

80



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DESARROLLO DE TOLERANCIA A METALES PESADOS
POR EL PROTISTA Euglena gracilis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A
LETICIA GUADALUPE NAVARRO MORENO



MEXICO D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente. Prof. Graciela Meza Ruiz.

Vocal: Prof. Rafael Moreno Sánchez.

Secretario: Prof. Homero Hernández Montes

1er Suplente. Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo.

2do Suplante. Prof. Hortensia Eugenia Lemus Díaz.


La presente tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. Rafael Moreno Sánchez en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Asesor del Tema:



Dr Rafael Moreno Sánchez.

Sustentante:



Leticia Gpe Navarro Moreno.

INDICE

	Página
Resúmen.	1
Introducción.	
Características generales de los metales pesados	2
Mercurio	5
Cadmio	9
Plomo	17
Contaminación por metales pesados	19
Mecanismos celulares de protección a metales pesados.	21
Fitoquelatinas.	23
Metalotioninas	28
Euglena gracilis	35
Objetivos	41
Materiales y Métodos	
Medios de cultivo	42
Curvas de crecimiento	44
Medición de consumo y producción de oxígeno	44
Determinación de clorofila	45
Medición de carotenos	45
Captación de metales pesados	46
Micrografías electrónicas	48
Aislamiento de mitocondrias	48

Determinación de proteína	50
Medición de citocromo oxidasa	51
Medición de potencial de membrana	51
Resultados	
Crecimiento celular	52
Efecto relativo de los metales sobre el crecimiento	54
Respiración y Fotosforilación	64
Síntesis de pigmentos	71
Captación de metales pesados	76
Microscopía electrónica	79
Discusión	86
Conclusiones	92
Perspectivas	94
Apéndice 1	100
Apéndice 2	106
Apéndice 3	108
Bibliografía	117

A mis padres y hermanos, a Pamela y a Willy.

Agradezco al Dr Edmundo Chávez y al Dr Rafael Moreno por haberme permitido realizar esta tesis.

En memoria de Joaquina y Marina.

RESUMEN

Euglena gracilis es un modelo de célula eucarionte interesante en el estudio del desarrollo de tolerancia a metales pesados pues puede crecer de manera heterótrofa con diferentes fuentes de carbono o bien de manera autótrofa mediante fotosíntesis. Este microorganismo es de vida libre por lo cual podría ser utilizado eventualmente en la purificación de cuerpos de agua contaminados con metales pesados, usando cepas resistentes a varios metales pesados.

Al realizar este trabajo, hemos encontrado, que este microorganismo puede crecer en presencia de metales pesados y que es capaz de desarrollar ciertos mecanismos para lograr sobrevivir cuando es expuesto a concentraciones tóxicas de metales pesados.

Este protista ha sido crecido en presencia de concentraciones variables de cadmio, mercurio y plomo, observándose que este último no causa un efecto dañino considerable . El cadmio al contrario, daña a las células de una manera directamente proporcional a la concentración utilizada y el mercurio a concentraciones mayores a 10 μM causa el 100% de daño celular.

Se cuenta con una cepa la cual ha sido preexpuesta por más de 15 generaciones a mercurio 1.5 μM y en la cual se ha observado la recuperación de las funciones al realizar estudios de Tolerancia cruzada.

INTRODUCCION

Los metales pesados están constituidos por cerca de 40 elementos no esenciales para la vida, cuya densidad es mayor a cinco (en relación con la del agua), entre ellos se encuentran: Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Hg, entre otros. Algunos de estos metales son requeridos a muy bajas concentraciones tanto por eucariontes como por procariontes [1]. Pueden estudiarse desde dos puntos de vista, uno está relacionado con los beneficios que aportan a nivel bioquímico, siendo parte de los sitios activos de algunas enzimas, con las que participan ya sea en la catálisis o al estabilizar la estructura macromolecular de proteínas y ácidos nucleicos. Algunos de los metales que pueden realizar algunas de estas funciones son: Fe, Co, Mn, Zn, etc. Por otro lado, también se puede estudiar lo relacionado a la toxicidad causada por exposición excesiva a algún metal como por ejemplo los problemas ocasionados por exposición excesiva de Zn en obreros.

Las acciones biológicas de los metales han sido condicionadas por el siguiente antagonismo: un metal induce efectos biológicos que alteran los requerimientos de otro, un ejemplo lo constituye de nuevo el Zn, el cual previene la toxicidad debida al Cd [2].

Características generales de los metales pesados.

Entre los metales que se pretenden estudiar en el presente trabajo se encuentran: Hg, Cd y Pb de los cuales a continuación se darán algunas características.

El Hg y el Cd pertenecen a la familia IIb de la tabla periódica de los elementos, por lo cual poseen estados de oxidación más bajos que los de la familia II y por ello no se les considera elementos de transición, son electropositivos, poseen puntos de fusión bajos y gran volatilidad. Pueden formar complejos con amonio (NH_4^+), aminas, CN y también pueden reaccionar con sulfuro (S^{2-}), P o Se. El Pb

que pertenece a la familia IV, posee un estado divalente estable, se disuelve en gran número de ácidos y es atacado rápidamente por halógenos. El Cd posee propiedades químicas muy parecidas a las del Zn ya sea como elemento propuesto ó como sus derivados. En cuanto a su capacidad para formar complejos, el Cd tiene un número de coordinación de seis pero el cuatro es el más común; el Hg tiene la tendencia de formar complejos lineares y tetraédricos ya que posee números de coordinación dos y cuatro respectivamente; por último, el Pb forma gran número de compuestos organometálicos, posee un número de coordinación para el Pb divalente de dos a siete y para el Pb tetravalente de cuatro a ocho. En la tabla 1 se muestra la capacidad de estos tres metales para formar complejos con diferentes compuestos [2]. La tabla 2 presenta las constantes de disociación de los metales pesados con diferentes ligandos [3].

Tabla 1: Constantes de solubilidad de los complejos formados entre los metales pesados y diferentes ligandos (log K1) [3].

Constantes de solubilidad			
complejos 1:1 (log K1)	Mercurio	Cadmio	Plomo
NH ₃	8.8	2.51	---
Imidazol	3.57	2.8	---
EDTA	22.1	16.6	18.3
Etilendiamina (N-N)	14.3	5.5	---
Cisteína (N-S)	45.4	---	12.2
Glicina (N-O)	10.3	4.8	5.47
Metionina	---	3.88	4.4
Histidina	7.9	5.65	6.84
Arginina	---	3.31	4.65
Glutación	---	10.5	10.6
8-Hidroxiquinoleína	---	7.78	9.02
Tris(2-amino-2-hidroximetil)-1,3-propenediol	8.3	2.22	---

Tabla 2: Constantes de disociación de los metales pesados Hg,Cd y Pb con diferentes compuestos orgánicos. [(1):Anderegg, 1964; (2): Jokl y Majer, 1965; (3):Koike y Hamaguchi, 1967; (a): a 20°C; (b): a 30°C; (c): a 40°C.] [2].

Constantes de disociación (log K _{d1})	Mercurio	Cadmio	Plomo
EGTA	23.2	16.1	11.8 a 14.71 (1)
EDTA	21.8	16.0 a 17.0	15.9 a 18.0 (1,2)
HEDTA	(a)19.47(3)	13.6	----- (4)
	(b,c)19.3-19.1(3)		

Los tres metales poseen fuerte afinidad por ligandos como fosfato (PO⁴⁻), cisteínas e histidina de proteínas, purinas, pteridinas y porfirinas. También, los tres elementos pueden actuar en un gran número de enzimas que posean grupos sulfhidrilo, pueden unirse y afectar la conformación de ácidos nucleicos y todos interrumpen las vías de fosforilación oxidativa. Por otra parte, los tres pueden inducir actividad catalítica en algunas enzimas como por ejemplo la carboxipeptidasa A pancreática bovina [2].

MERCURIO

El Hg se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, mar, suelo y agua de lluvia, así pues, todas las especies contienen naturalmente rastros de este metal variando con la localización.

El análisis cuantitativo de este elemento se ha logrado con los métodos de espectrofotometría de masas y cromatografía de gases aunque algunos derivados de Hg como el metil-, el etil-, el metoxietil- y el fenilmercurio (CH_3Hg , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$, CH_3OHg y $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}$ respectivamente) resultan un poco complicados para su identificación pero pueden analizarse mediante las técnicas del detector de captura de electrones o absorción atómica de flama. La afinidad que posee el Hg por los aminoácidos, las proteínas, las purinas, las pirimidinas y los ácidos nucleicos sirve para la bioquímica analítica.

Tanto el Hg como el Pb y el Cd pueden interactuar e interferir con el metabolismo del piruvato cerebral, simulando los síntomas y signos de la deficiencia de tiamina, interactuando igualmente con los grupos -SH del ácido lipóico, pantoteína y coenzima A. El Hg también puede reaccionar instantáneamente con NADH formando complejos 1:1 los cuales pueden ser disociados con EDTA. La principal causa de la toxicidad por Hg son las interacciones mercurio-grupos sulfhidrilo, aunque también interactúa con triptofano alterando su espectro de absorción. Puede interactuar, además, con grupos PO_4^- de la membrana celular y con grupos amino y carboxilo de las enzimas. La interacción de las enzimas con los compuestos mercuriales varía grandemente dependiendo de la fuente, las condiciones de reacción, la presencia de otros metales, etc.

Se ha estudiado la interacción del Hg con citidina, adenosina y guanosina con los que forma complejos 1:1, al igual que su interacción con nucleósidos, nucleótidos y DNA. Al interactuar el Hg con los ácidos nucleicos por adición a las bases, se ve afectada la viscosidad intrínseca y el espectro, entre otras características.

Muchos compuestos mercuriales producen anomalías cromosómicas e inducen efectos genéticos y teratogénicos. Tanto el fenil- como el metilmercurio pueden inhibir la formación del huso acromático durante la mitosis celular, se han reportado aberraciones cromosómicas en humanos que han consumido pescado contaminado con Hg y se ha observado que $10\mu\text{M}$ (2 ppm) de Hg es capaz de inducir transformación linfocítica humana y mitosis in vitro [2].

Se ha observado que ciertos mercuriales son capaces de mediar el intercambio Cl^-/OH^- a través de membranas lipídicas por formación de pares iónicos neutros en membranas de borde de cepillo renales de conejo, actuando así como ionóforos. El Hg inorgánico altera la homeostasis del calcio celular y la función mitocondrial ya que es capaz de atravesar bicapas se encuentran el cloruro de mercurio (HgCl_2), el acetato de fenilmercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgO}_2$) y el mercurio trialquilado o trifenilado, los cuales son tóxicos por colapsar los gradientes iónicos y de pH a través de las membranas biológicas. El Cu posee un efecto parecido como ionóforo [7].

El HgCl_2 , además produce cambios en el Ca^{2+} citosólico en cultivos de células renales de conejo, lo que las daña o les produce la muerte. La explicación es que el proceso de daño celular causado por Hg se debe a la entrada masiva de Ca^{2+} a la célula, acelerando la progresión del daño y consecuentemente causando la muerte. Cuando no existe Ca^{2+} extracelular, al tratar las células con HgCl_2 el daño se retarda [9].

En hepatocitos de rata, el HgCl_2 también causa toxicidad aparentemente como consecuencia de la inhibición de la fosforilación oxidativa, provocando pérdida de ATP y muerte celular. Se ha observado que $50\mu\text{M}$ de HgCl_2 causan oxidación de piridín nucleótidos seguida de despolarización de la membrana plasmática, pérdida de ATP y disminución de la viabilidad celular [10].

Se ha observado que al tratar mitocondrias aisladas de riñón de rata con $5\mu\text{M}$ de HgCl_2 , existe una oxidación de nucleótidos de piridina, liberación de Ca^{2+} y

despolarización de la membrana causada por el reciclaje de Ca^{2+} [11]. Chávez et al (1989) [12] propusieron dos vías diferentes para la liberación de Ca^{2+} mitocondrial como el efecto de la concentración de Hg^{2+} utilizado y la unión de este a la membrana interna. Una vía es activada cuando 11 nmol Hg^{2+}/mg se unen a la membrana dando como resultado un flujo de Ca^{2+} y Sr^{2+} . La otra vía se activa cuando se unen 2.5 nmol Hg^{2+}/mg a la membrana con lo cual se produce el flujo de Ca^{2+} pero no de Sr^{2+} . Estas dos vías son dependientes de la concentración de Ca^{2+} intercambiable, de la temperatura, del pH, de la polaridad, de la composición aniónica del medio y del estado metabólico de la mitocondria. Este intercambio de Ca^{2+} va acompañado de una disminución de la relación NADPH/NADP y la disminución del potencial de membrana. Estos efectos son revertidos por la adición de DTT (ditiotreitól). Además, por análisis electroforético se observó que el Hg^{2+} se une principalmente a proteínas que tienen una masa molecular de 20 y 30 kDa, lo cual podría explicar que la inducción de la liberación de Ca^{2+} es debida a la modificación de los grupos SH de estas proteínas [12].

