

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

Facultad de química

ACTIVACIÓN DE LA MAPK-P38 DE EUGLENA GRACILIS POR  
EXPOSICIÓN A CLORURO DE CADMIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA:

VALÉRIE THIBERT VERA



MÉXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES AÑO 2005  
FACULTAD DE QUIMICA

m351964



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.

Jurado asignado:

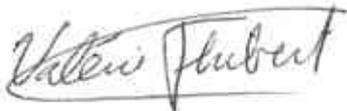
Presidente : Prof. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR  
Vocal : Prof. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ  
Secretario : Prof. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO  
1er. Suplente : Prof. RICARDO JASSO CHÁVEZ  
2º. Suplente : Prof. DAVID GUILLERMO MENDOZA COZÁTL

El tema se desarrolló en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Ciudad Universitaria en la UNAM.

Esta tesis se realizó con el apoyo del donativo  
DGAPA IN 218303



Asesor del tema: María Eugenia Torres-Márquez



Sustentante: Valérie Thibert Vera

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Valérie Thibert Vera

FECHA: 09 diciembre 2005  
FIRMA: Valérie Thibert

**Agradecimientos:**

A mis padres Michel y Luz Elena por el apoyo incondicional que siempre he recibido de ellos y en especial para mis estudios profesionales.

A mis hermanos Nathalie y François por aguantar mis tensiones durante la carrera... Los quiero mucho.

A toda mi gran familia por su cariño.

A Rodrigo por su paciencia y por todo el apoyo y el amor que me ha brindado.

Por supuesto a mi asesora la Dra. Maria Eugenia Torres Márquez que me ayudo muchísimo a apreciar la bioquímica y a entenderla mejor.

Y no olvido a Alicia y Juan-Carlos que me brindaron su ayuda durante mi experimentación.

## ÍNDICE

JURADOS	2
AGRADECIMIENTOS	3
INDICE	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
1- ANTECEDENTES	8
1.1- Las cinasas de proteínas o proteín-cinasas y las cascadas de señalización	8
1.2- La MAPKp38	12
1.3- Estrés por metales pesados y mecanismos de defensa	13
1.4- <i>Euglena gracilis</i>	15
1.5- Cascada de señalización en <i>E. Gracilis</i> con MAPKp38 y estrés por metales pesados	17
2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
- Hipótesis	20
- Objetivo general	20
- Objetivos particulares	20
3- PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1- Reactivos y material	21
3.2- Desarrollo experimental	22
3.3- Metodología global	23
4- RESULTADOS OBTENIDOS	26
4.1- Identificación de una cinasa semejante a MAPKp38	26
4.2- Tiempos largos	29
4.3- Tiempos cortos	31
4.4- Curvas de crecimiento	33
5- DISCUSIÓN	39
6- CONCLUSIONES	44
7- BIBLIOGRAFÍA	45
8- APÉNDICES	49

## RESUMEN

Se ha observado que el protozooario *Euglena gracilis* tiene una importante tolerancia a algunos metales pesados y una de sus respuestas es la síntesis de agentes quelantes como fitoquelatinas y glutatión. Considerando que el sub-grupo de cinasas activada por mitógeno (MAPK) denominado p38 responden a estímulos asociados con estrés, se analizó la presencia de una cinasa con características similares a las de una MAPKp38 en *E. gracilis* y su respuesta frente al estrés por cadmio. Se realizó la inmunoprecipitación e identificación de una cinasa con características de una MAPKp38, con un peso molecular de 38kDa, con actividad de cinasa, reconocida por anticuerpos específicos de pMAPKp38 e inhibida por el inhibidor SB203580. Al realizar cultivos de *E. gracilis* en presencia o ausencia de cloruro de cadmio 200  $\mu\text{M}$ , se pudo observar en los cultivos con cadmio, la activación de esta cinasa a partir de una hora de exposición y que dicha activación se mantenía en niveles altos indicando que la exposición a metales pesados induce respuestas del tipo estrés. En un segundo tipo de células, unas células pre-adaptadas a una concentración 1.5 $\mu\text{M}$  de cloruro mercuríco, se pudo notar una activación de la cinasa semejante a una MAPKp38, aún al estar en un medio sin metales pesados, sugiriendo que existe un cambio permanente en la *E. gracilis* generado por el contacto con mercurio. El uso del inhibidor SB203580 *in vivo*, muestra que a una concentración de 340 $\mu\text{M}$  el efecto es tóxico aunque esto no se puede relacionar directamente con la cinasa semejante a una MAPKp38.

## INTRODUCCIÓN

Los metales pesados son sumamente tóxicos para el ser humano así como para los organismos vivos, en particular el mercurio y el cadmio, pues la toxicidad de estos metales se basa en su unión a proteínas abatiendo sus funciones. Sin embargo, algunos organismos son capaces de tolerar a dichos metales e incluso llegan a ser resistentes por su gran capacidad de adaptación, un caso particular sería el protozooario *Euglena gracilis* (Navarro *et al.*, 1997, Áviles *et al.*, 2003). Algunos mecanismos de defensa contra los metales pesados son el impedimento del paso del metal a través de la membrana hacia adentro de la célula, o la disminución de su transporte, la expulsión activa, la compartimentalización de los metales en algunos organelos, y otro método importante es la formación de quelatos que engloban a los metales que son proteínas o péptidos como metalotioninas y fitoquelatinas, volviéndolos menos tóxicos. Se ha podido ver que la cinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 activa a algunos factores de transcripción para la activación de la síntesis de fitoquelatinas y sus precursores (Torres-Márquez *et al.*, 2001).

Las proteína cinasas son enzimas que reconocen a otras proteínas específicamente y que fosforilan residuos de serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr) e histidina (His), provocando una activación o una desactivación, de acuerdo al caso, de vías de transducción de señales particulares. Hay varios tipos de cinasas, el primer tipo son las de serina-treonina, de éste se desprende la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Una característica típica de las MAPK es que requieren una fosforilación previa por cinasas anteriores a éstas en la cascada de fosforilación. Existen tres familias de MAPK, y una de ellas son las MAPKp38; la MAPKp38, tiene un peso molecular de 38kDa, de allí viene su nombre, su región consenso tiene la secuencia: treonina-glicina-tirosina, Thr-Gly-Tyr (Torres-Márquez *et al.*, 2001). La respuesta de las MAPKp38 proviene de estímulos asociados con estrés como radiación ultravioleta, choques de calor y otros; por esta razón se le nombra a esta familia proteína cinasas activadas por estrés. Los sustratos más comunes de las MAPK son diversos factores de transcripción, es decir proteínas que modulan la expresión de genes. Para el caso de la MAPKp38, se piensa que activa la síntesis de fitoquelatinas y sus precursores, que quelatan a metales, como sería el caso del contacto con cadmio.

Se puede pensar que la MAPKp38 se activa frente a un estrés por metales pesados ya que es parte de cascadas de señalización de respuesta a estrés, además, sería interesante observar el comportamiento de dicha cinasa en un organismo con alta tolerancia a metales pesados, por ello nuestro objetivo es el de determinar la activación de la MAPKp38 en el mecanismo de respuesta a metales pesados en *Euglena gracilis*.

## 1- ANTECEDENTES

### 1.1) Las cinasas de proteínas o proteín-cinasas y las cascadas de señalización

Algunos fenómenos como la apoptosis, el crecimiento de las células y su diferenciación, son regulados por señales que provienen del exterior de la célula; la información se transfiere en la célula a través en una red de cruces entre vías de señalización que se conoce como transducción de señales. Las células reciben estas señales extracelulares por contacto con otras células, o por interacción con sustancias al interior de la célula, o finalmente, por el estímulo con un factor de señalización soluble (Heldin, 2000). Una cascada de señalización es un sistema de moléculas, por ejemplo proteínas transductoras, que unen la recepción de una señal externa con la respuesta celular (Ferrell, 1999). Estas cascadas de señalización pueden amplificar, filtrar, integrar y caracterizar las señales que se transmiten.

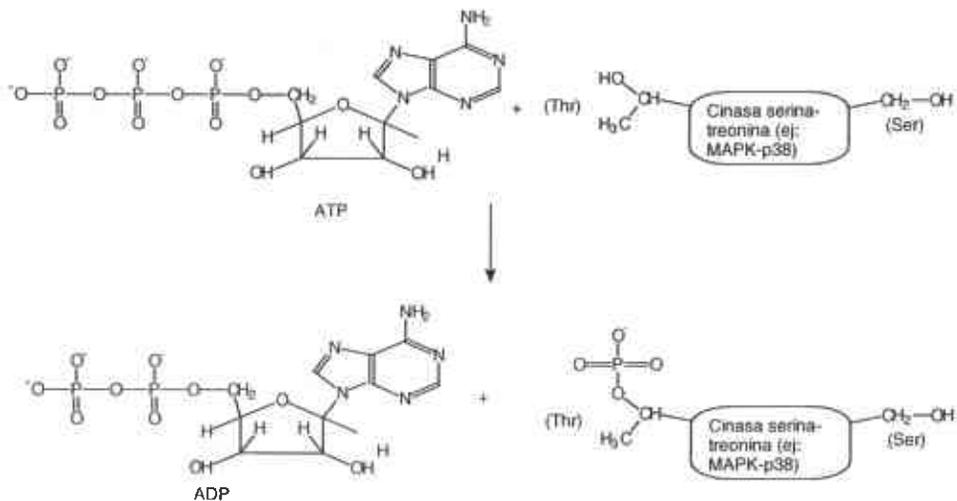
Las cascadas de transducción de señales inician con una señal externa a la célula que activa a los receptores. Los organismos pueden recibir señales gracias a estos receptores que en general se encuentran a nivel de las membranas celulares: provocan una serie de eventos comúnmente llamada cascada de señalización, que modifican la actividad celular o metabólica para responder al estímulo dado. Los componentes celulares de una cascada de señalización son los receptores en donde se recibe la señal, los transductores que comunican la información dentro de la célula, y los efectores que responden al estímulo inicial. Un ejemplo de receptores serían los receptores de interleucinas, también conocidos como receptores de citocinas, dentro de los transductores de esta vía pueden encontrarse algunas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), y los efectores de respuesta serían los factores de transcripción que son activados por dichas cinasas (Heldin, 2000).

Las proteínas denominadas cinasas participan dentro de estas cascadas catalizando la transferencia de un grupo fosfato de un polifosfato como el fosfato gama del ATP a algún terminal receptor específico que puede ser un átomo de oxígeno, de nitrógeno o de azufre, dentro de una proteína blanco (Metzler, 2001); por ejemplo, las MAPK suelen activar a factores de transcripción, que son proteínas que modulan la transcripción de genes, al fosforilarlos (Woodgett, 2000). Las cinasas gobiernan la regulación de procesos esenciales en la célula por esta transferencia (Sowadski *et al*, 2000).

Las proteína-cinasas, ó ATP fosfotransferasas, reconocen entonces a sus proteínas blanco específicas y las fosforilan en residuos de serina, treonina o tirosina particulares provocando una activación o una desactivación, de acuerdo al caso, de las vías de transducción de señales. Existen tres clases principales de cinasas que fosforilan a proteínas: las de serina-treonina que transfieren un fosfato de ATP a un residuo de serina o de treonina de la proteína blanco y se asocian abundantemente con señalizaciones en el citoplasma; las de tirosina que transfieren un fosfato de ATP a un residuo de tirosina de la proteína blanco y varios receptores de membrana se autofosforilan al ser activados por factores de crecimiento y otros ligandos; y las de especificidad dual que transfieren fosfato de ATP a unos residuos de treonina y de tirosina de la proteína blanco (Sowadski *et al*, 2000). La fosforilación reversible de proteínas es la base química de una gran cantidad de señales de transducción tanto en eucarionte como en procariontes. En células eucariontes las proteínas se fosforilan principalmente en las cadenas laterales de serina, treonina o tirosina; en cambio, en células procariontes existe un mecanismo de dos componentes en donde se fosforila primero una cadena lateral de histidina y luego se transfiere el grupo fosfato a un aspartato. Es frecuente la observación de esta dicotomía pero no es absoluta ya que se encuentran cinasas de histidina/aspartato en eucarionte y cinasas serina/treonina en procariontes (Hengge, 2003).

