



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**Anexo II**

**TITULACIÓN: Grado en Biología**

**MEMORIA INICIAL DEL TRABAJO FIN DE GRADO**

**CENTRO: Facultad de Ciencias Experimentales**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

**Título del Trabajo Fin de Grado:** Efecto del estrés por salinidad sobre las modificaciones post-trasduccionales por óxido nítrico mediante nitración en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*

**1. DATOS BÁSICOS DE LA ASIGNATURA**

**NOMBRE:** Trabajo Fin de Grado

**CÓDIGO:** 10216001

**CARÁCTER:** Obligatorio

**Créditos ECTS:** 12

**CURSO:** Cuarto

**CUATRIMESTRE:** Segundo

**2. TUTOR/COTUTOR(en su caso)**

Juan Bautista Barroso Albarracín / Raquel Valderrama Rodríguez

**3. VARIANTE Y TIPO DE TRABAJO FIN DE GRADO (Artículo 8 del Reglamento de los Trabajos Fin de Grado)**

Variante: Específico. Tipo: Experimental

Alumna: Lorena Aranda Caño



UNIVERSIDAD DE JAÉN

#### 4. COMPETENCIAS (\*) Y RESULTADOS DE APRENDIZAJE

##### Competencias generales:

CG6. Realizar análisis crítico de trabajos científicos y familiarizarse con su estructura.  
CG7. Utilizar las fuentes de información dentro del ámbito de las Ciencias de la Vida.  
CG9. Aplicar los principios básicos del pensamiento y del método científico.

##### Competencias transversales:

CT1. Adquirir capacidad de gestión de la información, análisis y síntesis  
CT3. Ser capaz de comunicarse correctamente de forma oral y escrita en la lengua materna  
CT4. Conocer una lengua extranjera  
CT6. Desarrollar actitudes críticas basadas en el conocimiento  
CT7. Ser capaz de realizar aprendizaje autónomo para el desarrollo continuo profesional  
CT8. Ser capaz de adaptarse a nuevas situaciones y de tomar decisiones  
CT9. Tener sensibilidad hacia temas de índole social y medioambiental

##### Competencias Específicas:

CE2 - Adquirir un conocimiento adecuado de las bases químicas de la vida  
CE4 - Realizar diagnósticos biológicos  
CE6 - Realizar cultivos celulares y de tejidos.  
CE11 - Evaluar actividades metabólicas  
CE8 - Aislar, analizar e identificar biomoléculas  
CE9 - Conocer las técnicas para el análisis de muestras biológicas  
CE27 - Diseñar experimentos, analizar datos y resolver problemas planteados en la experimentación con plantas

\* Estas son las competencias mínimas. Añadir las competencias necesarias para cada Trabajo Fin de Grado propuesto

#### Resultados de aprendizaje

<b>Resultado 216001A</b>	Capacidad de integrar creativamente sus conocimientos para resolver un problema biológico real.
<b>Resultado 216001B</b>	Capacidad para estructurar una defensa sólida de los puntos de vista personales apoyándose en conocimientos científicos bien fundados.
<b>Resultado 216001C</b>	Destreza en la elaboración de informes científicos complejos, bien estructurados y bien redactados.
<b>Resultado 216001D</b>	Destreza en la presentación oral de un trabajo, utilizando los medios audiovisuales más habituales.

#### 5. ANTECEDENTES

El **óxido nítrico** (NO) puede reaccionar con una gran variedad de dianas moleculares intra y extracelulares debido a su rápida velocidad de difusión como radical libre. Esta molécula ha adquirido una gran relevancia en distintos ámbitos de la investigación en células vegetales debido a su implicación como molécula señal en distintas etapas del desarrollo y especialmente en patogénesis.

El NO y moléculas derivadas designadas como especies de nitrógeno reactivo (RNS) ejercen su función por diversos procesos, siendo las modificaciones postraduccionales de proteínas por S-nitrosilación y por nitración de tirosina las más estudiadas.

La **nitración** consiste en la adición de un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) a uno de los dos carbonos



UNIVERSIDAD DE JAÉN

en posición orto del anillo aromático de los residuos de tirosina. En células vegetales, la nitración de tirosina de proteínas está siendo usada como biomarcador de estados patológicos y de estrés nitro-oxidativo ya que este proceso puede alterar la conformación y estructura de las proteínas, la actividad catalítica de enzimas y su susceptibilidad a proteolisis. Hasta la fecha, existen muy pocos datos acerca del proceso de nitración en plantas superiores, sin embargo, la relevancia biológica de este proceso ha sido demostrada por la pérdida de función de la proteína afectada en determinados casos, aunque en otros se ha descrito también la ganancia de función.