En cuanto a la absorción de Hg^{2+} en el intestino delgado, se han hecho experimentos en ratas y se ha observado que la alcalinidad aumenta la absorción disminuyendo la acumulación de Hg^{2+} en la pared intestinal. El incremento en el pH causa la conversión de HgCl_2 a $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}$ y $\text{Hg}(\text{OH})_2$ y el incremento en el ión Cl^- ocasiona la conversión del HgCl_2 en HgCl_3^- y HgCl_4^- , formas que compiten con las arriba anotadas. La afinidad del Hg^{2+} por haluros es $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. Así, se cree que la conversión de HgCl_2 , HgCl_3^- y HgCl_4^- a $\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}$ y $\text{Hg}(\text{OH})_2$ podría dar como resultado un incremento en la absorción de Hg^{2+} y disminuir la acumulación del metal en el tejido intestinal pero aumentando el Hg^{2+} circulante; además de que el incremento de la concentración de Cl^- o el cambio por Br^- o I^- podrían inhibir esta conversión [13].

El descubrimiento de la síntesis bacteriana de CH_3Hg (metilmercurio) incrementó la importancia del estudio de la toxicidad del metal, encontrándose la acumulación de CH_3Hg en peces de agua dulce y la síntesis de este compuesto por bacterias con posterior liberación en las aguas alledañas, o de manera indirecta por medio de la cadena alimenticia. El contenido de Hg^{2+} en peces de agua dulce varía de acuerdo a la especie, peso, edad, grado de contaminación del agua y el tipo de cadena alimenticia [2].

El CH_3Hg es el compuesto más tóxico derivado del Hg y cuando se acumula en el pez se retiene fuertemente y es excretado muy poco, con una vida media de muchos años. El metil y el fenilmercurio son más estables en el cuerpo de los animales y pueden circular por largos periodos unidos a los eritrocitos así como al plasma en el caso del Hg inorgánico. Los compuestos alquilmercuriales se acumulan preferentemente en el cerebro donde el 98% se encuentra en forma de CH_3Hg . El Hg es excretado por el hígado y en la bilis se encuentra generalmente como metilmercurio cisteína ($\text{CH}_3\text{Hg}-\text{C}_3\text{NO}_2\text{SH}_7$). Los compuestos organometálicos liberan lentamente el Hg, proceso que puede acelerarse al disminuir el pH y en presencia de tioles. Así, como la contaminación en agua dulce es debida a contaminación por industrias, el Hg en el océano puede deberse a la existencia de depósitos naturales además de la causada por desechos industriales [2].

En cuanto al humano, el período neonatal es en el cual existe gran posibilidad de acumulación de metales pesados. De nuevo, el CH_3Hg es el compuesto más tóxico en niños pequeños, adultos y animales. En niños que entran en contacto excesivo de Hg se ha observado el síndrome de acrodinia causado por exposición a vapores de fenilmercurio y sales mercuriosas o mercúricas [14].

El órgano más afectado por exposición a metales pesados es el riñón, en donde el Hg actúa a nivel del túbulo proximal, de las mitocondrias y de la membrana plasmática [15].

Hay gran variedad de enzimas que pueden ser alteradas al entrar en contacto con el Hg, ya sea incrementando o disminuyendo su actividad como se muestra en la tabla siguiente [2]:

Enzimas con actividad incrementada:

Fosfatasa alcalina.

β -Glucuronidasa.

N-acetilglucosaminidasa.

Fosfatasa ácida.

Deshidrogenasa láctica.

Transaminasa glutámico-oxaloacética.

Aspartato aminotransferasa.

Enzimas con actividad disminuida:

Fosfatasa alcalina.

Fosfohidrolasa ácida.

Citocromo c oxidasa.

Glutaminasa.

Deshidrogenasa láctica.

CADMIO

El Cd^{2+} es un elemento que se encuentra en la naturaleza en menor proporción que el Hg^{2+} y el Pb^{2+} . Se encuentra en pequeñas proporciones en el agua dulce al igual que en plantas y animales. Este elemento resulta tóxico principalmente para trabajadores industriales, mineros y productores de baterías alcalinas [2].

Algunas de sus características y propiedades son las siguientes:

Puede formar complejos con el Zn y algunos aminoácidos y péptidos. Las constantes de estabilidad del Cd con el Zn son grandes cuando el N y el O sirven como ligandos.

El Cd potencia las acciones antibacterianas de la espermina, la colistina, la eritromicina, la estreptomina y las tetraciclinas. Es capaz de unirse a albúmina

tanto humana como bovina y a la mercaptoalbúmina, compitiendo con el Zn por los mismos grupos sulfhidrilo o imidazol. Este metal es capaz de activar o inhibir un gran número de sistemas enzimáticos in vitro y la administración in vitro y la administración de Cd^{2+} a animales altera la actividad de muchas enzimas in vivo. A continuación se muestra una tabla en la que se muestran algunas de las enzimas cuya actividad es modificada por Cd [2].

Actividad enzimática sobreexpresada en bacterias:

Glucosa oxidasa.
Glutamato formimino transferasa.
Histidina amino liasa.
Oxaloacetato descarboxilasa.
Piruvato deshidrogenasa.

Actividad enzimática disminuida en hígado de rata:

Adenosina trifosfatasa.
Aldolasa.
Colinesterasa.
Citocromo c oxidasa.
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
Succinato deshidrogenasa.

El Cd constituye una parte integral de la metalotionina, la cual representa el 1-2% de la proteína soluble en la corteza de riñón de caballo. La metalotionina contiene altas cantidades de S, aproximadamente 6% de Cd, 2.2% de Zn unidos con altas constantes de estabilidad y pequeñas cantidades de Cu y Fe. El Cd y el Zn compiten por la tioneina que es la proteína libre de metal, la cual queda estabilizada al unirse éste último [2]. Ahora se sabe que existen metalotioninas en casi todas las especies de seres vivos expuestos al contacto con metales pesados.

El Cd interactúa con monómeros de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina con mayor afinidad que el Ca y el Na y estas interacciones pueden proveer la base bioquímica para los efectos tóxicos del Cd en las mitocondrias, los túbulos renales y las membranas nerviosas.

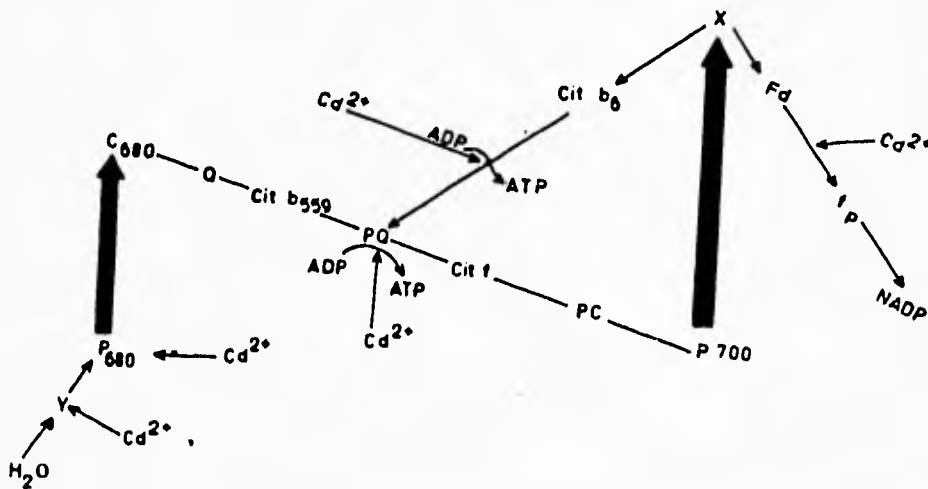
A una concentración de 5 μM (0.562 ppm), el de Cd puede desacoplar completamente la fosforilación asociada con la oxidación de succinato o citrato en mitocondrias de hígado de rata en vivo y en vitro. Esto puede ser revertido por EDTA, ditioles y otros metales como Mn, Co y Ni. La inhibición de la respiración mitocondrial por Cd esta también reportada en macrófagos alveolares pulmonares. Tanto el Cd como el Zn estimulan la acumulación dependiente de energía del Mg y el K en mitocondrias de corazón.

Hay estudios realizados en plantas que muestran que niveles elevados de Cd inhiben tanto la fotosíntesis como la fijación de CO_2 fotosintético. Muchos estudios in vitro demuestran que el Cd puede afectar directamente las reacciones fotosintéticas de los cloroplastos, entre los cambios se encuentran: cambios en las concentración y composición de pigmentos, inhibición de la actividad de los fotosistemas, inhibición de la fotofosforilación y desacoplamiento del transporte de electrones [16].

Varios autores han propuesto que el Cd inhibe el flujo de electrones entre el sitio de oxidación del agua y el fotosistema II. Se ha observado que el Cd afecta el estado conformacional de las membranas de los tilacoides por descomposición de los lípidos que los conforman, lo cual tiene como consecuencia efectos directos en el sistema de rompimiento del agua. Según Rawlyer y Siengenthaler (1981), la presencia de fosfatidilcolina en la capa interna de la membrana es esencial para la actividad máxima del fotosistema II. Otro componente importante es el fosfatidilglicerol, el cual parece jugar un papel importante en el transporte de

electrones del fotosistema I. Así, al dañarse alguno de estos compuestos se producirán daños en los procesos que se llevan a cabo en el cloroplasto.

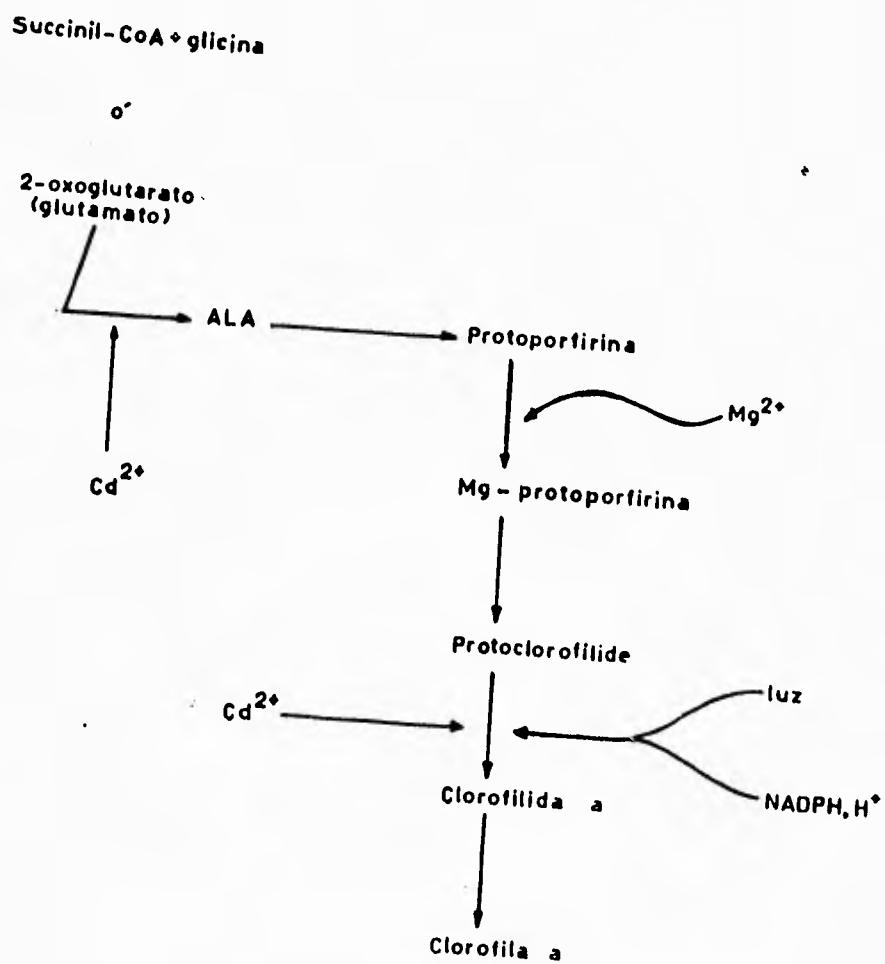
Por otra parte, De Filippis et al (1981) al realizar experimentos en *Euglena* propone dos sitios de inhibición por Cd^{2+} en la cadena de transporte fotosintética: el fotosistema II y el fotosistema I. Los posibles sitios de inhibición en la cadena de electrones fotosintética por el Cd^{2+} se muestra en la siguiente figura:



Baszynski T. 1986.

