Revista Tlamati Sabiduria

Título del artículo.

Influencia de $HgCl_2$ en la expresión de fibrilarina (Fb) en germinación de *Phaseolus vulgaris L.*

Título del artículo en idioma Inglés.

Influence of $HgCl_2$ in fibrillarin expression (Fb) on germination of *Phaseolus vulgaris* L

Autores.

Josefina Huerta García
Edgar León Esparza Ibarra
Francisco Javier Cabral Arellano
Lucía Delgadillo Ruiz

Referencia bibliográfica:

MLA

Huerta García, Josefina, Edgar León Esparza Ibarra, Francisco Javier Cabral Arellano, Lucía Delgadillo Ruiz. "Influencia de $HgCl_2$ en la expresión de fibrilarina (Fb) en germinación de *Phaseolus vulgaris L*". *Tlamati* 6.1 (2015): 16-26. Print.

APA

Huerta García, J., Esparza Ibarra, E. L., Cabral Arellano, F. J. y Delgadillo Ruiz,, L. (2015). Influencia de $HgCl_2$ en la expresión de fibrilarina (Fb) en germinación de *Phaseolus vulgaris L. Tlamati*, 6(1), 16-26.

ISSN: 2007-2066.
Publicado el 30 de Marzo del 2015
© 2015 Universidad Autónoma de Guerrero
Dirección General de Posgrado e Investigación
Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.

Revista Tlamati Sabiduría

Influencia de $HgCl_2$ en la expresión de fibrilarina (Fb) en germinación de *Phaseolus vulgaris L.*

Josefina Huerta García[1*]
Edgar León Esparza Ibarra[1]
Francisco Javier Cabral Arellano[1]
Lucía Delgadillo Ruiz[1]

[1] *Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Biotecnología y Ciencias Ambientales. Av. Preparatoria s/n. Col. Hidráulica C.P. 98000.*

***Autor de correspondencia**
jhuga@msn.com

Resumen

El mercurio (Hg) es considerado en la actualidad un contaminante ambiental de alto riesgo para la salud humana y el medio ambiente. La toxicidad del Hg y sus compuestos ha sido documentada ampliamente, sin embargo los mecanismos moleculares de su toxicidad no han sido del todo clarificados. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) en la expresión de Fb, como un biomarcador de efecto temprano de contaminación por mercurio, utilizando como modelo semillas de *Phaseolus vulgaris L.,* variedad negro Jamapa. Fibrilarina (Fb) uno de los principales componentes del nucléolo, es una ribonucleoproteína conservada filogenéticamente, esencial en procesamiento de RNA ribosomal (RNAr) en asociación con pequeños RNAs nucleolares (snoRNAs), además de otras funciones básicas en los sistemas biológicos. La expresión de Fb fue monitoreada a través de electroforesis de proteínas (PAGE-SDS) y Western blot en embriones de frijol durante etapas tempranas de germinación con diferentes tiempos 0, 6, 12, 18, 24 y 30 hrs y con una exposición de 10, 20 y 30 µM de $HgCl_2$. Los resultados obtenidos por Western blot revelaron que el mercurio inhibe la expresión de la proteína nucleolar Fb a partir de una concentración mínima de 10 µM de $HgCl_2$ después de 18 horas de iniciada la germinación. Estas observaciones demuestran que la proteína suele ser una molécula blanco de mercurio capaz de inhibir su expresión. Esta particular selectividad de $HgCl_2$ por la proteína pudiera constituir las bases bioquímicas para considerar a Fb como biomarcador temprano de contaminación por $HgCl_2$. Adicionalmente los resultados muestran que el $HgCl_2$ provocó una clara inhibición y retraso de la germinación de las semillas de manera paulatina, conforme se aumentó la dosis de mercurio hasta 30 µM de $HgCl_2$. El presente estudio describe por primera vez la presencia de Fb en *Phaseolus vulgaris L.*, y el efecto del mercurio en su expresión.

Palabras Clave: Fibrilarina, Cloruro de mercurio, Western Blot

Como citar el artículo:
Huerta García, J., Esparza Ibarra, E. L., Cabral Arellano, F. J. y Delgadillo Ruiz,, L. (2015). Influencia de $HgCl_2$ en la expresión de fibrilarina (Fb) en germinación de *Phaseolus vulgaris L. Tlamati,* 6(1), 16-26.

Abstract

Mercury (Hg) is now considered an environmental contaminant of high risk to human health and the environment. The toxicity of mercury and its compounds has been extensively documented, but the molecular mechanisms of toxicity have not been fully clarified. The aim of this study was to analyze the effect of mercuric chloride ($HgCl_2$) in the expression of Fb, as a biomarker of early effect of mercury contamination, using as a model of *Phaseolus vulgaris* L. seeds, black variety Jamapa . Fibrillarin (Fb) one of the main components of the nucleolus, is an essential ribonucleoprotein phylogenetically conserved in ribosomal RNA processing (rRNA) in partnership with small nucleolar RNAs (snoRNAs), along with other basic functions in biological systems. The expression of Fb was monitored by protein electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot of embryos beans during early stages of germination with different times 0, 6, 12, 18, 24 and 30 hrs and exposure 10 , 20 and 30 µM $HgCl_2$. The results obtained by Western blot revealed that inhibits mercury nucleolar protein expression Fb from a minimum concentration of 10 µM $HgCl_2$ after 18 hours after the start of germination. These observations demonstrate that the protein is usually a mercury target molecule capable of inhibiting its expression. This particular selectivity of $HgCl_2$ by protein may constitute the biochemical basis for considering Fb as early biomarker of contamination by $HgCl_2$ Additionally the results show that the inhibition $HgCl_2$ and caused marked delay seed germination gradually, as the dose of mercury is increased to 30 µM $HgCl_2$. The present study describes for the first time the presence of Fb in *Phaseolus vulgaris L*. and the effect of mercury in their expression.

Key words: Fibrillarin, Cloruro de mercurio, Western Blot

Introducción

Con el advenimiento del desarrollo industrial y minero, la contaminación ambiental se ha incrementado en las últimas décadas, siendo los metales pesados (MP) uno de los principales contaminantes cuya toxicidad implica múltiples efectos negativos sobre la salud de los seres vivos, incluyendo al ser humano. El ser humano es más sensible a la presencia de MP que las plantas, las cuales son capaces de acumular elementos metálicos en sus tejidos y órganos con cierta tolerancia (Sipter, Auerbach, Katalin y Mathe-Gaspar, 2009). El principal problema de los metales pesados es su bioacumulación y que no son biodegradables, por tanto representan un riesgo permanente para la salud y el medio ambiente (Pirrone, Costa, Pacyna y Ferrara, 2001).

El mercurio (Hg) por sus propiedades físicas y químicas únicas ha sido identificado como una sustancia tóxica persistente y bioacumulable (STPB). El Consejo de Administración del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2002) propone que existen pruebas suficientes de efectos adversos significativos de este elemento tanto en la salud como en el ambiente, por lo cual lo declara como una seria amenaza global.

Los efectos de mercurio nivel bioquímico muestran una alta afinidad para unirse a diversos grupos funcionales principalmente grupos sulfhidrilo (-SH), provocando profundas modificaciones metabólicas que incluso pueden conllevar a muerte celular (García y Reyes 2001) A nivel genético el Hg altera la fidelidad de duplicación del DNA además de interferir con la asociación de proteínas histonas, lo que conlleva a mutagénesis, esto explica las aberraciones cromosómicas y anomalías congénitas observadas durante las intoxicaciones alimentarias con mercurio (Schurz, Vilar y Gremmels, 2000; Patra, Bhowmik, Bandopadhyay y Sharma, 2004).

Fibrilarina (Fb) es una proteína conservada filogenéticamente, esencial en procesamiento de RNAr en asociación con snoRNAs (Baserga, Yang y Steitz, 1991). La literatura reporta que Fb suele ser molécula blanco de Hg, dicha asociación no es muy clara, sin embargo estudios reportan que el $HgCl_2$ provoca una modificación de las propiedades moleculares y funcionales de la proteína (Pollard, Lee, Casiano, Bluthner, Johnston y Tan, 1997; Pollard, Pearson yTan, 2000). Los grupos -SH forman parte estructural del aminoácido cisteína que se encuentra incorporado a centros activos de enzimas por lo que su bloqueo por este metal pesado resulta en una disminución o eliminación de sus actividades catalíticas. Las investigaciones reportan que Fb es una proteína involucrada en una serie de funciones biológicas básicas, además de presentar actividades enzimáticas. En base a esto, es razonable suponer que la unión de $HgCl_2$ desestabiliza los enlaces --SH intramoleculares, lo que resulta en alteración de la estructura tridimensional de Fb que induce la generación de epítopes crípticos que estimulan su degradación por proteosomas (Chen y von Mikecz, 2005).

