



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Identificación de la proteína HSP70 y modelación del desarrollo poblacional por toxicidad de UVB y tratamiento con Dialiltrisulfuro en *Daphnia magna*

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

p.Q.F.B. Gustavo Gonzaga Garita

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Laura Morales Lara

ASESOR EXTERNO

D.C. Rebeca Débora Martínez Contreras

ASESOR TÉCNICO

D. C. Ricardo Darío Peña Moreno

ABRIL 2021

ÍNDICE

I. INDICE DE FIGURAS	4
II. ÍNDICE DE TABLAS	5
III. RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Radiación ultravioleta en los ecosistemas de agua dulce	2
2.2 Consecuencias de la exposición a radiación UVB en <i>D. magna</i>	3
2.3 Biomarcadores relacionados con estrés oxidativo por UVB en <i>D. magna</i>	5
2.4 Proteínas HSP y su relación con el estrés oxidativo en <i>D. magna</i>	7
2.5 Dialiltrisulfuro como posible mediador contra los daños inducidos por UVB	8
3.0 JUSTIFICACIÓN	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivo General	11
4.2 Objetivos particulares.....	11
5. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
6.1 Material	13
6.2 Material biológico	13
6.3 Equipos	13
7. METODOLOGÍA.....	14
7.1 Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	14
7.2 Tratamiento de grupos de <i>D. magna</i>	14
7.3 Ensayo de inmunodetección	14

7.3.1	Obtención de Extracto de proteínas	14
7.3.2	Cuantificación de proteínas	15
7.3.3	SDS-PAGE	15
7.3.4	Western Blot	15
7.4	Evaluación de parámetros de historia de vida durante el desarrollo poblacional de <i>D. magna</i>	15
7.4.1	Modelado matemático	16
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
8.1	Desarrollo de la técnica Western Blot	16
8.1.1	Evaluación de los métodos de extracción de proteínas para <i>D. magna</i>	16
8.1.2	Determinación de las condiciones para electroforesis SDS-PAGE	20
8.1.3	Zimografía	21
8.1.4	Ensayos de transferencia de proteínas de Gel de poliacrilamida a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	23
8.1.5	Análisis bioinformático de la secuencia proteica HSP70 de <i>D. magna</i> y su homología con proteínas Diana del anticuerpo Anti HSP70	24
8.2	Investigaciones documentales	31
8.2.1	Daño UVB a nivel celular (Estrés oxidativo)	31
8.2.2	HSP70 como mecanismo de protección frente a la radiación UVB	35
8.2.3	HSP70 estructura y función	36
7.2.4	Daño UVB en <i>D. magna</i> a nivel fisiológico	40
7.2.5	Propuesta de los efectos benéficos de DATS sobre el daño producido por UVB	41
7.2.5	Importancia de la modelación matemática	44
7.2.6	Perspectivas de los resultados	46
9.	CONCLUSIONES.....	47
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	49

I. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Eliminación de las ERO por vía enzimática.....	6
Figura 2. Cuantificación de contenido de proteínas totales en diferentes medios de obtención de los extractos crudos.....	17
Figura 3. Eficiencia de la técnica y el buffer de extracción empleados en la concentración de proteínas.....	18
Figura 4. Comparación de métodos de extracción de proteínas totales.....	19
Figura 5. Corrimiento electroforético de proteínas totales en diferentes condiciones electroforéticas.....	21
Figura 6. Zimograma de proteasas digestivas.....	22
Figura 7. Transferencias en membrana PVDF teñida con amidoblack.....	24
Figura 8. Clustal omega de las HSP70 de diferentes especies.....	27
Figura 9. Grado de homología de las secuencias de las HSP70 evaluadas..	27
Figura 10. Diagrama de dominios conservados de HSP70.....	28
Figura 11. Árbol filogenético de la proteína HSP70.....	30
Figura 12. Especies oxidadas de los residuos aminoacídicos.....	33
Figura 13. Vía de transferencia de electrones.....	34
Figura 14. Vía de escisión del esqueleto proteico.....	35
Figura 15. Estructura tridimensional de la proteína HSP70 de humano.....	37
Figura 16. Mecanismo de acción de la proteína HSP70.	39
Figura 17. Epitelio intestinal de <i>D. magna</i>	41
Figura 18. Producción de ROS por vía de escisión de DATS..	42
Figura 19. Activación de Nrf2 y vía de señalización para la expresión de elementos de respuesta antioxidante..	43
Figura 20. Dinámica poblacional y expresión de HSP70 bajo los efectos de UVB y tratamiento con DATS.).....	45

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los equipos.....	13
Tabla 2. Referencia de los métodos	13
Tabla 3. Condiciones electroforéticas	20
Tabla 4. Condiciones de transferencia de proteínas de geles de SDS-PAGE a membrana de PVDF.....	23
Tabla 5. Ubicación de los dominios conservados sobre la estructura primaria de HSP70	29
Tabla 6. Aminoácidos altamente oxidables por los radicales libres	32

III. RESUMEN

Los organismos que habitan los ecosistemas de agua dulce pueden verse altamente afectados por factores abióticos como la radiación ultravioleta UVB, cuya incidencia ha aumentado en la corteza terrestre en los últimos años debido al agotamiento del ozono estratosférico.

El propósito de este trabajo, en un principio, fue evaluar los daños generados por la radiación UVB en el biomodelo ecotoxicológico *Daphnia magna*, sobre la expresión de la proteína de respuesta al estrés HSP70, mediante inmunodetección por western blot, a las 24 y 48 h post estrés. Además de evaluar el efecto benéfico del compuesto oleoso del ajo DATS, como una sustancia con propiedades antioxidantes, en una concentración de 15 μM ; complementando los resultados con la construcción de un modelo matemático que describiera el comportamiento poblacional de *D. magna* en estas condiciones.

Debido a las circunstancias, los resultados presentados en este trabajo corresponden a la estandarización de la técnica SDS-PAGE y transferencia a membrana para western Blot; se evaluaron 3 medios de extracción diferentes (PBS, Buffer de homogenización y agua) para la obtención del extracto crudo proteico, la eficiencia del buffer de homogenización y los métodos de extracción también fueron evaluados, además de determinar las condiciones óptimas para el corrimiento electroforético y la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF para las proteínas de *D. magna*. También se presentan los resultados de la técnica Zimografía para determinar la actividad de las proteasas digestivas en este organismo y se propone como una técnica a emplear para evaluar los efectos negativos de la radiación UVB sobre estas enzimas, debido al daño que genera a las biomoléculas. Debido a que no existen anticuerpos comerciales dirigidos hacia *D. magna*, fue necesario realizar un análisis bioinformático de HSP70 mediante alineación de secuencias por Clustal omega y la construcción de un árbol filogenético y se demostró que la proteína HSP70 de *D. magna* presenta un alto grado de homología con otras especies como Humano y rata, de esta forma se confirma que el anticuerpo comercial Anti HSP70 puede ser altamente reactivo con nuestra proteína de interés a pesar de que *D. magna* no se incluya como un organismo diana en las especificaciones del fabricante.

Por otro lado, se realizó una investigación documental que abordó sobre el daño generado por UVB a nivel fisiológico en *D. magna* y a nivel celular, enfatizando en el daño que pueden sufrir las proteínas y los residuos de aminoácidos en presencia de radicales libres, relacionándolo con la función de la chaperona HSP70 en el medio celular; finalmente se propone al DATS como un compuesto con actividad antioxidante que podría remediar el daño a proteínas causado por especies oxidantes con base en otros estudios realizados en modelos eucariontes.

1. INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta es un estresor para los organismos tanto acuáticos como terrestres, la radiación dañina que llega a la superficie de la tierra es la UVB (280-315 nm), la cual puede generar daños a nivel molecular y a nivel fisiológico en los organismos (Kim et al., 2009); en modelos biológicos terrestres se han reportado daños que incluyen: procesos inflamatorios, daño eritemático, carcinogénesis, oxidación de biomoléculas, aumento de la tasa de mutación, entre otras; *Daphnia magna* al ser un organismo pequeño y transparente que habita los sistemas de agua dulce lenticistas es potencialmente susceptible a este tipo de radiación (Rejas et al., 2017).

Uno de los efectos generados por la UVB es el aumento de los agentes oxidantes a nivel celular como lo son los radicales libres, especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, estas moléculas causan un desequilibrio redox en la célula conocido como estrés oxidativo; la célula cuenta con un sistema enzimático detoxificante que le permite disminuir la cantidad de estas moléculas oxidantes, no obstante, el daño que se genera en las biomoléculas debe ser reparado por diversos y complejos sistemas de reparación (Königsberg et al., 2007). Las proteínas HSP son denominadas proteínas de respuesta al estrés y tienen un papel importante en la recuperación del daño a proteínas contribuyendo en el replegamiento de proteínas dañadas, o bien llevándolas a la degradación, también participan en la desaglomeración de conjuntos proteicos. Particularmente la proteína HSP70 destaca por ser una de las principales chaperonas moleculares presente en el citosol, involucrada en procesos de plegamiento de proteínas nacientes (Jolly et al., 2010).

Actualmente diversos productos fitoquímicos han causado interés por su capacidad de proveer un efecto antioxidante a la célula. El compuesto orgánico de azufre, dialiltrisulfuro (DATS), es considerado como uno de los sulfuros de alilo más importantes del ajo (*Allium sativum*) debido a sus propiedades anticancerígenas, anti-microbianas, anti-oxidantes, anti-inflamatorios y quimiopreventivas (Puccinelli et al 2017).

Las propiedades antioxidantes de DATS corresponden al efecto pro-oxidante que genera en el entorno celular, provocando un estado de preacondicionamiento, preparando a la

célula para un aumento de la presencia de agentes oxidantes y que ésta pueda generar una respuesta eficiente para contrarrestar los efectos del estímulo estresor (Fillomeni et al., 2005). Estos efectos aún no han sido documentados en el modelo ecotoxicológico *D. magna*, por lo que es importante identificar los efectos generados por este compuesto fitoquímico, tanto a nivel molecular como en los parámetros de historia de vida de este crustáceo, los cuales incluyen el tamaño, tasa de reproducción, tasa de mortalidad, entre otros.

2. ANTECEDENTES

2.1 Radiación ultravioleta en los ecosistemas de agua dulce

El medio ambiente está constantemente expuesto a factores abióticos como productos químicos y radiación ultravioleta (RUV), la cual puede interferir con los organismos (Azebedo et al., 2015). La RUV es un factor de estrés ambiental que afecta a la mayoría de los ecosistemas terrestres, de agua dulce y hábitats marinos poco profundos en todo el mundo. La radiación de onda más corta que llega a la superficie de la tierra es la UVB (Miner et al., 2015).

La radiación ultravioleta B (UVB) comprende una longitud de onda entre los 280-315 nm, los niveles de radiación UV que inciden en la superficie de la tierra han aumentado en las últimas décadas debido al agotamiento del ozono estratosférico (Kim et al., 2009). Los ecosistemas acuáticos se ven afectados por el aumento de la radiación ultravioleta y la temperatura, estos cambios modifican la intensidad de la luz y la disponibilidad de los nutrientes, y con ello los insumos de los ecosistemas acuáticos (Wolinski et al., 2016). En los sistemas lenticistas, el zooplancton juega un papel clave en la transferencia de energía y la materia de los productores primarios a los niveles tróficos superiores. Así, cualquier factor que potencialmente dañe el zooplancton puede afectar al ecosistema a través de interacciones tróficas (Fernández et al., 2017).

El aumento de la radiación UVB representa una amenaza para organismos y sus ecosistemas por igual. Los estudios han reportado que la radiación UVB podría dañar

muchas especies acuáticas porque esta radiación puede causar efectos biológicos más perjudiciales que las radiaciones de longitud de onda más largas (Kim et al., 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, los ecosistemas acuáticos pueden albergar compuestos químicos, algunos de estos pueden ser fototóxicos y en presencia de radiación visible o UV pueden generar moléculas reactivas no solo en el medio ambiente, sino también en los organismos (Kim et al., 2009). Sin duda el aumento de la radiación UV compromete la calidad de los ecosistemas acuáticos y con ellos, la vitalidad y supervivencia de los organismos que los habitan.

2.2 Consecuencias de la exposición a radiación UVB en *D. magna*

En general, organismos pequeños y transparentes o aquellos en estado larvario o juvenil son particularmente susceptibles a la RUV (Kim et al., 2009). *Daphnia magna* es un miembro importante del zooplancton en los ecosistemas de agua dulce, la exposición a este tipo de radiación la condicionan a un estado de estrés. Para reducir los daños por radiación UVB *Daphnia* puede usar diferentes estrategias, la migración vertical es uno de los fenómenos bien documentados que pueden ocurrir en respuesta a la luz UV dañina; la pigmentación en la pared del cuerpo de los crustáceos es otra respuesta eficiente contra la radiación UV (Kim et al., 2009). La madurez sexual, reproducción y el tamaño también pueden verse alterados ante situaciones de estrés (Pauwels et al., 2005).

La radiación UVB actúa como un factor de estrés considerable que conduce a la disminución de la supervivencia de *D. magna*, así como de su capacidad de reproducción, alterando la dinámica de su población y sus interacciones con otras especies afectando, por lo tanto, la composición de la comunidad y la dinámica de su ecosistema (Fernández y Rejas et al., 2017). De tal manera que la RUV puede inducir cambios en la historia de vida, morfología, y comportamiento en *daphnia*.

Los parámetros de historia de vida en este crustáceo pueden monitorearse para construir un modelo matemático que permita simular lo que podría ocurrir en la dinámica poblacional a partir de los datos experimentales (Bustos et al., 2004).

A nivel molecular, la luz UVB puede afectar directamente las membranas celulares, resultando en deterioro biológico. También puede dañar importantes macromoléculas biológicas tales como ADN por absorción de UVB en timina o citosina en las cadenas de ADN, resultando un estado excitado capaz de formar hidratos de pirimidina o enlaces cruzados con pirimidinas adyacentes (Junkong et al., 2009). Al alterarse la estructura de los nucleótidos en formas que interfieran con la transcripción y la replicación se puede aumentar la carga mutacional de los organismos (Miner et al., 2015).

Diversos estudios han evidenciado que la radiación ultravioleta puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya interacción con macromoléculas sensibles podrían causar diversos efectos adversos como peroxidación lipídica de membranas biológicas, daño a proteínas, además de la oxidación y modificaciones en el ADN (Kim et al., 2009). Estos efectos también han sido reportados en *D. magna* expuesta a radiación UVB, por lo que genera estados de estrés oxidativo (Luo et al., 2018).

La RUV puede inducir la formación de moléculas oxidantes y electrófilas que pueden dañar a diversas biomoléculas del organismo. Sin embargo, estas moléculas electrófilas inducen una respuesta anti-oxidante celular, que permite al organismo sobreponerse al efecto dañino inducido por el estrés oxidativo.

El concepto de estrés oxidativo propuesto Helmut Sies en 1985 indica que debe existir un balance entre las especies oxidantes y antioxidantes para que la célula se encuentre en homeostasis y que el estado de estrés oxidativo, que eventualmente conlleva al daño celular, se presenta solo cuando existe un aumento de los oxidantes o una disminución de los antioxidantes (Königsberg et al., 2007).

Las sustancias oxidantes pueden ser radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ERO y ERN). Estas se pueden generar de manera natural como subproductos del metabolismo, los RL también se originan de alteraciones ambientales como la exposición a radiaciones ionizantes, rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta, polutantes atmosféricos (ozono, óxido nitroso, monóxido de carbono, dióxido de azufre, etc.), xenobióticos y algunos fármacos (Viada et al., 2017). *Daphnia magna*, en su hábitat está expuesta a más de uno de los factores antes mencionados, entre ellos la radiación UVB, por lo que es una especie propensa a generar un estado de estrés oxidativo (Königsberg et al., 2007).

Kim et al., en 2009 realizaron un estudio donde sometieron a *Daphnia magna* a RUV por 20 generaciones, la dosis empleada fue de $1.20 \text{ J cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$, en su estudio median la aclimatación de daphnia a la radiación, a través de indicadores como reproducción, tamaño, generación de pigmentos y esperanza de vida. Sus estudios demostraron que la aclimatación con RUV generaba dáphnidos más resistentes a otros estresores como metales pesados y antibióticos. La aclimatación UVB a largo plazo puede permitir que las daphnias adquieran defensa antioxidante a nivel génico, los cuales se reflejaron en el nivel de proteoma para mantener las características normales de la historia de vida de *D. magna*.