La fosforilación se lleva a cabo gracias al grupo  $-OH$  del residuo de interés, serina, treonina o tirosina, un ejemplo muy esquematizado de la reacción es el que se puede observar en la figura 1-A: una molécula de ATP en contacto con la cinasa (modelo muy simplificado) de serina-treonina provoca la fosforilación de dicha cinasa activándola para que a su vez fosforile a otras proteínas. La cinasa debe ser representada como una estructura en tres dimensiones en cuyo sitio activo se encuentra el residuo que se va a fosforilar, activando así a la cinasa, y todos los demás residuos necesarios para la catálisis. Una vez que se tiene en ésta un grupo fosfato, puede transferirse a su sustrato. En realidad, es un esquema muy simplificado ya que las reacciones de desplazamiento nucleofílico de fósforo, como sería el caso de la transferencia de un grupo fosfato de ATP hacia una proteína, son más complejas. Las ATP fosfotransferasas se forman por dos dominios con plegamientos variables que tienen cavidades profundas que contienen a los sitios activos;

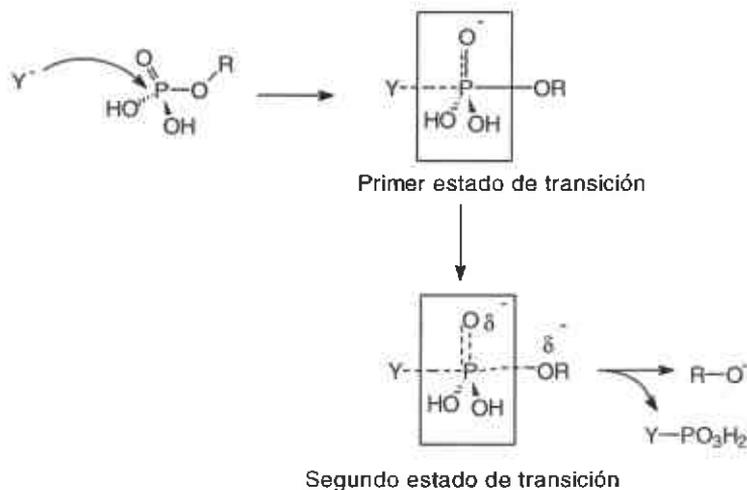
en el mecanismo de reacción de las ATP fosfotransferasas, se sugiere que dichas enzimas reconocen y atrapan a sus dos sustratos, el ATP y la



**Figura A-1:** Reacción de fosforilación de las cinasas de serina-treonina

proteína blanco, y después se cierran las cavidades del sitio activo para colocar a los sustratos en una posición adecuada para que se lleve a cabo la reacción (Metzler, 2001). Para la reacción de sustitución nucleofílica existen dos mecanismos posibles que serían el mecanismo asociativo o  $S_N2$  y el mecanismo disociativo o  $S_N1$ . En este caso, al ser una reacción enzimática, el mecanismo por el cual se realiza la sustitución es asociativo debido a que las enzimas permiten la colocación de los sustratos alineados adecuadamente para este mecanismo. En la figura A-2 se puede observar una ecuación general de sustitución nucleofílica pero se considera la posibilidad de tener un segundo estado de transición ya que el fósforo, a diferencia del carbono, puede tener una valencia de cinco. El nucleófilo  $Y^-$ , que en este caso sería el residuo de serina, treonina o tirosina de la proteína blanco, ataca al fósforo del grupo fosfato gamma del ATP pues al estar rodeado de oxígenos que son más electronegativos, tiene una carga parcial positiva; se forma entonces un estado de transición en donde  $Y^-$ , el fósforo gamma y lo que sería el ADP se encuentran alineados, después, se desprende el ADP obteniendo así la sustitución nucleofílica en el fósforo (Metzler, 2001). Cabe mencionar que la reacción requiere comúnmente de iones  $Mg^{2+}$  para neutralizar las

cargas negativas de los oxígenos del ATP que podrían aumentar la nucleofilia del grupo ADP obstaculizando la sustitución.



**Figura A-2:** Mecanismo de sustitución nucleofílica asociativa o  $S_N2$ . El nucleófilo  $Y^-$  ataca al fósforo que se encuentra deficiente de electrones, se forma entonces un primer estado de transición pentavalente relativamente estable; en un segundo estado de transición, la carga negativa se distribuye en todos los enlaces P-O, finalmente se desprende el producto de la sustitución nucleofílica.

A pesar de que existe una cantidad enorme de cinasas y de que su regulación es compleja, existe un alto grado de conservación en la evolución no solo de las cinasas sino que también de las vías en que participan. En muchos casos las cinasas tienden a activarse en serie en las cascadas de señalización, esta organización en cadena de cinasas sirve para que se presenten entrecruzamientos, diversas respuestas y se preserve la especificidad (Woodgett, 2000).

## 1.2- La MAPKp38

Del primer tipo de cinasas, las de serina-treonina, se desprende la familia de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas MAPK tienen una alta conservación entre los organismos y sus pesos moleculares oscilan entre 38-55 kDa. Las subfamilias tienen grandes similitudes con una homología del 40% (Torres-Márquez *et al.*, 2001). La activación de las MAPK se realiza por diferentes cinasas en una región en donde se tiene la secuencia treonina-Xaa-tirosina, Xaa es un aminoácido que varía de acuerdo a la subfamilia considerada (Torres-Márquez *et al.*, 2001). La cascada de señalización de las MAPK se forma básicamente con tres cinasas: la MAPK, las cinasas que fosforilan a la MAPK, es decir las MKK o MEK, y las cinasas que fosforilan a las MKK o MEK que se conocen como MKKK. Existen tres familias de MAPK que son: las que se activan por estímulos extracelulares y que se encuentran involucradas en procesos de proliferación (ERK1/2), las que son activadas por estrés de tipo metabólico y fosforilan el N-terminal de c-JUN (SAPK/JNK), y las MAPKp38 que participan en fenómenos de estrés celular. Una característica típica de las MAPK es que requieren una fosforilación previa por cinasas anteriores a éstas en la cascada de fosforilación.

La MAPKp38, forma parte de una subfamilia de las MAPK y tiene un peso molecular de 38kDa, de allí viene su nombre. Su región consenso tiene la secuencia: treonina-glicina-tirosina y de esta clase de cinasas se conocen 4 isoformas que tienen algunas características que las diferencian. Las cinasas que fosforilan a las MAPKp38 son las MKK3 y MKK6 (Woodgett, 2000), y la respuesta de las MAPKp38 proviene de estímulos asociados con estrés como radiación ultravioleta, choques de calor y otros; por esta razón se le nombra a esta familia protein-cinasas activadas por estrés. Los sustratos más comunes de las MAPK son diversos factores de transcripción, es decir proteínas que modulan la expresión de genes. Para el caso de las MAPKp38 también pueden fosforilar a otras cinasas. Algunos ejemplos de factores de transcripción que son fosforilados por este tipo de MAPK serían: el factor de transcripción de la familia C/EBP que se activa induciendo la diferenciación de eritrocitos por eritropoyetina, el factor activador de transcripción 2, la proteína básica de mielina, el factor de transcripción del complejo ternario, formado entre otros por los factores de respuesta al suero y elementos de respuesta al suero; algunos ejemplos de proteínas cinasas fosforiladas por la MAPKp38 serían: la MAPKAP cuya fosforilación

induce por ejemplo la fosforilación de una proteína de choque térmico como respuesta al estrés oxidativo. La MAPKp38 también tiene un papel en la apoptosis que depende del tipo de inducción y del tipo de célula, y además es selectiva (Torres-Márquez *et al.*, 2001). Entonces, la MAPKp38 es de gran importancia en las respuestas al estrés ya sea induciendo factores de transcripción o a otras cinasas cascada abajo. Entre las respuestas en que participa la MAPKp38 se encuentran, la diferenciación celular, la apoptosis y la secreción de citocinas. De aquí surge el interés por estudiar las vías que conducen a su estimulación y los elementos posteriores a ésta.

### 1.3- Estrés por metales pesados y mecanismos de defensa

Los organismos vivos pueden sufrir de estrés debido a cambios del ambiente que los rodea. Esto quiere decir que existen tensiones dañinas para dichos organismos que van desde la temperatura, el flujo de agua, el viento, hasta la presencia de sustancias tóxicas como metales pesados. Los tipos de estrés se clasifican a como abióticos o ambientales, y bióticos o biológicos (Rhodes y Nadolska Orczyc, 1999). Los abióticos o ambientales son los que dependen de condiciones del ambiente en que se encuentra el organismo, y los bióticos o biológicos son los que se basan en la convivencia con otros seres vivos. Cuando se encuentra un organismo en presencia de metales pesados se considera que se trata de un estrés abiótico.

Los metales pesados se definen como aquellos metales que tienen una densidad superior a  $5 \text{ gcm}^{-1}$  (Herrera Estrella *et al.*, 1999). Todos ellos son tóxicos a altas concentraciones por lo que los organismos tienen que responder activamente para protegerse del envenenamiento en sitios contaminados. Entre los metales pesados se encuentran el cadmio y el mercurio, este último es conocido por ser uno de los metales más tóxicos para el ser humano así como para muchos otros organismos. El cadmio se encuentra dentro del segundo periodo de transición y es considerado con el plomo y el mercurio, como uno de los tres grandes venenos entre los metales pesados. Este metal siempre se encuentra con un estado de oxidación de +2 en sus compuestos. Al encontrarse justo debajo del zinc en la tabla periódica de los elementos, el cadmio tiene un comportamiento similar al del zinc y esto puede formar parte de su toxicidad pues el zinc es un elemento esencial que puede ser

sustituido por el cadmio (Manahan, 1992). El cadmio ataca principalmente al hígado, los riñones y los huesos. Este metal se acumula en el cuerpo con una vida media entre 20 y 30 años en el ser humano y afecta a ciertas enzimas responsables de la absorción de proteínas en los riñones. También ataca a otras enzimas importantes en el metabolismo energético. El cadmio se utiliza para recubrir metales contra la corrosión, como un constituyente de baterías, y en la manufactura de ciertos plásticos. Otro metal pesado muy tóxico es el mercurio y se encuentra justo abajo del cadmio en la tabla periódica y tiene muchos usos como en lámparas de mercurio, bombas de vacío, válvulas, sellos, entre otros, y también los derivados de este metal tienen usos interesantes. Se puede inhalar al mercurio elemental y los compuestos inorgánicos de mercurio se pueden absorber por el intestino. El Hg(O) se acumula generalmente en el cerebro pues es liposoluble, mientras que el Hg(II) tiende a acumularse en los riñones (Manahan, 1992). El mercurio, como el cadmio, tienen una fuerte afinidad por los grupos sulfidrilo de las proteínas como las enzimas, la hemoglobina y la albúmina, afectando sus funciones. La presencia de mercurio en el cuerpo afecta al sistema nervioso dañando a la barrera hematoencefálica. Esto muestra bien que estos dos metales pesados son sumamente tóxicos para el ser humano así como para los organismos vivos pues la toxicidad de estos metales se basa en su unión a proteínas y tejidos y estas moléculas son muy similares entre diversas especies.

A pesar de estar tratando con sustancias de alta toxicidad, algunos seres vivos han encontrado mecanismos de defensa frente a los metales pesados: se puede unir el metal a la pared celular o a la cara externa de la membrana plasmática impidiendo su paso hacia el interior celular, otra posibilidad es que se reduzca el transporte a través de la membrana celular, también existe la expulsión activa por medio de la cual se permite que salga una mayor cantidad del metal de la que entra en la célula, además también se puede compartimentalizar al metal para que quede secuestrado en algunos organelos, igualmente existe la posibilidad de quelar al metal por proteínas o péptidos como metalotioninas y fitoquelatinas, compuestos orgánicos como sulfuro o fosfato, volviéndolo menos tóxico, y finalmente existe la opción de precipitar y atrapar a los metales por secreción de compuestos en el medio extracelular (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999). En el caso particular del mercurio, diversos organismos lo pasan a un estado de oxidación 0 que es menos tóxico que el Hg(II).

#### 1.4 – *Euglena gracilis*

Algunos organismos, al exponerlos a metales pesados sin llegar a una dosis letal, llegan a adquirir una cierta tolerancia e incluso llegan a ser resistentes a dicho estrés adaptándose así a su medio. A este fenómeno se le llama aclimatación (Herrera Estrella *et al.*, 1999). Un ejemplo bastante particular es el de la *Euglena gracilis*, pues se ha estudiado que dicho organismo puede preadaptarse a la presencia de mercurio para darle una mayor tolerancia después a otros metales pesados como cadmio (Navarro *et al.*, 1997). Este organismo se clasifica como un protozoario. Es capaz de vivir en un medio con o sin luz, teniendo cloroplastos y mitocondrias al vivir en un medio con luz, y únicamente mitocondrias al vivir en la oscuridad. Puede ser entonces un organismo cuya fuente energética es la fotosíntesis es decir un autótrofo, o puede alimentarse por el medio en el que vive con fuentes de carbono diferentes del CO<sub>2</sub> es decir un heterótrofo (Navarro *et al.*, 1997), esta es una de las características de la especie de *Euglena gracilis*.

Otras características de la *Euglena gracilis* es que se tiene un flagelo que por tanto le permite nadar para encontrar su comida, ver figura A-3; por otro lado tiene una especie de ojo fotoreceptor que le sirve para localizar la luz (Buetow, 1999). *Euglena gracilis* vive en el agua dulce, incluso en los charcos, y puede ser un signo de que el agua en que se encuentra está contaminada pues come algas y se amalgama formando suspensiones verdes.