Una característica en la estructura primaria de Fb tanto en animales como en plantas (*Arabidopsis thaliana),* es la presencia de dos a cuatro residuos de cisteína, los cuales parecen ser el sitio directo de interacción con el Hg (Pollard et al. 1997). El comprender las interacciones intramoleculares entre los grupos -SH de la cisteína tiene suma importancia no solamente para entender el papel funcional de Fb, sino también para clarificar la afinidad que tiene el mercurio hacia Fb (Takeuchi, Rothe y Goeddel, 1996).

El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de $HgCl_2$ en la expresión de Fb en embriones de *Phaseolus vulgaris L.*, durante etapas tempranas de germinación, que puede ser utilizado como un posible biomarcador de contaminación por Hg.

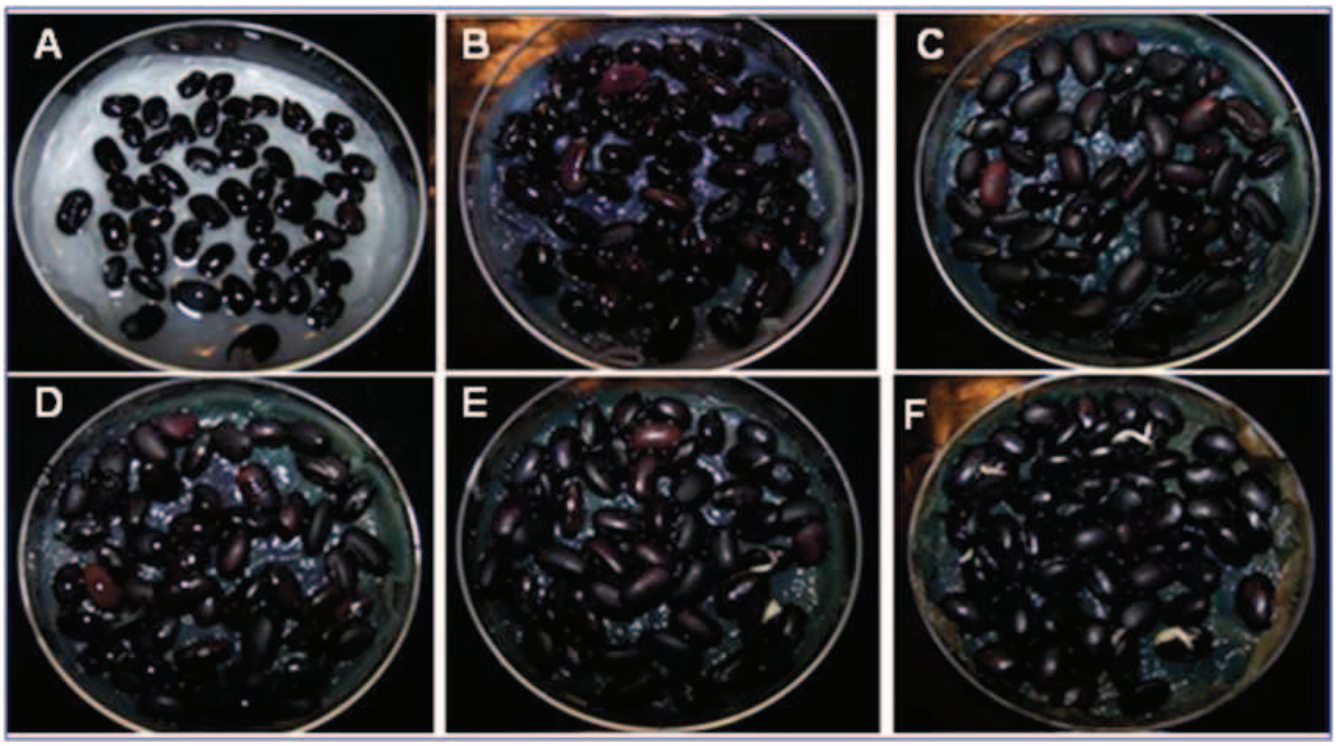


Figura 1**.** Germinación grupo Testigo (sin $HgCl_2$) : A - 0 hrs; B – 6 hrs; C -12 hrs; D -18 hrs; E - 24 hrs Inicio de germinación / 2 semillas y F -30 hrs/ 4 semillas germinaron

Materiales y métodos

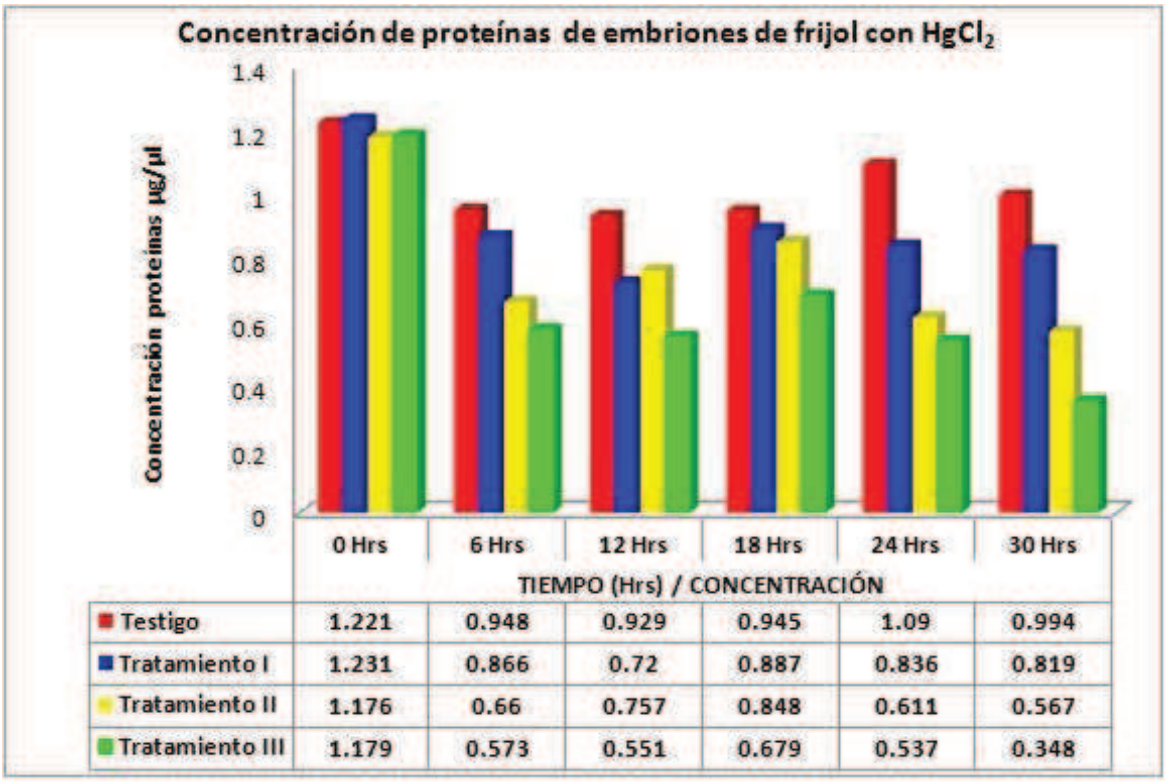
Germinación de semillas de Frijol Negro Jamapa. Se pesaron 15 gramos de semillas de frijol, se aplicó un tratamiento breve de esterilización superficial de la semillas por inmersión en hipoclorito de sodio al 1%, por 3 minutos, seguido de tres lavados de agua destilada estéril por 3 minutos c/u. (Wilson, 1915). Posteriormente se colocaron en cajas petri que contenían 3 discos de papel absorbente estéril, siendo cubiertas con un disco del mismo papel, se les agregó 25 ml de agua destilada estéril. La incubación se llevó a cabo en condiciones controladas de humedad y temperatura constante de 25º C, en una incubadora simple, con diferentes tiempos de germinación (0, 6, 12, 18, 24 y 30 hrs.).Se estudiaron 2 grupos, uno sin $HgCl_2$ (testigo) y tres expuestos a diferentes concentraciones de $HgCl_2$.:tratamiento 1-10 µM de $HgCl_2$, tratamiento II-20 µM de $HgCl_2$ y tratamiento III-30 µM de $HgCl_2$ (experimentales).