2.3 Biomarcadores relacionados con estrés oxidativo por UVB en *D. magna*.

Los organismos a menudo alteran la expresión génica que conduce a cambios en los niveles de actividad enzimática antioxidante cuando se exponen a ambientes estresantes. En diferentes especies de daphnia, estudios recientes han informado de respuestas de enzimas antioxidantes y cambios relacionados en la expresión de genes de enzimas de fase II como glutatión-S-transferasa y metiltransferas (Wang et al., 2018), que son regulados por factores de transcripción. Estos factores de transcripción son responsables de las respuestas celulares al estrés oxidativo, como Nrf1, que es indispensable para mantener la homeostasis celular, funciona como un sensor del equilibrio redox. El Nrf1 favorece la transcripción de los genes *gst*, *cat*, *gpx*, *trx*, para combatir el estrés oxidativo en algunos eucariotas como *D. magna* (Sijja et al., 2019).

El estrés oxidativo es contrarrestado por sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos, como glutatión y factores enzimáticos, como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y glutatión S-transferasa (GST) (Hyungjoon et al., 2019).

Estas enzimas pueden eliminar los radicales libres para prevenir el daño oxidante. La SOD cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido para formar peróxido de hidrógeno. El anión superóxido se genera por la reducción del oxígeno, que se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones, también es generado en

reacciones enzimáticas y de oxidación en diferentes organelos celulares como mitocondrias, retículo endoplásmico y citosol (Corrales et al., 2012).

CAT es un eliminador de peróxido de hidrógeno y cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno para proteger al organismo. Si bien, el peróxido de hidrogeno no es un radical libre, es una forma reactiva de gran importancia ya que posee la capacidad de generar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. Esta ERO se forma principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima SOD, como se ilustra en la figura 1. Aunque también se genera en otros organelos celulares como el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol (Corrales et al., 2012).

El glutatión es un sustrato para la GST, que cataliza una variedad de metabolitos electrofílicos y acelera la desintoxicación y excreción de compuestos nocivos. El cambio en las actividades de SOD, CAT y GST puede reflejar la protección del organismo ante efectos adversos del medio (Wang et al., 2018).

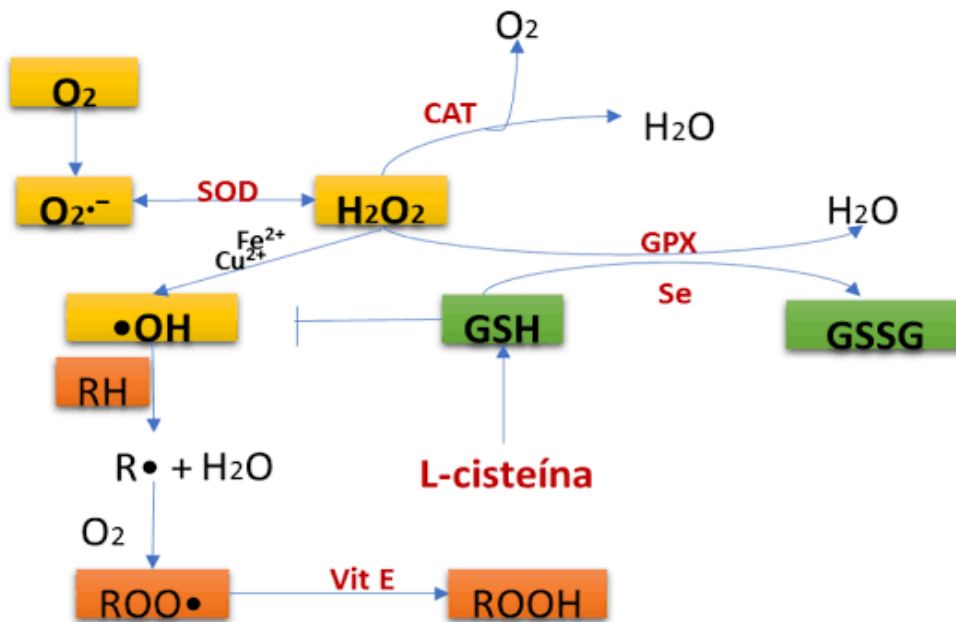


Figura 1. Eliminación de las ERO por vía enzimática. El esquema muestra la eliminación de especies electrofílicas mediante la actividad catalítica de SOD y CAT principalmente (Torres et al., 2019).

2.4 Proteínas HSP y su relación con el estrés oxidativo en *D. magna*

La exposición de las células a condiciones de estrés ambiental, incluyendo choque térmico, estrés oxidativo, metales pesados, resulta en la expresión inducible de proteínas de choque térmico (HSP) que funcionan como chaperonas moleculares o proteasas. Las chaperonas moleculares son una clase de proteínas que interactúan con diversos sustratos proteicos para ayudar en su plegamiento, con un papel crítico durante el estrés celular para evitar la aparición de intermediarios plegables que conducen a moléculas mal plegadas o dañadas. En consecuencia, las proteínas de choque térmico ayudan a la recuperación del estrés ya sea reparando proteínas dañadas (replegamiento de proteínas), degradando, o restaurando proteínas; así la homeostasis se recupera y se promueve la supervivencia celular. Estas proteínas no solo se inducen por un choque térmico o situaciones de estrés, también por situaciones fisiológicas normales como el ciclo celular, la proliferación celular, la diferenciación y muerte celular, también parecen funcionar en puntos reguladores en el control de la apoptosis (Jolly et al., 2000).

Está bien establecido que la exposición de proteínas a ERO y ERN, puede alterar su estructura química y física, mediante la oxidación de los grupos funcionales presentes en radicales de sus residuos aminoacídicos, fragmentación del esqueleto proteico, entrecruzamiento, pérdida del plegamiento, y formación de nuevos grupos reactivos. Esto último, incluye oxidación de derivados de los residuos aminoácil hidrofóbicos, carbonilación de proteínas (GC), formación de nitrotirosina (NT) y muchos otros. Los cambios conformacionales que resultan de este complejo de reacciones conllevan a la disminución o pérdida de la función biológica de la proteína (Huayta et al., 2013).

Se ha demostrado que el mal plegamiento de las proteínas no es suficiente para inducir la síntesis de las HSP, sino que requiere de la carbonilación de dichos sustratos, lo que sugiere que la oxidación proteica podría ser una marca o etiqueta de reconocimiento para las HSP, no sólo las regiones de aminoácidos hidrofóbicos que se exponen al desnaturalizarse las proteínas (Díaz et al., 2006).

La generación de grupos carbonilo, y otras moléculas como 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído α -aminoacético a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina generadas por la

oxidación de proteínas también lleva al mal plegamiento de las proteínas provocando que las proteínas pierdan su función biológica, de modo que las chaperonas moleculares se dirigen hacia la captura de intermediarios de plegamiento para evitar el plegado incorrecto y la agregación y para facilitar el replegamiento o la degradación (Díaz et al., 2006). Las HSP se han clasificado en seis familias principales según su tamaño molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y proteínas de choque térmico pequeñas (Jolly et al., 2000).

Las HSP70 son las chaperonas moleculares más importantes permanentemente activas en la célula. En cooperación con otras proteínas, son responsables de homeostasis celular en condiciones sin estrés. Además, desempeñan un papel vital en la tolerancia al estrés y la supervivencia bajo condiciones adversas. Las HSP70 también actúan para reducir la acumulación de agregados peptídicos, pero si esto sucede pueden disolver los agregados, además de promover el correcto plegamiento de proteínas recién sintetizadas (Mikulski et al., 2011).

Diversos estudios han evidenciado que al someter a *D. magna* a situaciones de estrés como xenobioticos, kariomonas y cambios de temperatura, aumenta la expresión de proteínas de respuesta al estrés como HSP40, HSP60, HSP70, actina y ph-H3 (histona fosforilada 3) (Pijanowska et al., 2004; Jordao et al., 2015).

2.5 Dialiltrisulfuro como posible mediador contra los daños inducidos por UVB

El ajo (*Allium sativum*) contiene gran cantidad de compuestos orgánicos de azufre (OSC), los principales ingredientes activos del ajo han atraído gran atención recientemente como un nuevo grupo de agentes de prevención y tratamiento del cáncer. Los OSC incluyen principalmente dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro (DATS) y otros polisulfuros de alilo. Además, los estudios postulan que el número de átomos de azufre explica la importancia de la actividad biológica de los OSC, y se ha demostrado que DATS que contiene la mayor cantidad de átomos de azufre es el compuesto con mayor efectividad (Liu et al., 2015).

El DATS ha sido investigado como un agente anticancerígeno y quimiopreventivo (Puccinelli et al., 2017). Gran parte de la investigación sobre los mecanismos de acción DATS se refiere a la inducción de la detención del ciclo celular en la fase G2/M, el aumento de la muerte celular programada, la inhibición de la migración e invasión celular, y la reducción de la angiogénesis (Liu et al., 2015).

Se ha demostrado que DATS induce enzimas de fase II NADPH: quinona oxireductasa y hemo-oxigenasa. La inducción de enzimas de fase II es un objetivo deseable, especialmente en la prevención de eventos iniciadores de cáncer, ya que las células pueden inactivar y eliminar mejor la mutación que causa carcinógenos (Puccinelli et al., 2017).

Pocos estudios se han enfocado en las propiedades antioxidantes del DATS, sin embargo, su mecanismo se ha relacionado con el factor de transcripción Nrf2 y el eje de respuesta antioxidante. En condiciones sin estrés, Nrf2 se mantiene en el citoplasma unido con Keap1 como regulador. La introducción de estresores modifica los residuos de cisteína en Keap1, lo que resulta en la disociación de Nrf2 y su translocación al núcleo y la inducción de enzimas como SOD y CAT. De hecho, DATS puede estar directamente involucrado en la señalización de Nrf2 ya que recientemente se observó que el sulfuro de monoalilo unido al fragmento de proteína que contiene cisteína 288 de Keap1 es necesario para regular la actividad de Nrf2 (Puccinelli et al., 2017).

Por lo tanto, la inducción de enzimas con actividad antioxidante mencionadas anteriormente generadas por los tratamientos con DATS, puede contrarrestar los efectos tóxicos de la radiación UVB en la célula, a través de la detoxificación de las ERO o RL por vía enzimática (Kim et al., 2014; Puccinelli et al., 2017).

3.0 JUSTIFICACIÓN

La radiación UVB causa daño significativo a los seres vivos, como se ha descrito en vertebrados superiores y líneas celulares, estos daños inducen al organismo a desarrollar una compleja respuesta celular ante el estrés que genera este estímulo estresor. El DATS es un compuesto fitoquímico mayoritario del ajo, oleoso, el cual ha mostrado que presenta propiedades anticancerígenas, antiproliferativas y anti-oxidantes. El daño de la radiación UVB también afecta a organismos acuáticos como el modelo ecotoxicológico *D. magna*, en el cual se desarrollan diversos daños relacionados con su fisiología, metabolismo y reproducción que implican modificaciones en el desarrollo poblacional, así como en la expresión de proteínas, en respuesta al daño nocivo de la radiación. Por lo que en este trabajo se evaluarán los efectos benéficos del compuesto de origen natural DATS, sobre el daño ocasionado por radiación UVB, en la inmunodetección de HSP70 y alteración del desarrollo poblacional.

4. OBJETIVOS

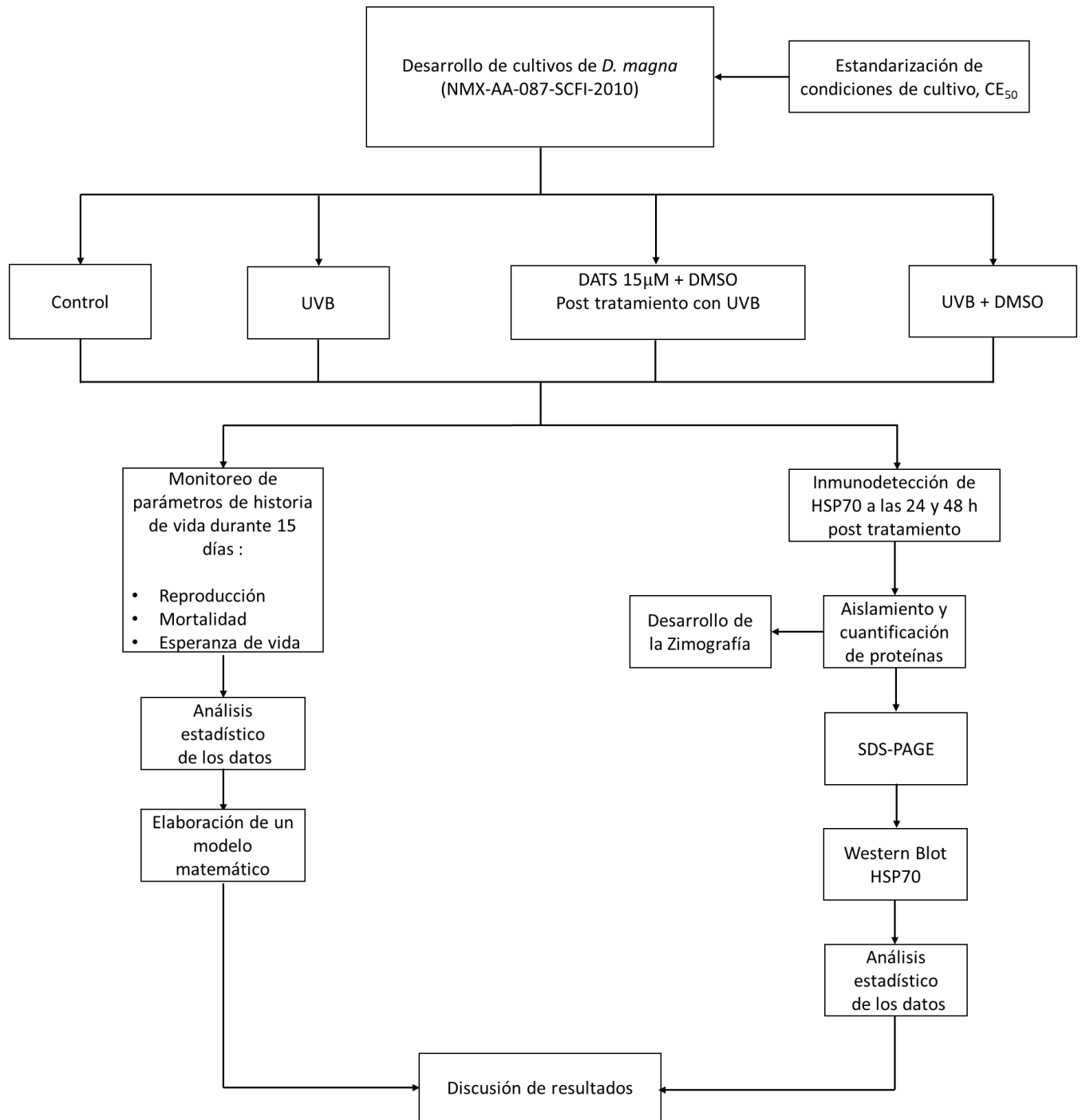
4.1 Objetivo General

Evaluar las alteraciones inducidas por toxicidad UVB y tratamiento con Dialiltrisulfuro, sobre la expresión de HSP70 mediante inmunodetección y alteraciones del desarrollo poblacional mediante modelación matemática, en el modelo ecotoxicológico *D. magna*.

4.2 Objetivos particulares

- Evaluar los efectos generados por irradiación UVB y post-tratamiento con DATS en la expresión aguda de HSP70 a las 24 y 48 horas posteriores a la exposición con DATS, mediante inmunotransferencia.
- Registrar efectos del estresor UVB en presencia del fitoquímico a partir de parámetros de historia de vida de *D. magna*, durante 15 días de vida.
- Desarrollar un modelo matemático que simule los efectos del estresor en presencia del fitoquímico.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material

Material de vidrio, plástico y reactivos de grado analítico o grado biología molecular según sea el caso para cada ensayo experimental.

6.2 Material biológico

Lotes de la tercera generación de *Daphnia magna* como modelo ecotoxicológico de acuerdo con la norma NMX-AA-087-SCFI-2010.

6.3 Equipos

Tabla 1. Características de los equipos.