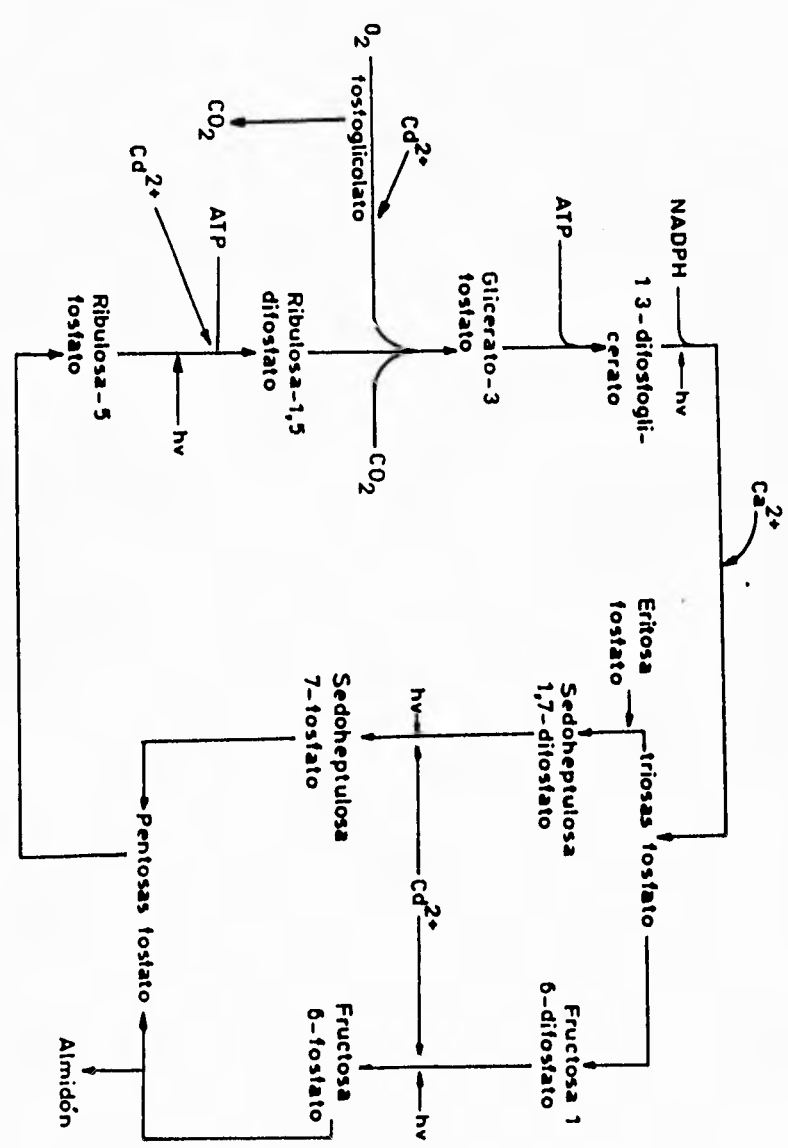
La síntesis de ATP que es el segundo producto de la fase luminosa de la fotosíntesis también es afectada por el Cd^{2+} . En cloroplastos rotos aislados, el Cd^{2+} inhibe la fosforilación cíclica y no cíclica [18].

Se ha observado que el metal también afecta la biosíntesis de clorofila a nivel del complejo protoclorofilida reductasa y de la síntesis del ácido 5-aminolevulínico [16], lo cual se muestra en la siguiente figura:



Baszynski T, 1986.

En la figura siguiente se muestran los sitios de inhibición del metal en el ciclo de Calvin:



Baszynski T, 1986.

En experimentos realizados en semillas de trigo se ha observado que los iones Cd^{2+} afectan la fotoquímica del fotosistema II. El Cd^{2+} induce decremento en la velocidad de fotoreducción del 2,6-diclorofenol-indofenol en presencia de un donador de electrones exógeno, la hidroxilamina, lo cual sugiere que el sitio de inhibición se encuentra cerca del sitio de donación de electrones por la hidroxilamina. Los resultados indican que el Cd^{2+} induce un incremento en el número de centros de reacción inactivos en el fotosistema II [19].

El Cd^{2+} puede inhibir o estimular el crecimiento de algunos virus ó microorganismos, por ejemplo, el acetato de cadmio $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}]$ puede inhibir el crecimiento del virus del mosaico del tabaco, mientras que bajas concentraciones de Cd^{2+} pueden estimular el crecimiento de *Chlorella* (alga verde fotosintética) pero también lo pueden inhibir a altas concentraciones [2]. Se han realizado estudios en cepas resistentes y sensibles a Cd^{2+} de la bacteria *Bacillus* y se ha observado que la cepa sensible acumula cerca de 10 veces más Cd^{2+} que la cepa resistente luego de cuatro horas de exposición a 1mg/ml (8.9mM) del metal. Se puede sugerir, por estudios hechos en protoplastos inhibidos con CN, que la captación del metal en la cepa sensible es un proceso activo, mientras que la captación del metal en la cepa resistente fué independiente de la viabilidad del protoplasto [20].

El Cd es un contaminante importante del medio ambiente y un tóxico potencial en bacterias, algas y hongos. Los mecanismos de toxicidad y resistencia son variables dependiendo del organismo. Se ha visto que las algas y las cianobacterias son organismos más sensibles, mientras que las bacterias y los hongos parecen ser más resistentes. En bacterias se ha encontrado que la captación de Cd^{2+} se relaciona con la presencia de plásmidos. El Cd^{2+} también induce aberraciones en los organismos (rompimiento de membranas, hinchamiento de organelos como mitocondrias y/o cloroplastos, etc) como resultado de su efecto en la síntesis de proteínas y organelos submitocondriales. La acumulación de Cd^{2+} en algas es un

proceso en dos fases. En la primera hay una absorción fisicoquímica rápida del metal por la pared celular, uniéndose a sitios que pueden ser proteínas o polisacáridos. A esta fase le sigue un período de latencia y posterior a éste, la captación intracelular. Esta fase posterior es dependiente de energía y puede implicar a sistemas de transporte usados para acumular otros cationes divalentes como Mn y Ca. Algunos datos indican que la resistencia a Cd^{2+} y posiblemente la captación en algas y cianobacterias es controlada por genes que codifican para plásmidos [20].

En embriones de hamster se ha observado que el Cd produce anomalías que pueden ser prevenidas por el Zn, aunque este no previene la transferencia del Cd hacia el interior de la placenta. En trabajadores expuestos a Cd se desarrolla proteinuria como resultado de inhalación de este elemento o absorción de sus derivados. La proteinuria se caracteriza por la presencia elevada de las fracciones α , β y γ -globulinas y baja albúmina, además se encuentran de 30 a 35% de proteínas de Bence-Jones, las cuales son una porción de cadena ligera de una inmunoglobulina monoclonal producida en exceso y excretada a través de la orina en pacientes con mieloma múltiple. Estas proteínas precipitan a 45-60°C, lo cual constituye la base para uno de los métodos de identificación, además de los de precipitación con ácidos o sales, electroforesis e inmunoelectroforesis [21]. Puede causar también hipertensión en la cual no se detecta la presencia de Cd^{2+} en orina. En mujeres japonesas se han detectado tanto la osteomalacia (desmineralización del cuerpo) y daño renal (nefropatía) como consecuencia de nacimientos múltiples o menopausia causada por exposición crónica de Cd. En estas mujeres se presenta proteinuria, aminoaciduria, glucosuria, hipercalciuria, incremento de Cd en orina y tejidos e hipertensión [2].

PLOMO

Se encuentra altamente distribuido en la atmósfera, océanos, corteza terrestre y agua y se absorbe y acumula en muchas plantas y animales.

El Pb^{2+} forma mercaptidos (R-S-S-R) con los grupos -SH de la cisteína. Puede formar complejos Pb-albúmina y Pb- γ -globulina los cuales son útiles para separar proteínas séricas. El Pb también puede inhibir o incrementar la actividad enzimática; la inhibición es a nivel del grupo -SH con concentraciones de metal de 0.1 al mM. A concentraciones más bajas, inhibe otras enzimas como ciertas ATPasa, ácido δ -aminolevulínico deshidratasa y a concentraciones de $6.5\mu M$ inhibe la lipoamida deshidrogenasa.

Se ha visto que este metal también disminuye la velocidad de la fotosíntesis [22,23] y el transporte de electrones mitocondrial [24]. También puede inhibir la actividad de varias enzimas de la vida de las pentosas fosfato [25].

Algunas actividades enzimáticas modificadas por acción del Pb son las siguientes:

Actividad disminuida

Acetilcolinesterasa.
Fosfatasa ácida.
Citocromo c oxidasa.
Fructosa 1,6-difosfatasa.

Actividad incrementada:

Fosfatasa alcalina.
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
Glutamato deshidrogenasa.
Transaminasa glutámico-pirúvica.
Transaminasa glutámico-oxaloacética.

El Pb altera la estructura molecular y la oxidación celular en varias especies de seres vivos y este fenómeno puede ser revertido usando EDTA.

El Pb puede unirse al Fe generando ferritina y un tipo anormal de Fe, dando origen a micelas ferruginosas en mitocondrias. También puede unirse formando complejos con el fosfato de ácidos nucleicos y nucleótidos y catalizar una hidrólisis no enzimática de nucleosidotrifosfatos (especialmente el ATP). A nivel cromosomal puede causar aberraciones. Entre sus efectos más tóxicos se encuentra la anemia en humanos al igual que las anomalías en el metabolismo de las porfirinas: excreción urinaria incrementada de porfirinas, coproporfirina y sus precursores, ácido δ -aminolevulínico, acumulación de protoporfirina libre en eritrocitos y δ -ALA incrementado al igual que la coproporfirina en sangre. Interactúa también con el fosfato de piridoxal impidiendo la activación de la síntesis del grupo hemo. Inhibe también una vía biosintética entre porfobilinógeno y coproporfirinógeno en eritrocitos humanos causando malformaciones, ya que se cree que el Pb inhibe la incorporación del Fe a la protoporfirina IX para formar el Hemo. Así, es evidente que el Pb afecta todas las vías para la síntesis del grupo Hemo. Junto a esto, también produce la inhibición de la incorporación de glicina dentro de la globina en muchas especies. sin embargo, la hemina es capaz de bloquear este efecto [2].

En cuanto a los microorganismos, los compuestos del Pb, ya sean orgánicos o inorgánicos son tóxicos. En organismos acuáticos como *Chlorella vulgaris* (alga verde fotosintética) y *Daphnia magna* (crustáceo del orden de los diplostracos, conocidos como pulgas de agua) la intoxicación por Pb ha sido comparada con la de Se, Ge y Si. En general, los derivados tetraetilicos son menos tóxicos que los correspondientes derivados tetrafenilos de estos metales. Cambios en los grupos alquil o aril o la introducción de un grupo OH reducen la toxicidad. El Pb (0.02-0.05 mg/l = 0.02-0.05ppm = 0.096-0.24 μ M) causa decaimiento en la movilidad de *Daphnia* en 15 días y resulta letal para este en 30 días. Los complejos de Pb con di-

cisteína son mucho menos tóxicos para Aspergillus niger (hongo de la familia de los ascomicetos) que los de aspartato y citrato, cuya acumulación en el medio destoxifica de Pb. La asparragina, la cisteína, el aspartato y el citrato forman complejos solubles con el Pb, y permanecen solubles en presencia de fosfato.

El Pb estimula el crecimiento de Sarcina flava (levadura que crece en condiciones de pH básico) lo cual se acompaña de un incremento en la degradación de la peptona existente en su medio de cultivo y un número de reacciones biosintéticas. El sulfuro de plomo (PbS) parece ser el metabolito final.