Extracción de proteínas solubles de embriones de frijol. Una vez que se cumplieron los tiempos de germinación, se procedió a la extracción de embriones de las semillas de frijol, posteriormente se pesó la cantidad obtenida de cada muestra y se sumergieron en nitrógeno líquido; y una vez congelados se trituraron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino, al cual se le adicionó buffer de extracción NET-2, 20 µl de buffer por µg de embrión pulverizado, según lo describen Nambara, Naito y McCoort (1992), luego se disolvió en agitador (vortex), y se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf, se almacenaron en congelación (-4ºC) hasta su cuantificación de proteínas solubles de acuerdo a la técnica de micro Bradford (1976), todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). Una vez obtenidos los extractos solubles se procedió a la separación de proteínas obtenidas en base a su peso molecular a través de PAGE-SDS, en condiciones reductoras por el método descrito por Laemmli (1970). Para lo cual se utilizó una minicamara de electroforesis dual Mini protean II de Bio-Rad. Se prepararon los geles separador (12%) y concentrador (4.5%). Se utilizaron 45 µg de proteína por carril, las cuales fueron desnaturalizadas con buffer de muestra Laemmli (Tris-Cl 0.5 M, pH 6.8, 4.0 ml de SDS al 10%, 1.0 ml de Bis-mercaptoetanol, 8.0 ml de glicerol, 20 µl de azul de bromofenol al 1% y 4.5 ml de agua destilada). Se colocaron las muestras en los pozos del gel, y se agregó buffer de corrida, se corrió el gel a 100 volts constantes por aproximadamente 2 horas usando una fuente de poder Power Pac de Bio Rad. Al término de la electroforesis se tiñeron los geles para visualizar las bandas de proteína con azul coomasie R-250. Se incluyeron marcadores de peso molecular de 10-250 kDa (Bio-Rad).

Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa. Después de llevar a cabo la electroforesis se procedió hacer la electrotransferencia de proteínas del corrimiento en gel a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a lo descrito por Towbin, Staehelin y Gordon (1979). En equipo semi dry y con fuente de poder modelo pac 200 marca Bio-Rad, en una corriente de 20 Volts por 30 minutos. Al ter-

Grafica 1. Efecto de $HgCl_2$ en concentración de proteínas (µg/µl) de embriones de frijol en etapas tempranas de germinación (0, 6, 12, 18, 24 y 30 hrs): Testigo/sin $HgCl_2$ (rojo); Tratamiento 10 µM de $HgCl_2$ (azul); Tratamiento 20 µM de $HgCl_2$ (amarillo) y Tratamiento 30 µM de $HgCl_2$ (verde).



	0 Hrs	6 Hrs	12 Hrs	18 Hrs	24 Hrs	30 Hrs
Testigo	1.221	0.948	0.929	0.945	1.09	0.994
Tratamiento I	1.231	0.866	0.72	0.887	0.836	0.819
Tratamiento II	1.176	0.66	0.757	0.848	0.611	0.567
Tratamiento III	1.179	0.573	0.551	0.679	0.537	0.348

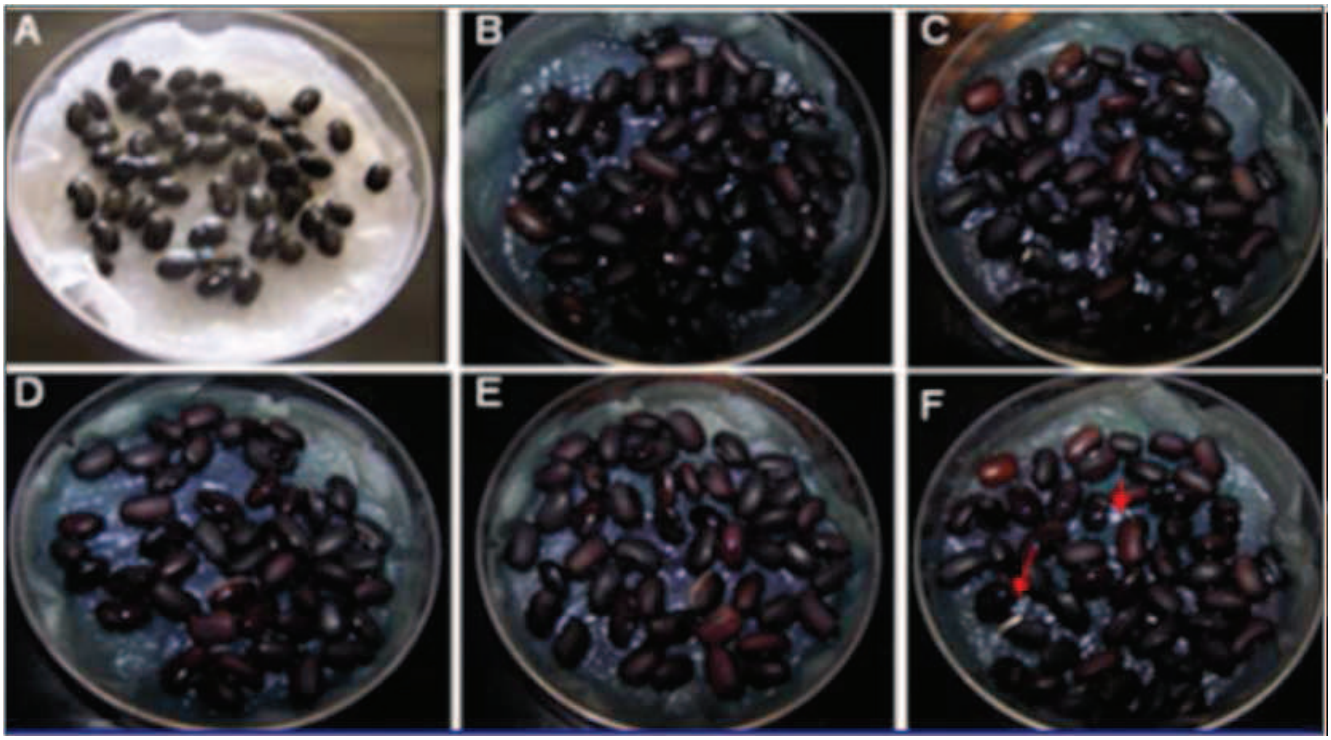


Figura 2. Germinación Tratamiento 10 µM $HgCl_2$: A - 0 hrs; B – 6 hrs; C -12 hrs; D -18 hrs; E - 24 hrs y F -30 hrs/ 2 semillas germinaron (flecha roja).

mino de la transferencia el papel de nitrocelulosa se tiñó en solución de fast green: 0.1 g de colorante (0.1%), 5 ml de ácido acético (5%), 10 ml de metanol (10%), aforados a 100 ml con agua destilada. Después se retiró el colorante y se lavó con agua destilada para verificar la transferencia de las proteínas y se dejó secar el papel de nitrocelulosa

Western Blot. Después de transferir las proteína, a las membranas de nitrocelulosa se sumergieron en solución de PBS- leche 3% en agitación constante durante toda la noche. Para determinar la presencia de la proteína Fb de 34 kDa mediante reactividad del anticuerpo se incubó con el autoanticuerpo anti-Fb de humano por 2 horas. Después se repitieron 3 lavados con PBS-Tween 20 posteriormente se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG humana cadena gamma específica conjugada con peroxidasa por 2 horas. Por último la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con el compuesto 3-3, Diamino Bencidina en presencia del catalizador Peróxido de Hidrogeno (Towbin y Gordon, 1984).

Densitometría. Las imágenes de las bandas de proteína obtenidas por Western blot, fueron capturadas en un fotodocumentador ChemiDoc XRS $^{+}$ marca Bio-Rad. Luego se sometieron a un análisis densitométrico cuantitativo, con el sofware Quanty One de marca Bio-Rad versión 2.01.