Equipo	Marca	Modelo
Centrífuga	Eppendorf	5424r
Espectrofotómetro	Jenway	6405 Uv/Vis
Vortex	Scientific Industries.	Vortex –T. Genie 2
Miniprotean Tetra Cell	Bio Rad	165-8000
Trans-blot Turbo. Blotting	Bio Rad	170-4155
Micro pipetas	Labnet	Bio Pette
Baño seco	Labnet	D1301

Tabla 2. Referencia de los métodos

Determinación	Método	Referencia
Obtención de proteínas	Obtención de Extracto Crudo	Jordao <i>et al.</i> , 2015
Electroforesis de proteínas	SDS-PAGE	Sambrook <i>et al.</i> , 1982
Cuantificación de proteínas	Bradford	Jordao <i>et al.</i> , 2015
Detección de proteínas	Western blot	Sambrook <i>et al.</i> , 1982
Modelación matemática	Modelo de Gompertz	Tjorve <i>et al.</i> , 2017

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo de *Daphnia magna*

Los cultivos de este crustáceo se realizaron conforme a la norma NMX-AA-087-SCFI-2010, en donde se especifican las condiciones de dureza del agua para el medio de cultivo, oxigenación, ciclo luz/oscuridad y temperatura. Se alimentaron con *Spirulina* a una concentración de 250,000 células/ml, y se mantuvo el fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas con luz blanca y fría con luminosidad 1000 lx, el recambio del medio fue cada tercer día.

7.2 Tratamiento de grupos de *D. magna*

Una vez obteniendo neonatos de la tercera generación, se formaron 4 grupos, cada uno de 3 lotes con 20 individuos cada uno. El primer grupo fue designado como control, el segundo fue irradiado con UVB, el tercero se irradió y se le dio un tratamiento con DATS 15 µM usando DMSO como vehículo y el cuarto fue irradiado y se aplicará el DMSO sin DATS, como un segundo control.

Los grupos 2, 3 y 4 fueron irradiados al séptimo día de edad a una intensidad de 2.0 W/m² con una lámpara de UV (modelo UVB-313, marca Instrulamp), el grupo 3 fue tratado con DATS al día 9, y al grupo 4 solo se le aplicó DMSO. La evaluación de la expresión de HSP70 fue evaluada a las 24 y 48 h posteriores a la aplicación del DATS. Es importante mencionar que la exposición de los dáphnidos al fitoquímico solo será de 12 h.

Nota: La concentración subletal de DATS, además de la dosis de UVB se determinó en el trabajo de tesis de Vargas 2019.

7.3 Ensayo de inmunodetección

7.3.1 Obtención de Extracto de proteínas

Los dáphnidos fueron macerados en mortero con pistilo estéril, en nitrógeno líquido, posteriormente se adicionó buffer de homogenización (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, sucrosa 0.5 M, KCl 0.15 M, Tritón x-100 al 0.1%, 2-mercaptoetanol 1 mM, fenantrolina 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, EDTA 1mM.), la mezcla se homogenizó en vórtex y centrifugó a 16000 g

por 10 min a 4°C, los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C para su posterior análisis (Jordao et al., 2015).

7.3.2 Cuantificación de proteínas

La determinación total de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976), realizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

7.3.3 SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas se realizó empleando el método de Laemmli (Laemmli et al., 1970). Las muestras se diluyeron 1:4 en el buffer de carga 4X (Tris-HCl 124 mM pH 6.8, glicerol al 50%, SDS 4%, 2-mercaptoetanol 1.42 M, azul de bromofenol 0.02%), posteriormente se calentaron a 95°C por 5 minutos. El gel concentrador fue preparado al 5% y se aplicó un voltaje de 110 V, mientras que el gel separador fue utilizado al 12% y se sometió a 150 V. Transcurrido el corrimiento electroforético, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 por dos horas y se destiñó hasta observar las bandas correspondientes a las proteínas.

7.3.4 Western Blot

La inmunodetección se realizó transfiriendo el gel de SDS-PAGE a una membrana de PVDF 20 minutos/ 20 V en un sistema semi-húmedo. Posteriormente, la membrana se tiñó con amidoblack, después se bloqueó con leche al 1% en buffer PBS-Tween al 0.5% por toda la noche, después se incubó 2 h con el anticuerpo primario y 2 h con el anticuerpo secundario entre cada paso se realizaron 3 lavados con PBS-Tween por 20 minutos cada uno. La membrana se reveló con luminol en una placa radiográfica (Jordao et al., 2015).

7.4 Evaluación de parámetros de historia de vida durante el desarrollo poblacional de *D. magna*

Para evaluar los parámetros de historia de vida de los *Dáphnidos* en estudio, se realizó el recambio del medio cada tercer día, manteniendo las condiciones de cultivo

recomendadas por la norma mencionada anteriormente. Se registró el número de neonatos, jóvenes, adultos, hembras grávidas, mudas y muertos, con estos datos se determinó la fertilidad y las tasas de natalidad y mortalidad (Billoir et al., 2007).

7.4.1 Modelado matemático

La interpretación adecuada de los resultados obtenidos en la experimentación permitirá realizar predicciones del estado de la población mediante el modelado matemático que simule la dinámica de la población ante el estresor y el fitoquímico evaluado empleando el modelo de Gompertz (Buldú and Wagemakers, et al 2007; Billoir et al., 2007).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo de la técnica Western Blot

8.1.1 Evaluación de los métodos de extracción de proteínas para *D. magna*

Se ejecutaron diversos ensayos para determinar las condiciones óptimas para la extracción de proteínas del crustáceo *D. magna*, en primera instancia se realizaron pruebas para evaluar el medio más adecuado para la extracción de proteínas, con un número de organismos $n=20$, en esta prueba las proteínas fueron extraídas con 3 diferentes soluciones, agua, Buffer salino de fosfatos (PBS) y Buffer de homogenización (Figura 2). Los extractos se sometieron a maceración mecánica en presencia de nitrógeno líquido, la cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford utilizando BSA como estándar, el análisis estadístico evidencia que la concentración de proteínas obtenida en cada condición influyó en la concentración de proteína obtenida (diferencia significativa, $p<0.05$), siendo la condición que resultó más eficiente para obtener una mayor concentración proteica el buffer de homogenización, el cual contenía inhibidores de proteasas.

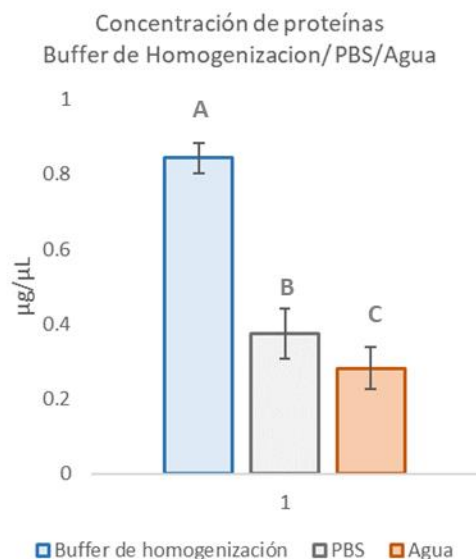


Figura 2. Cuantificación de contenido de proteínas totales en diferentes medios de obtención de los extractos crudos. Los medios empleados para la obtención de los extractos crudos fueron: agua, PBS y buffer de homogenización, todos los ensayos presentaron diferencias significativas ($p < 0.5$, prueba de Tukey).

La eficiencia del buffer de homogenización para la obtención de mejor concentración proteica en el extracto crudo se atribuye a sus componentes, el Tritón x-100 es un tensoactivo iónico que disuelve la membrana celular y de los organelos, permitiendo de esta manera una mayor exposición de proteínas que se encuentran en membranas; cabe resaltar la actividad de los inhibidores de proteasas, como fenantrolina que es un formador de complejos de coordinación por lo tanto inhibe a las metaloproteasas, junto con el EDTA que es un quelante, y el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) que inhibe a algunas proteasas de serina, si bien el buffer ya presenta buenos resultados, su eficiencia puede mejorarse en ensayos futuros al adicionarse aprotinina que es un polipéptido inhibidor de las proteasas de serina, como se ha sido evaluado por otros grupos de investigación (Jordao et al., 2015).

Diferentes trabajos reportan haber empleado un número de daphnidos variable para obtener el extracto crudo, estos van de 20 hasta 300, por tanto, en este trabajo evaluamos la eficiencia de la técnica y el buffer de extracción empleado, de acuerdo al número de individuos, comparando 2 buffers de extracción, el buffer de homogenización y el PBS, empleando un mismo volumen de buffer (250 µL) con un número creciente de

dáfnidos, 20, 40 y 60 (Figura 3), con la finalidad de determinar el número de organismos requeridos para obtener una mayor concentración protéica.

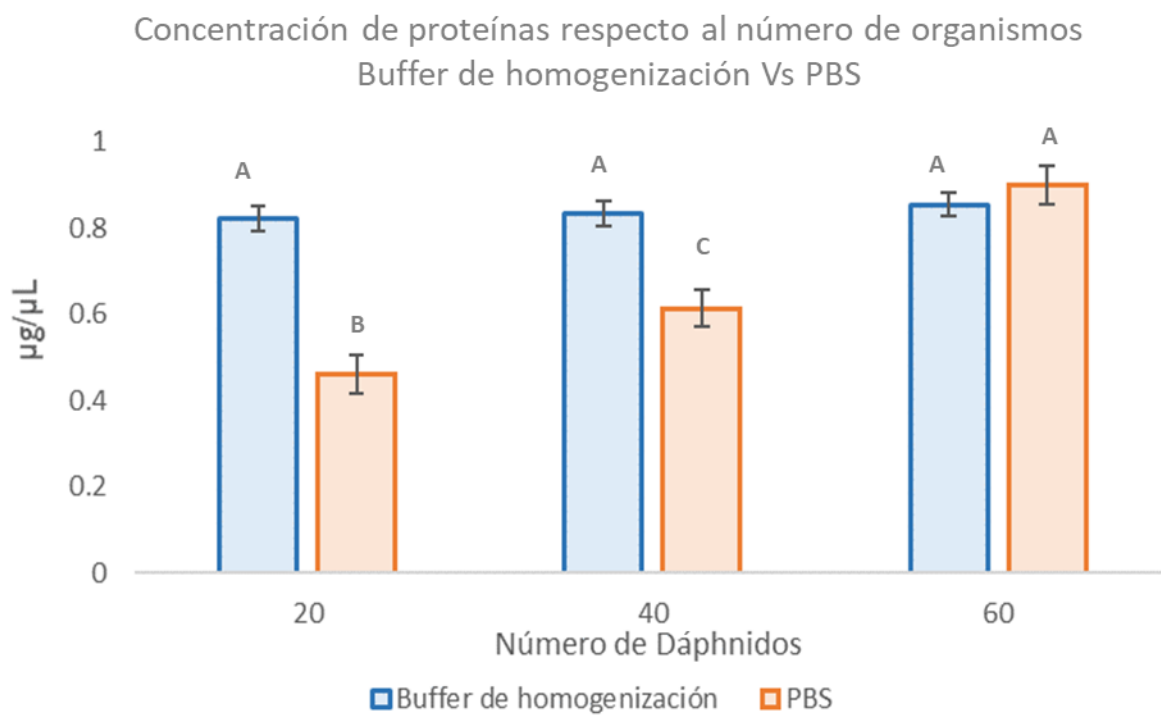


Figura 3. Eficiencia de la técnica y el buffer de extracción empleados en la concentración de proteínas. Comparación de los buffers PBS y buffer de homogenización frente a un número creciente de dáfnidos manteniendo un volumen de 250 µL.

Los resultados evidenciaron que al emplear el buffer de homogenización, se puede obtener una concentración de proteínas totales casi constante, indistintamente si se emplean 20, 40 o 60 individuos, mientras que con PBS la cantidad extraída de proteína aumenta proporcionalmente al número de dáfnidos, el análisis estadístico (Por análisis multifactorial) mostró que para el buffer PBS existe una clara diferencia significativa ($p < 0.05$), por lo que al aumentar el número de dáfnidos aumentará la concentración de proteínas que se puedan extraer; mientras que para el buffer de homogenización el análisis estadístico no mostró una diferencia significativa ($p > 0.05$), por lo que aumentar el número de dáfnidos empleados en el extracto, no aumentará el rendimiento de la extracción.

Probablemente, los resultados se deban a la concentración y composición del buffer de homogenización, es decir, cada componente del buffer llega a un punto de saturación, respecto a los componentes celulares, esta hipótesis podría demostrarse o refutarse con ensayos futuros en donde se aumenten las concentraciones de algunos reactivos, principalmente los inhibidores de proteasas.

Finalmente, para evaluar la técnica de extracción de proteínas, se realizó la comparación de los métodos de extracción entre el empleo de nitrógeno líquido contra el uso de un sistema de homogenización de microtubos, BEL-ART (Figura 4), el extracto crudo se realizó con n= 20 organismos en presencia del buffer de homogenización, la cuantificación de proteínas se determinó mediante el método de Bradford usando BSA como estándar. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el uso de nitrógeno líquido respecto al uso del homogenizador. Los resultados indican que el nitrógeno líquido brinda un mayor rendimiento para la extracción de proteínas, es probable que estos resultados se deban a la ultracongelación de la muestra y a que la maceración mecánica pueda llegar a realizarse con más fuerza respecto al homogenizador.

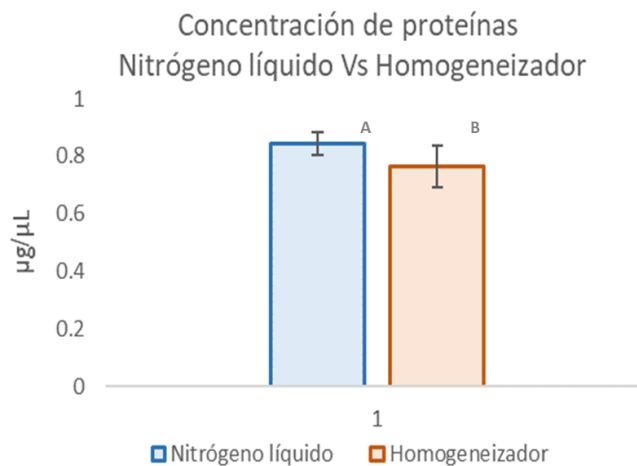


Figura 4. Comparación de métodos de extracción de proteínas totales. Nitrógeno líquido Vs Homogeneizador. El análisis estadístico (Por ANOVA) muestra diferencias significativas entre los métodos ($p < 0.05$).

Con base en los resultados anteriores se propone que las condiciones óptimas para realizar el extracto crudo de *D. magna* deben considerar realizarse en presencia de buffer de homogenización, un número de organismos n=20, y utilizando nitrógeno líquido.

8.1.2 Determinación de las condiciones para electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica para la separación de macromoléculas y resulta ser un punto crítico si se pretende realizar un western blot, por lo tanto, se busca tener una buena resolución en la separación de estas moléculas.

Los ensayos realizados fueron SDS-PAGE discontinua, para ello se determinaron las concentraciones adecuadas de los geles concentrador y de resolución, así como los voltajes más apropiados para cada sección del gel, los datos se describen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Condiciones electroforéticas

	Condición A		Condición B	
Sección del gel	Concentrador	Separador	concentrador	Gel separador
Concentración	8%	12%	5%	12%
Voltaje	80	110	110	150
Tiempo aproximado	40 min	2.5 h	35 min	2h

El rol que juegan la concentración de los geles y el voltaje empleado resulta en una buena separación de las proteínas, determinar adecuadamente estos parámetros no solo mejora los resultados sino también ayuda a optimizar el tiempo de ensayo.

Tras múltiples pruebas se determinó que las condiciones electroforéticas para obtener una adecuada resolución en la separación de proteínas se describen en la tabla anterior en la sección de condición B

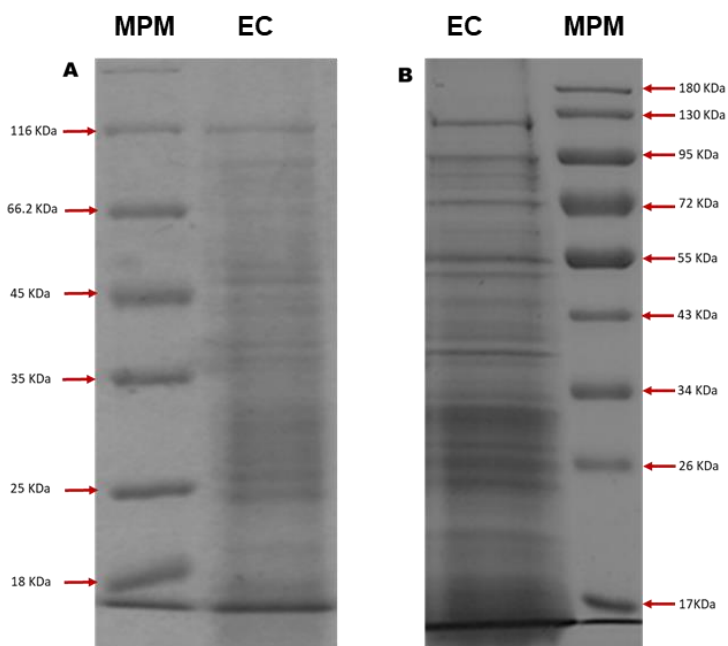


Figura 5. Corrimiento electroforético de proteínas totales en diferentes condiciones electroforéticas. A. SDS-PAGE de *D. magna*, gel concentrador 8% con 80 V, gel separador 12% con 110 V. B SDS-PAGE de *D. magna*, gel concentrador 5% con 110 V, gel separador 12% con 150 V. (MPM: Marcador de peso molecular; EC: Extracto crudo).