El Pb, al igual que el Cd, ha sido usado como antihelmíntico en pollos. En peces, la toxicidad varía con la especie estudiada al igual que en el caso del Cd.

Contaminación por metales pesados.

La contaminación causada por metales pesados y por rastros de metales en el medio ambiente ha sido causada por el avance industrial en nuestro tiempo, lo cual trae como consecuencia la bioacumulación de metales a lo largo de las especies que conforman la cadena alimenticia. Los niveles de desechos metálicos en las emisiones industriales, se dividen de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1) Concentración del metal en el material utilizado.
- 2) Tecnología de producción empleada en la industria emisora.
- 3) Tipo y eficiencia de las instalaciones de control de la contaminación.

Las industrias que producen este tipo de contaminación son: las de la producción de Fe y acero, las cementeras, las fundidoras de metales no ferrosos y la industria minera. La incineración de desechos caseros e industriales es una fuente importante de rastros de elementos contaminantes de la atmósfera.

Emisiones atmosféricas:

La combustión en las industrias es la fuente de contaminación por Hg, Mo y Se y en grado más importante por As, Cr, Mn, Sb y Ta. La combustión de aceite es la fuente de contaminación por V, Ni y Sn. La industria de materiales no ferrosos

contribuye con el Pb (combustión de gasolina), As, Cd, Cu y Zn emitidos. El Cr y el Mn contaminantes se originan principalmente de la industria del Fe y el acero [26].

Descargas dentro del agua:

Las fuentes mayores de contaminación son los efluentes de agua sucia doméstica (especialmente en As, Cr, Cu Mn y Ni), plantas quemadoras de carbón (As, Hg y Se en particular), fundidoras de metales no ferrosos (Cd, Ni, Pb y Se) y plantas de Fe y acero (Cr, Mo, Sb y Zn).

Si tomamos en cuenta que sólo el 25% de los efluentes son descargados dentro de las lagunas y los ríos (volumen total 1.3×10^6 l anual) en Europa y América del Norte, las concentraciones promedio en estas aguas podrían ser incrementadas hasta cerca de los 90 ng/l (0.45 nM) para Hg, 180 ng/l (2.27 y 2.41 nM) para Se y As, 2200 ng/l (34.6 y 38.79 nM) para Cu y Ni, aproximadamente 2500 ng/l (38.2 nM) para Zn y arriba de 4000 ng/l (19.3 nM) para Pb. Las concentraciones de metales traza en lagunas y ríos no contaminados son muchas veces menores a los incrementos mencionados [26].

Descargas en el suelo:

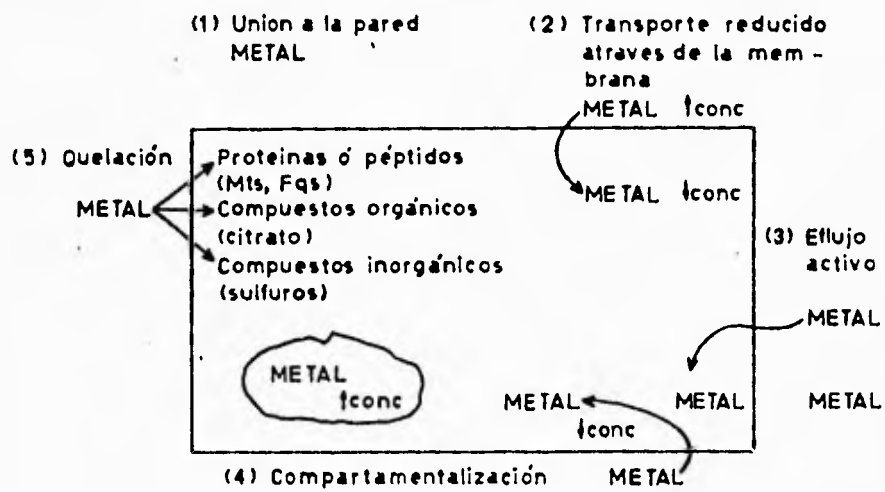
El suelo recibe la mayor cantidad de elementos traza de una gran variedad de industrias. Los desechos urbanos son una gran fuente de Cu, Hg, Pb y Zn, con notable contribución de Cd, Pb y V [26].

Estudios realizados en el Golfo de México han demostrado que en la zona conocida como Head of Passes, situada entre Texas y Florida, durante 1982-1983 se obtuvo un total de materia suspendida de 32 ± 3 $\mu\text{g/l}$ y se encontraron cerca de 110 ± 50 ng/l (0.53 nM) de Pb disuelto en el agua de mar. Esta concentración resulta elevada comparada con la de 20 ng/l (0.09 nM) para agua natural de río [27].

MECANISMOS CELULARES DE PROTECCION A METALES PESADOS

Como se mencionó en las secciones anteriores de ésta tesis, un exceso de metales pesados y micronutrientes como Cd, Hg, Ni y Pb resultan extremadamente tóxicos para la célula. Se pueden encontrar niveles letales de metales pesados cerca de sitios de desperdicio municipales e industrias, en diversos tipos de suelo incluyendo los suelos agrícolas. En estos lugares las plantas crecen normalmente, debido a que tienen la capacidad de adaptarse rápidamente y tolerar niveles tóxicos o letales de los metales pesados. Es por esta razón que en las plantas se realizaron los primeros estudios para conocer el mecanismo por medio del cual podían sobrevivir generando tolerancia. Este fenómeno se explicó por el hecho de que las plantas son capaces de sintetizar péptidos de bajo peso molecular conocidos como fitoquelatinas o por la presencia de proteínas también de bajo peso molecular conocidas como metalotioninas [28].

Se ha observado que la tolerancia a metales pesados puede darse además por varios mecanismos como son: la unión del metal a la pared celular con lo cual se impediría el paso de éste hacia el interior celular; reducción del transporte a través de la membrana celular; eflujo activo por medio del cual sale mayor cantidad de metal que la que entra; compartimentalización, en la cual el metal queda secuestrado en una vacuola en el interior celular y finalmente por acción quelante, la cual puede estar dada por complejos ya sea con proteínas o péptidos (metalotioninas y fitoquelatinas), compuestos orgánicos (por ejemplo citrato) o compuestos inorgánicos (por ejemplo sulfuro) [29]. Esto se ilustra en la siguiente figura:



Tomado de Tomsett y Thurman, 1988.

(A) FITOQUELATINAS

Las metalotioninas se pueden clasificar en tres clases:

Clase I: polipéptidos con localización de la cisteína muy semejante a la de la metalotionina de corteza renal equina.

Clase II: polipéptidos con localización de la cisteína poco relacionada con la metalotionina renal equina.

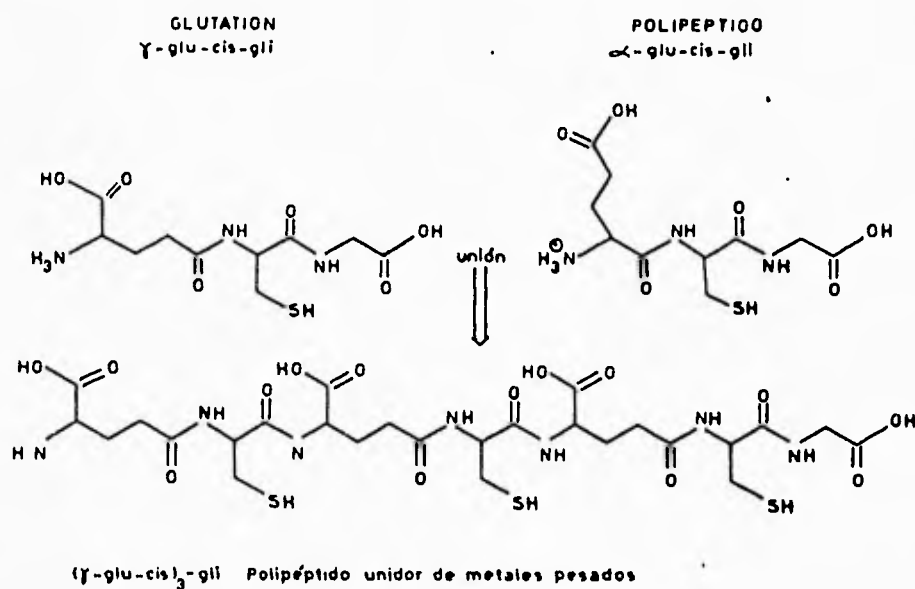
Clase III: atípica [30].

Las fitoquelatinas pertenecen al grupo III.

La síntesis de fitoquelatinas es inducida por metales pesados. Estos polipéptidos poseen la estructura $(\gamma\text{-glu-cis})_n\text{-gli}$ donde $n=2-11$ y una glicina terminal y de 5 a 17 aminoácidos [31,34].

Los iones metálicos tóxicos penetran a la célula por el mismo sistema de captación de los iones metálicos fisiológicamente importantes como Cu y Zn.

Los organismos fotosintéticos son los principales puntos de entrada de los metales dentro de la cadena alimenticia, llegando así hasta los animales y el hombre. Los productores primarios viven en ambientes acuáticos y terrestres los cuales proveen los nutrientes esenciales incluyendo Cu y Zn, así como los metales Cd, Pb, Hg y Ag. Los niveles de estos metales dependen de perturbaciones hechas por el hombre. Las fitoquelatinas se inducen cuando hay concentraciones elevadas de metales pesados. Entre sus características se encuentran: peso molecular menor a 10 kD, alto contenido de metal al igual que de cisteína, ausencia de aminoácidos aromáticos, contienen secuencias de cis-x-cis, siendo x otro aminoácido u otra molécula de cisteína y no conservan su estructura secundaria. Las fitoquelatinas son derivadas del glutatión y para que se forme un péptido que una metales pesados deben existir una serie de enzimas diferentes. La estructura de estos péptidos se muestra a continuación:

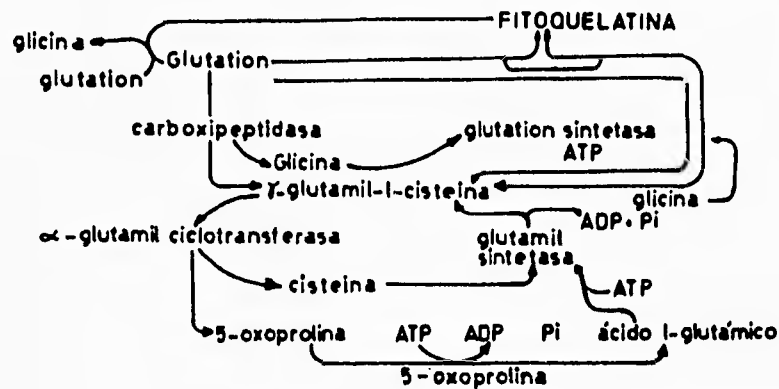


Tomado de Steffens J.C. 1990.

Estos polipéptidos fueron descritos primeramente por Murasugi et al [30] en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* en donde se observó la inducción por Cd^{2+} (por lo cual se le llamó cadistina). Se propusieron varias estructuras hasta que se llegó a la identificación y síntesis total de $(\gamma\text{-glu-cis})_3\text{-gli}$. La capacidad de sintetizar fitoquelatinas en respuesta a metales pesados se encuentra en muchas especies de

plantas, animales y microorganismos, por ejemplo en orquídeas, algas rojas, algas verdes y algas cafés, *Datura innoxia*, *Chlorella fusca*, *Rauvolfia serpentina*, etc.