Resultados

Los resultados obtenidos de las semillas expuestas a diferentes tratamientos de $HgCl_2$ mostraron marcados efectos de inhibición y retraso en el proceso de germinación a partir de una concentración de 10 µM, este comportamiento se incrementó al ir aumentando la dosis a 20 µM, y culminando con la muerte de las semillas a una concentración de 30 µM de mercurio a las 102 hrs (dato no mostrado), en comparación con el grupo testigo, como se observa en las figuras 1, 2, 3 y 4.

Una vez que los diferentes tratamientos sobre las semillas cumplieron los tiempos de germinación con los respectivos tratamientos de $HgCl_2$, se cuantificó la concentración de proteínas por espectrofotometría en cada uno de los grupos de estudio, observándose un buen rendimiento para ser procesadas en PAGE-SDS. Los resultados que se muestran en la Gráfica 1 nos permiten observar que la concentración de proteínas fue mayor en el grupo testigo, en comparación con los tres tratamientos de $HgCl_2$. Cada uno de los grupos iniciaron con una alta concentración de proteínas en semillas en dormancia (0 hrs), sin embargo una vez que dio inicio el proceso de germinación se observa que la exposición gradual de 10, 20 y 30 µM de HgCl2 va disminuyendo la síntesis proteica, datos mostrados en la Grafica 1, demostrando así el gran potencial que tiene el Hg para inhibir la síntesis de proteínas solubles a través del tiempo de germinación temprana (6, 12, 18, 24 y 30 hrs), en presencia de mercurio.

Los resultados electroforéticos (véanse figuras 5 y 6) mostraron perfiles proteicos diferenciales en la expresión de bandas en cada uno de los grupos. El grupo testigo expresó gran cantidad de bandas de proteínas en etapas tempranas de germinación. Una de las bandas comunes que se

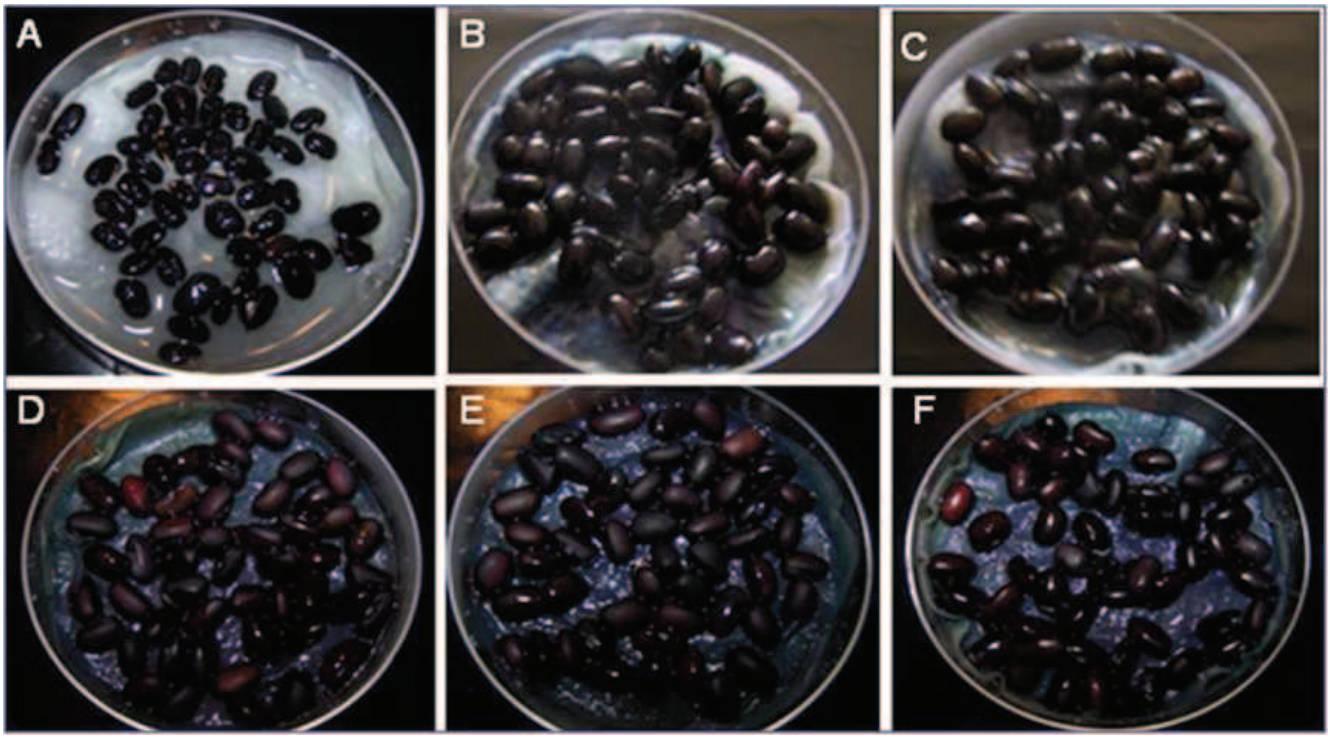
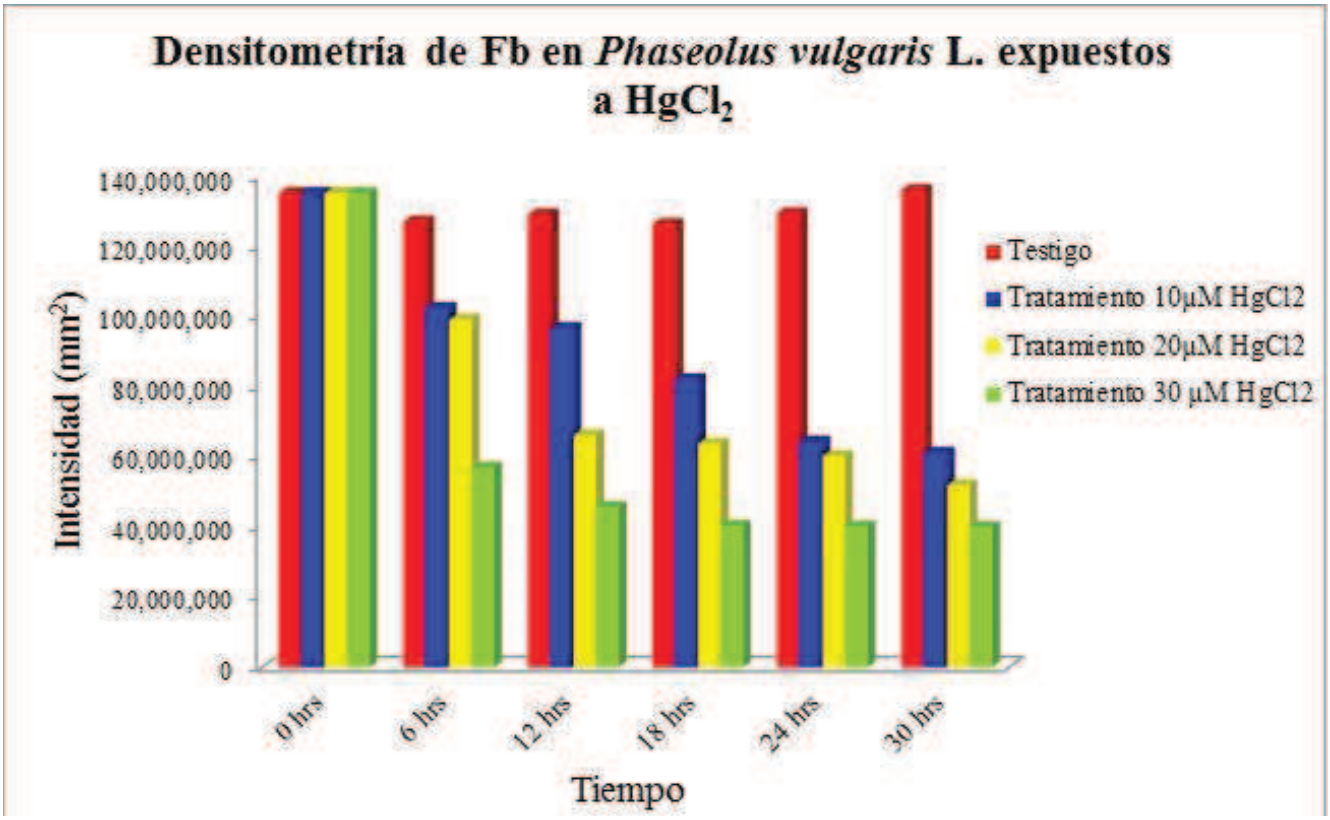


Figura 3. Germinación Tratamiento **2**0 µM $HgCl_2$: A - 0 hrs; B – 6 hrs; C -12 hrs; D -18 hrs; E - 24 hrs y F - 30 hrs.