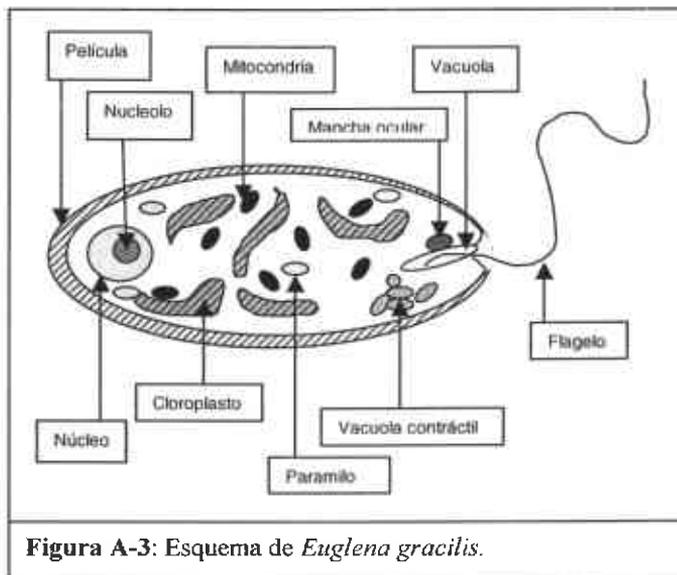


Figura A-3: Esquema de *Euglena gracilis*.

Por el medio en el que vive la *Euglena*, se dice que es un protozoo de vida libre, es decir que no es parásito y el hecho de vivir en un medio que puede cambiar mucho hace que se pueda adaptar a circunstancias difíciles como cambios bruscos de concentración de componentes del ambiente en el que vive. Esta adaptación es característica del género pues se encuentran especies que viven en aguas residuales, en la nieve, en aguas de mina de carbón que son muy ácidas. En particular, la especie *E. gracilis* sobrevive a temperaturas de 1°C a 38°C y pH de 2.3 a 11 (Buetow, 1999). De misma manera se puede pensar que se adapta posiblemente a la presencia de metales pesados por lo cual es interesante estudiar dicha interacción.

Los organismos celulares del género *Euglena* tienen una estructura compleja y muestran características tanto animales como vegetales. Las diversas especies conocidas son asexuales y se reproducen por fisión binaria (Buetow 1999). La especie de *Euglena gracilis* tiene una longitud de aproximadamente 50µm y un ancho de aproximadamente 10 µm con una apariencia alargada, ver figura 2. Los cloroplastos de esta especie son lábiles y se pueden perder fácilmente, por lo tanto, esta especie puede perder su color por varios agentes como temperatura arriba de 34°C, o antibióticos.

Se llega a asumir que la mayoría de las mutaciones de la *Euglena* no son cromosómicas y que provienen más bien de los genomas de mitocondrias o de plástidos. Como la *Euglena* es un aerobio y requiere de oxígeno para sobrevivir, las mutaciones a nivel de la mitocondria que afecten sus funciones serían letales, en todo caso para las que se cultivan a oscuras. Además, teniendo más de 500 mitocondrias por célula, es poco probable que una mutación en una mitocondria se segregue para formar una línea celular (Schiff *et al.*, 1968). Experimentalmente se sugiere que las mutaciones a nivel del genoma de cloroplastos son las que se observan, y se asume generalmente que sucede lo mismo con el DNA de plástidos.

Un mutante es aquella cepa que tiene una alteración de su fenotipo que es heredable. Existen diversos tipos de mutantes de *Euglena* que se han clasificado como: mutaciones que afectan el color de la colonia, mutaciones que afectan las funciones fotosintéticas, mutantes resistentes a fármacos, mutantes sin movimiento, mutantes resistentes a la temperatura, mutantes auxotrópicos, mutantes de morfología celular y mutantes de

morfología colonial. Al mutante, para identificarlo, se le da un código de cuatro letras que describe el fenotipo de aislamiento, que depende de la clasificación anterior, la especie parental, el mutágeno utilizado y si se ha cultivado al mutante con o sin luz (Schiff *et al.*, 1968). La especie parental puede ser B de *Euglena gracilis* Klebs var. *bacillaris*, Pringsheim, o Z de *Euglena gracilis* Klebs, cepa Z, Pringsheim.

Por las características señaladas en los párrafos anteriores, se puede notar que este microorganismo es fácil de cultivar. Además fue uno de los primeros microorganismos domesticados para el uso en el laboratorio, se regenera en 10 a 25 horas. Sus propiedades dependen del medio en el que se le cultiva, y como tiene una gran flexibilidad en morfología, fisiología y bioquímica, es un organismo bastante popular. Como se pueden aislar diversos organelos de esta especie, se permite un estudio de procesos biológicos y bioquímicos a nivel del núcleo y de organelos subcelulares. Además se pueden hacer distinciones entre esta especie y los eucariontes más evolucionados para adquirir información relativa a evolución (Buetow, 1999).

A la *Euglena* se le han dado usos diversos: se ha utilizado para ensayos de determinación de vitamina B12, para monitorear radiaciones ultravioletas y solares artificiales, es un sistema de purificación de aguas contaminadas, sirve de bioreactor en la producción de vitamina E y para la transformación de terpenoides y compuestos asociados.

1.5- Cascada de señalización en *E. gracilis* con MAPKp38 y estrés por metales pesados.

*E. gracilis* tiene una tolerancia importante a algunos metales pesados (Navarro *et al.*, 1997). Anteriormente, para empezar a elucidar el mecanismo que tiene este organismo para tolerar al mercurio, se realizó un estudio (Devars *et al.*, 2000) del cual se obtuvo como conclusión que en realidad la volatilización biológica del mercurio no es un mecanismo realmente efectivo para su eliminación por el protozoario; sin embargo, se observa un alto contenido de glutatión en la célula. En otro trabajo (Áviles *et al.*, 2003), se encontró que las células de *E. gracilis* que se exponen por varias generaciones a una dosis ligera de mercurio (II) adquieren un cambio permanente que mejora su resistencia a un estímulo posterior con cadmio. En estos estudios se pudo observar que hay una compartimentalización del cadmio en las mitocondrias y que además aumentan los niveles de malato, cisteína y glutatión en la

célula y la mitocondria. De aquí se deduce que podrían existir dos mecanismos de tolerancia del organismo a los metales pesados: por un lado hay compartimentalización del metal y además se están sintetizando compuestos quelantes. Por lo que se observa en ese estudio, parece haber una modificación permanente dentro del mecanismo de respuesta de *E. gracilis* frente a metales pesados al tener una exposición previa a mercurio.

Para entender la interacción de la *Euglena gracilis* frente a metales pesados, se tiene que pensar en la posibilidad de una cascada de señalización que explicase estos hechos. A continuación, se puede observar un esquema simplificado de lo que esto significa y en qué parte entrarían las MAPK en la figura A-4.

Este esquema es muy simplificado y representa lo que podría estar pasando como respuesta al estrés por metales pesados. El primer paso es el estímulo de cadmio en la membrana celular, este cadmio puede estar penetrando en la célula, incluso se ha podido estudiar que efectivamente se acumula en las células de *Euglena gracilis* (Navarro *et al.*, 1997), y una de las posibles entradas de dicho metal pueden ser los canales receptores de otros metales con carga similar, en particular el zinc. Esto provocaría la activación de diversas cinasas, como son las dos descritas anteriormente, es decir la MKKK y la MKK o MEK, hasta llegar a la MAPKp38 que a su vez toma una vía para activar algunos factores de transcripción (Torres-Márquez *et al.*, 2001).

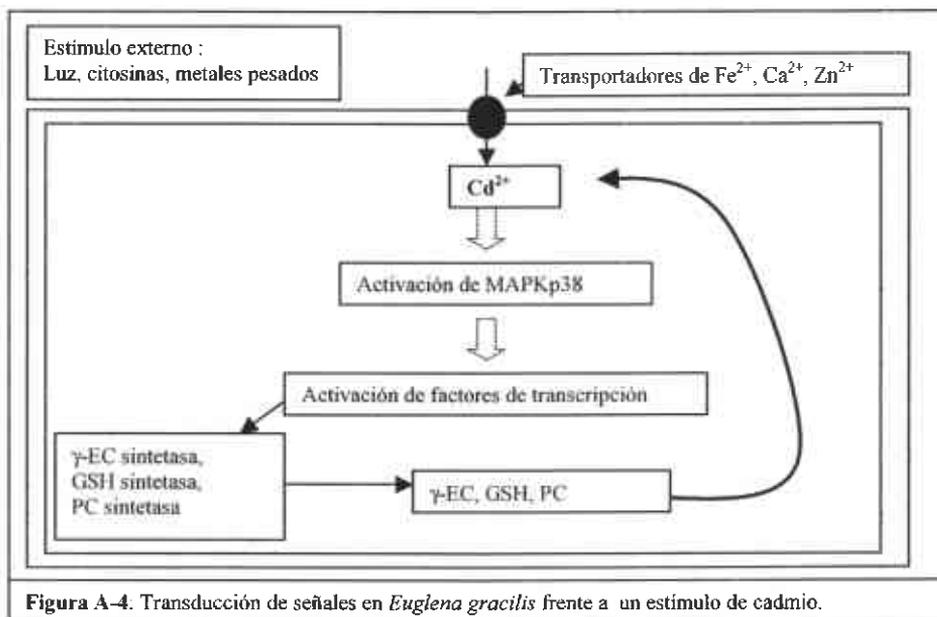


Figura A-4. Transducción de señales en *Euglena gracilis* frente a un estímulo de cadmio.

Los factores de transcripción a su vez, activan a las sintetasas descritas en el esquema y esto permite la síntesis de  $\gamma$ -EC, GSH y PC (fitoquelatinas y sus precursores) (Mendoza-Cozatl *et al.*, 2002). Finalmente, las fitoquelatinas permiten formar quelatos con el metal invasor para inhibir en lo posible los daños que ocasiona (Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999).

En el modelo propuesto ya se han estudiado diversos pasos del mecanismo descrito, pero aun no se sabe si la MAPKp38 se encuentra efectivamente en la cascada de señalización presentada. Por lo tanto, para estudiar como reacciona la *Euglena gracilis* frente al estrés por metales pesados, nos proponemos analizar la presencia de la MAPKp38 en diversos cultivos de este protozoario, que hayan sido expuestos a metales pesados, para demostrar su importancia como factor de respuesta. También se propone ver si la activación de la MAPKp38 es un factor que trasciende con la preexposición a metales pesados.

## 2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

**Hipótesis:** Al estar en contacto con metales pesados como el  $Cd^{2+}$  o el  $Hg^{2+}$ , el organismo *Euglena gracilis* tiene un mecanismo de respuesta en donde interviene una cinasa semejante a MAPKp38.

**Objetivo general:** Determinar la intervención de una cinasa semejante MAPKp38 en el mecanismo de respuesta a metales pesados de *Euglena gracilis* y observar la temporalidad de la activación de la cinasa frente al estímulo de cloruro de cadmio (II).

### Objetivos particulares:

- Montar una técnica de separación e identificación de una cinasa semejante a MAPKp38 de *Euglena gracilis* a partir de técnicas como la electroforesis, inmunoprecipitación, inmunoblot, transferencia de proteínas, y revelado.
- Identificar a la cinasa que se ha separado a través de su ubicación en un western y observando su actividad al estar en presencia de un inhibidor específico.
- Estudiar las diferencias entre los lisados de los cultivos en los diferentes medios: unos controles sin metales pesados, unos controles preadaptados a la presencia de mercurio, unas muestras con presencia de cadmio en organismos sin adaptación y unas muestras con presencia de cadmio en organismos preadaptados a la presencia de mercurio.
- Trabajar a diferentes tiempos de estímulo con cloruro de cadmio (II) durante el cultivo, observando la presencia de una cinasa semejante a MAPKp38 fosforilada con el uso de anticuerpos específicos.
- Analizar el efecto *in vivo* de un inhibidor específico de una cinasa semejante a la MAPKp38 sobre la cinasa estudiada gracias al estudio de la curva de crecimiento de la *Euglena gracilis* en los diferentes medios de cultivo utilizados.
- Deducir como interviene la cinasa semejante a la MAPKp38 de *Euglena gracilis* en la respuesta del microorganismo a un estímulo de  $Cd^{2+}$  200 $\mu$ M.

### 3- PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1- Reactivos y material

Las materias primas para realizar los diferentes amortiguadores provienen de Sigma, Tecsiquim y Baker.

Los anticuerpos para la inmunoprecipitación de MAPKp38 total son policlonales de chivo y provienen de Santa Cruz Biotechnology con número de catálogo sc-535-G, se generaron. Este anticuerpo está dirigido contra los últimos 20 aminoácidos del carboxilo Terminal de la MAPKp38 de ratón y se ha probado por Santa Cruz que reconoce el antígeno en ratón, rata y humano.