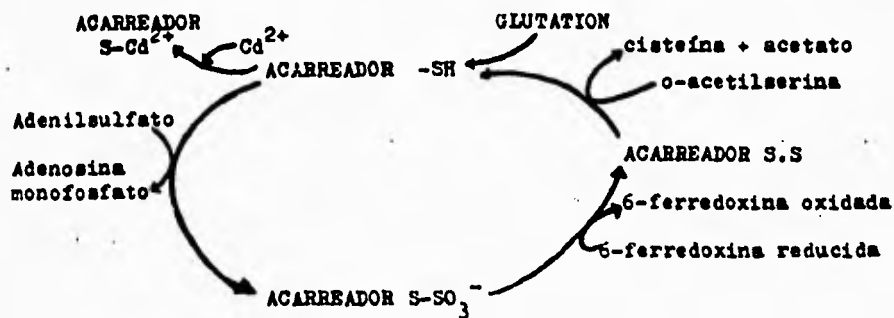
La síntesis de fitoquelatinas sigue una vía enzimática bien caracterizada. Para muchas especies, la molécula inicial es el glutatión (γ -glu-cis-gli). Las fitoquelatinas pueden ser sintetizadas por la adición de unidades γ -glutamil-cisteína o glutatión. La presencia de uniones γ -carboxamida implica que esta no puede ser sintetizada directamente via RNAm y por ello los oligonucleótidos de su secuencia no pueden ser usados para reconocer los genes responsables para la síntesis [29]. La biosíntesis de fitoquelatinas requiere de las mismas enzimas que la síntesis de glutatión. Este último es sintetizado en plantas como en animales. La etapa limitante de la síntesis de glutatión es $\text{glu} + \text{cis} \rightarrow \gamma\text{-glu-cis}$ catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa con hidrólisis de ATP a ADP y Pi para dar energía a la reacción. Esta enzima se inhibe por acción de la butionina sulfoximina (BSO). La segunda etapa de biosíntesis es $\gamma\text{-glu-cis-gli} + \text{gli} \rightarrow \gamma\text{-glu-cis-gli}$ y es catalizada por la glutatión sintetasa y también utiliza energía proveniente de la hidrólisis del ATP. El glutatión puede ser sustituido por homoglutatión (γ -glu-cis- β -ala) en algunas especies. La siguiente enzima que participa en la formación de fitoquelatina es la (γ -glu-cis) n -gli sintetasa, la cual sigue adicionando residuos de γ -glu-cis a la cadena ya formada, así las células que tienen glutatión a mayor concentración de (γ -glu-cis) $_2$ -gli producirán más (γ -glu-cis) $_2$ -gli, mientras que las células que tienen (γ -glu-cis) $_2$ -gli en mayor proporción que el glutatión producirán más (γ -glu-cis) $_3$ -gli [30]. La síntesis es citoplásmica, aunque ya se ha detectado la compartimentalización de las fitoquelatinas. Esta síntesis en algunas especies puede llevarse a cabo en un período de tiempo de 5-15 min después de la exposición a un exceso de metal. En la figura siguiente se muestran las rutas para la síntesis de fitoquelatinas, glutatión y γ -glutamil-cisteimina en plantas [29]:



Tomado de Tomsett y Thurman, 1988.

Las fitoquelatinas son sintetizadas en plantas, en donde no se han detectado otras metalotioninas. Steffens y cols (1986) sugieren que las fitoquelatinas también actúan como acarreadores de sulfuro durante la reducción del sulfato. El acarreador -S todavía no ha sido bien caracterizado, pero existe la evidencia de que es un péptido que contiene tioles, similar al glutatión, con peso molecular de 1200. Este grupo de investigadores argumentan que las fitoquelatinas podrían jugar este papel y explicar que las cantidades de H_2S generado proporcionan la acidificación como es de esperarse. Esta hipótesis puede explicar muchas de las observaciones sobre las propiedades de las fitoquelatinas, por ejemplo en células resistentes a Cd podría

esperarse que se incrementara la capacidad para sintetizar moléculas acarreadoras, las cuales sirven para mantener el metabolismo celular [29].



Vías de reducción del sulfato

Tomado de Tomsett y Thurman, 1988.

Aunque muchos metales inducen la síntesis de fitoquelatinas, la unión de metales por estos péptidos se ha demostrado para los metales Cu, Zn, Pb y Cd. La afinidad del péptido varía dependiendo del metal. Los complejos formados de $(\gamma\text{-glu-cis})_2\text{-7-gli}$ son muy heterogeneos debido a su gran facilidad de formar diferentes combinaciones. Así, la estequiometría de los complejos formados entre el péptido y el metal se reporta frecuentemente como la relación de moles de sulfhidrilo en lugar de moles de péptido. La relación de cis-SH para un metal en el complejo con fitoquelatina es 2:1 para el Cd, Zn y Pb. El Cu, el cual está presente en los complejos $(\gamma\text{-glu-cis})_n\text{-gli}$ como Cu I se encuentra unido al grupo sulfhidrilo en una relación 1:1 [33].

(B) METALOTIONINAS

Las metalotioninas descubiertas en 1957 por Margoshes y Valle son proteínas que no son inducidas alostéricamente por metales pesados como las fitoquelatinas, sino genéticamente; son constituyentes de los seres vivos, son de bajo peso molecular (menor a 40 kD), carecen de aminoácidos aromáticos, poseen uniones cis-x-cis ó cis-cis, conservan su estructura primaria (fenómeno que no ocurre con las fitoquelatinas⁹ y pueden ser sintetizadas por invertebrados (como hongos), insectos y mamíferos. Se pueden clasificar en tres clases:

Clase I: incluye a las metalotioninas de mamífero y polipéptidos de otras familias relacionados con la estructura primaria.

Clase II: se incluyen las metalotioninas cuya estructura no se parece a las de mamífero, por ejemplo las de ciertas levaduras, procariontes, erizos de mar, raíz del trigo, etc.

Clase III: en la cual se encuentran polipéptidos atípicos que contienen unidades de γ -glutamilcisteinil [36].

La clase I de las metalotioninas posee un polimorfismo genético elevado. Los tejidos de mamífero generalmente contienen dos fracciones principales: MT-1 y MT-2 difiriendo a pH neutro por una carga negativa; también existen isoformas de estas fracciones: MT-1a, MT-1b, etc en primates y otras especies como hongos, etc, estas isoformas se pueden separar por HPLC.

Tanto la clase I como la clase II de las metalotioninas se caracterizan por ser proteínas de cadena simple. Las formas de mamífero contienen de 61 a 62 aminoácidos, la metalotionina de pollo contiene de 63 a 64 aminoácidos. En invertebrados hay cadenas cortas al igual que en algunos hongos, por ejemplo en Neurospora crassa se ha encontrado una cadena de 25 aminoácidos. Las metalotioninas de clase III son estructuras oligoméricas formadas por dos o más cadenas polipeptídicas variables. La secuencia de aminoácidos es conocida ahora

para más o menos 36 clases de metalotioninas tipo I, cuatro clase II y dos para la clase III.

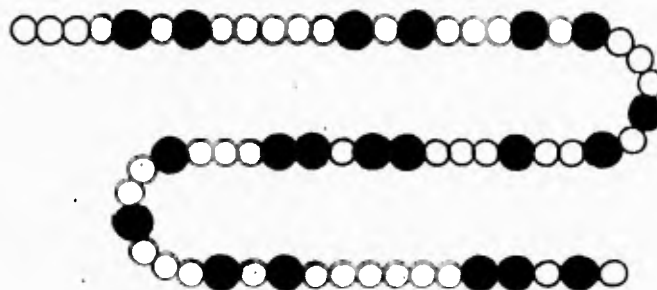
La composición de aminoácidos en las metalotioninas varía en número dependiendo de la especie de la cual se trate. En cuanto a la composición metálica, se han aislado lotes de enzimas de varias fuentes como la de corteza renal equina, la cual contiene 2.9 % de Cd, 0.6% de Zn y 4.1% de S por gramo de peso seco de proteína [35]. Así mismo, la composición metálica de las metalotioninas es variable y depende del tejido de origen. El Cd y el Zn se encuentran en igual abundancia en la proteína de riñón, mientras que el Zn es el componente metálico de la proteína de hígado [35].

Desde su descubrimiento, las metalotioninas han sido identificadas en la fracción citosólica del hígado, el riñón y otros tejidos parenquimatosos de una gran variedad de especies animales y también en microorganismos. No obstante, existe variación en su abundancia natural, por ello, un hígado humano puede contener cerca de 200 mg mientras que en animales experimentales esta cantidad es pequeña pero puede aumentar al administrarles metales inductores como Cd, Zn, Hg y Ag principalmente.

Se ha establecido una distribución de residuos de cisteína en las metalotioninas y se ha observado una secuencia predominante de cis-x-cis. Otra peculiaridad es la yuxtaposición de aminoácidos básicos y de residuos de serina o cisteína. En muchas metalotioninas, se han encontrado dos o más residuos de aminoácidos ligadores de metal (L) que se encuentran en posiciones vecinales en la cadena formando secuencias de oligopeptidos de forma -L-X-L- ó -L-X-Y-L-. Se dice también que existen siete secuencias cis-x-cis cada una de las cuales es un sitio de unión del metal. La acción quelante de los iones metálicos por estos ligandos vecinales puede ser la primera etapa en la interacción proteína-metal. La formación de este complejo podría ser seguida por la unión adicional del metal a un tercer

residuo de cisteína localizado en otra región de la cadena y presumiblemente unir otros ligandos.

La distribución de los residuos de cisteína en la metalotionina se muestra a continuación. Los 20 residuos de cisteína presentes participan en la unión de siete iones metálicos bivalentes pesados a través de la formación de uniones mercáptido. En metalotioninas de mamíferos las 20 cisteínas son invariables al igual que los residuos de lisina y arginina [36]:



- Cisteína
- Otros aminoácidos.

Tomado de Kägi y Schöffler, 1988.

Las secuencias comparativas de metalotioninas de diferentes especies y órganos revelan similitudes importantes. Las posiciones de las cisteínas así como de las serinas y aminoácidos básicos está altamente conservada. Los aminoácidos reemplazados se encuentran localizados generalmente fuera de estas regiones y su

presencia se explica por cambios de bases a lo largo de la evolución. Así, porejemplo, la diferencia en ocho posiciones de aminoácidos entre los dos tipos de metalotioninas renal-equina sugiere la existencia de más de un cistrón por metalotionina. Además se ha demostrado que la selectividad de las metaloproteínas por uno u otro catión está determinada principalmente tanto por su localización fisiológica como por su estructura polipeptídica [37].

La síntesis de metalotioninas está inducida a nivel transcripcional y las células seleccionadas para tolerancia a metales pesados pueden presentar amplificación de los genes para metalotioninas. La expresión genética de las metalotioninas es rápidamente inducida por exposición a metales pesados y en células de mamífero son inducidas por factores como algunas hormonas o el interferón. En mamíferos, la síntesis de metalotioninas es inducida durante el desarrollo normal y la diferenciación. También puede inducirse por estrés oxidativo. Entre los metales inductores en metalotioninas de mamífero se encuentran Cd, Zn y Cu, mientras que en las metalotioninas que unen Cu de ciertos hongos parece ser este metal el único inductor. La concentración óptima para la inducción varía en diferentes sistemas pero generalmente es más baja al nivel que causa la toxicidad. La cinética con la cual la síntesis de metalotioninas es activada también varía durando días en mamíferos y minutos en levaduras. Se cree que los metales pesados pueden estimular la transcripción genética de la metalotionina, por lo cual se podrían originar irregularidades como diferencias en el RNAm, disminución de la vida media de la proteína y se podría afectar también la velocidad en la cual el metal se une y penetra a la célula blanco. Hay estudios que indican que los metales pesados actúan al nivel de síntesis, procesamiento y degradación del RNAm [28,38].

Los genes responsables de la síntesis de metalotioninas han sido estudiados tanto por los métodos de la genética clásica como por técnicas de DNA recombinante [29].

Se ha observado que las metalotioninas pueden ser inducidas por condiciones de stress como son la exposición al calor o al frío o por inanición al igual que por la circulación de hormonas esteroideas a ciertas concentraciones. En cultivos de hepatocitos se ha estudiado en efecto de los glucocorticoides al igual que en cultivos de fibroblastos, hepatoma, sarcoma y células eritroides pero no en células que contienen genes hipermetilados inactivos de metalotionina. En ratas y ratones, los glucocorticoides estimulan la síntesis de metalotioninas en hígado con pequeños efectos en el riñón, músculo esquelético y bazo. Se ha encontrado que la inducción ocurre principalmente a nivel de iniciación de la transcripción con un menor efecto en la estabilidad del RNAm. Un modelo aceptado para la acción de los glucocorticoides es que la hormona se une al receptor con lo cual se estimula la transcripción por interacción directa con las secuencias de DNA nuclear. Una forma alternativa es la posibilidad de que las secuencias reguladoras del glucocorticoide se encuentran localizadas a cierta distancia (aproximadamente 25 kb) de los genes.

La síntesis de metalotioninas también se induce por el daño tisular causado por la inyección de compuestos como la turpentina, el tetracloruro de carbono o una endotoxina bacteriana [2].