Gráfica 2. Densitometría de Fb en embriones de frijol expuestos a $HgCl_2$ en etapas tempranas de germinación (0 a 30 hrs). Testigo/sin $HgCl_2$ (rojo); Tratamiento 10 µM de $HgCl_2$ (azul); Tratamiento 20 µM de $HgCl_2$ (amarillo) y Tratamiento 30 µM de $HgCl_2$ (verde).



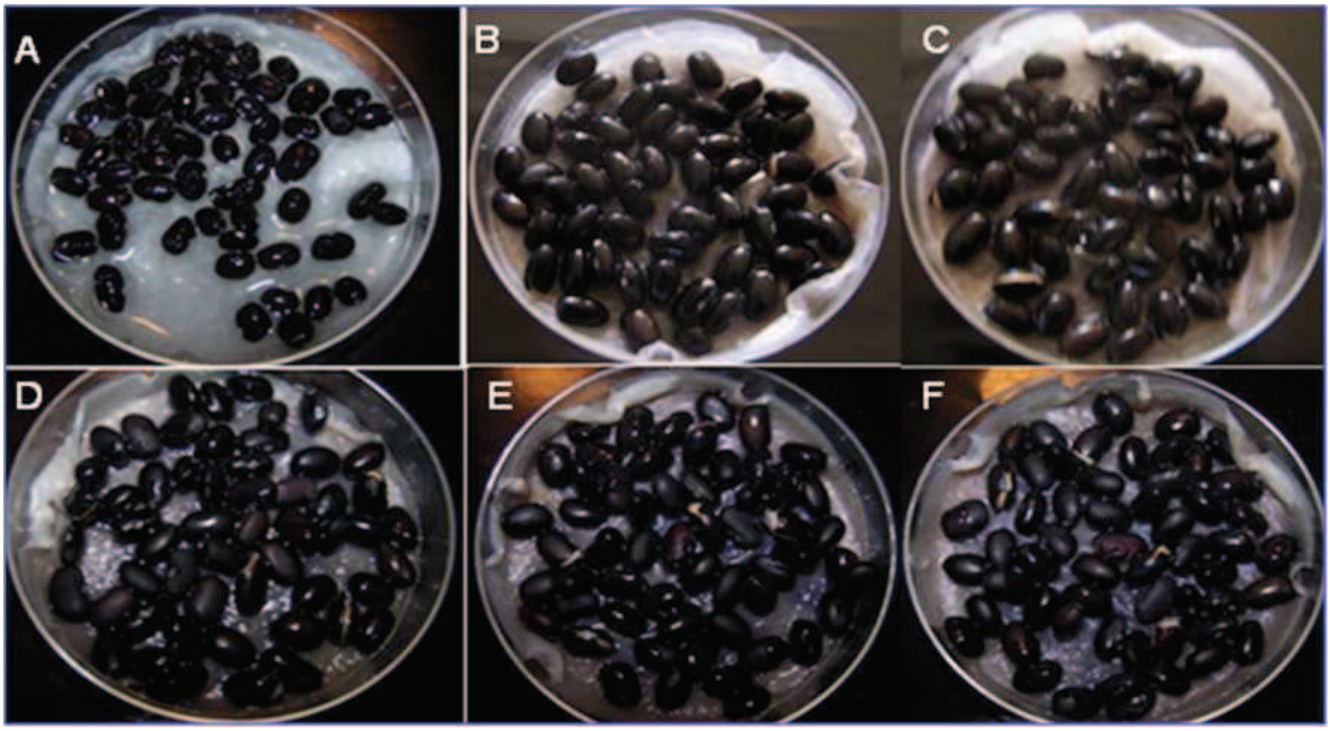


Figura 4. Germinación Tratamiento 30 µM $HgCl_2$: A - 0 hrs; B – 6 hrs; C -12 hrs; D -18 hrs; E - 24 hrs y F -30 hrs

identificó en todos los carriles fue una banda de aproximadamente 34-36 kDa. El tratamiento de 10 µM de $HgCl_2$, mostró una disminución de proteínas, a partir de 12 hrs (carril 3) y vuelven a expresarse bandas que estaban presentes a las 6 hrs, para posteriormente en 24 y 30 hrs volver a inhibirse la expresión de una gran cantidad de proteínas. Los Tratamientos de 20 µM de $HgCl_2$ y 30 µM de $HgCl_2$ revelaron un descenso generalizado en la expresión de proteínas (véase gráfica 1).

Los resultados de Western blot mostraron el reconocimiento molecular de la banda de Fb en embriones de frijol en los diferentes tiempos de germinación en el grupo A (testigo sin $HgCl_2$) y en grupo B (10 µM de $HgCl_2$) solo en las primeras horas de germinación 6, 12 y 18 hrs se observa la banda de Fb pero a las 24 hrs disminuye severamente su expresión, inhibiéndose aún más a las 30 hrs (Figura 7). En grupo C (20 µM de $HgCl_2$) la banda es muy tenue durante las primeras 6 y 12 hrs y por último en el grupo D (30 µM de $HgCl_2$) no se observa ninguna banda (véase figura 8).

Una vez que se identificó la banda de Fb (34/36 kDa) por Western blot, en embriones de frijol expuestos a tres tratamientos de $HgCl_2$, se realizó el análisis de densitometría, los cuales guardan correlación con los resultados en ensayos de Western blot, presentando una disminución gradual en la banda de interés conforme aumentó la dosis de mercurio, datos mostrados en Gráfica 2.

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos en el grupo testigo y grupos experimentales con tres tratamientos de mercurio nos permiten inferir que este metal aún en cantidades mínimas de 10 µM altera, procesos fisiológicos y bioquímicos básicos en las plantas que conllevan a inhibir y/o retardar la germinación como se observa en las figuras 1, 2, 3 y 4, así como a inhibir la síntesis de proteínas (véase gráfica 1) en etapas tempranas de germinación y la expresión de Fb (véase gráfica 2).

Los datos sobre concentración de proteínas indican el comportamiento de los niveles de expresión proteica que están siendo codificadas durante el proceso de germinación y como estos perfiles de expresión son modulados en presencia de $HgCl_2$ produciendo un descenso al ir incrementándose la dosis de mercurio, a través de las diferentes