En la figura 5 se puede observar que las condiciones electroforéticas, de acuerdo con las especificaciones B, proporcionan una mejor resolución en la separación de las bandas correspondientes a las proteínas de *D. magna* con respecto a las condiciones A. Un gel concentrador laxo permite un mejor reordenamiento de las proteínas, cuando estas llegan al gel separador, un tamaño de poro menor permite una separación más definida, el gradiente de voltaje también contribuye para esta resolución.

8.1.3 Zimografía

La zimografía es una técnica para evaluar la actividad catalítica de proteasas en un gel de electroforesis, este ensayo se desarrolló para las enzimas digestivas del organismo *D. magna* con base en el método de Agrawal et al., 2005. El extracto crudo fue obtenido en Buffer PBS pH 6.5, siguiendo la técnica antes descrita; se realizó una electroforesis desnaturizante pero no reductora, por lo tanto en estas muestras se aplicó el SDS pero no fueron calentadas ni se les adicionó agentes reductores como 2- Mercaptoetanol o

DTT; este test se desarrolló en un sistema discontinuo con un gel concentrador al 3.6% y un gel de resolución al 12% el voltaje aplicado fue 80 y 110 V respectivamente, el voltaje fue menor para evitar el calentamiento del buffer. Después del corrimiento, el gel se incubó a 4°C por 30 min en una solución Buffer Tris 50 mM pH 9.0 con caseína al 0.75% para renaturalizar a las proteínas, posteriormente se hace un cambio de solución y se lleva a 20 °C, se incubó por 2 h en agitación, consecutivamente el gel se fija en una solución de ácido tricloroacético al 20% por 30 min, finalmente el gel se tiñe por 3 h y se destiñe hasta observar bandas blancas en el gel, estas bandas corresponden la presencia de proteasas capaces de degradar a la caseína, como se muestra en la figura 6.

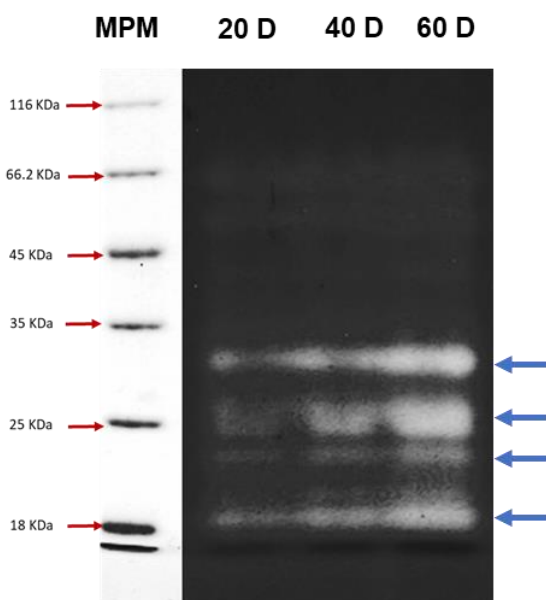


Figura 6. Zimograma de proteasas digestivas. Las bandas blancas (Indicadas con flechas azules) resultan de la hidrólisis de la caseína por las proteasas digestivas del organismo, principalmente tripsina y quimotripsina (El número de los carriles indica el número de organismo empleados para la obtención del extracto proteico).

Las proteasas digestivas son enzimas importantes en la nutrición de los organismos, su actividad resulta en la ruptura de enlaces peptídicos de otras proteínas de tal forma que se generan aminoácidos que pueden ser absorbidos y utilizados para procesos metabólicos (Schwarzenberger et al., 2010). En *D. magna* la radiación UVB es un factor tóxico capaz de dañar a las biomoléculas, entre ellas las proteasas digestivas. Mediante zimografía se podría evaluar la disminución de la actividad catalítica de estas proteínas,

como consecuencia del daño producido por UVB; actualmente, esta técnica no se ha descrito con esta finalidad en *D. magna*. Los resultados podrían estar relacionados con la disminución de los parámetros de historia de vida, principalmente con el retraso del crecimiento y reproducción, (Huebner et al., 2012) debido a la deficiencia de la asimilación de nutrientes.

8.1.4 Ensayos de transferencia de proteínas de Gel de poliacrilamida a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las condiciones de transferencia en un sistema semihúmedo iniciales (A) y las condiciones después de haber estandarizado la técnica (B) se describen en la tabla 4, los resultados pueden observarse en la figura 7, en ellas se observan las membranas de PVDF después de ser teñidas con amidoblack (Paso opcional, antes del bloqueo de la membrana).

Tabla 4. Condiciones de transferencia de proteínas de geles de SDS-PAGE a membrana de PVDF

	Condición A	Condición B
Membrana	PVDF	PVDF
Voltaje	18 V	20 V
Tiempo	18 min	25 min

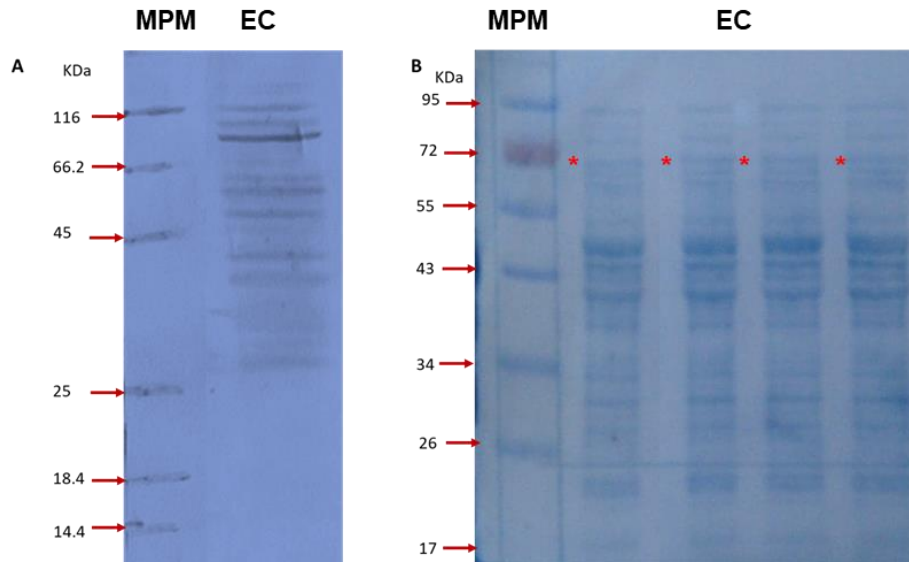


Figura 7. Transferencias en membrana PVDF teñida con amidoblack. A. Transferencia a 18 V por 18 min. B transferencia a 20V 25min. Las condiciones B permiten una mayor eficiencia en la transferencia de las proteínas (MPM: Marcador de peso molecular; EC: Extracto crudo; los asteriscos * indican la probable ubicación de HSP70).

En la sección B de la figura 7 se puede apreciar visualmente una mejor transferencia de proteínas, debido a que tienen un ligero aumento de voltaje y tiempo respecto a las condiciones A, además en la parte inferior de las membranas se visualizan bandas que no se pueden observar en la sección A.

8.1.5 Análisis bioinformático de la secuencia proteica HSP70 de *D. magna* y su homología con proteínas Diana del anticuerpo Anti HSP70

El anticuerpo (Ac) seleccionado para realizar los ensayos fue el anticuerpo policlonal Anti HSP70 / HSP72 fabricado en conejo por la empresa ENZO lifesciences con número de código: SPA-812, con afinidad a especies como Humano, Ratón, Rata, Beluga, Bovino, Perro, Drosophila, Pez, Conejillo de Indias, Hámster, Mono, Porcino, Oveja. Si bien, el fabricante no incluye a *D. magna* como organismo con reactividad para este Ac, algunos autores como Pijanowska et al., 2005 lo utilizaron exitosamente en sus estudios, además de esta razón se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de HSP70 de *D. magna* y su homología con la misma proteína en otras 7 especies, mediante una alineación de secuencias y un árbol filogenético.

En primera instancia se realizó una búsqueda a través de BLAST para identificar a las secuencias FASTA de proteínas con mayor homología a la HSP70 de *Daphnia magna*, los resultados demostraron que *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, y otras especies de artrópodos coincidían con la búsqueda de proteínas HSP70 homólogas; además de estas especies se incluyeron a *Daphnia pulex*, *Mus musculus* (Ratón), *Rattus norvegicus* (Rata) y *Homo sapiens* (Humano) para la alineación debido a que algunas de estas especies tenían reactividad para el anticuerpo anti HSP70, de acuerdo con el proveedor. La alineación de secuencias se realizó por Clustal omega, utilizando el programa clustalo, versión 1.2.4, para la alineación de la secuencia proteica. La matriz de transición predeterminada es Gonnet, Clustal omega utiliza el algoritmo HHaling y su configuración predeterminada como motor central, el algoritmo se describe en Sôding J. 2005.

Los resultados de la alineación se muestran la figura 8:

```

|Q9BIS2| DROSOPHILA_MEL  -----MPAIGIDL GTTYS CVGVYQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDSERLIGDPAKNQ 55
|B1PZ16| DAPHNIA_MAGNA  -MAKKAPCIGIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 59
|E9GEV3| DAPHNIA_PULEX  -MAKKAPCIGIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 59
|B0S610| DANIO_RERIO    MSSPKEIAIGIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 60
|P0DMV8| HUMANO         --MAKAAAI GIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 58
|P0DMW1| RATA           --MAKKA TAIGIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 58
|P17879| RATON         --MAKN TAIGIDL GTTYS CVGVFQH GKVEI IANDQGNRTT PSYVAF TDERLIGDAAKNQ 58
                .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
                .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

|Q9BIS2| DROSOPHILA_MEL  VAMNPRNTVFD AKRL IGRKYDDPKIAEDMKHWPFKVVS DGGKPKIGVEYKGESKRFAPEE 115
|B1PZ16| DAPHNIA_MAGNA  VAMNPINTVFD AKRL IGRRFDDATVQSDMKRWPFKVIS DGGKPKIQVDYKGETKTFSPPEE 119
|E9GEV3| DAPHNIA_PULEX  VAMNPINTVFD AKRL IGRRFEDACVQSDMKHWPFKVVS DGGKPKIQVEYKGETKTFSPPEE 119
|B0S610| DANIO_RERIO    VAMNPNNTVFD AKRL IGRRFDDPVVQSDMKHWSFKVVS DGGKPKVAVEHKGENKTFNPEE 120
|P0DMV8| HUMANO         VALNPQNTVFD AKRL IGRKFGDPVVQSDMKHWP FQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEE 118
|P0DMW1| RATA           VALNPQNTVFD AKRL IGRKFGDPVVQSDMKHWP FQVNDGDKPKVQVNYKGENRSFYPEE 118
|P17879| RATON         VALNPQNTVFD AKRL IGRKFGDAVVQSDMKHWP FQVNDGDKPKVQVNYKGESRSFFPEE 118
                **:* ** *****: : * : .***: * * :*: .** .***: * :*:** : * **
                .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

|Q9BIS2| DROSOPHILA_MEL  ISSMVLTKMKETA EAYLGESITDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGHIAGLNVLRIINEPTA 175
|B1PZ16| DAPHNIA_MAGNA  ISSMVLVKMKETA EAYLGQKVTDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTA 179
|E9GEV3| DAPHNIA_PULEX  VSSMVLVKMKETA EAYLGQKVTDAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTISGLNVLRIINEPTA 179
|B0S610| DANIO_RERIO    ISSMVLVKMKEIA EAYLGQKVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTA 180
|P0DMV8| HUMANO         ISSMVLTKMKEIA EAYLGPVTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTA 178
|P0DMW1| RATA           ISSMVLTKMKEIA EAYLGHVPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTA 178
|P17879| RATON         ISSMVLTKMKEIA EAYLGHVPTNAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTA 178
                .*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

|Q9BIS2| DROSOPHILA_MEL  AALAYGLDKNLKGERNVLI FDLGGGTFDV SILTIDEGSLFEVRSTAGDTHLGGEDFDNRL 235
|B1PZ16| DAPHNIA_MAGNA  AAIAYGLDKKVTGERHVLIFDLGGGTFDV SMLTIEES-IFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRM 238
|E9GEV3| DAPHNIA_PULEX  AAIAYGLDKKVTGERHVLIFDLGGGTFDV SMLTIEEG-IFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRM 238
|B0S610| DANIO_RERIO    AAIAYGLDKGKSSERNVLI FDLGGGTFDV SILTIEDG-IFEVKATAGDTHLGGEDFDNRM 239

```



```

|E9GEV3|DAPHNIA_PULEX      EIEGVCKPIITKLYAAGGAPPGGMPGGMPGAAGGAPPRGGAGGPTIEEVD      648
|B0S610|DANIO_RERIO       ELEKVCNPVISKLYQGMPAG--GCGAQ----ARAASGASAQGPPIIEEVD      643
|P0DMV8|HUMANO            ELEQVCNPIISGLYQGAGGPGGGFQAQ----G-P-KGGSGSGPTIEEVD      641
|P0DMW1|RATA              ELERVCNPIISGLYQGAGAPGAGGFQAQ----A-P-KGGSGSGPTIEEVD      641
|P17879|RATON             ELERVCSPPIISGLYQGAGAPGAGGFQAQ----A-PPKGASGSGPTIEEVD      642
*:      *.*:::  ::      *      .      ..  ***  .

```

Figura 8. Clustal omega de las HSP70 de diferentes especies

El resultado de la alineación mostró que existen 422 posiciones idénticas de las 7 secuencias evaluadas y 138 posiciones similares, en el alineamiento de las secuencias se marca con un asterisco (*) los aminoácidos que son idénticos; con dos puntos (:) a los que presentan características químicas altamente similares y con un punto (.) a los aminoácidos que tienen ciertas similitudes entre sí. El programa Clustal Omega realizó una matriz de identidad que se muestra en la figura 9, en donde se evalúa el porcentaje de la homología de las secuencias proteicas analizadas; después de la HSP70 de *D. pulex* con un 96.73% de homología, las proteínas más similares a la de *D. magna* son *Danio rerio* con 83.07% y la HSP70 de humano con 81.32% de homología.

1: sp Q9BIS2 DROSOPHILA_MEL	100.00	74.33	75.31	74.80	75.91	76.38	76.42
2: tr B1PZ16 DAPHNIA_MAGNA	74.33	100.00	96.73	83.07	81.32	79.59	79.47
3: tr E9GEV3 DAPHNIA_PULEX	75.31	96.73	100.00	83.80	82.53	81.44	81.46
4: tr B0S610 DANIO_RERIO	74.80	83.07	83.80	100.00	86.07	85.92	85.47
5: sp P0DMV8 HUMANO	75.91	81.32	82.53	86.07	100.00	96.57	95.32
6: sp P0DMW1 RATA	76.38	79.59	81.44	85.92	96.57	100.00	98.44
7: sp P17879 RATON	76.42	79.47	81.46	85.47	95.32	98.44	100.00

Figura 9. Grado de homología de las secuencias de las HSP70 evaluadas. El programa clustal omega generó una matriz de identidad de las secuencias proteicas, siendo las secuencias de *D. rerio* y Humano las más homólogas.

El análisis por BLAST de la secuencia de HSP70 de *D. magna* identificó a través de la base de datos de la plataforma NCBI que de los residuos 2 al 612 se tiene un alto grado de similitud a la superfamilia de las HSP70 (ID: PTZ00009), esta familia se constituye por 4 dominios conservados, que han sido estudiados con mayor detalle en la HSP70 de

bovino y han sido registrados en la base de datos de dominios conservados con el código: 212675 (Figura 10).