Entre las funciones fisiológicas de las metalotioninas una de las más importantes sería la destoxificación del Cd, lo cual puede ocasionar que aumente la síntesis de metalotioninas por amplificación de los genes responsables. La metalotionina exhibe una actividad enzimática no conocida y no se sabe si toma parte en el proceso redox. Un papel importante es el hecho de que esta proteína puede tomar un metal que se encuentra en el exterior celular y pasarlo hacia adentro de la célula a apoenzimas que lo necesitan. Un ejemplo de ello es la activación de apoenzimas que requieren de Zn o de Cu para funcionar, metales que les son suministrados por las metalotioninas, con lo cual estas proteínas demuestran su importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular. También pueden tener

un papel importante en la adaptación celular a varios tipos de stress. Se ha visto que las células de mamífero que expresan altos niveles de metalotioninas son resistentes a la irradiación por rayos X con lo cual se puede pensar que la proteína se encuentra envuelta en un complejo orden de interacciones en el control del metabolismo normal al igual que en la adaptación celular al stress. Otra función que tienen estas proteínas es la de secuestrar metales no esenciales en el organismo como son Hg, Pb, Bi, Ag y Au. Todo lo anterior demuestra que las metalotioninas no son un simple sistema de detoxificación sino que es más probable que representen una parte importante en la homeostasis de los metales pesados. Así, cuando las células cultivadas son expuestas a niveles tóxicos de metales se produce la amplificación de los genes que codifican para la síntesis de las proteínas y como resultado se obtiene un aumento en la capacidad de protección celular [2, 29, 36, 37].

Existen muchos microorganismos capaces de sintetizar ya sea metalotioninas o fitoquelatinas cuando se encuentran sujetos a concentraciones tóxicas de metales. Un ejemplo de lo anterior lo constituye el estudio del efecto de concentraciones tóxicas de metales. Un ejemplo de lo anterior lo constituye el estudio del efecto de concentraciones fisiológicas y no fisiológicas de metales en *●chromonas dánica* (protozoario de vida libre), el cual fue expuesto a concentraciones variables de los metales Cu y Cd, observándose que en el caso del primero, no se encontró un efecto significativo sobre el metabolismo y la estructura del fitoflagelado, mientras que en el caso del segundo, al ir aumentando la concentración del metal, se observó la disminución tanto del crecimiento como de la movilidad celular. Se encontró que en la presencia de Cd, la célula sintetiza una glicoproteína que juega un papel protector contra los metales, la cual es similar a la metalotionina; se proponen también otros mecanismos detoxificantes como son la producción de material orgánico (como citrato) el cual es afín a los metales luego de que estos entran a la célula [39].

Otro organismo en el cual se ha estudiado la síntesis de péptidos poli-(γ -glutamilcisteinil)glicina y su relación con la unión de Cd es Datura innoxia. Se trataron dos líneas, una no tolerante en la cual 250 μM de CdCl_2 resultó tóxico; y otra tolerante, la cual sobrevive y crece en estas concentraciones. Tanto las células tolerantes como las no tolerantes sintetizaron la misma cantidad de polipéptidos durante las 24 horas iniciales de exposición a esta concentración de metal. En lo referente a la formación de complejos polipéptido-metal se formaron en mayor cantidad en las células no tolerantes, pero estos fueron de menor peso molecular y no unieron todo el Cd celular, en contraste con la que sucedió en las células tolerantes [40].

En otro trabajo se seleccionó, aisló y caracterizó una cepa de Datura innoxia resistente a Cd, la cual posee la capacidad de crecer y dividirse rápidamente en concentraciones letales de Cd. Las células resistentes a 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 μM de CdCl_2 se aislaron y utilizaron para iniciar suspensiones celulares resistentes al ión tóxico metálico. La resistencia a Cd se relacionó con la síntesis de proteínas ricas en cisteína y que unían Cd. Las proteínas sintetizadas no fueron detectadas en la cepa sensible a Cd de la cual se derivó la cepa resistente [41]. Se han estudiado muchos otros microorganismos con variaciones en la síntesis de proteínas, mutaciones, etc; por ejemplo, se han aislado mutantes de Schizosaccharomyces pombe incapaz de sintetizar la cadistina, un péptido que une Cd y que es de tamaño pequeño [42]. También se han hecho estudios en bacterias como Escherichia coli la cual se ha expuesto a concentraciones de 3 μM de CdCl_2 y se han observado sus efectos. Se han crecido otras especies como Micrococcus luteus y Azotobacter en presencia de Pb, Chlamydomonas reinhardtii en presencia de proteínas o péptidos destoxicantes de metales pesados [43].

Euglena gracilis.

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó como modelo del protozoario Euglena gracilis que es un microorganismo de vida libre con la capacidad de crecer en diferentes condiciones como son: en ausencia de luz de manera heterotrófica con la característica de desarrollar mitocondrias y llevar a cabo el proceso oxidativo. Puede desarrollarse en diferentes fuentes de carbono como por ejemplo glutamato más malato (medio Hutner), peptona más acetato, etanol, láctico, etc. También puede crecer en presencia de luz de manera autotrófica desarrollando cloroplastos y llevando a cabo el proceso de la fotosíntesis, también en medios sintéticos[44].

Se ha estudiado y demostrado la capacidad que Euglena gracilis cepa Z, crecida en presencia o ausencia de luz, tiene para desarrollar tolerancia a los metales pesados como Cd^{2+} (a 500 μM). Se hicieron estudios en cuanto al efecto de esta concentración de Cd^{2+} y se observó que hay aumento en el tamaño celular, el contenido de proteína y que además el metabolismo del adenilato se encuentra afectado [45]. En Euglenas autótrofas, se vio afectada la fijación de CO_2 para la fotosíntesis, en tanto que en Euglenas heterótrofas, la respiración resultó afectada al igual que la oxidación del lactato además de que decrece la carga energética celular. Se observó también que el daño causado por Cd^{2+} resultó ser más reversible para el caso de la fotosíntesis que para el caso de la respiración en donde el daño no llega a ser reversible. Las células resistentes a Cd^{2+} presentan idénticos valores de cambios de energía así ser cultivadas en presencia o ausencia de Cd^{2+} . Bariaud y cools en 1985 [85] reportan una baja acumulación de Cd^{2+} en células resistentes en comparación con una mayor acumulación del metal en las células sensibles [46]. En estudios realizados para observar los cambios ultraestructurales de células de Euglena se consideran dos concentraciones, una de 500 μM para la cepa sensible y otra de 25 mM para la cepa resistente. Se observan las anomalías causadas tanto en

cloroplastos como en mitocondrias. En los primeros, las modificaciones perduran durante todo el crecimiento; entre otras se encuentran el aumento en el tamaño y una fuerte estimulación para la formación de clorofila. Se ha observado también que el Cd inhibe la capacidad de utilizar el carbono orgánico como una fuente de energía. En cuanto a las mitocondrias se observa la formación de estructuras parecidas a mielina que se encuentran fuera o dentro de la mitocondria. Se cree que estas representan material fosfolipídico no funcional derivado de la mitocondrias y eventualmente eliminado. Esto sugiere que el Cd puede dañar el sistema enzimático respiratorio. Estos estudios se hicieron creciendo a las células en medio lactico para desarrollo de mitocondrias y en medio Cramer-Mayers para desarrollo de cloroplastos [45].

Cuando se tiene una cepa resistente a Cd^{2+} de Euglena, esta es capaz de resistir también concentraciones elevadas de otros metales como Hg, Ni, Se, Cu, Zn y Co y se pueden determinar tanto la concentración mínima inhibitoria como la concentración crítica de crecimiento. Bariaud y Mestre en 1984 [46] usando tanto en cepas resistentes a una concentración de $500\mu\text{M}$ de CdCl_2 como en cepas no resistentes determinaron tanto la concentración mínima inhibitoria como la concentración crítica al crecer las células en presencia de los metales Hg, Ni, Se, Cu, Co y Zn. Los resultados se presentan en la siguiente tabla

Metal	mic M		cc M	
	Eg-Z	Eg-ZR	Eg-z	Eg-ZR
Mercurio	5x10 ⁻⁷		3x10 ⁻⁶	
Niquel	1x10 ⁻⁴		1x10 ⁻³	
Selenio	7.5x10 ⁻⁵		1x10 ⁻³	
Cobre	7.5x10 ⁻⁵		1x10 ⁻²	
Cobalto	5x10 ⁻⁴	2x10 ⁻³	3x10 ⁻³	5x10 ⁻³
Zinc	1x10 ⁻²		7.5x10 ⁻²	>10 ⁻¹

En donde mic= concentracion minima inhibitoria.

cc= concentracion critica.

Eg-Z= cepa sensible.

Eg-ZR= cepa resistente.

La manera por la cual Euglena gracilis es capaz de adquirir resistencia a metales pesados a concentraciones tóxicas se ha explicado por varios procesos, uno de los cuales es el antagonismo del Cd con el Zn. Este es importante ya que se supone que por tener características muy semejantes, el Zn puede desplazar al Cd y así evitar el daño causado por este último [48].

Se mhan realizado algunos estudios sobre el efecto que tienen concentraciones subletales de Zn, Cd y Hg tanto en la fotosíntesis y la respiración como en las actividades fotoquímicas. Se sabe que el Zn, el Cd y el Hg son fuertes inhibidores del crecimiento de Euglena aunque los mecanismos implicados no están bien claros. Los tres metales inhiben fuertemente el consumo de oxígeno en células crecidas en la obscuridad como la producción de oxígeno en cultivos iluminados. Se

ha encontrado que los tres metales afectan a los fotosistemas I y II, especialmente por inhibir la actividad de la enzima NADP-oxidoreductasa [49].

Se ha estudiado la movilidad y la orientación fototáctica en *Euglenas* crecidas en la luz y expuestas a diferentes concentraciones de Hg, Cd y Cu, y se ha encontrado que el Cu no afecta ninguno de estos parámetros, en contraste con los otros elementos. El Pb a concentraciones de 2-200 μ M reacciona con los grupos sulfhidrilo y bloque los grupos carboxilo afectando el crecimiento, fotosíntesis, respiración y división celular en este protozooario. El Cd retarda el crecimiento a concentraciones de 10 μ M y a 30 μ M no se observa división celular. El Hg a concentraciones más bajas afecta ambos parámetros, resultando así el elemento más tóxico en este microorganismo. Tanto la fototaxis como la movilidad son afectadas dependiendo de la concentración de metal utilizado [50].

Se han estudiado las propiedades fisicoquímicas y el significado fisiológico de una proteína que puede unir Cd, la cual ha sido encontrada en *Euglena gracilis*. Esta proteína se puede expresar en células heterótrofas y autótrofas, cuando se les somete a una concentración de 4.7 μ g/ml (41.8 μ M). Se han identificado, por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefaraosa, dos especies distintas de esta proteína: BP-1 y BP-2 (BP=Binding protein). Con los resultados obtenidos se puede afirmar que esta proteína es distinta a las metalotioninas encontradas en mamíferos. Entre las diferencias encontradas se encuentran el peso molecular, el contenido de cisteína y la reactividad cruzada con anticuerpos de metalotionina de hígado de rata [52].

En la actualidad se están realizando estudios utilizando microalgas como la *Spirulina máxima* para remover los metales pesados de aguas contaminadas, a lo cual se le ha dado el nombre de Bioremoción. Este término puede ser definido como la acumulación y concentración de contaminantes de aguas mediante el uso de materiales biológicos, preferentemente microalgas, las cuales son capaces de

secuestrar iones metálicos por los mismos mecanismos de adsorción y absorción al igual que otros microorganismos, así como la formación de fitoquelatinas, las cuales pueden sintetizarse en respuesta a niveles tóxicos de metales pesados [53].

Existen otros procedimientos para remover metales pesados como son la precipitación y el intercambio iónico sobre los cuales la bioremoción, tiene, entre otras, las siguientes ventajas:

- 1.- Uso de biomateriales renovables naturales que pueden ser producidos de forma barata.
- 2.- Alta selectividad por los metales pesados.
- 3.- Capacidad de tratar grandes volúmenes de agua.
- 4.- Alta afinidad.
- 5.- Capacidad de funcionar bajo una gran variedad de condiciones fisicoquímicas incluyendo temperatura, pH, y la presencia de otras iones (incluyendo Ca^{2+} y Mg^{2+}) [54].