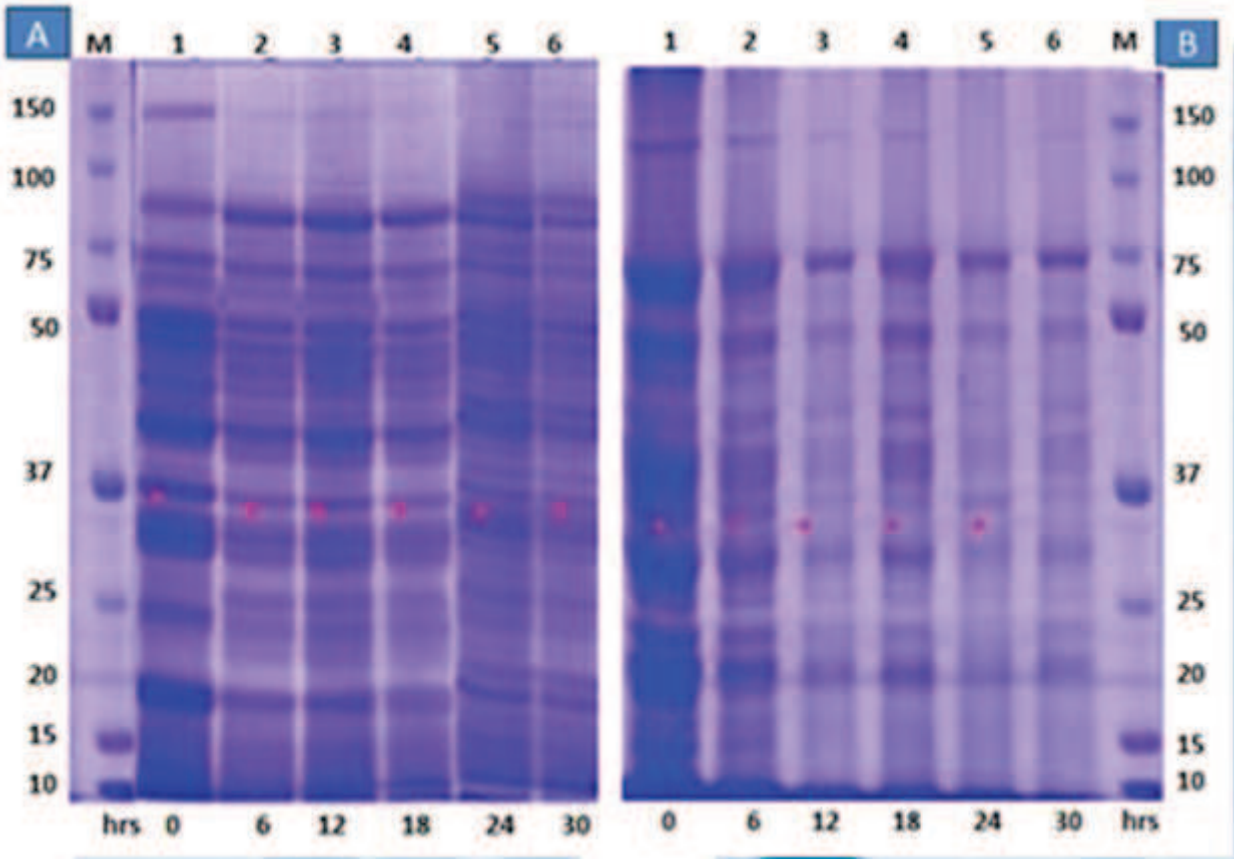


Figura 5. Electroforesis de proteínas de frijol en gel de poliacrilamida al 12% **(A)** Grupo Testigo (sin $HgCl_2$) Carriles: M - P.M. (BIO-RAD); 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12 hrs; 4-18hrs; 5-24 hrs y 6-30 hrs. **(B)** Tratamiento 10 µM de $HgCl_2$ Carriles: M - P.M.; 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12hrs; 4-18hrs; 5-24hrs y 6-30 hrs.

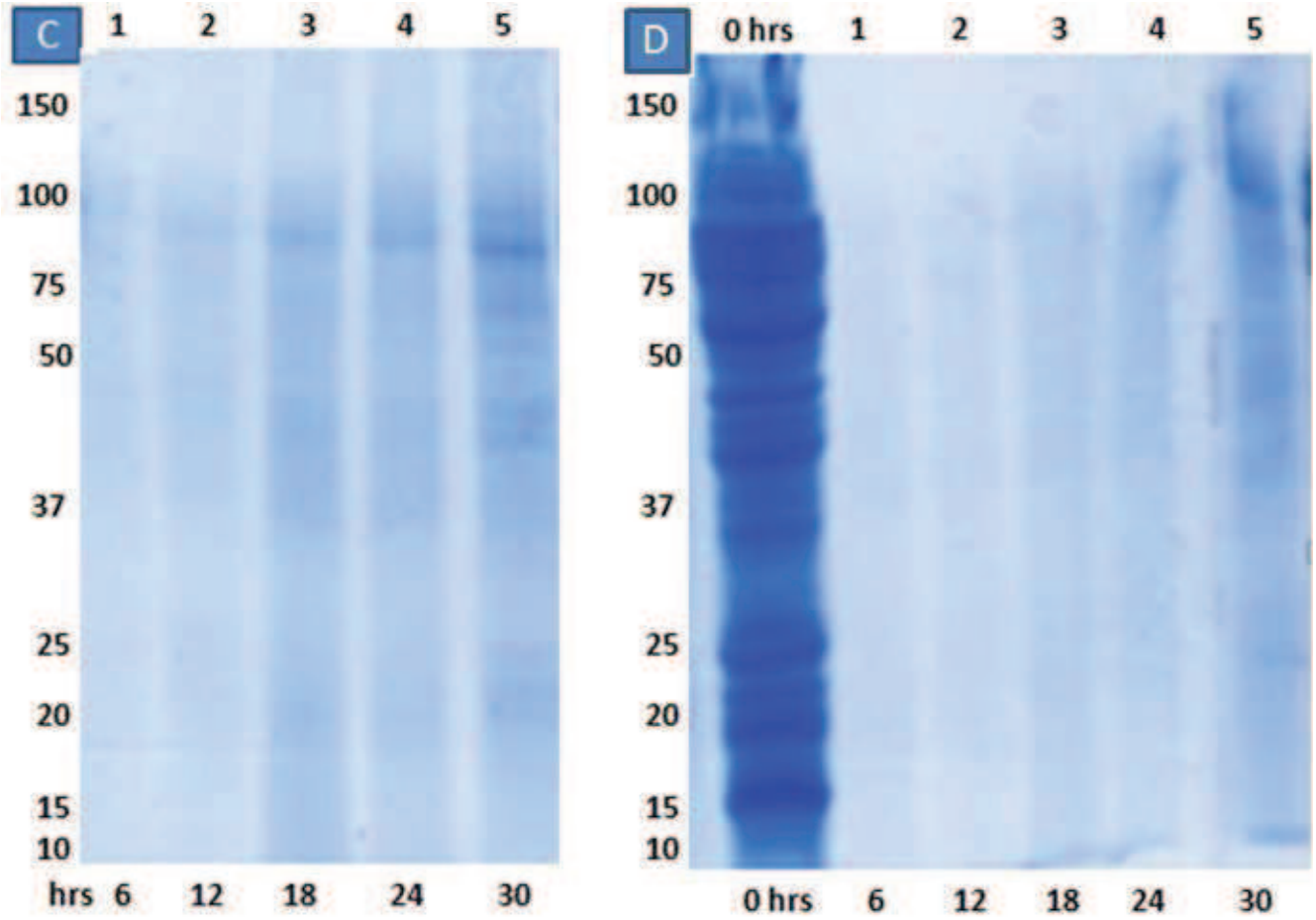


Figura 6. Electroforesis de proteínas de frijol en gel de poliacrilamida al 12% **(C)** Tratamiento 20 µM de $HgCl_2$ Carriles 1-6hrs; 2-12 hrs; 3-18hrs; 4-24 hrs y 5-30 hrs. **(D)** Tratamiento 30 µM de $HgCl_2$ Carriles: 0hrs; 1- 6hrs; 2-12hrs; 3-18hrs; 4-24hrs y 5-30 hrs.

etapas de germinación como se muestra en la gráfica 1, éstos resultados concuerdan con estudios de Ericson y Alfinito (1984) quienes proponen una baja concentración de proteínas en plantas expuestas a mercurio, que coinciden a su vez con los reportes de Costa y Spitz (1997) sobre la disminución de proteínas solubles por exposición a metales pesados. Por su parte Palma, Sandalio y Romero-Puertas (2002) también sugieren que la disminución en el contenido proteico resulta de un incremento de actividades proteolíticas en respuesta a metales pesados.

Fibrilarina ha sido caracterizada en algunas especies de plantas (Pih, Yi, Liang, Shin, Cho, Hwang y Son 2000; Stepinski, 2009), sin embargo el presente estudio la reporta por primera vez en *Phaseolus vulgaris L.,* donde se muestra que concentraciones mínimas de 10 µM $HgCl_2$ inhibieron su expresión después de 18 hrs de iniciado el proceso germinativo. Esto tiene gran relevancia en base a lo que reporta Chen, Rockel, Steinweger, Hemmerich, Risch y von Mikecz (2002) sobre concentraciones de 5 µM de $HgCl_2$ en células animales es suficiente para inducir una redistribución subcelular de Fb hacia proteosomas nucleoplasmicos donde es degradada, por tanto en base a los resultados obtenidos en semillas de *Phaseolus vulgaris L.,* podemos proponer un efecto similar en células vegetales, con la diferencia que el efecto sobre Fb de plantas fue a partir del Tratamiento I (10 µM de $HgCl_2$), en el que el tóxico provocó su proteólisis, lo que conllevó a inhibir su expresión, en las subsiguientes horas, y como consecuencia alteró de manera importante la homeostasis del proceso germinativo de las semillas. Estos datos demuestran como las células vegetales presentan mayores mecanismos de tolerancia que las células animales (Barceló y Poschenrieder, 2003).