Dado el alto grado de homología entre la secuencia consenso y la HSP70 de daphnia, podemos inferir que los dominios encontrados presentan funciones similares. Sin embargo, para asegurar estas funciones, sería necesario desarrollar otros experimentos que nos permitan verificar las funciones de los dominios de esta proteína.

El dominio 1 corresponde al dominio de unión a nucleótidos (Nucleotide-binding domain, NBD), esta región se asocia con la función ATPasa de la proteína; el dominio 2 reconocido como el sitio de interacción NEF/HSP70, se relaciona con el ciclo ATP/ADP y la liberación del nucleótido, esta función podría regularse tras la interacción con los factores de liberación de nucleótido en esta zona de la proteína; el dominio 3 reconocido como sitio de interacción con BAG, es el punto de colaboración con otras co-chaperonas que presenten el dominio J, como HSP40, la co-chaperona BAG y CHIP y finalmente el dominio 4 registrado como dominio de unión a sustrato (substrate-binding domain, SBD), es la región hidrófoba que podría estar reconociendo a las proteínas desnaturalizadas para llevar a cabo su función como chaperona molecular.

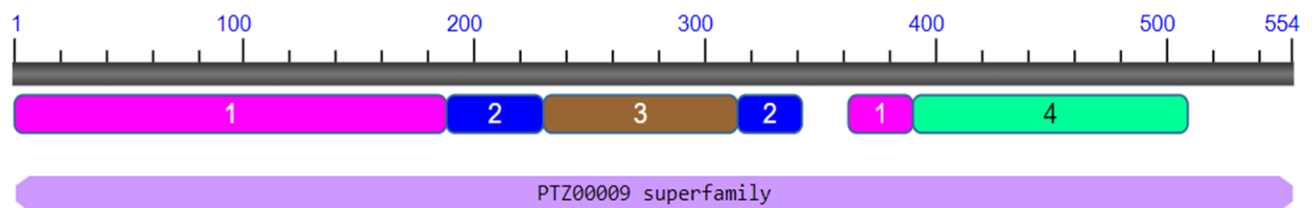


Figura 10. Diagrama de dominios conservados de HSP70. La secuencia de HSP70 de *D. magna* presenta 4 dominios conservados presentes en la superfamilia de las HSP70

A continuación, en la tabla 5, se muestra el número de residuos aminoacídicos que conforman los dominios de la proteína conforme a su estructura primaria. Es importante mencionar que estas ubicaciones son con base a la estructura consenso, y que en la proteína de daphnia estos dominios pueden tener una ubicación aproximada, y de acuerdo con los resultados anteriores, al demostrarse que esta proteína es altamente

conservada, se espera que la arquitectura de la proteína en daphnia sea homóloga a la arquitectura de la estructura consenso, lo cual le permitiría desarrollar apropiadamente sus funciones como chaperona molecular.

Tabla 5. Ubicación de los dominios conservados sobre la estructura primaria de HSP70

Número de dominio	Nombre	Aminoácidos que lo conforman
1	NBD	1-187, 362-389
2	NEF/HSP70	188-229, 314-341
3	Sitio de interacción con BAG	230-313
4	SBD	390-508

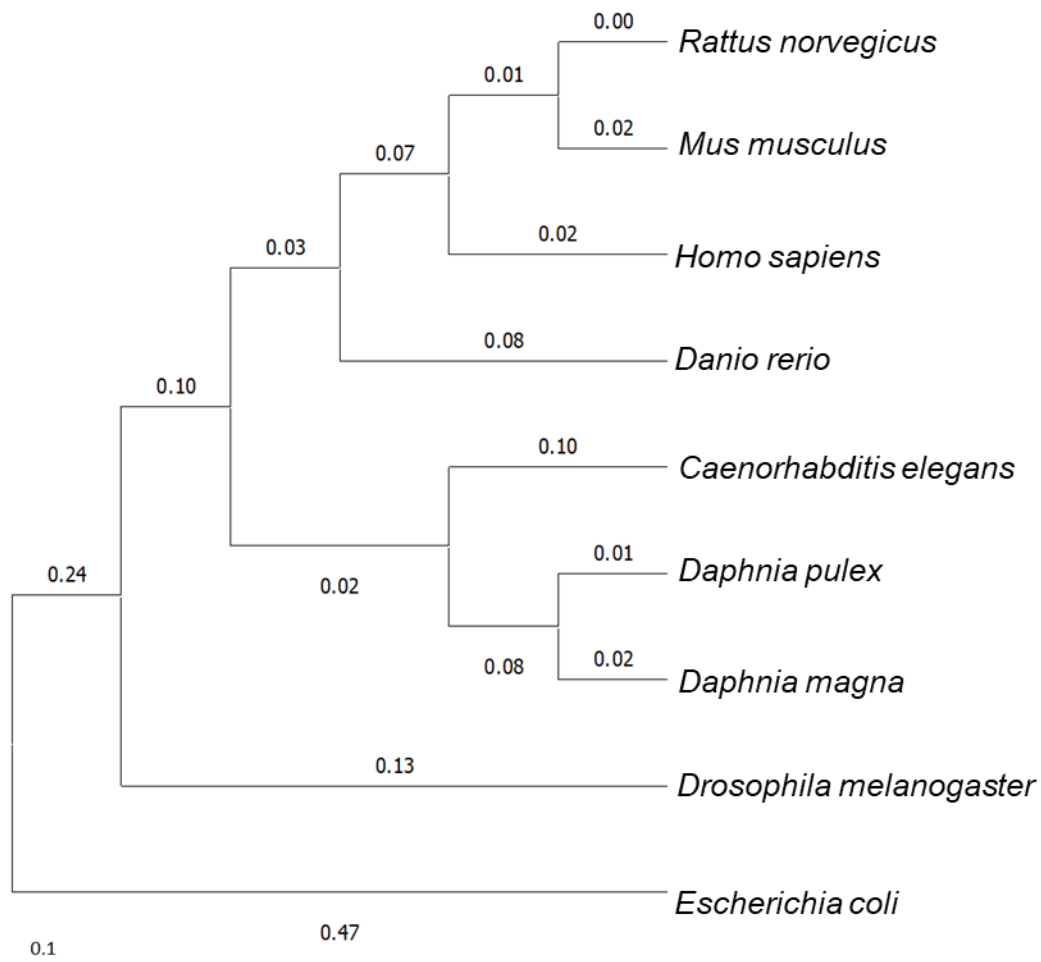


Figura 11. Árbol filogenético de la proteína HSP70. El árbol filogenético se construyó con la secuencia proteica de HSP70 de diferentes especies y se utilizó a la DnaK de 70 KDa de *E. coli* para darle un origen al árbol.

El árbol filogenético (Figura 11) se construyó empleando el programa MEGA X, utilizando la secuencia aminoacídica de la proteína HSP70 de las especies: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Rattus norvegicus*, *mus musculus*, *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, para representar gráficamente la homología de las proteínas entre las diferentes especies; se utilizó a la DnaK de 70 kDa de *Escherichia coli* que es la proteína homóloga en procariotas para darle un origen al árbol filogenético.

Los resultados muestran que la proteína HSP70 de *D. magna* resulta tener un alto grado de homología respecto a las especies que la marca comercial del Anticuerpo considera como reactivas, sumado a esto, el anticuerpo fabricado es policlonal, por lo tanto, tiene un mayor número de epítomos para reconocer, lo que aumenta la probabilidad de mostrar reactividad con la proteína de *D. magna*, razón por la cual este Anticuerpo se vuelve un candidato idóneo para los análisis de inmunodetección.

8.2 Investigaciones documentales

8.2.1 Daño UVB a nivel celular (Estrés oxidativo)

Como ya se mencionó anteriormente, múltiples factores abióticos causan un estado de estrés en *D. magna*, particularmente cuando el estresor es UVB, este organismo tiene diversas estrategias para contrarrestar el daño que esta radiación le pudiera causar, el primer mecanismo es a nivel de comportamiento, este crustáceo busca estratos de agua más profundos a los habituales para que con la refracción de la luz, la intensidad de RUV pueda disminuir, este fenómeno es conocido como migración vertical descendente, sin embargo, cuando esto no es suficiente, daphnia comienza con mecanismos de defensa fisiológicos, este organismo tiene la capacidad de producir pigmentos como melanina para protegerse de la RUV; los daños a nivel celular en macromoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, son remediados por complejos sistemas de reparación (Connelly et al., 2008).

Como es sabido la RUV puede generar alteraciones en el ADN, como dímeros de pirimidina (Junkong et al., 2009), la célula posee mecanismos de reparación de estas afectaciones, los más conocidos son reparación por escisión de nucleótidos (NER) o reparación fotoenzimática (PER), esta última es la más sencilla ya que solo depende de la enzima fotoliasa, que requiere de radiación de 400 a 500 nm para reparar los daños al ADN; NER es un proceso más complejo que requiere de un sistema multienzimático que elimina una pequeña porción de ADN que contiene las lesiones, este proceso requiere de un gasto energético a diferencia de PER (Connelly et al., 2008).

La radiación UVB pueden oxidar moléculas mediante la absorción de luz por cromóforos generando especies en estado excitado (es decir, especies con un electrón en un orbital

superior, fotorreacciones tipo 2) o radicales (fotorreacciones tipo 1), como resultado de la fotoeyección de un electrón. Las especies en estado excitado pueden inducir oxidación directa, por ejemplo, mediante la abstracción de electrones o átomos de hidrógeno o mediante transferencia de energía al oxígeno molecular O_2 para dar oxígeno singulete (1O_2), además de su formación por fotorreacciones de tipo 2, el 1O_2 también se forma por algunas reacciones catalizadas por enzimas, a través de reacciones de que involucren al radical peroxilo ($ROO \cdot$), y algunos procesos catalizados por iones metálicos; el 1O_2 es, por tanto, un intermedio importante producido por la luz UVB además del radical hidroxilo y peroxilo (Hawkins et al., 2019; Pattison et al., 2012). A continuación, se muestra en la tabla 6 los residuos aminoacídicos que son altamente afectados por estos radicales.

Tabla 6. Aminoácidos altamente oxidables por los radicales libres

Agente oxidante	Estructura	Objetivo
Oxígeno singulete	1O_2	Cys, Met, Trp, Tyr, His
Radical hidroxilo	$HO \cdot$	Todo, incluida la estructura peptídica
Radical peroxilo	$ROO \cdot$	Cys, Met, Trp, Tyr
Radiación UVB		Trp, Tyr, cistina

Los aminoácidos afectados por estos radicales pueden generar múltiples productos de oxidación, de acuerdo con la zona en donde sean atacados, en la figura 12 se muestran las estructuras químicas de los productos de oxidación derivados de estos aminoácidos.

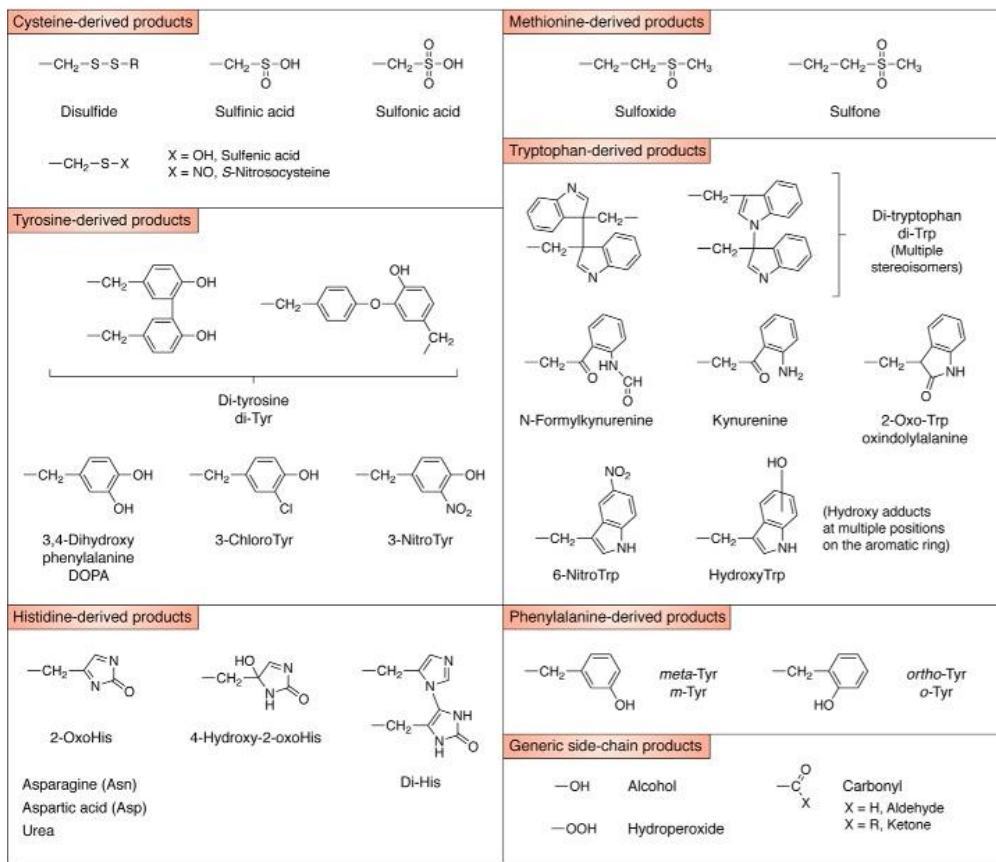


Figura 12. Especies oxidadas de los residuos aminoacídicos. Hawkins et al., 2019

En la figura 13 se puede observar un ejemplo de intercambio de electrones entre los residuos de tirosina y triptófano que sean adyacentes, generando los radicales fenoxil tirosina e indolil de triptófano, estos cambios estructurales en los residuos de aminoácidos generan la pérdida de la estructura nativa de la proteína y con ello su función biológica, debido a que se vuelven agentes reductores (Hawkins., et al 2019).

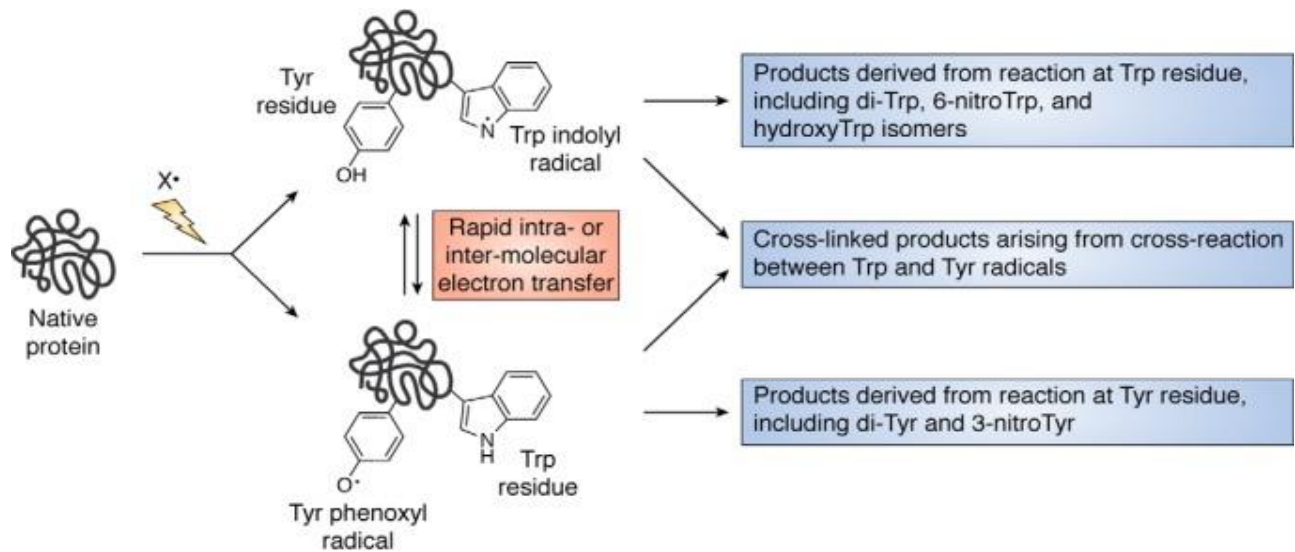


Figura 13. Vía de transferencia de electrones. Algunos residuos de aminoácidos al ser oxidados se vuelven altamente reactivos, lo que lleva a alteración de la estructura proteica. Hawkins et al., 2019.

