oligonucleotido GGGTCTAGTACAAACTCTGG y la proteína CK18 se necesitan pequeñas cantidades de proteína CK18 para formar el aducto o entrecruzamiento, esto es importante porque se necesitan solo 1.355 nM de proteína CK18 para que la interacción entre las macromoléculas sea identificada por la generación del complejo Oligonucleótido-proteína.

Biológicamente hablando la caracterización de las interacciones ADN-proteínas entre macromoléculas tan importantes como son el DNA y las proteínas es muy importante; ya que diversos procesos celulares dependen de estas interacciones para su correcta función. Aunado a lo anterior y considerando que existen diversos agentes tóxicos cuyo mecanismo de acción tiene como blanco las proteínas y ADN que cuando se exponen in vitro e in vivo son capaces de interactuar eficientemente entre sí formando complejos entre ellas que se han asociado con alteraciones celulares en diversos procesos celulares como la replicación, la reparación, la recombinación, la transcripción, la remodelación de la cromatina; ya que su presencia representa por si misma, interrupciones en la doble hélice. Conocer que tan fuerte es la asociación de una proteína como la CK18 que normalmente no se asocia al DNA es

importante ya que puede verse modificada en presencia de diversos agentes tóxicos.

La formación de aductos ADN-proteínas se ha propuesto como biomarcadores de daño temprano en exposiciones *in vitro* e *in vivo* a diversos agentes tóxicos.

Las interacciones ADN proteínas incluyendo aquellos en sus formas descompuestas y conformados por oligonucleotidos de cadena corta son detectables con remarcable frecuencia utilizando diversas estrategias experimentales, sin embargo, durante el empleo de estos métodos de análisis químico analíticos debemos optar por aquellos cuya sensibilidad, y especificidad es adecuada de acuerdo a las características químicas a evaluar y considerando su relación con los eventos biológicos asociados a su presencia y su utilidad en el área de la salud como biomarcador.

Lo que nos permitirá estudiar los mecanismos de acción del agente inductor o modulador de las uniones ADN-proteínas lo que apoyaría el estudio acerca de su significado biológico en presencia de agentes xenobióticos.

En este trabajo, cantidades mínimas de oligonucleótidos fueron capaces de interaccionar efectivamente con nanomoles de proteína CK18. El estudio de las características de unión, cinética de formación, moléculas involucradas entre otras nos permite abundar en el significado biológico de este tipo de daño y en sus repercusiones en la célula si consideramos en este caso que la CK18 es una proteína muy importante que al verse modificada en su estructura, síntesis y expresión se ha relacionado con un incremento en la susceptibilidad hepática al daño inducido por agentes tóxicos y con algunas

enfermedades como la cirrosis biliar primaria, cirrosis idiopática, hepatitis alcohólica y carcinoma entre otras.

La afinidad entre moléculas nos permite determinar la mayor o menor tendencia de un ligando a unirse a un receptor o estructura molecularmente afín. Cuanto menor sea la constante de afinidad (K_d) mayor es la afinidad entre ambos (receptor-ligando), en este caso la proteína CK18 y el oligonucleótido, en este caso el ligando produce sus efectos a concentraciones más bajas. La K_d se puede calcular a partir de la curva; ya que es el 50% del efecto máximo.

El oligonucleotido fue adquirido acoplado a fluoresceína debido a que el oligonucleotido por sí solo no es fluorescente, de esta manera su uso en los análisis de electroforesis capilar acoplado a el detector LIF facilitando este tipo de estudios y su implementación. A la fecha existen 4 clases de compuestos comúnmente empleados para el marcaje de aminas marcadas: Esteres succimidílicos (SE) incluyendo los sulfosuccimidílicos, isotiocianatos (ITC), cloruros sulfonílicos (SC) y ésteres tetrafluorofenílicos (TFP). Estos últimos son los preferidos en conjugaciones químicas. Generan enlaces carboximida estables como los en los (SE). Estos compuestos son menos susceptible a la hidrólisis que los esterres succimidílicos por lo que proveen un mayor tiempo de reacción fluorescente en reacciones desarrolladas en ambiente acuoso.

La derivatización fluorescente de oligonucleótidos para el análisis de aductos utilizando electroforesis capilar acoplada la fluorescencia inducida por láser se desarrolló por Giese y colaboradores con objeto de tener ensayos

con sensibilidad comparable a los métodos de marcaje radioactivo ^{32}P . El autor propuso el uso de fluorocromos como el cloruro de dancilo o con isotiocianato de fluoresceína en un paso utilizando como grupo de complejación al fluorocromo la hisitidina.