En células vegetales, no se encontraron reportes sobre el efecto de $HgCl_2$ a nivel de expresión molecular en etapas tempranas de germinación, los trabajos disponibles en la literatura científica se orientan sobre toxicidad en germinación, crecimiento y desarrollo de plantas de cultivo principalmente (Navarro, Arrieta y Maldonado, 2006), tampoco existen datos en literatura sobre el uso de un biomarcador de contaminación por Hg en etapas tempranas de germinación que involucren la expresión o inhibición de proteínas como marcadores bioquímicos.

Los ensayos de Western blot, demostraron la reactivi-

dad del suero humano anti-Fb en sistema de plantas reconociendo el péptido de 34-36 kDa así como de otras bandas, esto comprueba la conservación evolutiva de Fb en organismos eucariontes (Guiltinan, Schelling, Ehtesham, Thomas y Christensen, 1988), lo que concuerda con reportes de Cerdido y Medina (1995) quienes demuestran que anticuerpos anti-Fb de humanos reconocen proteínas de 34 a 36 kDa en plantas. El anticuerpo policlonal de Fb humana utilizado en esta investigación mostró reconocimiento contra péptidos de embriones de frijol, con ello se demuestra la capacidad reactiva del anticuerpo en ambos sistemas y de la presencia de antígenos equivalentes. Tal reconocimiento nos indica que el anticuerpo reconoce estructuras o epítopes conservados en los diferentes sistemas biológicos.

Con tales resultados y para tener elementos en la interpretación de los datos al revisar la literatura encontramos reportes de Takeuchi et al. (1996), quienes citan que el $HgCl_2$ suele tener como blanco molecular a la proteína Fb, el mecanismo por el cual el $HgCl_2$ tiene gran selectividad por esta molécula en particular, es aún incierto, Pollard et al. (2000) sugieren que la interacción de Fb con $HgCl_2$ puede ser través de los residuos de cisteínas, que presentan grupos –SH, y por los cuales el mercurio muestra alta afinidad, causando la desestabilización de la proteína que induce a una muerte celular y esto trae como resultado la alteración de una serie de eventos celulares y moleculares básicos en los cuales participa Fb en sistemas biológicos, así mismo Chen y von Mikecz (2005) han propuesto que la unión de $HgCl_2$ a Fb, altera la estructura tridimensional de la proteína que estimula su degradación hacia proteosomas.

Estos resultados permiten poner de manifiesto que la asociación de Fb con el mercurio, provoca un cambio en su estructura conformacional, y por tanto la perdida de su funcionalidad que conlleva a la supresión de actividades moleculares y fisiológicas básicas en las cuales está involucrada. Aún cuando la función de Fb estrictamente en germinación, nunca ha sido reportada, los efectos observados en este estudio a concentraciones de 10 µM $HgCl_2$ y su corto tiempo de exposición (18 hrs) fue suficiente para inhibir la expresión de la proteína (datos mostrados en ensayos de Western blot), esto indica su gran potencial para ser utilizada como biomarcador bioquímico de toxicidad por Hg.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de $HgCl_2$ en la expresión de Fb en embriones de *Phaseolus vulgaris L.*, durante la germinación, para considerar a Fb una proteína nucleolar presente en humanos y plantas co-

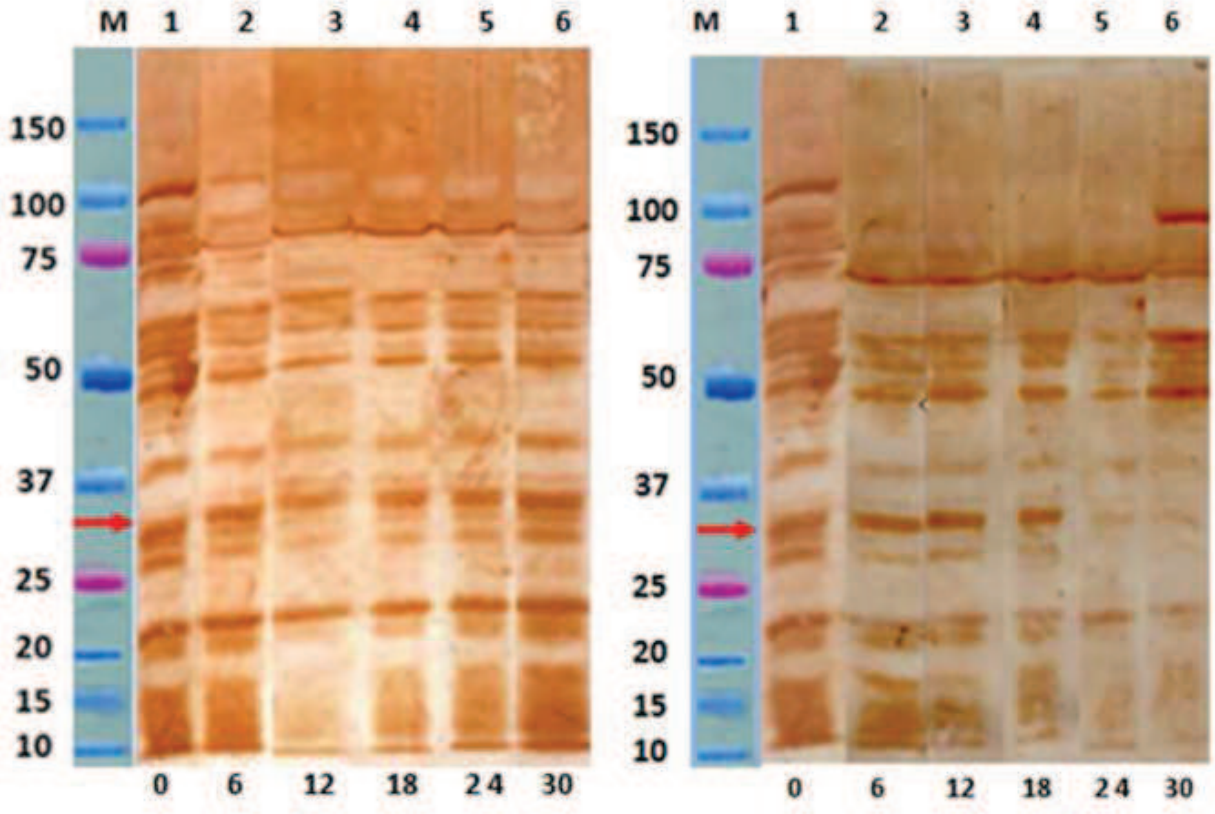


Figura 7. Western blot de proteínas de frijol **(A)** Grupo Testigo ((sin $HgCl_2$) Carriles: M - P.M. (BIO-RAD); 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12 hrs; 4-18hrs; 5-24 hrs y 6-30 hrs. **(B)** Tratamiento 10 µM de $HgCl_2$ Carriles: M -P.M.; 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12hrs; 4-18hrs; 5-24hrs y 6-30 hrs. La flecha roja señala la banda de Fb (34-36 kDa).