Los radicales libres también pueden generar un daño directo a las cadenas polipeptídicas, resultando en la fragmentación del esqueleto proteico y esto parece ocurrir principalmente a través de la abstracción del átomo de hidrógeno del carbono α o por la escisión de los grupos R de los aminoácidos, a través de dos vías diferentes que involucran al radical peroxilo (ROO^\bullet) mediante hidrólisis y alcoxilo (RO^\bullet) mediante B-Escisión, esto puede resultar en una amplia gama de diferentes sitios de escisión a lo largo de la estructura de una proteína (Hawkins et al., 2019; Davies., et al 2003) como se ilustra en la figura 14.

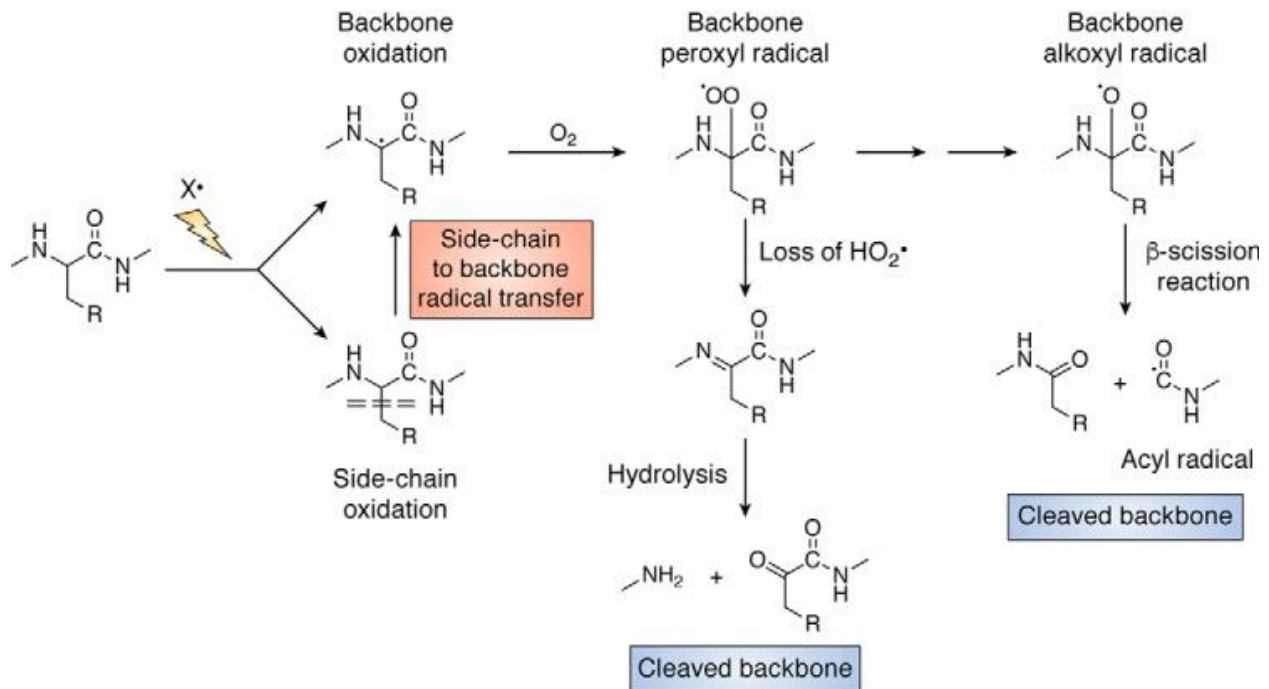


Figura 14. Vía de escisión del esqueleto proteico. La ruptura de la cadena peptídica se lleva por el ataque nucleofílico del carbono alfa de n residuo aminoacídico. Hawkins et al., 2019.

La oxidación de proteínas puede generar tanto fragmentación, como agregación de proteínas (Hawkins et al., 2019), esto conlleva a la activación de los sistemas de reparación a nivel celular.

8.2.2 HSP70 como mecanismo de protección frente a la radiación UVB

Cuando las células están expuestas a factores estresantes, entre ellos la RUV, se induce una serie de las llamadas proteínas de respuesta al estrés para conferir protección contra dichos factores estresantes. Las proteínas de choque térmico (HSP) son representativas de estas proteínas de respuesta al estrés, y especialmente la sobrerregulación de la expresión celular de HSP70, proporciona resistencia dado que las HSP repliegan o degradan las proteínas desnaturalizadas por factores de estrés como ROS (Matsuda 2010).

Matsuda y colaboradores en 2010, demostraron que la proteína HSP70 provee de protección celular frente a los daños provocados por la radiación UVB, en ratones y en cultivos celulares de queratinocitos de ratones. Demostraron que, en ratones, el daño epidérmico era mayor respecto a una cepa de ratones transgénicos, que expresaban

HSP70, además de que en estos últimos la respuesta inflamatoria tenía un menor impacto debido a que suprime la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, disminuyen la producción de ROS y aumentaba la expresión de I κ B- α (un inhibidor de NF- κ B, que es un factor de transcripción que regula la respuesta del sistema inmunológico). De igual forma los queratinocitos transfectados con un plásmido de HSP70 expuestos a RUV resistían más a los procesos apoptóticos respecto a los controles. Se sugiere que HSP70 suprime varios pasos en las vías moleculares que gobiernan la apoptosis, incluida la activación de p53, que juega un papel importante en la apoptosis inducida por UVB (Matsuda et al., 2010; Tang et al., 2007).

Uno de sus hallazgos más interesantes fue que tanto en los cultivos celulares transfectados y en los tejidos de los ratones transgénicos que fueron irradiados con UVB disminuyeron los niveles de dímeros de ciclobutano de pirimidina y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (Especie generada por el radical hidroxilo HO \cdot), probablemente debido a que HSP70 estimula la reparación por escisión de bases, posiblemente mediante la activación de la endonucleasa AP humana y la ADN-polimerasa β (Matsuda et al., 2010; Raj et al., 2007).

Por lo que la HSP70 provee de respuesta antiinflamatoria, anti apoptótica y protege contra el daño al ADN. Estos efectos de HSP70 deberían ser mutuamente dependientes. Por ejemplo, las ROS estimulan la actividad de NF- κ B y el daño del ADN, y tanto las ROS como el daño del ADN inducen la apoptosis.

8.2.3 HSP70 estructura y función

De las chaperonas moleculares, HSP70 es una de las proteínas más importantes debido a que se expresa de forma constitutiva e inducible, es la más abundante en el protoplasma celular y en menor medida en el núcleo celular, dos funciones de HSP70 son especialmente interesantes, el plegamiento *de novo* de polipéptidos nacientes y la interacción con proteínas de transducción de señales. Se estimó que las HSP70 ayudan al plegamiento *de novo* del 10-20% de todas las proteínas bacterianas, por lo que la dependencia de HSP70 para un plegado eficaz se correlaciona con el tamaño de la proteína. Dado que el tamaño medio de las proteínas en las células eucariotas aumenta

(52 kDa en humanos) en comparación con las bacterias (35 kDa en *E. coli*), es de esperar que un porcentaje aún mayor de proteínas eucariotas necesitarán Hsp70 durante el plegamiento *de novo* (Mayer et al.,2005).

HSP70 se compone de dos dominios básicos (figura 15); el dominio de unión a nucleótidos N-terminal (NBD) de 45 kDa es una estructura en forma de V compuesta por dos subdominios globulares, cada uno formados por cadenas A y B, que encierran el sitio de unión de ATP. El dominio de unión al sustrato (SBD) de 25 kDa también está formado por dos subdominios: un dominio de hoja beta (SBD β) o base y un dominio de alfa hélice (SBD α) o Lid. La función de Hsp70 implica interacciones alostéricas entre el NBD y el SBD. El NBD impulsa los cambios conformacionales del SBD, y los cambios conformacionales inducidos por el sustrato se transmiten desde el SBD a la interfaz NBD (Fernández et al., 2018; Mayer et al., 2005).

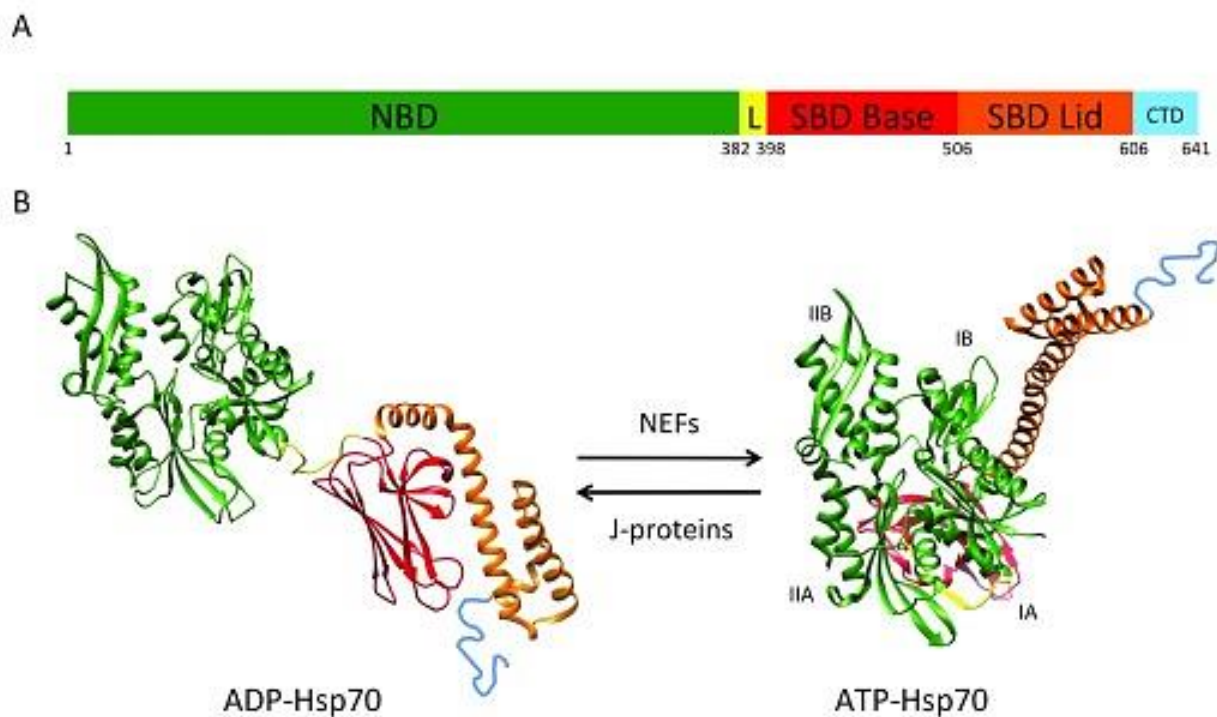


Figura 15. Estructura tridimensional de la proteína HSP70 de humano. Fernández et al., 2018.

La región SBD reconoce un motivo presente en la mayoría de las proteínas, en promedio cada 30 a 40 residuos, hay un motivo corto de cinco residuos hidrófobos y está flanqueado con residuos predominantemente cargados positivamente. Estas secuencias hidrófobas suelen estar enterradas en el núcleo de la proteína y su accesibilidad indica una conformación mal plegada. El SBD puede adoptar dos conformaciones: abierto y cerrado. La unión de ATP al NBD induce la conformación abierta de SBD al separar los subdominios Base y Lid, una conformación de baja afinidad por la unión de proteína. La hidrólisis de ATP impulsa la conformación cerrada; los reordenamientos estructurales se originan en el NBD y se transmiten a través del enlazador para inducir que los subdominios SBD Base y Lid se acerquen y atrapen la proteína sustrato con alta afinidad. El enlazador flexible y conservado contacta con el NBD en el estado abierto y se separa de él en la conformación cerrada. Por lo tanto, las Hsp70 reconocen varios sustratos al interactuar con los hidrófobos expuestos (Fernández et al., 2018; Voises et al., 2007).

Varias co-chaperonas (HSP40, Bag-1, Hip, CHIP) interactúan con HSP70 en diferentes regiones para modular su ciclo de ATPasa. Un componente esencial del ciclo es la co-chaperona HSP40. HSP40 se une a HSP70 y estimula su Actividad ATPasa, estabilizando la interacción de HSP70 y sustrato. Las co-chaperonas adicionales pueden modular aún más el ciclo de reacción de HSP70. La proteína Hip puede unirse al dominio ATPasa, estabilizando el estado unido a ADP promoviendo interacciones estables de HSP70 con su sustrato. Los factores de intercambio de nucleótidos, como Bag-1, también pueden unirse al dominio ATPasa de HSP70, liberando al ADP unido. La unión de ATP libera sustrato, completando el ciclo. En algunos casos, CHIP promueve la ubiquitinación y degradación de sustratos de HSP70. CHIP inhibe la actividad ATPasa estimulada por HSP40 de HSP70 reduciendo la capacidad de HSP70 para plegar su sustrato como se ilustra en la figura 16 (Voises et al., 2007), de esta manera la HSP70 es capaz de plegar proteínas *de novo* o replegar proteínas que han sido dañadas.

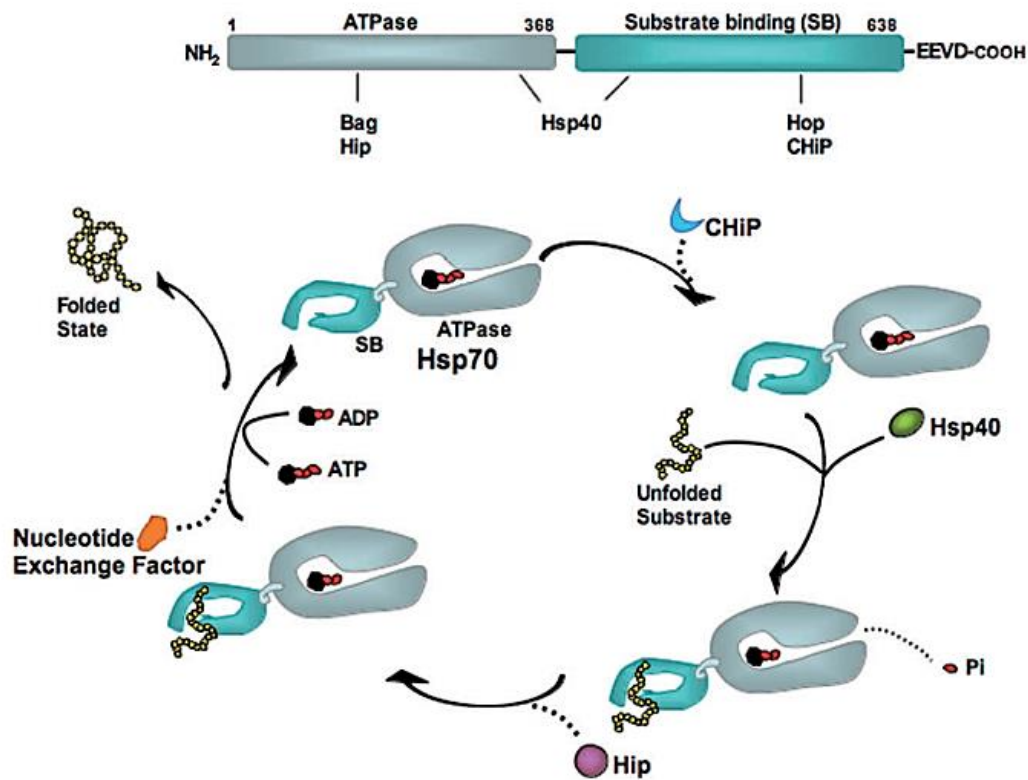


Figura 16. Mecanismo de acción de la proteína HSP70. Voises et al., 2007.

Para que HSP70 pueda desaglomerar los agregados proteicos debe funcionar como Co-chaperona de HSP's más grandes como HSP90 y HSP100.

La degradación de las proteínas se lleva mediante el sistema de ubiquitina-proteasoma asistido por chaperona (CUPS), implica la ubiquitinación de una proteína sustrato unida a la chaperona y su posterior interacción en el proteasoma.

En las células, CUPS implica el acoplamiento directo de la ubiquitina ligasa CHIP al extremo C de HSP70. Esta interacción favorece la ubiquitinación de proteínas unidas a HSP70. En el dominio NBS, la Bag-1 coordina la liberación de la proteína mal plegada de HSP70 con interacciones con el proteasoma. Bag-1 interactúa con el proteasoma a través de un dominio similar a la ubiquitina (UBL), y la ubiquitilación de Bag-1 por la ligasa

CHIP mejora esta asociación. Así, Bag-1 libera las proteínas sustrato de HSP70 cerca del proteasoma, facilitando su degradación.