Por otra parte, las plantas poseen diferentes estrategias de defensa frente al estrés oxidativo generado durante la salinidad, sin embargo existe una información limitada sobre la participación del NO en la tolerancia de la planta al estrés abiótico por salinidad.

En hojas de plantas de olivo cultivadas *in vitro*, nuestro grupo ha constatado que la salinidad inducía un estrés nitrosativo mediado por el incremento de la producción de NO dependiente de L-arginina, nitrosotioles (SNOs) totales y el número de proteínas que sufren nitración de tirosina. Además, diversos trabajos han realizado aproximaciones indirectas mediante la aplicación exógena de donadores de NO para analizar la implicación del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la salinidad. De esta forma, la aplicación exógena de nitroprusiato sódico (SNP) estimulaba la expresión de la bomba ATPasa-H<sup>+</sup> de membrana potenciando la tolerancia a la salinidad por el incremento de la ratio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, así como la germinación de la semilla en condiciones de salinidad en plantas de girasol. Finalmente, la aplicación exógena de SNP inducía la actividad de los principales sistemas antioxidantes en arroz y naranjo proporcionando una mayor resistencia a la salinidad. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede establecer una relación entre el estrés abiótico por salinidad y el metabolismo del NO.

A la vista de estos antecedentes, y dado que no se dispone de información acerca de su participación en la modulación de diferentes especies de nitrógeno reactivo, hemos planteado el estudio de la posible implicación del estrés por salinidad sobre las modificaciones post-trasduccionales por óxido nítrico mediante nitración en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

## 6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

### Hipótesis de partida y objetivos generales perseguidos:

El objetivo fundamental del presente estudio consiste en la caracterización bioquímica y molecular en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, reconocida planta modelo, del efecto del estrés por salinidad sobre la participación de modificaciones post-trasduccionales por óxido nítrico mediante nitración en los cambios funcionales de diferentes dianas celulares antioxidantes. Los estudios planteados se realizarán utilizando como material de experimentación cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* disponibles en nuestro laboratorio.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

## 7. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES A REALIZAR

### 7.1.- Revisión bibliográfica actualizada: Antecedentes.

### 7.2.- Metodología y plan de trabajo.

7.2.1.- *Detección e identificación de dianas celulares de nitración durante el estrés por salinidad en cultivos celulares de A. thaliana.*

Inicialmente se realizará un análisis diferencial mediante inmunoblots con objeto de detectar proteínas nitradas endógenamente. Tras esta aproximación inicial, se procederá a caracterizar el comportamiento de dicha modificación post-trasduccional durante el estrés por salinidad, y a la identificación de entre las dianas detectadas, de los posibles sistemas antioxidantes susceptibles de modificarse.

### 7.3.- Elaboración y defensa de la Memoria del TFG según las directrices y orientaciones aprobadas por la Facultad de Ciencias Experimentales de la UJA.

## 8. DOCUMENTACIÓN/BIBLIOGRAFÍA

- Baker, L.M., Baker, P.R., Golin-Bisello, F., Schopfer, F.J., Fink, M., Woodcock, S.R., Branchaud, B.P., Radi, R., and Freeman, B.A. (2007). Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem* 282, 31085- 31093.
- Batthyany, C., Schopfer, F.J., Baker, P.R., Duran, R., Baker, L.M., Huang, Y., Cervenansky, C., Branchaud, B.P., and Freeman, B.A. (2006). Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem* 281, 20450-20463.
- Cole MP, Rudolph TK, Khoo NK, Motanya UN, Golin-Bisello F, et al. (2009) Nitro-fatty acid inhibition of neointima formation after endoluminal vessel injury. *Circ Res* 105: 965–972.
- Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, et al. (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* 281: 35686–35698.
- Delmastro-Greenwood M, Freeman BA, Wendell SG (2014) Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids. *Annu Rev Physiol.* 76:79-105. doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170341.
- Derakhshan, B., Hao, G., and Gross, S.S. (2007). Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 75, 210- 219.
- Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sa´nchez-Calvo B, Vitturi D , Valderrama R, Barroso JB , Radi R , Freeman BA , Rubbo H. (2014) Olives and Olive Oil Are Sources of Electrophilic Fatty Acid Nitroalkenes. *PLoS ONE* 9(1): e84884. doi:10.1371/journal.pone.0084884
- Ferreira AM, Ferrari MI, Trostchansky A, Batthyany C, Souza JM, et al. (2009) Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J* 417: 223–234.
- Freeman, B.A., Baker, P.R., Schopfer, F.J., Woodcock, S.R., Napolitano, A., d'Ischia M (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem*, 283, 15515-9.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