En el laboratorio, se trata de introducir a Euglena gracilis como un microorganismo capaz de captar metales pesados contaminantes de aguas, ya que tanto por las características señaladas anteriormente y por los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos afirmar que este protista tiene la capacidad y características necesarias para desarrollar tolerancia a concentraciones altas de metales pesados y en consecuencia podría ser utilizado en el tratamiento de aguas contaminadas por metales pesados.

Si las Euglena gracilis son capaces de crecer en presencia de concentraciones tóxicas de metales pesados desarrollando mecanismos que las vuelven tolerantes a éstos, es posible utilizarlas en los procesos de descontaminación de aguas. En base a ésta hipótesis hemos elaborado este proyecto de investigación, el cual, está apoyado por los resultados que hemos obtenido hasta el momento. Puesto que el problema de

la contaminación es grande, y la utilización de recursos algunas veces es elevado, nosotros consideramos que la utilización de las Euglenas en este problema es de gran ayuda ya que es un microorganismo fácil de cultivar y del cual se obtienen altos rendimientos en cuanto a masa y a eliminación del metal, además de que es capaz de crecer de manera autótrofa como heterótrofa.

OBJETIVOS:**Objetivo general:**

Obtener cepas de Euglena gracilis resistentes a la presencia de metales pesados y capaces de acumular cantidades de los metales tóxicos.

Objetivos particulares:

- 1.- Determinar las condiciones que favorecen el desarrollo de tolerancia a metales pesados (Hg, Cd y Pb) tanto en condiciones autótrofas como heterótrofas.
- 2.- Determinar el efecto de los metales pesados en la respiración (mitocondrias) y en la producción de oxígeno (cloroplastos).
- 3.- Determinar la capacidad de captación de los metales pesados tanto en células sensibles como en células resistentes.
- 4.- Ensayar Tolerancia Cruzada entre cepas de células.

MATERIALES Y METODOS.

Medios de cultivo:

Se utilizó una cepa de Euglena gracilis la cual, por poseer las siguientes características se asemeja a la cepa Z [59]: 1) El tiempo generacional de 10 a 14 horas el cual depende de la fuente de carbono [55], 2) crecimiento nulo en galactosa como fuente de carbono [56] y 3) tendencia a blanquearse entre 34-35°C [57].

Las muestras de Euglena gracilis fueron cultivadas axénicamente en la obscuridad con agitación orbital suave a 61 rev/min a temperatura ambiente (20-25° C) en los medios de cultivo: 1) Peptona más acetato, 2) Hutner modificado por Schiff [57] y 3) Láctico, cuya composición es la siguiente:

Medio de Glutamato+Malato:

Elemento	Concentración final (%) en l l
CaCO ₃	0.02
Fuente de carbono:	
ácido l-glutámico	0.5
ácido dl-málico	0.2
Minerales:	
MgSO ₄	0.05
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.02
KH ₂ PO ₄	0.08
ZnSO ₄	0.009
MnSO ₄	0.008
Na ₂ MoO ₄	0.002
CoCl ₂	0.00016
CuSO ₄	0.00039
H ₃ BO ₄	0.00028
NaI	0.000012
FeCl ₃	0.0005
Vitaminas:	
Disulfuro de Tiamina (B ₁)	0.010
Clorhidrato de Piridoxina (B ₆)	0.0001
Cianocobalamina (B ₁₂)	0.010
pH 3.5 ajustado con KOH	

El medio Láctico contiene los mismos elementos pero en lugar de poner como fuente de carbono ácidos glutámico y málico se añade 36 mM de ácido dl-láctico.

El medio de cultivo sin vitaminas se esterilizó 40 minutos a una presión de 20 libras a 120°C.

Las vitaminas B₆ y B₁₂ se añadieron como Neurobión (MERCK) en plover que junto con la vitamina B₁ se esterilizaron por filtración en una membrana milipore de 0.22µM. Posteriormente se agregaron al medio de cultivo al momento de realizar la siembra de las células.

Medio de Peptona:

Peptona bacteriológica	1 g/l
Peptona extracto de carne	1 g/l
H ₂ O	1.6 g/l
pH 6.8	1000 g/l

En cada medio se realiza la siembra de células en diferentes concentraciones de metales pesados: Cd²⁺, Hg²⁺ y Pb²⁺ [adicionados como CdCl₂, HgCl₂, Pb(NO₃)₂ debido a que son sales solubles en agua]. Para sembrar las células se realiza un conteo en una cámara de Neubauer diluyendo e inmovilizando con HCl 1:1 y así se ajusta una población inicial de células de 0.2x10⁶células/ml de acuerdo a la relación:

$$X = \frac{(\text{vol}) \times (0.2)}{(\text{y}) \times (\text{dil}) / 100}$$

donde. vol=volumen que se quiere sembrar
 X=número de células que se deben sembrar para alcanzar la concentración inicial.
 0.2=concentración inicial de células.
 y=número de células promedio contadas en la cámara.

Las células se colectan en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día) en donde las densidades alcanzadas fueron $4 \pm 0.5 \times 10^6$ células/ml en el medio glutamato+malato, $3.5 \pm 0.6 \times 10^6$ células/ml en el medio Láctico y $1.8 \pm 0.35 \times 10^6$ células/ml en el medio peptona+acetato. Los valores representan la media \pm el error estándar de tres experimentos por triplicado. Las células recolectadas fueron lavadas por centrifugación a 1000xg por 15 min en un medio que contiene 10 mM de KH_2PO_4 y 2 mM de EGTA a pH 7.5.

También se crecieron células bajo iluminación ($22 \mu\text{M}/\text{m}^2 \text{ seg}$) en un régimen de 12 hr luz/12 hr oscuridad a 20-25°C con agitación de 110 rpm en el medio de glutamato+malato.

Curvas de crecimiento:

Se realizaron las curvas de crecimiento en presencia de concentraciones variables de los metales pesados antes descritos. Las concentraciones de los metales varían desde 10 μM hasta 1 mM para el caso del Cd^{2+} y del Hg^{2+} y de 10, 100 y 500 μM para el caso del Pb^{2+} , tanto en células autótrofas como heterótrofas. Las células inician su crecimiento después de la inoculación con una población inicial de 0.2×10^6 células por mililitro (día cero). A partir de este periodo, se comienzan a tomar muestras de 1 ml a diferentes intervalos de tiempo con lo cual se va cuantificando el número de células y se construye la curva de crecimiento. La población celular varía dependiendo de la concentración de metal utilizada, así a más alta concentración menor crecimiento celular.

Medición de consumo y producción de oxígeno:

El consumo de oxígeno en *Euglena* ($5-7 \times 10^6$ células enteras) fue medido con un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro (YSI modelo 53) a 25°C en un medio que contiene 120 mM de KCl, 20 mM de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y 2 mM de EGTA a pH 7.2 (medio KME). La solubilidad del oxígeno fue de 798 ng átomo de O/ml a 25°C y una altitud de 2240

m. La producción de oxígeno en células expuestas a la luz se realiza en el mismo medio (KME) en donde primero se deja que las células consuman todo el oxígeno presente en el medio en condiciones de oscuridad, posteriormente se estimula la producción de oxígeno al someter a las células a la luz de un proyector de acetatos (luz actínica).

Se ensayó de manera conjunta la medición de la actividad de la citocromo oxidasa al estimularla con un donador artificial de electrones, el N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) a una concentración final de 0.6 mM. Se observó también el efecto del carbonilcianuro-m-cloro-fenilhidrazona (CCCP) a una concentración final de 10 μ M, tanto en el consumo como en la producción de oxígeno en células heterótrofas y autótrofas respectivamente.

Determinación de la clorofila:

Se aplicó el método de Arnon [58] para la medición de clorofila en las células crecidas en presencia de luz. Aproximadamente 0.5 ml de la suspensión celular fué sometida a extracciones sucesivas en 2.5 ml de acetona acuosa al 80%. La mezcla fué agitada vigorosamente 2 minutos y centrifugada a 2500 rev/min por 5 minutos. La absorbancia del sobrenadante obtenido fué medido directamente a 645, 652 y 662 nm y los cálculos fueron hechos usando los coeficientes de extinción reportados por Arnon. Las mediciones se realizan de la siguiente manera:

Clorofila total=27.8 (Abs 652) mg/l

Clorofila a=12.7 (Abs 662)-2.69 (Abs 645)

Clorofila b=22.9 (Abs 645)- 4.68 (Abs 662)

Nosotros solo determinamos el contenido de clorofila total.

Medición de carotenos:

Esta determinación se realizó en células heterótrofas almacenadas a -70°C durante varios días mediante un barrido espectrofotométrico de 400 a 700 nm, utilizando un espectrofotómetro de doble haz (SLM-AMINCO DW-Z UV-VIS). Se

utiliza un medio que contiene 100 mM de KH_2PO_4 , 10% de glicerol y pH 7.5. En células control (sin exposición a metales pesados) se pueden detectar tres picos de absorción aproximadamente a 407, 433 y 465 nm que corresponden a los carotenos presentes. La presencia de estos picos varía dependiendo del metal y de manera inversa a la concentración utilizada.

Captación de metales pesados:

Se midió la capacidad de las células de Euglena para captar metales pesados mediante espectrofotometría de absorción atómica (PYE UNICAM sp 192 Atomic Absorption Spectrophotometer). Se mide la concentración de metal en tres fracciones obtenidas, las cuales son:

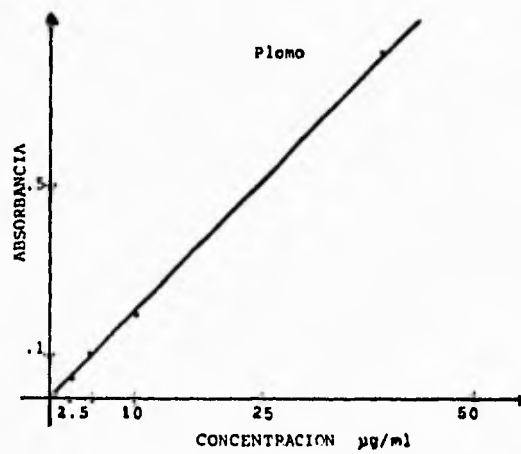
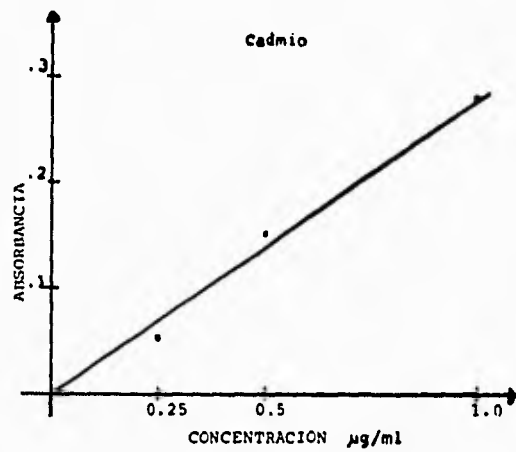
- 1) 10 ml del medio original con o sin el metal pesado.
- 2) 10 ml del sobrenadante de la primera centrifugación (medio de crecimiento libre de células).
- 3) Células digeridas por mezcla de ácidos (dilución 1:10).

El tratamiento de las células se realiza de la siguiente manera:

Se lavan las células con un medio que contiene 100 mM de KH_2PO_4 y 2 mM de EGTA a pH 7.5, el paquete celular se resuspende en un volumen mínimo de medio, se toma una alícuota que corresponda a 10^7 células/ml, y se agregan 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado, 2.5 ml de HNO_3 concentrado y 0.5 ml de HClO_4 70-72%. Las muestras se ponen a hervir hasta que aparecen los vapores de SO_3 y posteriormente por 10 minutos más. Se realizó una dilución 1:10 con el sobrenadante obtenido y el medio de lavado de las células.

Las tres muestras obtenidas se leen en el espectrofotómetro a la longitud requerida para cada lámpara. Se realiza una curva estándar para cada metal pesado a medir. Se determinó la capacidad de captación para Cd^{2+} y Pb^{2+} (Apéndice 1).

A continuación se presentan las curvas estándar para los metales Cd^{2+} y Pb^{2+} .