7.2.4 Daño UVB en *D. magna* a nivel fisiológico

Las investigaciones realizadas por Judith D. Huebner et al., 2012, demostraron que la exposición de *D. magna* a UVB tiene efectos negativos sobre la supervivencia y reproducción de este cladóceros, los animales expuestos tenían un crecimiento más lento respecto a los controles, además de que, al alcanzar la madurez sexual, tenían un menor número de crías al mismo tiempo que nacían con un tamaño menor, este efecto se potenciaba al aumentar la temperatura de 25°C a 30°C, estos hallazgos fueron complementados con estudios histológicos de intestino y ovario de *D. magna* (Figura 17) basándose en las aportaciones de Zellmer et al., 2006, quienes observaron que en *D. pulex*, la exposición a RUV retrasa el inicio de la alimentación, retrasa el movimiento del alga por su intestino además de dañarlo. Las bajas tasas de crecimiento y reproducción también podrían justificarse debido a que dosis subletales de RUV aumentan la respiración celular en los daphnidos, las tasas de respiración más altas podrían provocar una reducción en las reservas de energía disponibles para el crecimiento y la reproducción, proporcionando otro mecanismo que conduce a menor tamaño de los animales y menor número de crías (Fischer et al., 2006). Además de un aumento en las ERO y ERN a nivel mitocondrial.

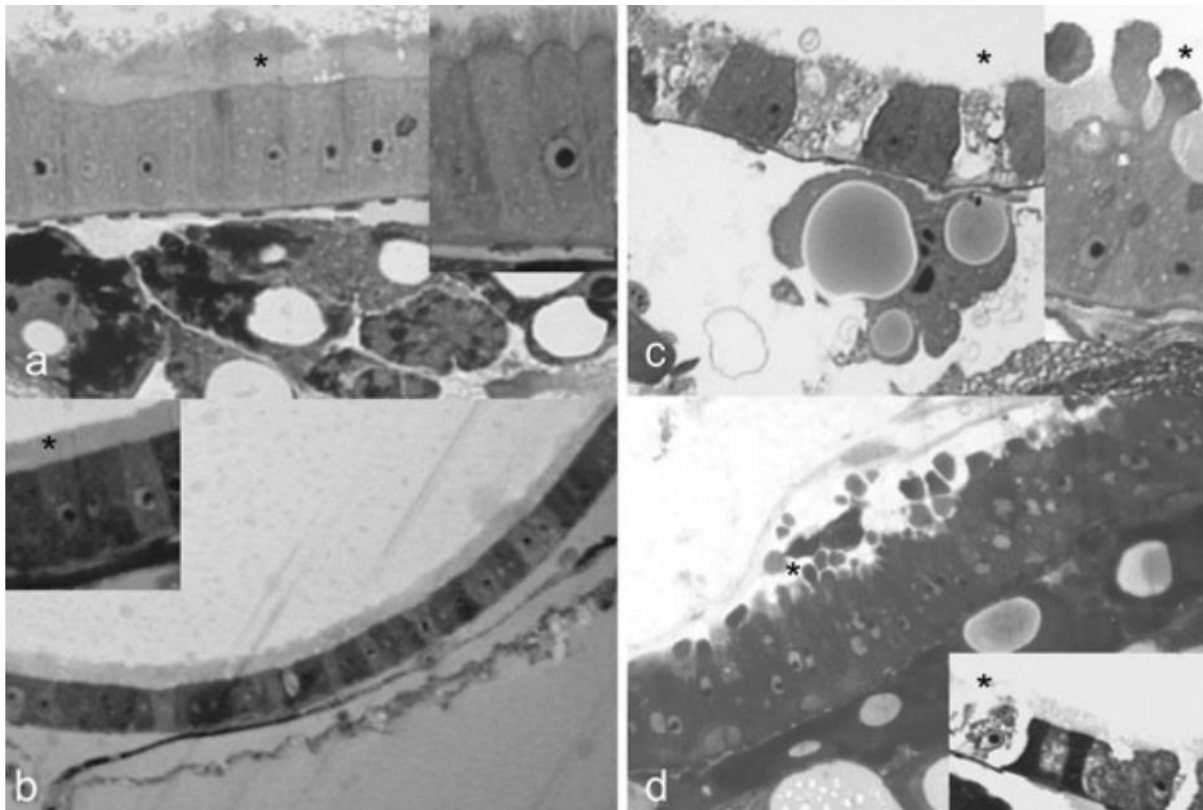


Figura 17. Epitelio intestinal de *D. magna*. *Epitelio columnar con borde de cepillo a 25°C (a) y a 30°C (b). Exposición del crustáceo a luz UVB a 25°C (c) y a 30°C (d). *disrupción de células epiteliales y formación de ampollas apicales. Zellmer et al., 2006.

7.2.5 Propuesta de los efectos benéficos de DATS sobre el daño producido por UVB

Como se mencionó anteriormente, el DATS es uno de los compuestos orgánicos de azufre más abundantes en el ajo (*Allium sativum*), y uno de los compuestos que más han llamado el interés debido a sus propiedades benéficas como quimiopreventivo, anticancerígeno y antimetastásico (Puccinelli et al., 2017), sin embargo, pocos estudios de este compuesto se han enfocado en las propiedades antioxidantes.

Actualmente varios mecanismos bioquímicos han sido relacionados con DATS, se sabe que es un agente prooxidante dentro de la célula y es capaz de generar ROS. Una vía de generación de ROS comienza con la degradación de la proteína de almacenamiento de hierro, ferritina, después del tratamiento con DATS, lo que conduce a un aumento en la reserva de hierro lábil, luego, a través de la reacción de Fenton / Haber-Weiss, el hierro

férrico libre reacciona con superóxido y peróxido de hidrógeno para formar radicales hidroxilo e iones hidróxido. Estos y otros ROS están implicados en procesos biológicos como el daño del ADN y la transducción de señales de muerte celular (Puccinelli et al., 2017; Borkowska et al., 2011).

Por otro lado, Fillomeni et al., 2008, propone que la propia molécula de DATS es una especie que puede generar ROS, mediante reacciones que dependen de la escisión homolítica del enlace disulfuro. Esto conduce a la formación de radicales alil- (per) tiilo, que pueden reaccionar rápidamente con GSH, formando así radicales disulfuro o polisulfuro y reducir el oxígeno para producir ROS. El superóxido y el peróxido de hidrógeno también se pueden producir como subproductos de la reacción entre el perthiol y el oxígeno como se muestra en la figura 18. Estos prooxidantes pueden inducir en la célula la activación de mecanismos antioxidantes y desintoxicantes, fenómeno conocido como pre-acondicionamiento.

Producción de ERO

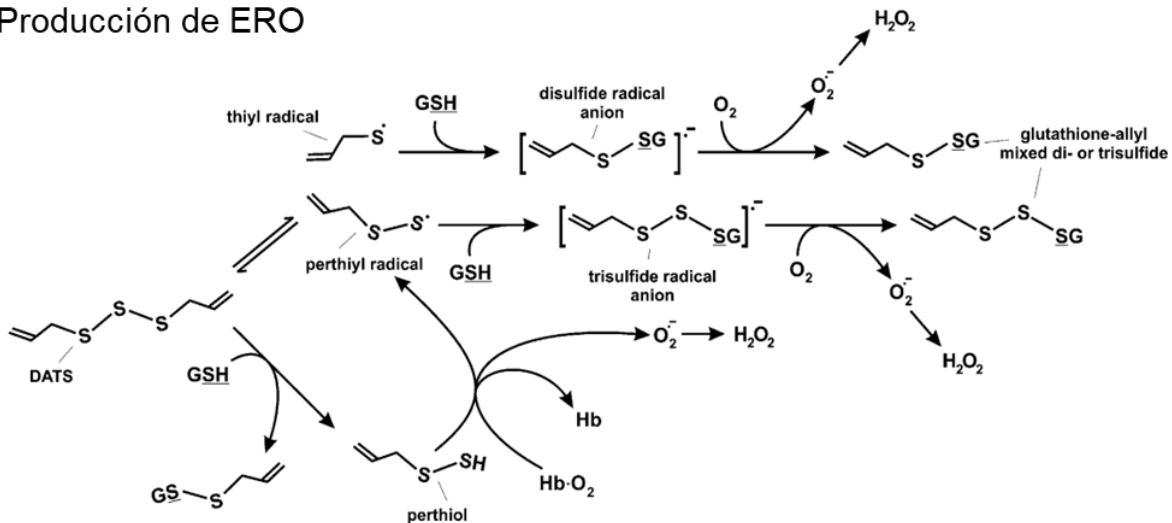


Figura 18. Producción de ROS por vía de escisión de DATS. Fillomeni et al., 2008.

Cuando la célula ha sido preacondicionada a las sustancias oxidantes, es más resistente a la aparición de más desafíos oxidativos. Uno de los ejemplos mejor establecidos es la activación del factor 2 relacionado con el factor eritroide nuclear 2 (Nrf2), que

normalmente está secuestrado en el citoplasma, pero se traslada al núcleo en respuesta al estrés oxidativo (Figura 19). Los sulfuros de alilo del ajo son capaces de activar rápidamente Nrf2, por lo que induce la transcripción de genes que codifican enzimas del sistema antioxidante / desintoxicante, como los relacionados con GSH. Sin embargo, el estado de precondicionamiento implica que el estrés oxidativo aplicado a las células no debe superar la capacidad amortiguadora del sistema de defensa antioxidante para evitar daños irreversibles de biomoléculas y / o muerte celular (Filomeni et al., 2008).

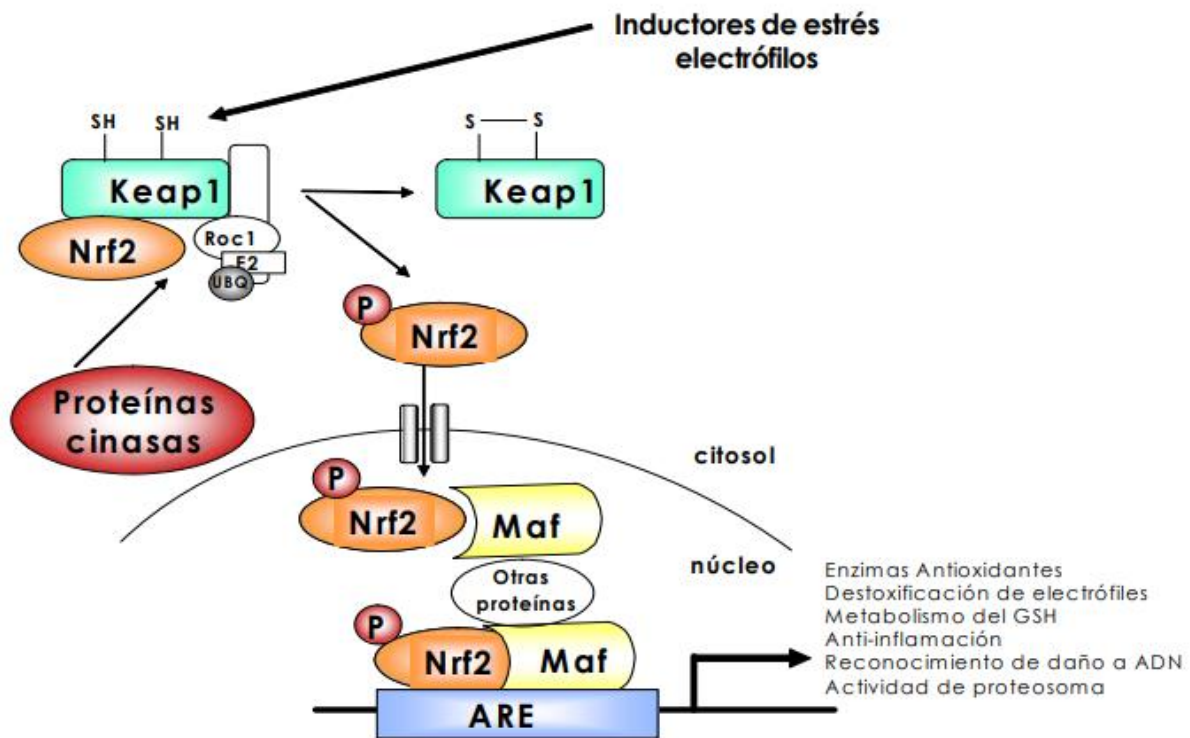


Figura 19. Activación de Nrf2 y vía de señalización para la expresión de elementos de respuesta antioxidante. Konigsberg et al., 2007.

En el entorno celular la proteína Keap 1 mantiene resguardado a Nrf2, por su parte Keap 1 tiene en su estructura, un grupo de cisteínas libres que actúan como un sensor de especies oxidantes, cuando estas cisteínas detectan a estas estructuras electrófilas, Keap 1 sufre un cambio conformacional que le permite dissociarse de Nrf2 y este puede trasladarse al núcleo celular donde comienza la transcripción de los elementos de respuesta antioxidante (Konigsberg et al., 2007).

Sijja et al., en 2019 evaluaron el estrés oxidativo por los efectos del paracetamol mediante la expresión de genes Nrf 1 y otras proteínas del sistema antioxidante en *Daphnia magna*, sus resultados mostraron que, en efecto, el aumento de Nrf1 estaba directamente asociado con el aumento de algunas enzimas detoxificantes principalmente a las 48 h posteriores a la exposición con paracetamol.

Si bien no hay una evidencia sólida acerca de la presencia de Nrf2 en *D. magna* es posible que el DATS también pueda actuar el Nrf1 para activar los elementos de respuesta antioxidante, además el DATS, al ser una molécula prooxidante puede generar ROS, en un escenario hipotético, estas ROS pueden dañar a las proteínas celulares y con ello activar los mecanismos de reparación mediante la HSP70, mencionados anteriormente.

7.2.5 Importancia de la modelación matemática

Daphnia magna es un modelo biológico cuyos parámetros de historia de vida como crecimiento, tasa de mortalidad y natalidad han sido evaluados en diversos estudios bajo diferentes situaciones de estrés (Luo et al., 2018; Bosker et al., 2019; Kim et al 2009), sin embargo, pocos estudios han relacionado a los biomarcadores celulares con los parámetros de historia de vida de este organismo de forma experimental. Es de suma importancia correlacionar los resultados de ambos aspectos de investigación; es decir a nivel molecular podemos evaluar distintos biomarcadores, que, bajo conceptos teóricos explicarían un comportamiento celular, sin embargo, a nivel fisiológico y poblacional los resultados podrían ser más complejos de lo que esperamos.

En estudios previos, de nuestro equipo de trabajo, se evaluó el comportamiento poblacional y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante, entre ellos el gen para *HSP70* cuando el organismo fue estresado con UVB y tratado con DATS en concentraciones de 10, 15 y 20 μM . Los resultados mostraron que, si bien todas las concentraciones aumentaron la expresión del gen *HSP70* respecto al control, la concentración 15 μM fue la que tuvo una mayor expresión, además de que únicamente en esta condición la población de dáfhnidos pudo recuperarse. Para las concentraciones

de 10 y 20 μM la natalidad de neonatos no se pudo recuperar a pesar del aumento en la expresión de *HSP70* (Figura 20). Los resultados podrían explicarse con base a la capacidad de amortiguación antioxidante que genera el DATS a nivel celular, por un lado, la concentración de 10 μM no genera un estímulo suficiente, que conlleve a la recuperación de la población, mientras que 20 μM sobre pasa la capacidad de defensa antioxidante, llevando a la muerte celular.