Los anticuerpos para el inmunoblot de la MAPKp38 fosforilada son: un anti-fosfo-MAPKp38 de conejo que proviene de Cell Signaling con número de catálogo 9211S, estos anticuerpos policlonales se generaron inmunizando conejos con un fosfo-péptido sintético correspondiente a los residuos alrededor de Thr180/Tyr182 de la MAPKp38 humana, y el segundo anticuerpo es un anti-conejo de chivo de Zymed con número de catálogo 81-6120. La proteína A-sefarosa es de la marca RepliGen y su número de catálogo es el IPA300.

La cristalería y el material de plástico provienen de Corning, Nalgene, Pyrex, Kartell, Wilson.

Se utilizan los agitadores MAXI ROTATOR y ORBIT SHAKER, ambos de Lab-Line Instruments Inc..

Para centrifugar se utiliza una centrífuga Universal 32-R con refrigeración de Hettich Zentrifugen.

Las muestras se congelan en un congelador REVCO a  $-70^{\circ}$  C.

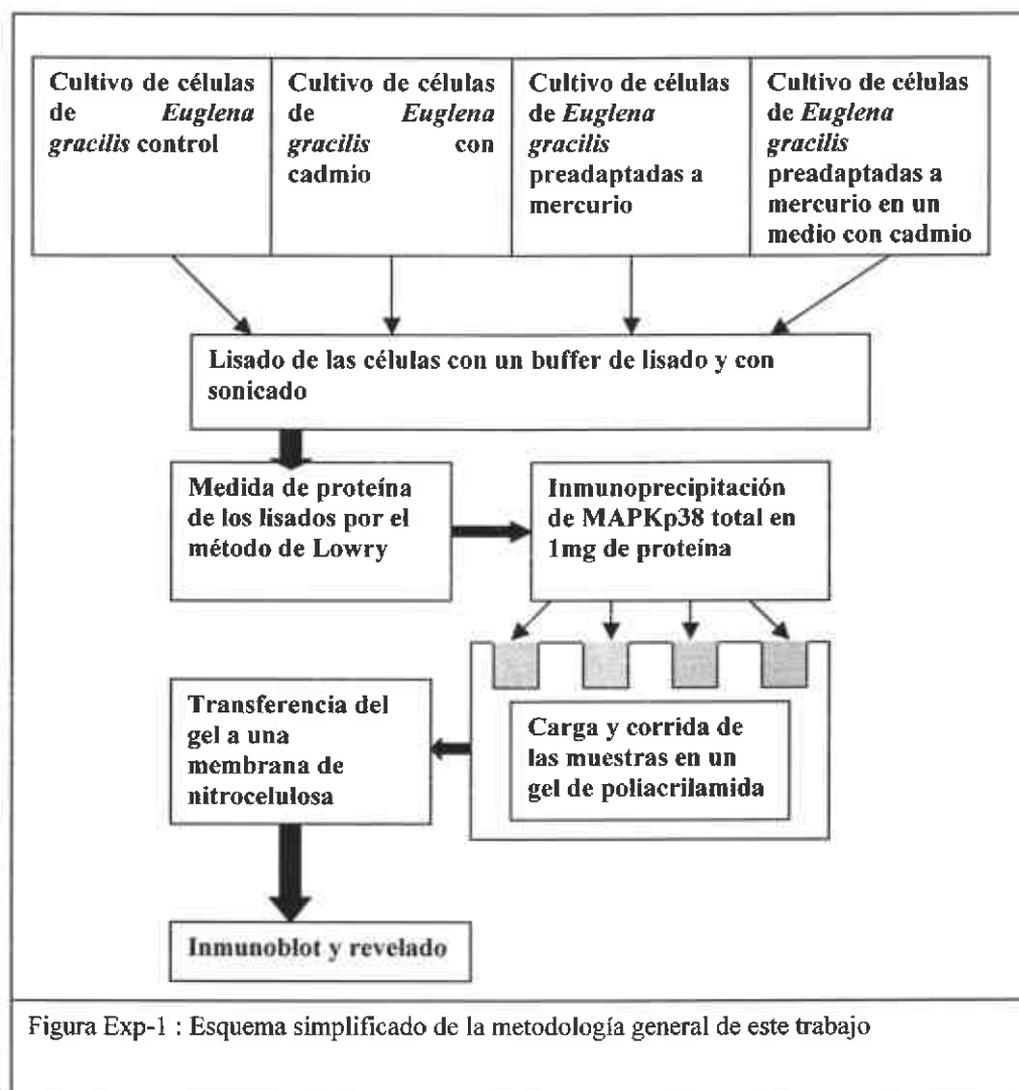
Para los revelados se utilizan placas de Kodak y soluciones de Kodak y de Pierce.

Las cámaras de electroforesis y transferencia provienen de Owl Scientific Products.

El sonicador es un Soniprep 150.

### 3.2- Desarrollo experimental

En esta sección solo se incluye a la figura Exp-1 en donde se resumen en forma de un esquema simple las etapas principales del procedimiento global que se comenta en la sección 3.3.



### 3.3- Metodología global

#### *Cultivos y condiciones de crecimiento*

Lo primero que se lleva a cabo es la siembra de cultivos stock de *Euglena gracilis* Klebs cultivadas a oscuras para los diversos ensayos requeridos. En general las siembras se realizan de 50mL o 100mL de acuerdo a la cantidad de células requeridas en los ensayos posteriores y se mantienen en agitación orbital. El medio en el que se siembran las células es en todos los casos un medio con ácido láctico como fuente de carbono y que contiene vitaminas (Schiff *et al.*, 1971). Se tiene disponibilidad de dos stock: uno control y otro que contiene mercurio en una concentración de  $1.5\mu\text{M}$  de cloruro de mercurio (II). El cultivo se inicia con  $0.2 \cdot 10^6$  células/mL para los controles y de  $0.3 \cdot 10^6$  células/mL para los medios con mercurio (Navarro *et al.*, 1997). Se cambian los cultivos a un medio fresco cada 3 o 4 días. El conteo de células se realiza mediante una cámara de Neubauer con una dilución de 1:10 con agua inmovilizando con ácido clorhídrico concentrado.

Para cada ensayo se prepararon 4 matraces con medio y vitaminas: uno control, uno con cadmio, uno de preadaptadas a mercurio y uno de preadaptadas a mercurio con cadmio. Los ensayos tienen una composición similar a la de los stock, pero en el caso de las preadaptadas a mercurio, ya no se agrega mercurio al medio, y en el caso de las que contienen cadmio la concentración final es de  $200\mu\text{M}$  de cloruro de cadmio (II). En estos ensayos, se variaron los tiempos de cultivo para observar los resultados correspondientes, los tiempos estudiados fueron de 30 minutos, 1, 2, 5, 8, 24, 48 y 96 horas.

#### *Lisado e inmunoprecipitación*

Una vez concluido el tiempo de incubación de cada ensayo, se realiza una centrifugación de las células durante 8 minutos a 4000rpm para eliminar el medio de cultivo. Para romper las células se ocupa un buffer de lisis utilizado anteriormente para la obtención de MAPKp38 (Franco *et al.*, 2001), se realiza todo en frío a  $4^\circ\text{C}$ , y se sonicán las células con pulsos de 30 segundos 12 micrones y 30 segundos de reposo, se repite tres veces el procedimiento.

Para medir proteína se ocupa el método de Lowry que consiste en el uso de reactivo fenólico de Folin y un tratamiento alcalino con cobre en donde se detectan principalmente los residuos de tirosina y de triptofano; la reacción se lleva a cabo en dos pasos: la reacción del cobre en medio alcalino con la proteína y después la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstenico, o reactivo de Folin, con la proteína pre-tratada con cobre en medio alcalino (Lowry et al. 1951). De esta manera se calcula el volumen para tener 1mg de proteína total para inmunoprecipitar. Entonces se le agrega a este volumen de lisado una cantidad de 0.8µL, equivalente a 160ng de anticuerpo policlonal de conejo de MAPKp38 total, es decir no fosforilada y fosforilada, se realiza una incubación, se le agregan después 160µL de proteína A-sefarosa (RepliGen), se incuba, y finalmente se elimina el sobrenadante por centrifugación. Se le agrega a las perlitas de proteína A-sefarosa el buffer de muestra para la corrida de las muestras en un gel de acrilamida de acuerdo a la metodología descrita previamente (Franco R., 2001).

#### *Corrida de gel y transferencia*

Una vez cargados los inmunoprecipitados de los cuatro cultivos en un gel concentrador de acrilamida al 4%, se realiza la corrida en un gel de corrida de acrilamida al 10%, de acuerdo al método de Laemli (1970); utiliza para el gel separador Tris 1.5M pH8.8, y para el gel concentrador Tris 0.5M pH6.8. Se trata de una electroforesis SDS-PAGE y se corre a 30mA. Después se realiza una transferencia a una membrana de nitrocelulosa durante una hora y media a 90V. Finalmente se tiñe el gel con Coomassie y la membrana con Poinceau S para corroborar la eficiencia de la transferencia.

#### *Inmunoblot y revelado*

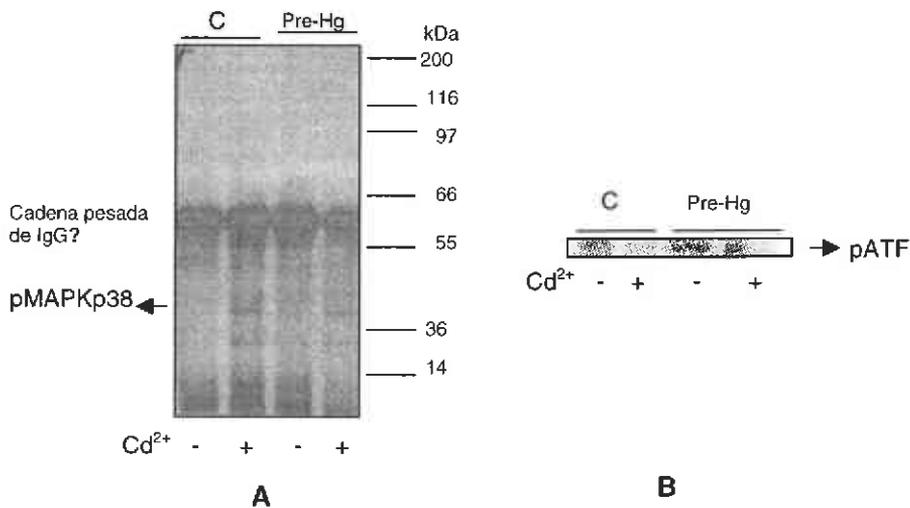
Si la transferencia fue buena, se procede al inmuoblot. Para ello se lava bien a la membrana hasta que no esté roja y entonces se puede poner a bloquear en una solución de TBS con 5% de leche durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Después de esto se agrega el primer anticuerpo que en general es de anti-PMAPKp38 (Thr180/Tyr182) de conejo 1:3000 en TBS, y a veces se ocupa anti-MAPKp38 total en la misma

concentración; se deja incubando toda la noche en el refrigerador. El siguiente día se lava primero a la membrana varias veces con TBS y tween al 0.1% (TBS-T) y luego se le pone el segundo anticuerpo que es antiinmunoglobulina del animal del que proviene el primer anticuerpo unido a una peroxidasa, el anticuerpo está en una concentración de 1:10000 y se incuba media hora a temperatura ambiente. Una vez más se lava bien a la membrana con TBS -T y después con TBS sin detergente. Finalmente se procede al revelado agregando a la membrana luminol y buffer de peróxido, se exponen las placas a la membrana, se revelan, se lavan, se fijan, se vuelven a lavar y se dejan secar para su observación y interpretación.

## 4 - RESULTADOS OBTENIDOS

### 4.1) Identificación de una cinasa semejante a MAPKp38

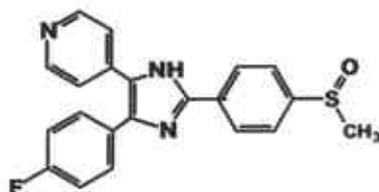
Se ha reportado, en diversos organismos y microorganismos como levaduras, la existencia de la familia MAPK (Woodgett, 2000), sin embargo, para el microorganismo *Euglena gracilis* no se ha reportado aún su existencia. Para poder estudiar la participación de una cinasa semejante a MAPKp38, se utilizaron anticuerpos específicos de MAPKp38 para inmunoprecipitarla y posteriormente ver si se encontraba activa por medio de anticuerpos contra la forma fosforilada o medir su actividad *in vitro*. En el análisis por Western blot, se encontró la banda de una cinasa semejante a la MAPKp38 activada o p-MAPKp38, con un peso molecular de 38kDa que correspondería a la MAPKp38 Ver figura R-1A. En los experimentos donde se utiliza un anticuerpo para inmunoprecipitar una proteína, se espera que si la región inmunogénica con la que se preparó el anticuerpo es reconocida por éste, la proteína deberá precipitarse, con otras proteínas que puedan acompañarla, de tal manera que encontrar una banda con el peso molecular esperado es una evidencia un tanto indirecta de la presencia de la proteína de interés. No obstante, en la membrana el anticuerpo que se utilizó para reconocer a la proteína semejante a la MAPKp38 es diferente al utilizado para la precipitación y generado contra la región que se encuentra fosforilada en la proteína activa (pTre180/pTyr182), que vale la pena resaltar se encuentra altamente conservado en la escala filogenética (Chang *et al*, 2002), lo cual impone una cierta restricción al reconocimiento inespecífico. Considerando lo débil que puede ser aun esta evidencia fue interesante corroborar que una actividad de cinasa que utiliza un sustrato, reconocible por la MAPKp38 (factor activador de transcripción 2 -ATF), se encontraba presente en el inmunoprecipitado; ver figura R-1B. De manera que de aquí en adelante denominaremos a la banda reconocida por el anticuerpo pMAPKp38, proteína semejante a la MAPKp38, con todas las salvedades que implica el establecimiento definitivo de la identidad de la proteína como la obtención del gen y/o la secuencia a partir de la proteína, pues esto si bien es parte de las metas que se tienen en el laboratorio, se encuentran dentro de las atendibles a un mediano plazo.