La detección y cuantificación de interacciones AND-proteínas es muy importante en relación a diversos fenómenos anormales como el cáncer. La alta sensibilidad y selectividad son características requeridas en la detección de este tipo de interacciones ya que el contenido natural de estas interacciones en la célula es muy pequeña comparado con las cantidades normales de bases, nucleótidos y pequeños oligonucleotidos.

Cabe mencionar que durante el desarrollo del presente trabajo se tuvieron algunas complicaciones en las mediciones, porque la fluoresceína es muy susceptible a cambios de pH y temperatura lo que hizo difícil las mediciones; por lo tanto solo se utilizaron alícuotas pequeñas del oligonucleótido controlando el pH y la temperatura de conservación del oligonucleótido la cual era siempre a -20°C .

Un oligonucleótido es una secuencia corta de DNA, en este caso con 20 bases. Tienen distintas funciones: como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación, en bloqueos específicos de ARN mensajero y en nuestro caso para conocer la constante de afinidad (Kd) al unirse con la proteína CK18. La secuencia fue seleccionada al azar, pero si analizamos detenidamente la secuencia (GGGTCTAGTACAACTCTGG) tratamos que existiera cierto equilibrio entre la relación de las bases como: Adenina = 5, Guanina = 6, Citosina = 4, Timina = 5. Con objeto de que en el caso de que hubiera cierta susceptibilidad incrementada en las interacciones

entre la CK18 y las bases del nucleótido esto no se diera por exceso en el oligonucleótido.

Durante el análisis electroforético se utilizó un capilar neutro para realizar las mediciones electroforéticas lo que evitó que las proteínas, dada su carga de acuerdo a la composición de aminoácidos tienden a ser adsorbidas hacia las paredes del capilar cuando hay Flujo electroosmótico. Al adquirir el capilar neutro el flujo EOF fue mínimo. Al no tener EOF es mucho más fácil trabajar y realizar las mediciones, porque no hay problemas de adsorción o atracción de las proteínas a las paredes. También para evitar la adsorción de la proteína CK18 se trabajó a pH 7, en donde las proteínas tienen una carga neutra.

CONCLUSIONES

- El aislamiento de la proteína CK18 mediante la técnica de inmunoprecipitación, la caracterización mediante SDS-PAGE y la separación por ultrafiltración son métodos y técnicas eficaces para la obtención de la proteína CK18.
- La determinación de la constante de afinidad mediante electroforesis capilar acoplada a la fluorescencia inducida por láser entre la proteína CK18 y el oligonucleótido es de gran importancia con objeto de determinar la afinidad entre su interacción si consideramos que esta proteína no se ha asociado al material genético.
- El método es rápido y reproducible, sin embargo hay que manejar con cuidado las variables inherentes al manejo de fluorocromos.
- El uso de un capilar neutro en donde están desactivados los grupos silanol fue muy favorable porque el flujo electroosmótico fue mínimo y evitamos la absorción de la proteína CK18 a las paredes del capilar.

PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos; desde el aislamiento por inmunoprecipitación, la caracterización, la separación de la proteína CK18 y la electroforesis capilar quedan por desarrollar algunos aspectos como:

- Conocer los efectos de agentes tóxicos sobre la constante de afinidad entre CK18 y secuencias de nucleótidos codificantes genéticamente.
- Conocer la cinética de formación de los complejos de manera natural y en presencia de agentes tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

1. Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. 2005. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research*. 589, 111-135
2. Basu A., Mahata J, Gupta S, Giri A.K., 2001, Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen arsenic: a review. *Mutation research/reviews in mutation research*, 488(2), 171-194.
3. Carnelley T.J., Barker, S., Wang, H., Woei, G., Weinfeld, M., 2001. Synthesis, Characterization, and Applications of a Fluorescent Probe of DNA Damage. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1513-1522
4. Costa, M., Zhitkovich, A., Toniolo, P. 1993. DNA-Protein cross-links in welders: Molecular Implications. *Cancer Res.* 53, 460-463
5. Costa, M., Zhitkovich, A., Gargas, M., Paustenbach, D., Finley, B., Kuykendall, J., Billings, R., Carlson, T.J., Wetterhahn, K., Xu, J., Patierno, S., Bogdanffy, M. 1996. Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks. *Mutat. Res.* 369, 13-21
6. Darnel j, Lodish H, Baltimore D. 1993. Ediciones Omega SA. 10a Ed. P.p. 156-160.
7. Ku, N.O., Zhou, X., Toivola, D.M., Omary, M.B. 1999. The cytoskeleton digestive epithelia in health and disease. *Am. J. Physiol.* 277, G1108-G1137.
8. Farmer P.B. 2004. DNA and protein aducts as marker of genotoxicity. *Toxicology Letters* 149, 3-9.