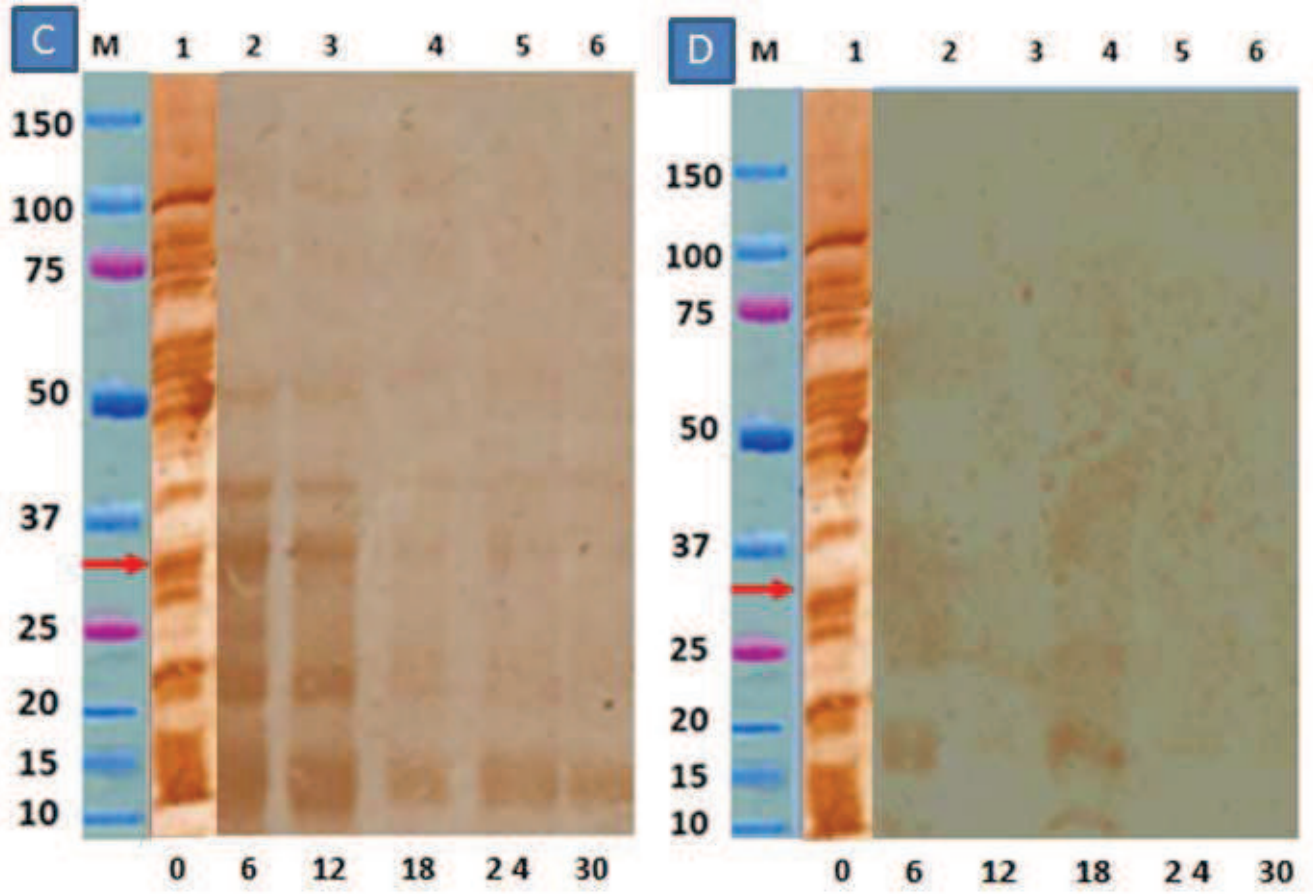


Figura 8**.** Western blot de proteínas de frijol **(C)** Tratamiento 20 µM de $HgCl_2$ Carriles: M - P.M. (BIO-RAD); 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12 hrs; 4-18hrs; 5-24 hrs y 6-30 hrs. **(D)** Tratamiento 30 µM de $HgCl_2$ Carriles: M -P.M.; 1- 0hrs; 2- 6hrs; 3-12hrs; 4-18hrs; 5-24hrs y 6-30 hrs. La flecha roja señala la banda de Fb (34-36 kDa).

mo un posible biomarcador de contaminación por Hg.

En base a lo reportado anteriormente y a los objetivos planteados en la Investigación podemos concluir lo siguiente

Se identificó la presencia de Fb por primera vez en *Phaseolus vulgaris L.,* en etapas tempranas de germinación.

Se demostró que concentraciones mínimas de 10 µM de $HgCl_2$ suprimen la expresión de Fb después de 18 hrs de exposición en semillas de frijol.

Podemos establecer por los resultados presentados en el presente estudio que la expresión de la proteína Fb puede ser considerada como un marcador bioquímico de contaminación por $HgCl_2$.

Referencias

Barceló, J. y Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectivas. *Contributions to Science,* 2 (3), 333-344.

Baserga, S.J., Yang X.D. y Steitz J.A. (1991). An intact box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO,* (10), 2645–2651.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Analytical Biochemistry, 72, 248-255.

Cerdido, A. y Medina F.J. (1995). Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma*, 103, 625-634.

Costa, G. y Spitz E. (1997). Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, proteins content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. Plant Science, 128, 131-140.

Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch J. y von Mikecz, A. (2002) Subcellular Recruitment of Fibrillarin to Nucleoplasmic Proteasomes: Implications for Processing of a Nucleolar Autoantigen. *Molecular Biology of the Cell*. 13(10), 3576-87.

Chen, M. y von Mikecz, A. (2005). Xenobiotic-induced recruitment of atuantigens to nuclear proteasomes suggests a role for altered antigen in Scleroderma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051, 382-389

Ericson, M.C. y Alfinito, A.E. (1984). Proteins produced during salt stress in tobacco cell cultures. *Plant Physiolo-*

gy, 74, 506-509.

Garcia, E.M. y Reyes, R.E. (2001). Synthesis pattern of an Hg-binding protein in Acetabularia calyculus during short-term exposure to mercury. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66, 357-364.

Guiltinan, M.J., Schelling, M.E., Ehtesham, N.Z., Thomas, J.C. y Christensen, M.E. (1988). The nucleolar RNA-binding protein B-36 is highly conserved among plants. *European Journal of Cell Biology*, 46, 547-553.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavaje of Structural Proteins during the Assembly of the Head Bacteriophage T4. *Nature,* 227, 680-685.

Nambara E, Naito S. y McCoort P. (1992). A Mutant of *Arabidopsis* wich is Defective in Seed Development Storage Protein Accumulation is a New abi3 Allele. *The Plant Journal*, 2(4), 435-441.

Navarro, A.R., Arrieta R.G., y Maldonado M.C. (2006). Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Critical Reviews in Toxicology*, 23, 125-129.

Palma, J.M., Sandalio, C.F., Romero-Puertas M.C. (2002). Plant Proteases protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 521-530.

Patra, M., Bhowmik N., Bandopadhyay, B. y Sharma, A. (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerante. *Environmental and Experimental Botany,* 52, 199-223.

Pih, K. T., Yi, M. J., Liang, Y. S., Shin, B. J., Cho. M. J., Hwang, I. y Son D. (2000). Molecular Cloning and Targeting of a Fibrillarin Homolog from Arabidopsis. *Plant Physiology*, 123, 51-58

Pirrone, N., Costa P., Pacyna, J. M. y Ferrara, R. (2001). Atmospheric mercury emissions from anthropogenic sources in the Mediterranean Región. *Atmospheric Environment*, 35, 2997-3006.

Pollard, K. M., Lee, D. K. Casiano, C. A., Bluthner, M., Johnston, M. M. y Tan E. M. (1997). The Autoimmunity-Inducing Xenobiotic Mercury Interacts with the Autoantigen Fibrillarin and Modifies Its Molecular and Antigenic Properties. *The Journal of Immunology*, 158, 3521-3528.

Pollard, K. M., Pearson, D. L. y Tan, E. M. (2000). Proteolytic Cleavage of a Self-Antigen Following Xenobiotic-Induced Cell Death Produces a Fragment with Novel Immunogenic Properties. *The Journal of Immunology,* 165, 2263–2270.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2002). *Evaluación Mundial sobre el Mercurio (Hg). Ginebra Suiza*. (Versión español publicada Junio 2005), 2:32-53; 3:70-92; 4: 113-137.

Schurz F., Vilar M. S. y Gremmels J.F. (2000). Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis*, 15(6), 525-530.

Sipter E., Auerbach R., Katalin G. y Mathe-Gaspar G. (2009). Change of bioacumulation of toxic metals in vegetables. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40, 285-293.

Stepinski D. (2009) Immunodetection of nucleolar proteins and ultrastructure of nucleoli of soybean root meristematic cells treated with chilling stress and after recovery. *Protoplasma*, 235, 77-89.

Takeuchi, M., Rothe, M. y Goeddel, D. V. (1996). Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 19935-19942.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). La transferencia electroforética de las proteínas desde geles de poliacrilamida a láminas de nitrocelulosa: procedimiento y algunas aplicaciones. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU*, 76, 4350-4354

Towbin, H. y Gordon, J. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding. Curret status and outlook. *Journal of Immunological Methods*, 72, 312.

Wilson, J.K. (1915). Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. *American Journal of Botany*, 2, 420-427