**Figura R-1:** Reconocimiento de la proteína semejante a pMAPKp38 y determinación de la actividad de cinasa *in vitro*.

Las Euglenas control o las pre-tratadas con Hg (pre-Hg) se incubaron por 48 hs en ausencia o en presencia de CdCl<sub>2</sub> 200 μM, se inmunoprecipitaron con el anti-MAPKp38 y se realizó el Western (A) con el anti pMAPKp38 o se midió la actividad de cinasa *in vitro* (B) utilizando ATF como sustrato.

Como parte de la identificación de la actividad semejante a MAPKp38, se probó su susceptibilidad al inhibidor específico de MAPKp38 (Torres-Márquez M-E et al. 2001) cuyo nombre es SB203580 que inhibe a las isoformas MAPKp38 $\alpha$  y p38 $\beta$  y cuya estructura se observa en la figura R-2.



**Figura R-2 :** Inhibidor SB-203580, su nombre exacto es 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4.piridil)1H-imidazol

Se realizó un ensayo de actividad *in vitro* con este inhibidor en cultivos de 48 horas de exposición a cadmio; las muestras preparadas fueron un control, unas células con exposición a cadmio y unas células con exposición a cadmio pero en presencia de inhibidor. Se puede observar en la fig R-3 que la activación producida por la exposición a Cd<sup>2+</sup>, se disminuye casi a nivel basal en presencia del inhibidor SB 203580.



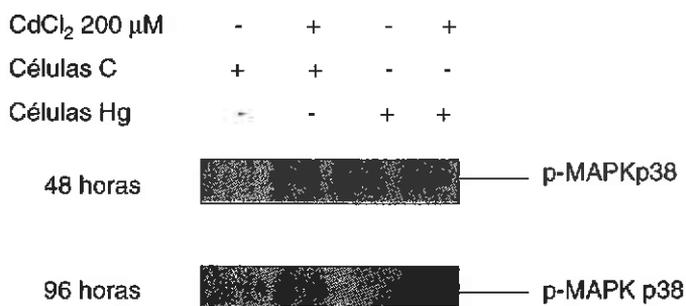
**Figura R-3:** Efecto del inhibidor SB203580 sobre la actividad de la cinasa semejante a MAPKp38.

Las Euglenas se incubaron en ausencia o en presencia de CdCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M por 48 horas, se procesaron para obtener la actividad de cinasa asociada con el anti-MAPKp38 y se realizó el ensayo de actividad en presencia o en ausencia del SB203580 100 $\mu$ M.

#### 4.2) Tiempos largos:

La MAPKp38 es una cinasa de respuesta a estrés como choque térmico o choque osmótico (Johnson y Lapadat 2002), por ello se esperaría que al exponer a *Euglena gracilis* al estrés por metales pesados, como es el caso del cadmio, la cinasa semejante a MAPKp38 se active. Se expusieron dos cultivos diferentes de *Euglena gracilis* a cloruro de cadmio 200 $\mu$ M, el primer cultivo era de células control (C), es decir que no han estado en contacto con ningún metal, mientras que el segundo cultivo era de células preadaptadas a mercurio (pre-Hg) 1.5  $\mu$ M, es decir que llevaban varias generaciones en contacto con cloruro mercúrico. Los tiempos considerados corresponden a tiempos de cultivo de las células con o sin cadmio en el medio. Lo que se consideró como tiempos largos fueron tiempos de 48 horas en adelante ya que en estos tiempos se tienen las fases de crecimiento exponencial y estacionaria del microorganismo (ver más adelante en esta sección de resultados las curvas de crecimiento). Para tiempos largos se escogieron placas para la cinasa semejante a la MAPKp38 fosforilada representativas de cuatro experimentos de cultivos de 48 horas y de 96 horas, éstas últimas seleccionadas como características de cada fase de crecimiento.

Como resultado de la exposición a cadmio a tiempos largos se puede observar, en la figura R-4 que a 48 y 96 horas, la cinasa se encuentra activada o fosforilada en mayor proporción que sus controles, cuando las células han estado en presencia de CdCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M. Además, en el carril en donde se tiene la muestra de células preadaptadas a mercurio, ya sin un estímulo de metales pesados, se puede observar una banda de la cinasa fosforilada que es más tenue que en el caso donde hay exposición adicional a cadmio. Finalmente, comparando a los dos cultivos con cadmio, parece ser que la banda que proviene de células control es más intensa que la banda que proviene de células preadaptadas a mercurio.



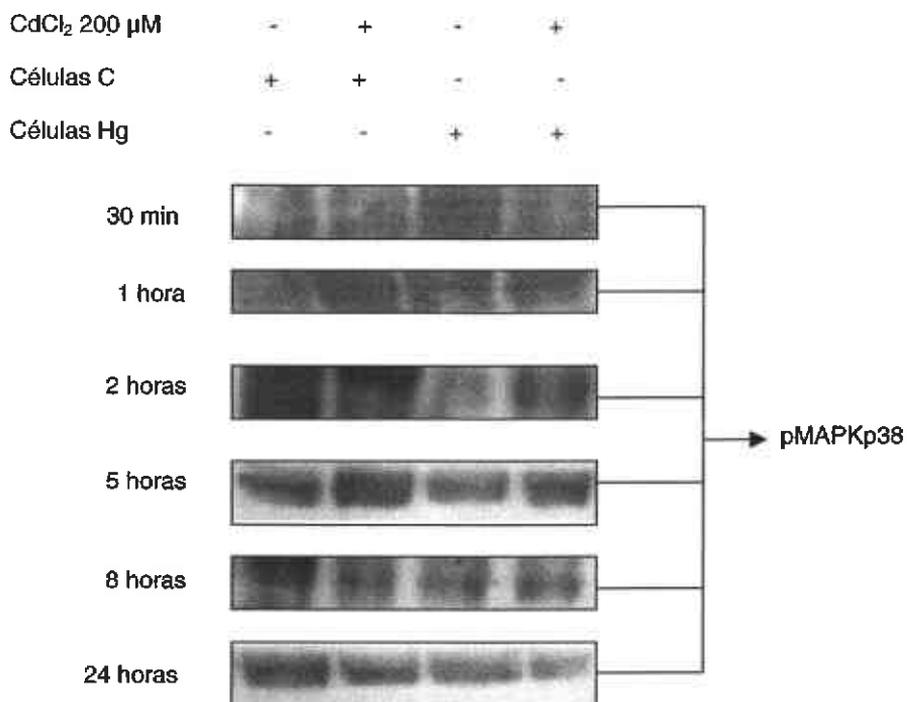
**Figura R-4:** Activación por Cd<sup>2+</sup> de la MAPKp38 (P-MAPKp38) de las células control, y pre-adaptadas a mercurio.

Las Euglenas control o las pre-tratadas con Hg (pre-Hg) se incubaron por 48 hs y 96 hs en ausencia o en presencia de CdCl<sub>2</sub> 200 μM, se inmunoprecipitaron con el anti-MAPKp38 y se realizó el Western con el anti pMAPKp38.

#### 4.3) Tiempos cortos:

En tiempos largos se observó que desde 48 horas de exposición a cadmio ya hay una fosforilación de la cinasa semejante a MAPKp38, esto nos sugiere que la respuesta que produce esta fosforilación se genera en la fase de adaptación del microorganismo, lo cuál tiene sentido pues el microorganismo debe sentir el medio durante esta fase. Se ha visto anteriormente que la MAPKp38 responde de manera muy rápida a los estímulos extracelulares tales como estrés oxidativo o nitrosativo (Capone et al., 2004), y estrés osmótico (Kültz y Ávila, 2001), estos tiempos de activación llegan a ser de hasta 15 minutos después de la exposición. Los tiempos cortos, son los que corresponden a la fase lag o fase de adaptación del microorganismo, estos tiempos llegan entonces hasta 24 horas de exposición a cadmio (ver más adelante en esta sección de resultados las curvas de crecimiento). Para dichos tiempos se seleccionó un rango de 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 8 horas y 24 horas. Estos resultados se presentan en la figura R-5.

A treinta minutos de exposición a cadmio, se observa una activación marginal en las células control que no se supera por la exposición a  $Cd^{2+}$ . En las células preadaptadas a  $Hg^{2+}$  se observa que la enzima tiene una actividad basal mucho mayor que la de las células control, no obstante, la presencia de  $Cd^{2+}$  no provoca una mayor activación de la cinasa en dichas células. A partir de una hora de exposición a cadmio en el cultivo, se empieza a observar una fosforilación de la cinasa semejante a la MAPKp38 en las células control, que es mucho mayor a lo observado en ambos cultivos de células preadaptadas a mercurio, en donde no se observa todavía activación por  $Cd^{2+}$ . En los tiempos siguientes se conserva esta importante fosforilación de la cinasa en el carril de células control expuestas a cadmio. A partir de dos horas de cultivo se puede ver que la cinasa semejante a MAPKp38 fosforilada tiene un basal activado que no es superado por la estimulación por  $Cd^{2+}$ . No obstante las células pre-adaptadas muestran un incremento en la forma fosforilada de la cinasa semejante a la MAPKp38 entre 2 y 5 horas en respuesta al  $Cd^{2+}$ , para posteriormente mantener una actividad semejante a sus contrapartes no expuestas a este estímulo.



**Figura R-5:** Activación por Cd<sup>2+</sup> de la cinasa semejante a MAPKp38 de las células control, y pre-adaptadas a mercurio a tiempos cortos. Las Euglenas control o las pre-tratadas con Hg (pre-Hg) se incubaron los tiempos indicados en ausencia o en presencia de CdCl<sub>2</sub> 200 μM, se inmunoprecipitaron con el anti-MAPKp38 y se realizó el Western con el anti pMAPKp38.

#### 4.4) Curvas de crecimiento

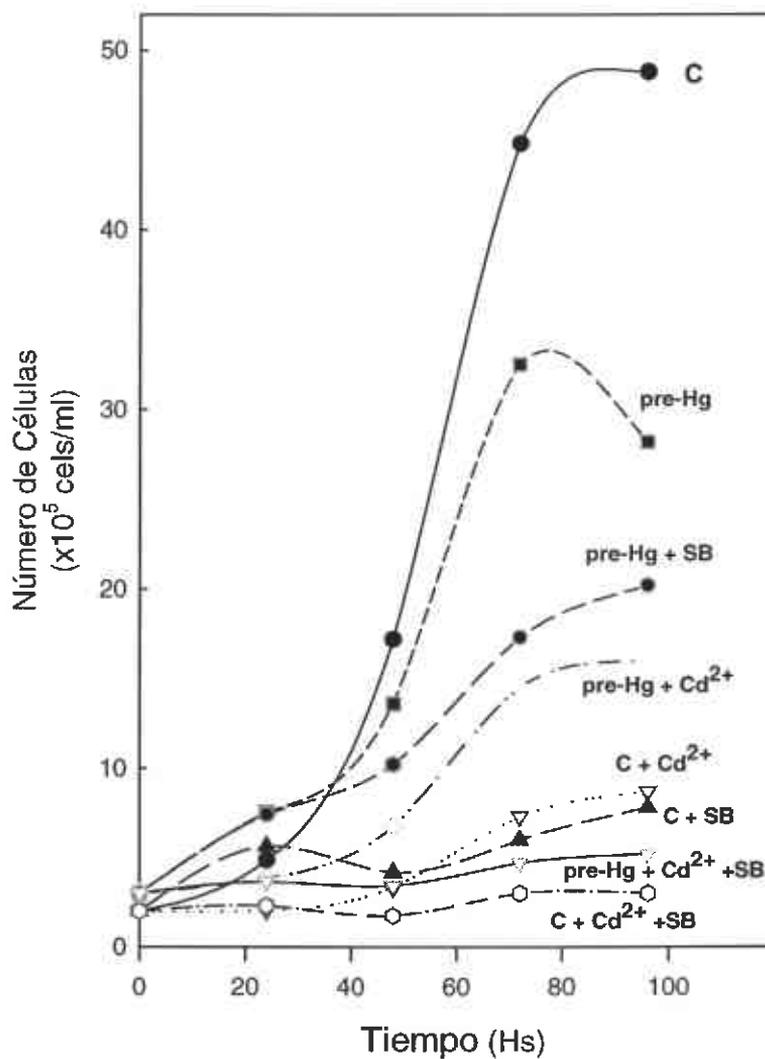
De los experimentos anteriores pudimos observar que el cadmio estimulaba a la cinasa semejante a MAPKp38, lo que nos llevaba a plantear la posibilidad de que podría participar en alguno de los eventos que estimulan su resistencia a metales pesados. Entre los eventos que se disparan por el cadmio, está la producción de agentes quelantes de metales pesados como las fitoquelatinas y sus precursores (Áviles et al, 2004). Estos fenómenos parecieran tener un arranque visible a las 48 horas, por lo que si teníamos la posibilidad de inhibir a la cinasa semejante a la MAPKp38 antes de las 48 horas, podríamos predecir si ésta tiene alguna participación en dichos eventos.