9. Fuchs E., Weibel, K. 1994. Intermediate filaments, dynamics, function and disease. *Ann. Rev. Biochem.* 63, 345-382.
10. Fraga. M.F., Ballestar Esteban., Esteller Manel, 2003. Capillary electrophoresis-based method to quantitate DNA-protein interactions. *Journal of Chromatography B*, 789, 431-435.
11. Gao J, Mrksich M, Mammen M, Whitesides G. Affinity capillary electrophoresis: Using capillary electrophoresis to study the interactions of proteins with ligands. 1998. *High Performance Capillary Electrophoresis*, Mortenza G Khaledi. Chemical Analysis series. Vol. 146. p.p. 947-971.
12. Geisler N, Xhunenmann J, Weber K, 1992. Chemical crosslinking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *Eur.J. Biochem.* 31:319-362
13. Hughes Michael F. 1994. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133(2002)1-16
14. Hermann, H., Aebi, U. 2000. Intermediate filaments and their associates: multitasking structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 79-90
15. Hesse M, Magin T.M., Weber K, 2001. Genes for intermediate filament proteins and draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin 8 and 18. *J. Cell Sci.* 114: 2569-2575
16. Iwaka, K. 2003. CK18 degraded products are detected in breast cancer and correlate with aggressiveness.

17. López M.A., 2004. Inducción de aductos DNA-proteínas por monometil arsénico (MMA) en cultivos de cortes de hígado. FESC 1. UNAM.
18. Manahan S.E., Toxicology chemistry, second edition, Lewis publishers, Inc., 2003
19. Merk O, Speit G. 1998. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 32:260-268
20. Minko Irina G y cols, 2001, Incision of DNA-protein cross-links by UVrABC nuclease suggest a potential repair pathway involving nucleotide excision repair PNAS. 99:1905-1909.
21. Murray R, Granner D, Mayes A, Rodwell B. 2001. Bioquímica de Harper. 25ª Edición. Editorial Manual Moderno. Pags 844 y 845.
22. Nakamichi I., Hatekeyama, S., Nakayama, K.I. 2002. Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Molecular Biology of the Cell* 13, 3441-3451.
23. Omary, M.B., Ku, N.O., Toivola, D.M. 2002. Keratins guardians of the liver. *Hepatology* 35(2), 251-257.
24. Ramaekers C.S., Bosman, F.T. 2004. The cytoskeleton and disease. *Journal of pathology* 204, 351-354.
25. Ramírez P., Del Razo, L.M., Gutierrez Ruiz, M.C., Gonsébat, M.E. 2000. Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis* 24(4), 701-706.

26. Schmitz O.J., Theophil C.C., Stach D., Wiebler M. Capillary electroforesis 2002. Analysis of DNA Adducts as Biomarkers for carcinogenesis. 2002, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 3.
27. Skoog. 2001. Principios de análisis instrumental, McGraw Hill. 5ª Ed.
28. Strelkov S.V., Herrmann H., Aebi U. 2003. Molecular architecture of intermediate filaments. *BioEssays.* 25:243-251
29. Steinert, P.M., Marekov, L.N., Parry, D.A. 1993. Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol. Chem.* 268, 24916-24925
30. Kyte J. 2007. Structure in protein Chemistry. Garland Science. 2da Ed. p.p. 820-821.
31. Stumptner, C., Omary, M.B., Fickert, P., Denk, H., Zatloukal, K 2000. Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a Mallory body mouse model. *Am. J. Pathol.* 156, 77-90
32. Voitkun V, Zhitkovich A. 1999. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutation Research* 424, 97-106.
33. Yuan, S.S., Hou, M.F., Chang, H.L., Chan, T.F., Wu, Y.H., Wu, Y.C., Su, J.H. 2003. Arsenic induced nitric oxide generation is cell cycle dependent and aberrant in NBS cells. *Toxicol. In Vitro.* 17, 139-143
34. <http://web.udl.es/dept/medicina/sedaicmf/sedai/fluor.htm>
35. http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mrgarcia/Analisis/EC-2005-2006.pdf.
36. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/fluorocromos.htm>