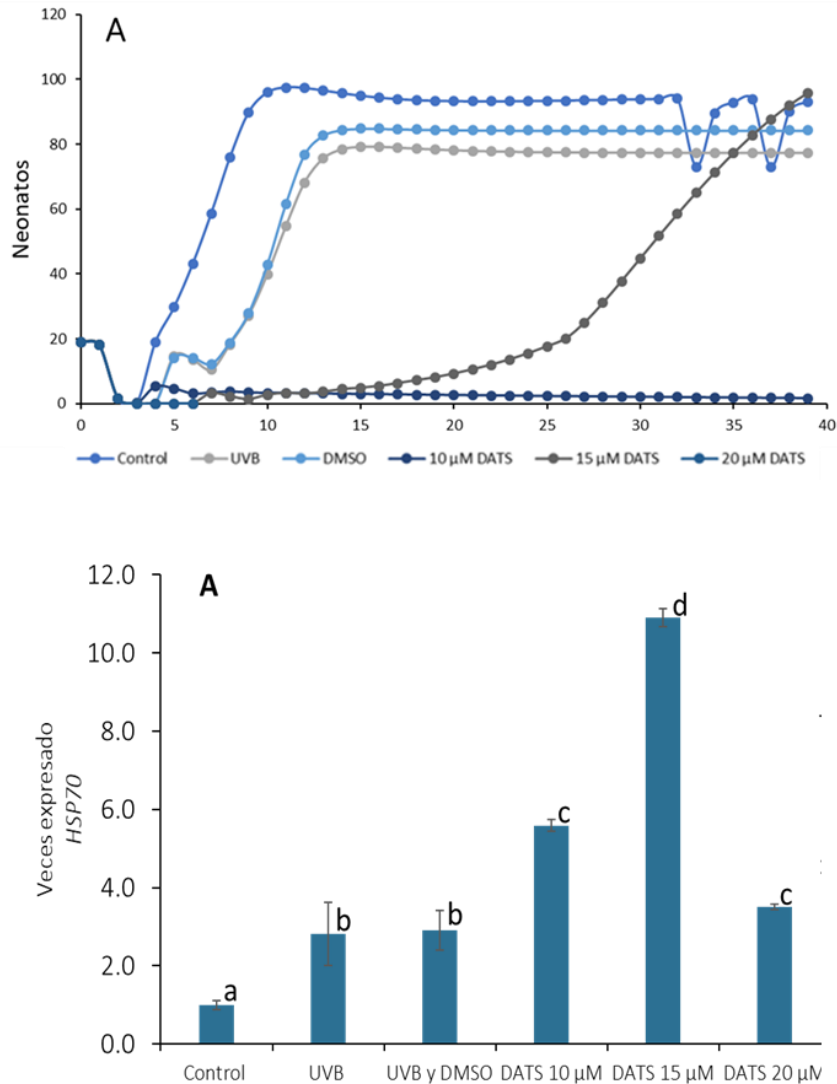


Figura 20. Dinámica poblacional y expresión de HSP70 bajo los efectos de UVB y tratamiento con DATS. (Tesis de Vargas 2019).

Por lo anterior, no se puede aseverar que la expresión de un biomarcador que, se sabe, mejora el estado celular, pueda realmente generar un beneficio a nivel fisiológico, por lo que es necesario evaluar otros parámetros para verificar los resultados.

7.2.6 Perspectivas de los resultados

Debido a la contingencia sanitaria causada por la pandemia de COVID-19 (SARS-CoV-2) los objetivos planteados no se pudieron concluir, sin embargo, es importante resaltar que el trabajo presentado puede funcionar como punto de partida para futuras investigaciones.

El primer objetivo particular podría complementarse identificando a la proteína HSP70 en diferentes puntos del ciclo de vida de *Daphnia magna*, para valorar si el efecto generado por DATS pudiera proveer beneficios a largo plazo en este organismo.

Por otro lado, evaluar biomarcadores relacionados con el crecimiento y reproducción de *D. magna* como la expresión de los genes: proteína cuticular y vitelogenina mediante técnicas como PCR, contribuiría a entender la disminución de los parámetros de historia de vida que se han reportado cuando este organismo es estresado con radiación UVB; esto con la finalidad de complementar lo planteado en el segundo objetivo particular.

Finalmente, como parte de seguir monitoreando a la población, podría realizarse un estudio multigeneracional a los descendientes de los dáfnidos que fueron estresados con UVB y tratados con DATS para determinar si las crías presentan una mejor defensa antioxidante ante el estresor respecto a sus predecesores, como parte de enriquecer lo establecido en el tercer objetivo particular.

9. CONCLUSIONES

Desarrollar estudios para la evaluación de los efectos tóxicos de la radiación UVB y los efectos post-tratamiento de DATS en la expresión de HSP70 en el modelo ecotoxicológico *D. magna*, requiere estandarizar procesos de crecimiento del modelo de estudio, así como de obtención de extractos proteicos en los que se pueda identificar a la proteína HSP70 mediante inmunodetección. En este trabajo se estandarizaron los procesos de extracción, cuantificación y separación de extractos proteicos totales mediante SDS-PAGE, identificando que a partir de 20 dáfhnidos, realizando la lisis celular mecánicamente en presencia de nitrógeno líquido y en solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7.6, sucrosa 0.5 M, KCl 0.15 M, Tritón x-100 al 0.1%, 2-mercaptoetanol 1 mM, fenantrolina 0.1 mM, PMSF 0.1 mM, EDTA 1mM., se obtuvieron extractos crudos con una concentración aproximada de 210 µg de proteína total, que fueron identificados mediante SDS-PAGE, en donde se estimó a una proteína de 70.3 kDa, la cual pudiera estar relacionada con HSP70, de acuerdo con el peso molecular reportado para esta proteína identificada en *D. magna*, en estudio previos. Respecto al desarrollo de los ensayos de inmunodetección, se logró identificar que 15 µg de extracto crudo fueron transferidos a la membrana de fluoruro de Polivilideno (PVDF) a 20 V, durante 25 minutos, estos antecedentes facilitarán la obtención de los resultados de inmunodetección, ensayo que se desarrollará con el anticuerpo policlonal Anti HSP70 / HSP72 (SPA-812) el cual es recomendado para detección de HSP70 para ratón, humano, rata, perro, *Drosophila*, entre otros, no obstante, en este trabajo se identificó mediante análisis bioinformático que la proteína HSP70 de *Daphnia magna* presenta homología de 81.32% con la proteína humana, y 79.59% con la proteína de rata, lo que señala que su empleo en futuros ensayos de inmunodetección en extractos proteicos totales obtenidos de *D. magna* presentará inmunoreactividad.

Se realizó una investigación documental sobre el daño que produce UVB a *D. magna* tanto a nivel celular como fisiológico, destacan las alteraciones inducidas a las proteínas principalmente la oxidación proteica, bajo estas condiciones, HSP70 sobresale como una de las proteínas de respuesta al estrés involucrada en los mecanismos de reparación de proteínas, gracias a sus funciones como chaperona molecular y su intervención en

múltiples procesos bioquímicos como degradación de proteínas por vía de la ubiquitina o su participación en el plegamiento de proteínas *sintetizadas de novo*. Adicional a la respuesta natural que la célula desarrolla para responder al estrés medio ambiental, compuestos fitoquímicos como DATS podrían contribuir positivamente a su recuperación, gracias a sus funciones antioxidantes, debido a que al ser un agente prooxidante podría favorecer la expresión de HSP70 y otros enzimas detoxificantes, y con esto atenuar los daños que la luz UV-B puede generar.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Azebedo S., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A., Loureiro, S. (2015). Co-exposure of zno nanoparticles and uv radiation to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: combined effects rather than protection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 35, No. 2, pp. 458–467.
- Agrawal M., Zitt A., Bagchi D., Weckesser J., Bagchi S., Von Elert E. (2005). Characterization of Proteases in Guts of *Daphnia magna* and Their Inhibition by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol Junio de 2005*; 20 (3): 314-22.doi: 10.1002 / tox.20123.
- Billoir E., Péry R., Charles S. (2007). Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: a combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, 203(3-4), 204-214.
- Borkowska A., Sielicka A., Herman A., Halon M., Wozniak M., Antosiewicz J. (2011). mediated ferritin degradation—A novel mechanism of ROS formation. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;51:658–663. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.045.
- Bosker T., Olthof G., Vijver, M. G., Baas J., Barmentlo, H. (2019). *Significant decline of Daphnia magna population biomass due to microplastic exposure. Environmental Pollution.* doi:10.1016/j.envpol.2019.04.067
- Buldú J., Wagemakers A. (2007). Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. *Revista Española*, 27–33. Retrieved from http://138.4.130.4/jmbuldu/files/07_buldu_rsef.pdf
- Bustos C. (2004). Aplicación de Modelos de Dispersión Atmosférica en la Evaluación de Impacto Ambiental: Análisis del Proceso (Tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Chen S., Chen D., Yang F., Nagasawa H., Yang W. (2011). Characterization and Processing of Superoxide Dismutase-Fused Vitellogenin in the Diapause Embryo Formation: A Special Developmental Pathway in the Brine Shrimp, *Artemia parthenogenetica*. *Biology of reproduction* 85, 31–41 (2011).
- Connelly J., Moeller E., Sanchez G., Mitchell L. (2009). *Temperature Effects on Survival and DNA Repair in Four Freshwater Cladoceran Daphnia Species Exposed to UV Radiation. Photochemistry and Photobiology*, 85(1), 144–152. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00408.x.
- Corrales L., Muñoz M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18 Julio - diciembre de 2012: 135 – 250.*
- Davies J., (2003) Singlet oxygen-mediated protein damage and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 305, 761–770 10.1016 / S0006-291X (03) 00817-9
- Díaz E., Membrillo J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1):34-44, 2006.
- Fernández E., Rejas, D. (2017). Effects of UVB radiation on grazing of two cladocerans from high-altitude Andean lakes. *PloS one*, 12(4), e0174334.

- Fernández, E., Campero M., Uvo C., Hansson. L. (2017). Disentangling population strategies of two cladocerans adapted to different ultraviolet regimes. *Ecology and Evolution*. 2018; 8:1995–2005.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo R. (2008). Molecular transduction mechanisms of the redox network underlying the antiproliferative effects of allyl compounds from garlic. *The Journal of nutrition*, 138(11), 2053-2057.
- Fischer M., Fields A., Pryzbylkowski P., Nicolai J., Neale J. (2006). Sublethal exposure to UV radiation affects respiration rates of the freshwater cladoceran *Daphnia catawba*. *Photochem. Photobiol.* 82, 547–550.
- Giraud M., Douville M., Cottin G., Houde M. (2017). Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine disrupting potential and molting effects. *PLoS ONE* 12(2): e0171763. doi:10.1371/journal.pone.0171763.
- Gutiérrez J., Mondragón P., García L., Hernández S., Ramírez S., Núñez N. R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Rev Esp Méd Quir* 2014; 19:446-454.
- Hannas R., Wang H., Thomson S., Kwon G., Li H., LeBlanc, A. (2010). Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquatic Toxicology* 101 (2011) 351–357
- Hawkins C., Davies M. (2019). *Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. Revista de Química Biológica, jbc.REV119.006217.* doi: 10.1074 / jbc.rev119.006217
- Huayta R., Zúñiga H., Esquerre C., Hernández L., Carranza L. (2013). Niveles de hidroperóxidos de proteínas y de grupos carbonilos en órganos de cobayos nativos de altura (huancavelica, 3660 m). *Ciencia e Investigación* 2013; 16(2): 90-95.
- Huebner J., Loadman N., Wiegand M., Huebner E., Palitsky D., Husarewycz W. (2012). UVB Radiation Affects Growth, Reproduction and Tissue Structure of *Daphnia magna* Across Several Temperatures. *Photochemistry and Photobiology 2012 The American Society of Photobiology* 0031-8655/12
- Hyungjoon I., Palas S., Joorim N., Jinho J. (2019). Time-Dependent Responses of Oxidative Stress, Growth, and Reproduction of *Daphnia magna* Under Thermal Stress. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02613-1>.
- Jolly C., Morimoto R. (2000). Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 19, October 4, 2000.
- Jordão R., Camosa B., Lemosc M. F. L., Soaresb A., Taulera R., Barata C. (2015). Induction of multixenobiotic defense mechanisms in resistant *Daphnia magna* clones as a general cellular response to stress. *Aquatic Toxicology* 175 (2016) 132–143.

- Kim E., Ansell C, Dudycha L. (2014). Resveratrol and food effects on lifespan and reproduction in the model crustacean *Daphnia*. *J. Exp. Zool.* 321A:48–56.
- Kim J., Lee M., Oha, S., Ku J., Kim K., Choi K. (2009). Acclimation to ultraviolet irradiation affects UV-B sensitivity of *Daphnia magna* to several environmental toxicants. *Chemosphere* 77 (2009) 1600–1608.
- Königsberg M. (2007). Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26(1): 18-25, 2007.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227, 680-685.
- Liu Y., Zhu P., Wang Y., Wei Z., Tao L., Zhu Z. (2015). Antimetastatic Therapies of the Polysulfide Diallyl Trisulfide against Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) via Suppressing MMP2/9 by Blocking NF- κ B and ERK/MAPK Signaling Pathways. *PLoS ONE* 10(4): e0123781. doi: 10.1371/journal.pone.012378.
- Loannidou, Z. S., Theodoropoulou, M. C., Papandreou, N. C., Willis J. H., Hamodrakas S. (2014). CutProtFam-Pred: Detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile Hidden Markov Models. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 52 (2014) 51e59
- Luo T. Chena J., Lia X., Zhanga S., Yaoa H., Peijnenburg W. (2018). Effects of lomefloxacin on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna* under simulated sunlight radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 166 (2018) 63–70
- Martínez R., Hernández U., Hernández A., Contreras A., Álvarez, C. (2013). Inducción a la síntesis de vitelogenina plasmática en machos de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) mediante el uso de 17 β Estradiol. ISSN – 1665-0514.
- Matsuda M., Hoshino T., Yamashita Y., Tanaka I., Maji, D., Sato, K., Mizushima T. (2010). Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5848-5858.
- Mayer M., Bukau B. (2005). Chaperonas de Hsp70: funciones celulares y mecanismo molecular. *Ciencias de la vida celular y molecular: CMLS*, 62 (6), 670–684.
- Mikulski A., Bernatowicz P., Grzesiuk M., Kloc, M., Pijanowska J. (2011). Differential Levels of Stress Proteins (HSPs) in Male and Female *Daphnia magna* in Response to Thermal Stress: A Consequence of Sex-Related Behavioral Differences? *J Chem Ecol* (2011) 37:670–676, DOI 10.1007/s10886-011-9969-5.
- Miner, B., Kulling, P., Beer K., Kerr B. (2015). Divergence in DNA photorepair efficiency among genotypes from contrasting UV radiation environments in nature. *Molecular Ecology* (2015) 24, 6177–6187.
- Pattison D., Rahmanto A., Davies M. (2012) Protein photooxidation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 38–53 10.1039 / C1PP05164D

- Pauwels, k., Stoks R., De Meester, L. (2005). Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *evol. b iol.* 18 (2005) 867–872
^a 2005 european society for evolutionary biology.
- Pijanowska, J., Kloc M. (2004). *Daphnia* Response to Predation Threat Involves Heat-Shock Proteins and the Actin and Tubulin Cytoskeleton. *Genesis* 38:81–86 (2004).
- Puccinelli M., Stan S. (2017). Dietary Bioactive Diallyl Trisulfide in Cancer Prevention and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1645; doi: 10.3390/ijms18081645.
- Raj D., Brash E., Grossman D. (2006). Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *The Journal of investigative dermatology*, 126(2), 243–257.
- Sambrook J., Maniatis T., Green R. *Clonación molecular: un manual de laboratorio* (cuarta edición). 2012.
- Sijia L, Rui D, Ping NX. (2019). Assessment of oxidative stress of paracetamol to *Daphnia magna* via determination of Nrf1 and genes related to antioxidant system, *Aquatic Toxicology* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.014>.
- Song T., Yang M., Wang Y., Liu Q., Wang H., Zhang J., Li T. (2016). Cuticular protein LmTwdl1 is involved in molt development of the migratory locust. *Insect Science* (2016) 23, 520–530, DOI 10.1111/1744-7917.12342
- Tang D., Kang R., Xiao W., Wang H., Calderwood K., Xiao X. (2007). The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 179(2), 1236–1244.
- Torres V., Urrego R., Echeverri J., Albeiro Z. (2019). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 2019;10(2):433-459.
- Viada E., Gómez, L., Campaña I. R. (2017). Estrés oxidativo. ISSN 1560-4381 CCM 2017.
- Wang Y., Wang T., Ban Y., Shen C., Shen Q., Chai X., Zhao W., Wei J. (2018). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Modulates Antioxidant Enzyme. Activity and Gene Expression in Juvenile and Adult *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (2018) 75:145–156.
- Wolinski L., Modenutti, B., Souza S., Balseiro E. (2016). Interactive effects of temperature, ultraviolet radiation and food quality on zooplankton alkaline phosphatase activity. *Environmental Pollution* 213 (2016) 135e142.
- Zellmer D., V. Strus. (2006) Food chain effects of sublethal ultraviolet radiation on subarctic *Daphnia pulex*—A field and laboratory study. *Arch. Hydrobiol.* 167, 515–531.