Por otro lado se pudo ver en la primera parte de la sección de resultados, que el inhibidor específico de MAPKp38 inhibe a ésta o una cinasa semejante de *Euglena gracilis* en un ensayo *in vitro*. De tal manera que podíamos explorar si la exposición de las células al SB203580 *in vivo* tenía algún efecto sobre la capacidad de resistir a los metales pesados, por la sobrevida. Por esto, se realizaron curvas de crecimiento en medios con y sin cadmio con el inhibidor SB203580 en diferentes concentraciones; los resultados obtenidos se pueden observar en las gráficas G-1, G-2, G-3 y G-4 , en donde se ocuparon las concentraciones de inhibidor 340  $\mu\text{M}$ , 100nM, 1 $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente.

El crecimiento poblacional de *Euglena* (C) se lleva a cabo en tres fases que consisten en una fase lag que dura alrededor de 24 hs, seguida por una fase exponencial o de crecimiento acelerado durante las 48 y 70 horas, para estabilizarse posteriormente en lo que se conoce como fase estacionaria, la cual seguimos hasta las 96 hs. Cuando a las células se les añade 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  ( $\text{C}+\text{Cd}^{2+}$ ) su crecimiento se ve prácticamente bloqueado (80% respecto a las células control). Las células pre-adaptadas a mercurio (pre-Hg), al estar en un medio sin metales pesados, tienen a partir de 48 horas de cultivo un crecimiento más lento (30% menor) que las células control e incluso no logran llegar a tener la misma densidad al cabo de 96 horas. Al exponer a estas células al reto con  $\text{CdCl}_2$  (pre-Hg +  $\text{Cd}^{2+}$ ), se observa que si bien el crecimiento poblacional decae solo es en una proporción del 38% a las 96 hrs. Estas observaciones son muy semejantes a las realizadas previamente (Áviles et al, 2003).

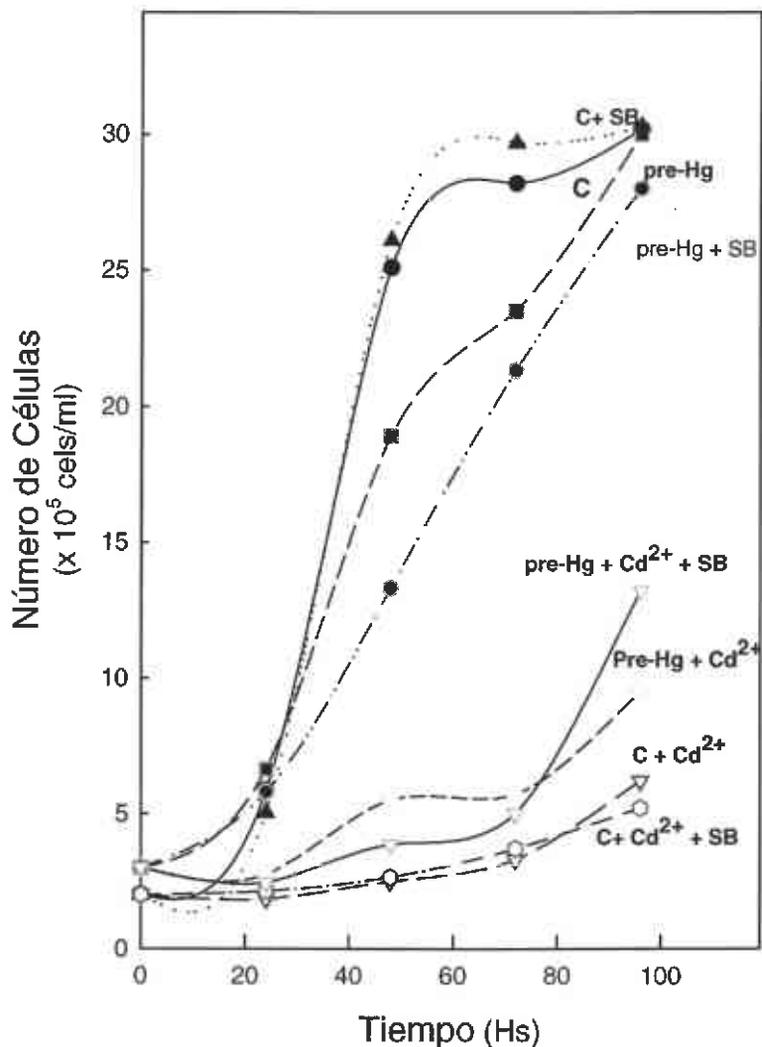
Solo cabe hacer que nuestra población pre-Hg alcanza una menor densidad poblacional a las 96 hrs., pero la resistencia a  $Cd^{2+}$  es mayor que en los trabajos previos, posiblemente por una mayor cantidad de subcultivos en  $Hg^{2+}$  (Figs G-1 a G-4).

Si el inhibidor SB203580 entra a la *Euglena gracilis*, es muy probable que esté inhibiendo a la cinasa semejante a MAPKp38 que se encuentra en el citosol de la célula. Se pensaría que el SB203580 podría afectar únicamente a las células en contacto con cadmio ya que la cinasa se activa al contacto con dicho metal, mientras que los cultivos sin metales pueden no tener ninguna reacción particular. La constante de inhibición de SB203580 para la cinasa es de 0.034mM con MgATP como sustrato (Torres-Márquez et al, 2001), en un primer experimento se utilizó un exceso (340  $\mu$ M) de este inhibidor en el medio de cultivo para ver si estaba entrando a las células. Los resultados de este experimento se pueden observar en la gráfica G-1. Para esta concentración, se observa que el crecimiento se inhibe en los cuatro cultivos diferentes (células con o sin cadmio), indicando que el inhibidor está entrando a las células pero que esta afectando su crecimiento e incluso tuvo un efecto tóxico. Para evitar esta consecuencia y tratar de ver un efecto parcial sobre la enzima probamos concentraciones menores de inhibidor. No se observa alguna respuesta particular en las tres gráficas, es decir a concentraciones de inhibidor de 100nM (gráfica G-2), 1 $\mu$ M (gráfica G-3) y 10  $\mu$ M (gráfica G-4), el crecimiento es muy similar entre los cultivos con inhibidor y sin él.

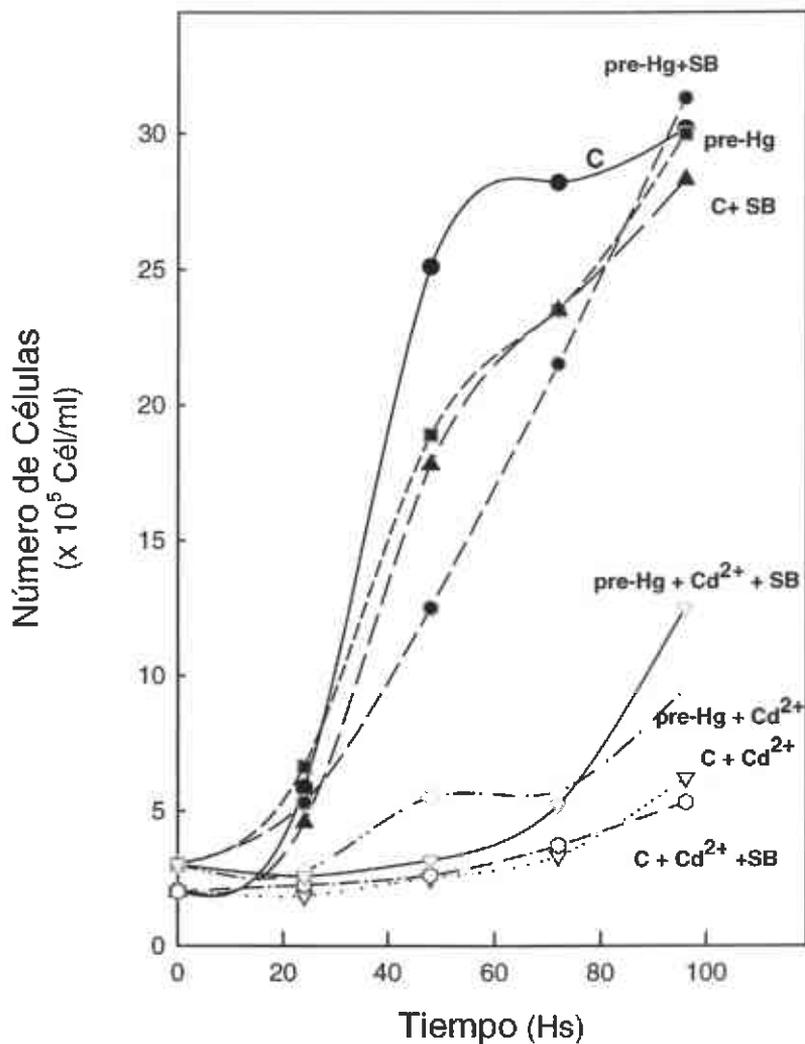


**Gráfica G-1:** Efecto de SB-203580 340  $\mu$ M sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* con y sin cadmio.

Las células se incubaron como se describió en la sección de Parte experimental, el inhibidor SB203580 (SB) se añadió a la concentración indicada, después de 24 hs de iniciado el cultivo.

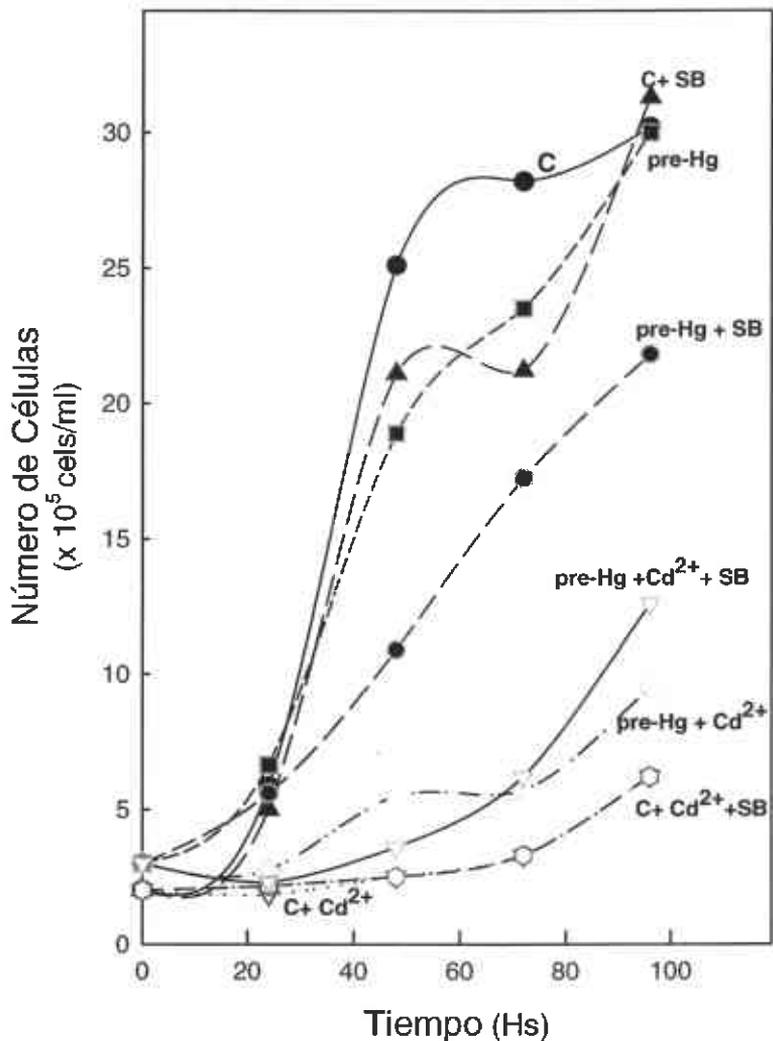


**Gráfica G-2:** Efecto de SB-203580 100 nM sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* con y sin cadmio. Las células se incubaron como se describió en la sección de Parte experimental, el inhibidor SB203580 (SB) se añadió a la concentración indicada, después de 24 hs de iniciado el cultivo.