- Geisler, A.C., and Rudolph, T.K. (2011). Nitroalkylation - A redox sensitive signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*.
- Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, et al. (2011) Electrophilic Nitro-fatty Acids Activate NRF2 by a KEAP1 Cysteine 151-independent Mechanism. *J Biol Chem* 286: 14019–14027.
- Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, Woodcock SR, Bonacci G, et al. (2008) Nitro-oleic Acid, a Novel and Irreversible Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase. *J Biol Chem* 283: 36176–36184.
- Li Y, Zhang J, Schopfer FJ, Martynowski D, Garcia-Barrio MT, et al. (2008) Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma. *Nat Struct Mol Biol* 15: 865–867.
- Moncada S (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine* 92: 164-169.
- Netto, L.E., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P., Cussiol, J.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., and Horta, B.B. (2007). Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, 180-193.
- Rauhala P, Andoh T, Chiueh CC. (2005) Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*. 207(2 Suppl):91-5.
- Rubbo, H., and Radi, R. (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1318-1324.
- Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, et al. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 938–945.
- Rudolph V, Rudolph TK, Schopfer FJ, Bonacci G, Woodcock SR, et al. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 85: 155–166.
- Rudolph, T.K., and Freeman, B.A. (2009). Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal*, 29;2(90):re7. doi: 10.1126/scisignal.290re7.
- Rudolph, V., Schopfer, F.J., Khoo, N.K., Rudolph, T.K., Cole, M.P., Woodcock, S.R., Bonacci, G., Groeger, A.L., Golin-Bisello, F., Chen, C.S., Baker, P.R., and Freeman, B.A. (2009). Nitro-fatty acid metabolome: saturation, desaturation, beta-oxidation, and protein adduction. *J Biol Chem* 284, 1461-1473.
- Sánchez-Calvo B, Barroso JB, Corpas FJ (2013) Hypothesis: Nitro-fatty acids play a role in plant metabolism. *Plant Science* 199-200:1-6. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.10.006.
- Sawa, T., Arimoto, H., and Akaike, T. (2010). Regulation of redox signaling involving chemical conjugation of protein thiols by nitric oxide and electrophiles. *Bioconjug Chem* 21, 1121-1129.
- Schopfer FJ, Cole MP, Groeger AL, Chen CS, Khoo NK, et al. (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem* 285: 12321–12333.
- Schopfer, F.J., Cipollina, C., and Freeman, B.A. (2011). Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem Rev* 111, 5997-6021.
- Trostchansky A, Bonilla L, Thomas CP, O'Donnell VB, Marnett LJ, et al. (2011) Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. *J Biol Chem* 286: 12891–12900.
- Trostchansky A, Rubbo H (2008) Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical



UNIVERSIDAD DE JAÉN

characterization, and biological properties. Free Radic Biol Med. 44: 1887-96.  
Villacorta L, Chang L, Salvatore SR, Ichikawa T, Zhang J, et al. (2013) Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPSdependent TLR4 signalling in lipid rafts. Cardiovasc Res 98: 116–124.  
Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radic Biol Med 45, 549-561.

## 9. CRONOGRAMA PROVISIONAL

Semana	A-5 Trabajo Fin de Grado	Trabajo autónomo	Observaciones
Nº 1 28 enero- 1 febrero 2015	0.5	5	Introducción al manejo y uso de bases de datos bibliográficas. Introducción teórica al contenido del trabajo. Búsqueda bibliográfica autónoma.
Nº 2 2 - 8 feb 2015		20	Búsqueda bibliográfica autónoma y lectura de la bibliografía seleccionada.
Nº 3 9 - 15 feb 2015	0.5	20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 4 16 feb - 22 feb 2015	0.5	20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 5 23 feb - 1 mar 2015	0.5	20	Trabajo experimental en el laboratorio.
Nº 6 2 - 8 mar 2015		20	Trabajo experimental en el laboratorio.
Nº 7 9 - 15 mar 2015	0.5	20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 8 16 - 22 mar 2015		20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 9 23 - 29 mar 2015	0.5	20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 10 4 - 12 abr 2015		20	Trabajo experimental en el laboratorio
Nº 11 13 - 19 abr 2015	0.5	20	Revisión y discusión de resultados
Nº 12 20 abr - 26 abr 2015	0.5	20	Redacción de la memoria.
Nº 13 27 abr - 3 may 2015		20	Redacción de la memoria
Nº 14 4 - 10 may 2015	0.5	20	Redacción de la memoria
Nº 15 11-17 may 2015		15	Preparación de la defensa de la memoria
Nº 16 18-19 may 2015	0.5	15	Preparación de la defensa de la memoria.
<b>Total</b>	<b>5.0</b>	<b>295.0</b>	

## 10. IMPLICACIONES ÉTICAS

El TFG requiere autorización de la Comisión de Ética:  Sí  No

**En caso afirmativo, es preceptivo adjuntar la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Jaén o, en su defecto, la solicitud realizada a dicha Comisión.**



UNIVERSIDAD DE JAÉN