**Gráfica G-3:** Efecto de SB-203580 1  $\mu$ M sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* con y sin cadmio.

Las células se incubaron como se describió en la sección de Parte experimental, el inhibidor SB203580 (SB) se añadió a la concentración indicada, después de 24 hs de iniciado el cultivo.



**Gráfica G-4:** Efecto de SB-203580 10  $\mu$ M sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* con y sin cadmio. Las células se incubaron como se describió en la sección de Parte experimental, el inhibidor SB203580 (SB) se añadió a la concentración indicada, después de 24 hs de iniciado el cultivo.

## 5- DISCUSIÓN

A lo largo de este proyecto se ha hablado de la cinasa como una MAPKp38, sin embargo, en *Euglena gracilis* no se ha reportado la existencia de dicha cinasa, en este trabajo surgen varios puntos que apuntan hacia la existencia de una cinasa que comparte alguna de sus propiedades. En primer lugar, al realizar ensayos de actividad con las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-MAPKp38 y ATP marcado con fósforo radioactivo y poder observar la fosforilación de un sustrato (en este caso el ATF), se pudo ver que efectivamente se obtenía una actividad de cinasa. Por otro lado, el peso molecular de la cinasa fosforilada/activada de los Western donde se midió su actividad es de aproximadamente 38kDa, que es una de las características de las MAPKp38. Además, la estructura de la cinasa obtenida con un anticuerpo específico de pMAPKp38 (vs pTre180/pTyr182) a partir del lisado de células debe de ser bastante semejante a la de una MAPKp38 para poder ser reconocida por éste, pues este fragmento fosforilado constituye “la firma característica” de esta familia de MAPKp38 (Chang *et al*, 2002). Cabe recordar que esta familia de cinasas se encuentran altamente conservadas entre los organismos (Torres-Márquez *et al.*, 2001) y por lo tanto puede incluir a la *Euglena gracilis*. Finalmente, un inhibidor competitivo específico (LoGrasso *et al.*, 1997), de MAPKp38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , el SB203580, inhibe la fosforilación del ATF en ensayos *in vitro*. Es claro, que la demostración concluyente de la existencia de una cinasa homóloga a la MAPKp38 en *E. gracilis*, se tendrá que establecer cuando se de fe del gen que la codifica y/o la purificación de la proteína con lo cual se tendrá una entidad física específica con una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que pueda compararse en algún banco de datos con otras proteínas de la misma familia. En el laboratorio se está trabajando en identificar y clonar este posible gen.

Nos interesaba conocer el estado de activación de la cinasa semejante a MAPKp38, en estados donde las Euglenas empiezan a mostrar un crecimiento diferente, al comparar a las poblaciones pre-expuestas a Hg<sup>2+</sup> o no, particularmente cuando se exponen a Cd<sup>2+</sup>, por el hecho de que la cinasa semejante a MAPKp38 podría tener un papel en esta fase y esto se denotaría en primera instancia por su activación. Este estado es sostenido durante la fase estacionaria y de allí la selección de las 96 hs.

A 48 horas, como a 96 horas, se nota que la fosforilación es distinta entre unos cultivos y otros. Parece ser que la presencia de cadmio activa de manera importante a la cinasa ya que en los carriles de control con cadmio y de células preadaptadas a mercurio con cadmio, hubo una activación mayor que en los respectivos controles. Además se pudo notar que la cinasa en las células preadaptadas a mercurio sin metales pesados en el medio, presenta una actividad basal que es superior a la de las células control. Estos resultados indican que hay una activación de la cinasa semejante a la MAPKp38 generada por la presencia del cadmio y parece ser que esta activación se mantiene en la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo.

Con estos resultados podemos confirmar que la exposición a metales pesados induce respuestas tipo estrés, pues la cinasa semejante a la MAPKp38 se está activando. Por otro lado parecería que la pre-exposición a  $Hg^{2+}$  mantiene un estado activado de la cinasa semejante a la MAPKp38 que podría favorecer su mejor respuesta adaptativa, como se puede deducir de su mayor resistencia al reto posterior con  $Cd^{2+}$ . Tanto la pre-exposición a  $Hg^{2+}$ , que muestra un basal activado de la cinasa semejante a la MAPKp38, como la retención de esta actividad a 96 horas nos habla de la cinética de activación de la cinasa semejante a la MAPKp38 a largo plazo.

En una variedad de sistemas estudiados en respuesta al estrés (Capone *et al.*, 2004; Kültz y Ávila, 2001) se ha observado que este tipo de cinasas tienen una activación rápida, por lo que se realizaron ensayos a tiempos cortos. El resultado de treinta minutos indica que, como se había observado a tiempos largos las células preadaptadas a mercurio tienen siempre una cantidad apreciable de cinasa activada y este no es el caso de los cultivos que no han estado expuestos a metales pesados. También se podría pensar que dentro de los cambios que sufre la *Euglena gracilis* por la presencia de mercurio, como serían un aumento en los niveles de tioles en la célula y un mayor almacenamiento de cadmio en éstas (Áviles *et al.*, 2003), podría estarse manteniendo de manera permanente una cierta activación de la cinasa semejante a la MAPKp38. No obstante, la respuesta a cadmio de las células de *Euglena gracilis* a 1 hora muestra una tendencia diferente, parece que es un tiempo suficiente para que la presencia de cadmio provoque una fosforilación de la cinasa en las células que nunca habían estado en contacto con metales pesados. También aumenta

la fosforilación de la cinasa semejante a MAPKp38 en las células pre-adaptadas a mercurio estimuladas con cadmio en relación a las pre-Hg. Esto nos sugiere que las células están respondiendo después de una hora a la presencia de metales pesados activando a la cinasa semejante a la MAPKp38, el mecanismo es muy rápido y no se sabe exactamente qué papel tiene la cinasa en la respuesta al estrés por metales pesados. La tendencia observada a 1 hora de estímulo es la que se observa a 48 horas de estímulo y se podría haber esperado que se conservara constante en los diferentes tiempos de exposición.

En algunos tiempos cortos hay una fosforilación basal en las células control que no han tenido contacto con metales pesados. Esto sugiere que los estados de activación de la cinasa semejante a la MAPKp38 se regulan por mecanismos endógenos, ejemplos de esto pueden ser los ritmos circadianos. En éste sentido se sabe que los niveles de AMPc en *E. gracilis* varían con el ritmo circadiano y las actividades de la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa tienen una variación en su actividad congruente con los cambios del metabolito. Esto es, la actividad de adenilato ciclasa aumenta mientras que la fosfodiesterasa de AMPc disminuye, cuando aumentan los niveles de éste metabolito (Mohabir y Edmunds, 1999). No obstante se desconocen todavía los mecanismos que conllevan a la orquestación de tales modificaciones de las actividades enzimáticas. De tal manera que nuestras comparaciones se establecieron con su correspondiente control de poblaciones nunca expuestas al cadmio.

Los experimentos de activación diferencial de la cinasa semejante a la MAPKp38 por exposición a  $Cd^{2+}$  y/o pre-exposición a  $Hg^{2+}$  sugerían una participación de ésta, por lo que quisimos probar si la inhibición *in vivo* de esta activación tenía un efecto sobre un parámetro muy general aunque complejo, como la sobrevivencia. Para estos fines se utilizó al SB203580, considerando que había demostrado inhibir a la enzima *in vitro* (fig R-3).

En los experimentos donde se usó un exceso de inhibidor ( $340\mu M$ ), se encontró un efecto tóxico del mismo, por lo que se sugiere que este sí puede penetrar a la célula. Dado que la acción del inhibidor es competitiva frente al ATP (Lo Grasso *et al.* 1997), se podría sugerir que a tales concentraciones este efecto no sea tan específico y pudiera estar afectando a otras cinasas. Se ha encontrado que este inhibidor puede inhibir también a cinasas como las R1PK2, la Raf y la GAK (Rockey y Elcock 2005). El SB3203580 también inhibe la señalización del TGF $\beta$  que es un factor de crecimiento involucrado en la regulación de la

proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la migración en eucariotes complejos (Yakymovych *et al*, 2002). Por lo tanto podría ser comprensible que este inhibidor tenga una cierta toxicidad para la *E. gracilis* en una concentración tan elevada. También existen casos en que se ha asociado a la MAPKp38 con proliferación (Yang *et al*, 2004) celular pero no está muy claro en qué manera está participando en este último proceso. La activación de la MAPKp38 tiene generalmente efectos en el incremento de la actividad transcripcional particularmente en moléculas pro-inflamatorias, también se asocia con la apoptosis y la diferenciación celular

El inhibidor de la MAPKp38 SB203580 está teniendo un efecto tóxico en una concentración elevada, pero este efecto no permite identificar un papel claro de la cinasa semejante a la MAPKp38 al responder a la presencia de metales pesados. Por tal motivo utilizamos concentraciones menores del inhibidor.

Se disminuyó la cantidad de inhibidor en el medio de cultivo para ver si se podía notar un efecto del mismo únicamente en las células en presencia de metales pesados, para ello se utilizaron las tres concentraciones diferentes de inhibidor, de 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. En nuestro trabajo, no se ve un efecto en la mortalidad del microorganismo a las concentraciones de SB203580 de 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, pero tampoco tuvo algún efecto sobre la respuesta a metales, que sugiriera que a estos niveles de inhibición de la cinasa semejante a la MAPKp38, estuvieran afectando la respuesta a metales pesados. La inhibición con SB203580 del receptor de TGF $\beta$  tipo I, tiene algunas similitudes con la que tiene la MAPKp38, en particular que el orden de concentraciones para observar la inhibición *in vitro* es muy similar en ambos casos. Se ha observado que el efecto inhibitorio del SB203580 sobre el receptor mencionado *in vivo* se da a una concentración de 10 $\mu$ M (Yakymovych *et al* 2002). Por ser la proliferación un proceso tan complejo en su regulación por la necesidad natural de preservarlo por la naturaleza, efectos más específicos de la participación de la cinasa semejante a MAPKp38 en la respuesta a metales pesados, como la producción de fitoquelatinas se están evaluando en el laboratorio. Estos experimentos permitirán demostrar si la activación que se observa de la cinasa semejante a la MAPKp38 tiene una participación en la respuesta a metales pesados o si solo se trata de un epifenómeno. Un ejemplo de éstos procesos se observó cuando un estímulo hipo-

osmótico activó a la MAPKp38 en neuronas, mientras que su inhibición no modificó la liberación de osmolitos compatibles que es una respuesta a este estímulo (Morales-Mulia *et al*, 2001).

## 6- CONCLUSIONES

Diversos experimentos realizados en este trabajo nos permitieron identificar a una enzima con actividad de cinasa, cercana a un peso de 38kDa, reconocida por anticuerpos específicos de pMAPKp38 e inhibida por el inhibidor SB203580, todas estas características nos permiten concluir que observamos una cinasa que podría ser una MAPKp38 en el microorganismo *E. gracilis*.

El uso de un anticuerpo policlonal específico de MAPKp38 fosforilada para determinar semi-cuantitativamente la activación de la cinasa resulta efectivo pues se confirmaron los datos con ensayos de actividad con fósforo radioactivo.

Existe una activación de la cinasa semejante a la MAPKp38 provocada por la presencia del cadmio y parece ser que esta activación es rápida y después se mantiene en la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo. Esto indica que la exposición a metales pesados induce respuestas tipo estrés

La célula está respondiendo después de una hora a la presencia de metales pesados activando a la cinasa semejante a la MAPKp38, lo cual confirma que la activación es muy rápida.

El inhibidor SB203580 a una concentración elevada tiene un efecto claro de toxicidad en *E. gracilis*, lo que no implica que la toxicidad esté relacionada con la cinasa semejante a MAPKp38.

## 7- BIBLIOGRAFÍA:

- Agrawal g.K., Tamogami S., Iwahashi H., Agrawal V.P., Rakwal R. - Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (*OsBWMK1*) by diverse biotic and abiotic stresses, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41 : 355-361 (2003).
- Áviles C., Loza-Tavera H., Terry N., Moreno-Sánchez R. – Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*, *Archives of Microbiology*, 180:1-10 (2003).
- Áviles C., Torres-Márquez M.-E., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R. – Time-course development of the Cd<sup>2+</sup> hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*, *Archives of Microbiology*, 184:83-92 (2004).
- Buetow D.E. – Euglena, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (1999).
- Capone R., Sagar T.B., Levine A. – Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42:425-428 (2004).
- Cervantes C., Moreno Sánchez R. – Contaminación ambiental por metales pesados, impacto en los seres vivos, A.G.T. Editor S.A., México D.F. (1999).
- Chung-I Chang, Bing-e Xu, Radha Akella, Melanie H. Cobb, Elizabeth J. GoldsmithC - Crystal Structures of MAP Kinase p38 Complexed to the Docking Sites on Its Nuclear Substrate MEF2A and Activator MKK3b, *Molecular Cell*, Vol 9, issue 6:1241-1249 (2002).
- Devars S., Áviles C., Cercantes C., Moreno-Sánchez R. – Mercury removal and uptake by *Euglena gracilis*, *Archives of Microbiology*, 174: 175-180 (2000).
- Ferrell J.E. – Regulatory cascades: function and properties, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (1999).
- Flores Vieyra R., Raya-Pérez J.C., Torres-Márquez M.E. – Proteín cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>: características y activación, *Revista de Educación Bioquímica* (en prensa).
- Heldin C-H. – Signal transduction: overview, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (2000).

- Hengge A.C. – Phosphoryl transfer reactions, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (2003).
- Herbour Ed., Lane D. - Antibodies, a laboratory manual, editorial Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 Capítulo 11 (1988).
- Herrera Estrella L.B., Guevara García A.A., López Bucio J.- Heavy-metal adaptation, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (1999).
- Jasso-Chavez R., Vega-Segura A., El-Hafidi M., Moreno-Sanchez R., Torres-Márquez M.E. - Kinetic and thermodynamic characterization of adenylyl cyclase from *Euglena gracilis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 404(1):48-54 (2002).
- Johnson G.J., Lapadat R.- Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinases, *Science*, 298: 1911-1912 (2002).
- Kültz Dietmar, Ávila Kristina – Mitogen activated protein kinases are in vitro transducers of osmosensory signals in fish gill cells, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129:821-829 (2001).
- Laemli U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 15:227-680 (1970).
- Lehninger, Nelson, Cox- Principles of biochemistry, Worth Publishers, New York, second edition, p 406 (1993).
- LoGrasso P.V., Frantz B., Rolando A.M., O'Keefe S.J., Hermes J.D., O'Neil E.A. – Kinetic mechanism for p38MAP kinase, *Biochemistry*, 36:10422-10427 (1997).
- Lowry O., Roserbrough N., Farr A., Ryall R. – Protein measurements with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275 (1951).
- Manahan S. - Toxicological Chemistry, Lewis Publishers, Florida, second edition, pp.249-252, 254-257 (1992).
- Marshall C.J., Leever S.J. – Mitogen-activated protein kinase activation by scrape loading of p21ras, *Methods in enzymology*, 255,28:273-279 (1995).
- Meglitsch P.A., Schram F.R.- Invertebrate Zoology, Oxford University Press, New York, 694p (1991).

- Mendoza-Cozatl D., Devars S., Loza-Tavera H., Moreno Sánchez R. - Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiologia plantarum* 115:276-283 (2002).
- Metzler D.E. – Biochemistry, the chemical reactions of living cells, Hartcourt Academic Press, New York, second edition, vol. 1 p 637-656 (2001).
- Mohabir G., Edmunds LN Jr. - Circadian clock regulation of the bimodal rhythm of cyclic AMP in wild-type *Euglena*, *Cellular Signaling*, 11(2):143-7 (1999).
- Morales-Mulia S., Cardin V., Torres-Marquez ME., Crevenna A., Pasantes-Morales H. - Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons, *Neurochemistry International*, 38(2):153-61 (2001).
- Moreno-Sanchez, R, Raya JC. Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication, *Plant Science*, 48: 151-157 (1987).
- Navarro L., Torres-Márquez M.-E., González-Moreno S., Devars S., Hernández R., Moreno-Sánchez R. – Comparison of Physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116C3 : 265-272 (1997).
- Philp J.C., Atlas R.M., Cunningham C.J. - Biorremediation, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (1999).
- Reina M. (1) Página web: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm#arriba>, Material docente diseñado y elaborado por Manuel Reina, 15/09/2003.
- Reina M. (2) Página web: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm>, Material docente diseñado y elaborado por Manuel Reina, 15/09/2003.
- Rhodes D., Nadolska Orczyc A. - Plant stress physiology, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (1999).
- Rockey W.M., Elcock A.H. – Rapid computational identification of the targets of protein kinase inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 48 : 4138-4152 (2005).
- Sabio G., Simon J., Campbell A., Kuma I., Peggie M., Carr J., Murray-Tait V., Centeno F., Goedert M., Morrice N., Cuenda A. – p38 $\gamma$  regulates the localization of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP, *The European Molecular Biology Organization Journal*, 24: 1134-1145 (2005).

- Schiff J.A., Lyman H., Russell G.K. - Isolation of mutants from *Euglena gracilis*, *Plant Physiology*, 43(8): 1284-1290 (1968).
- Sowadski, Janusz, Epstein- Protein Kinases, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (2000).
- Torres-Márquez M-E., Franco R., Ochoa L.D. - La MAPKp38, su estructura, cinética y función, *Boletín de Educación Bioquímica*, 20(3): 167-174 (2001).
- Torres-Márquez M.-E., Avilés-Rodríguez C., Vega-Segura M.A., Moreno-Sánchez R. - MAPK p-38 in *Euglena gracilis* and its participation in Heavy metals exposure, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 15:A546 (2001).
- Woodgett J.R – Protein kinases, physiological roles, in *Nature Encyclopedia of Life Sciences* (2000).
- Yakymovych I., Engström U., Grimsby S., Heldin C.-H., Souchelnytskyi S. – Inhibition of Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling by low molecular compounds interfering with ATP- or substrate-binding sites of the TGF $\beta$  type I receptor kinase, *Biochemistry*, 41:11000-11007 (2002).
- Yang B., Cao D.J., Colman R.W., Guo Y.L. – Different roles of ERK and p38MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices, *Journal of Cellular Physiology*, 200:360-369 (2004).

## 8- APÉNDICES

### Técnicas utilizadas

#### Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial (Reina (1) 2003). El método consiste en inmovilizar a las proteínas en estudio en un material gelatinoso (gel) hecho con almidón, poliacrilamida o alguna otra sustancia, en este caso se trata de poliacrilamida. La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comunmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas se constituyen de aminoácidos y se sabe que existen unos aminoácidos determinados que presentan grupos R capaces de adquirir una carga eléctrica cuando se encuentran en disolución. Esta es positiva para los aminoácidos básicos, lisina, arginina e histidina (al aceptar protones del medio) y negativa para los aminoácidos ácidos, ácido aspártico y glutámico (al ceder protones al medio). La carga eléctrica neta de una proteína dependerá de los aminoácidos que la constituyan y del pH de la disolución. Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoelectrónico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato ( $S_2O_8^{2-}$ ) que se añade en forma de persulfato amónico. La porosidad del gel

la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida contra acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

En la electroforesis SDS-PAGE, se ocupa en la constitución del gel un detergente que es el dodecilsulfato de sodio (SDS) y que desnaturaliza a las proteínas. Se utilizan generalmente dos geles para preparar la corrida de una electroforesis: el gel concentrador con un rango de entrecruzamiento de  $\approx 4\%$  y con un pH de 6.8 para tener a todas las proteínas en un mismo estado inicial; y el gel de corrida con un entrecruzamiento variable según los casos y en nuestros experimentos es de  $\approx 10\%$  y un pH de 8.8 para permitir la separación de las proteínas teniéndolas cargadas negativamente (Reina (1) 2003).

#### Transferencia de proteínas o Western Blot, Inmunoblot.

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots' (Reina (2) 2003). El método más potente es el denominado 'Western blot' en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren a una membrana (de nitrocelulosa) mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Las ventajas de transferir a las proteínas son que permiten una tinción y destinción más rápidas, se detectan cantidades menores de proteína y es más cómodo de manipular.

Todo procedimiento de 'blotting' consta de 5 etapas:

- Inmovilización de proteínas sobre la membrana.
- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados, o bloqueo. Esto se puede hacer con leche.
- Incubación con el anticuerpo primario específico de la proteína de interés.
- Incubación con anticuerpos secundarios, o reactivos que ligan al anticuerpo primario, unidos a enzimas u otros marcadores.

- Incubación con los sustratos apropiados para formar productos que se puedan visualizar en el lugar en donde se encuentran las bandas de la proteína. En este caso se utiliza un anticuerpo secundario con peroxidasa en un medio con luminol y peróxido de hidrógeno que permite la fluorescencia de los sitios marcados para identificar a la proteína de interés por revelado de una placa fotográfica.

## Inmunoprecipitación

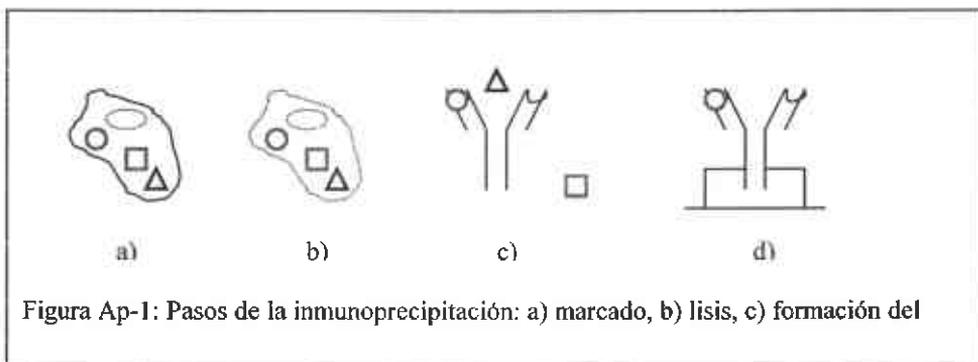
La técnica de inmunoprecipitación (Herbour y Lane 1988) es de gran importancia ya que al acoplarla con la electroforesis en gel se pueden determinar características importantes del antígeno como son: cantidad y peso molecular.

Los diversos pasos que cuenta la inmunoprecipitación son los siguientes, ver figura 4:

- Marcado del antígeno. En nuestro caso este paso no se realiza ya que el reconocimiento de la proteína se realiza durante la transeferencia con los anticuerpos específicos.
- Lisis de la célula para liberar al antígeno. Se ocupen diversos tipos de buffer de lisis y en general la lisis se puede realizar con detergentes, por un método mecánico, o por congelación y descongelación. Se tienen que inhibir a las proteasas bajando la temperatura y con inhibidores de proteasas. Las variables importantes de un buffer de lisis son: la concentración de sales, el tipo de detergente, la presencia de cationes divalentes y el pH. En nuestro caso, se describirá la composición del buffer ocupado más adelante, además se ocupa sonicado de células.
- Formación de complejo anticuerpo-antígeno. Se trata de un paso simple en donde se consideran las variables de cantidad de anticuerpo agregado, el volumen final y el uso de anticuerpos de inmunoglobulinas. Nosotros ocupamos anticuerpos policlonales por lo que el volumen no tiene gran importancia.
- Purificación de los complejos inmunes. Se utilizan reactivos secundarios que se unen al anticuerpo como redes con anti-inmunoglobulinas que luego se separan por centrifugación. Otra opción es el uso de una fase sólida que contiene alguna proteína de la pared celular de una bacteria que une anticuerpos.

La proteína A sefarosa es una proteína que proviene de *S. Aureus*. En 1975, Kessler sugirió el uso de esta proteína como una fase sólida para colectar los complejos de anticuerpo-antígeno. La proteína A forma parte de la pared celular de dicha bacteria, estas proteínas de la pared celular se fijan por un tratamiento con formaldehído, la bacteria se mata por un tratamiento con calor, y las partículas resultantes forman una excelente matriz sólida para fijar anticuerpos. La proteína se une al anticuerpo en el dominio Fc por lo que no afecta el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo.

Un esquema que representa a la inmunoprecipitación se observa en la figura Ap-1:



#### Medida de actividad de la cinasa

Para medir la actividad de la cinasa, después de haber realizado los inmunoprecipitados con anti-P-MAPK, se les agregan los sustratos de la MAPKp38: ATP radioactivo para tener una manera de detectar la activación, y una proteína blanco que en este caso fue pATF que es un factor de transcripción sustrato de la MAPKp38. Se deja incubar unos minutos para que se lleve a cabo la reacción de fosforilación, y se detiene con ácido tricloroacético (TCA) o percloroacético, que precipita a la proteína. En los casos en que se utilizó al inhibidor SB2303580, éste se agregó durante la reacción de fosforilación. Se tiene que tomar en cuenta que las cinasas de trasnducción tienen varios sitios de fosforilación y solo algunos son críticos para su activación y es en estos sitios en donde actúa el SB203580.

Una vez que se ha detenido la reacción y que se separó el precipitado de proteína, se realiza una electroforesis SDS-PAGE y se transfiere el todo a una membrana de nitrocelulosa como ya se describió más atrás dentro de esta sección. Después se lee la radioactividad con un medidor de pulsos obteniendo así la banda correspondiente al ATF fosforilado.