Micrografías electrónicas:

Se realizaron micrografías electrónicas tanto de barrido como de transmisión para observar los cambios morfológicos que producen los metales pesados en las diferentes estructuras celulares (mitocondria, membranas, cloroplastos, etc.). Las células se fijan en un medio que contiene sacarosa 250 mM, Hepes [ácido n-(2-hidroxietil)piperazin-N-(2-etano)sulfónico] 10 mM, EGTA 2 mM, albúmina 0.1% y glutaraldehído no polimerizado al 2.5% a pH 7.2 y se sigue el procedimiento descrito en el Apéndice 2 para preparar las muestras y tomar las micrografías. La realización de esta parte del trabajo se llevó a cabo con la colaboración de Mariaelena Mirando y Armando Zepeda del Departamento de Microscopía electrónica del Instituto Nacional de Cardiología.

Aislamiento de mitocondrias:

Se sigue el método descrito por Moreno-Sánchez y Raya (1987), el cual consiste en romper las células por sonicación y recuperar las mitocondrias por centrifugación diferencial, con algunas modificaciones (ver diagrama siguiente).

Las células se centrifugaron (ICE Centra 8R) a 1780xg durante 13 minutos y se resuspendieron en un medio que contiene sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 2 mM (SHE) a pH 7.4 para centrifugar a 327xg durante 5 minutos.

Posteriormente, se lavan con medio SHE y albúmina bovina delipidada al 0.1% (SHEA) dos veces, centrifugando a 327xg durante 5 minutos cada vez.

Se realizó un conteo en la cámara de Neubauer, para sonicar de $1-1.5 \times 10^9$ células en 30-40 ml de medio SHEA en un sonicador SONIPREP 150 (120-12 micrones de amplitud) en un baño de hielo por 2 intervalos de 15 segundos cada uno. Posteriormente, se centrifugó a 581xg durante 10 minutos a 8714xg a 4°C en una centrífuga SORVALL.

El paquete mitocondrial obtenido se resuspende en medios de SHEA a un volumen aproximado de 5 ml para incubar con ADP 1mM y 0.25% de albúmina

delipidada por un lapso de 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó a 8714xg durante 10 minutos y el sobrenadante se resuspendió en aproximadamente 1ml de SHEA.

Aislamiento de Mitocondrias de *Euglena gracilis*.

Colectar las células en fase logarítmica de crecimiento. Centrifugar 10 min 1780xg.



Lavar las células en un medio de sacarosa 250mM, HEPES 10mM, EGTA 2mM (SHE) pH 7.4. Centrifugar 5 min. 327xg



Lavar las células en medio SHE y albúmina delipidada 0.1% (SHEA) 2 veces.



Conteo en cámara de Neubauer.



Sonicar 1-1.5x10⁹ células en 30-40 ml de medio SHEA (10-12μ de amplitud) durante dos intervalos de 15" cada uno en un baño de hielo.



Centrifugar el sobrenadante 10 min a 8714xg.



Resuspender el paquete mitocondrial e incubarlo con 1mM de ADP y 0.25% de albúmina delipidada durante 10 min.



Centrifugar 10 min a 8714xg.

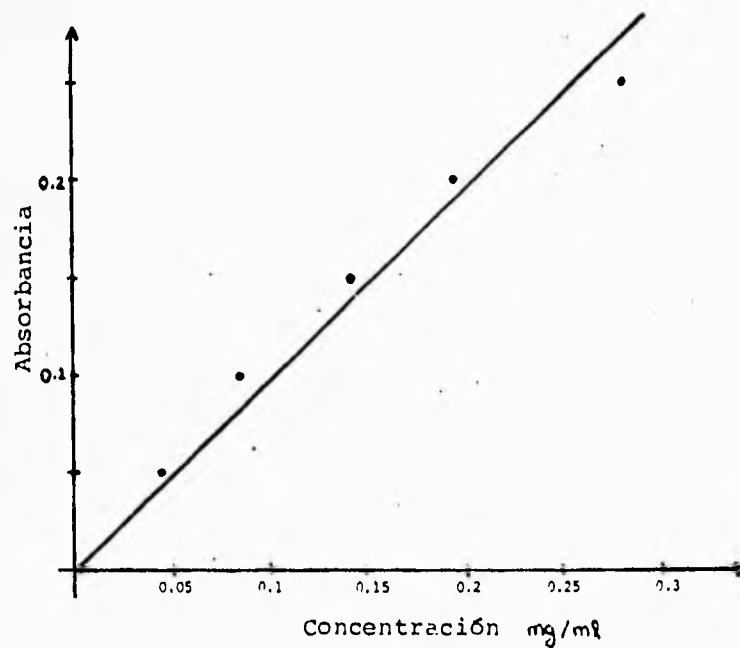


Resuspender en 1 ml de SHEA.

Determinación de Proteína:

La proteína mitocondrial fué estimada por el método de Biuret [62] en presencia de 1% (p/v) de desoxicolato de sodio y utilizando albúmina como estándar.

La turbidez ocasionada por el paramilo fué eliminada centrifugando los tubos después de 20 minutos de añadido el reactivo de Biuret a 327xg durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga IEC-CENTRA 8R. Se muestra una curva estandar para la determinación de proteína en la siguiente figura:



Medición de la actividad de la citocromo oxidasa:

Se realiza en un oxímetro tipo Clark (YSI Modelo 53) conectado a un registrador, en un medio que contiene acetato de sodio 26 mM y ascorbato de sodio 7.5 mM a pH 7.5 en el cual se incuban las mitocondrias (1 mg/ml) y se añade a intervalos de 1 minuto, antimicina 5.5 μ M, CCCP 1.1 μ M, TMPD 1 mM y se inhibe la actividad con azida de sodio 11 mM.

Medición del potencial de membrana:

Se mide en un espectrofotómetro de doble haz con agitación y oxigenación constantes a una velocidad de 200 y una absorbancia de 0.1. Se utiliza un medio que contiene sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, Hepes 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM y CH₃COONa 10 mM a pH de 7.2, en el cual se incuban las mitocondrias (1mg/ml) y se añade safranina 10 mM. Se mide la diferencia de absorbancia de 533-511, el cambio de señal registrado se considera como un reflejo del cambio en la magnitud del potencial de membrana [63].

RESULTADOS

CRECIMIENTO CELULAR

Se cultivaron a las células en tres diferentes medios de cultivo: glutamato+malato, láctico y peptona y en presencia de distintas concentraciones de metales pesados (Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}), tanto en ausencia como en presencia de luz, obteniéndose los siguientes resultados:

CELULAS HETEROTROFAS:

La figura 1 muestra el crecimiento de las células en el medio glutamato+malato en presencia de los metales pesados Cd^{2+} (fig 1A), Hg^{2+} (fig 1B) y Pb^{2+} (fig 1C). El metal que inhibió menos el crecimiento fué el plomo, ya que al comparar el crecimiento a una concentración alta de metal ($500\mu\text{M}$) en el caso de Cd^{2+} y Pb^{2+} se puede observar que el segundo posee un efecto menor en el crecimiento que el primero. En el caso del Hg^{2+} se utilizaron concentraciones más bajas y se encuentra que $100\mu\text{M}$ de metal tiene un efecto inhibitorio significativo.

En el caso de la concentración de 1 mM de Cd^{2+} y Hg^{2+} se puede observar que el segundo inhibe totalmente el crecimiento, mientras que en el caso del primero, las células alcanzan a crecer un poco (0.8×10^6 células/ml en la fase estacionaria). Así, se puede establecer que los metales afectan el crecimiento en el siguiente orden: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ en este medio.

En la figura 2 se muestra el crecimiento de las células en el medio láctico en presencia de Cd^{2+} (fig 2A), Hg^{2+} (fig 2B) y Pb^{2+} (fig 2C). Se observa que la densidad celular obtenida en ausencia de metal pesado (3.5×10^6 células/ml) es menor a la encontrada en el medio anterior (4.7×10^6 células/ml). El efecto de los metales sigue el mismo comportamiento que en el medio anterior, ya que el Pb^{2+} sigue siendo el metal que menos afecta el crecimiento celular. Además (al igual que en el medio glutamato+malato), las fases del crecimiento celular se conservan (fase lag, fase log y fase estacionaria). En el caso del Cd^{2+} , el crecimiento es afectado a partir

de la concentración de 50 μM y se ve que la fase lag se encuentra alterada, alcanzando una fase log sólo en el caso de las concentraciones de 50 y 100 μM , las células más afectadas son las que crecieron a las concentraciones de 250, 500 y 1000 μM . para el caso del Hg^{2+} se utilizaron concentraciones menores del metal y se alcanzó la inhibición total del crecimiento al utilizar la concentración de 1000 μM .

En el caso de las células crecidas en el medio peptona, el efecto de los metales pesados se representa en la figura 3. En los tres casos se conservan las fases del crecimiento celular. Tanto el Cd^{2+} como el Pb^{2+} a concentración de 500 μM afectan el crecimiento celular de forma inversa a la concentración presente. Se utilizaron concentraciones menores para el caso del Hg^{2+} y se observa que la concentración de 30 μM causa una inhibición mayor del crecimiento. En este caso las células control presentan una densidad de población en la fase estacionaria (1.8×10^6 células/ml) menor a la encontrada en los medios glutamato+malato y láctico.

Podemos ver que el crecimiento celular sigue un comportamiento en el cual el crecimiento celular se encuentra determinado por el medio de cultivo utilizado, siendo el medio glutamato+malato en el cual se encuentra el mejor crecimiento.

Los ensayos denominados de tolerancia cruzada (fig 4), consisten en la preexposición a Hg^{2+} 1.5 μM (por más de 15 generaciones) y la consiguiente inoculación en medios con concentraciones variables de Cd^{2+} y Pb^{2+} . Se observó que el crecimiento celular se reestablece solamente en el medio láctico (fig 4C) con relación a las células no preexpuestas a 1.5 μM de Hg^{2+} que se exponen por primera vez al metal. En el caso de las células crecidas en el medio glutamato+malato, el crecimiento celular no aumenta de manera considerable en relación con las células no preexpuestas al metal. Sin embargo, otras funciones celulares si se reestablecen después de la preexposición al metal, como se verá más adelante.

CELULAS AUTOTROFAS:

Las células fueron crecidas en el medio glutamato+malato en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} . Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. Las células más afectadas fueron las que se crecieron en presencia de Hg^{2+} ya que la concentración mínima utilizada ($10\mu\text{M}$) causa inhibición del crecimiento celular, razón por la cual no se muestra la curva correspondiente a este metal. El Cd^{2+} afecta aún más las fases del crecimiento celular que el Pb^{2+} , aunque en los dos casos se conservan las fases del crecimiento celular. Se puede observar también que el crecimiento de las células expuestas a metal es menor (2.9×10^6 células/ml) en relación a las crecidas en el mismo medio pero de manera heterótrofa.

EFECTO RELATIVO DE LOS METALES SOBRE EL CRECIMIENTO.

La figura 6 representa las gráficas de porcentaje de crecimiento en los distintos medios de cultivo en relación con la concentración del metal utilizado, en ella podemos observar para cada metal que células resultaron más afectadas o fueron las más resistentes a las diferentes concentraciones de los metales utilizados. Para el caso del Cd^{2+} (fig 6A), las células que crecieron en el medio glutamato+malato presentan una mayor resistencia ($\text{IC}_{50}=250\mu\text{M}$ calculado a partir de la figura 6), que las crecidas en los medios láctico y peptona ($\text{IC}_{50}=10\mu\text{M}$). El efecto del Cd^{2+} se observó ya a concentraciones de $10\mu\text{M}$ con el cual se ve un 30, 40 y 60 % de inhibición por $10\mu\text{M}$ de Cd^{2+} para glutamato+malato, láctico y peptona respectivamente.

En el caso de Hg^{2+} (fig 6B), se observó que el crecimiento se ve afectado de manera similar en los tres medios de cultivo (IC_{50} aproximadamente de 40, 35 y $27\mu\text{M}$ para glutamato+malato, láctico y peptona respectivamente). El crecimiento celular en glutamato+malato y peptona es menos afectado (10 y 30% de inhibición respectivamente) que en láctico a bajas concentraciones ($10\mu\text{M}$). Al aumentar la

concentración de Hg^{2+} hasta 1 mM, las células crecidas en los medios de láctico y glutamato+malato adquieren un comportamiento similar, mientras que las células crecidas en medio peptona se ven ligeramente más afectadas.

En lo que respecta al crecimiento en presencia de concentraciones variables de Pb^{2+} (fig 6C), podemos observar que las células que crecieron en glutamato+malato se ven afectadas a un mínimo de 20% en su crecimiento aún a concentraciones de $500\mu\text{M}$. En medio láctico la población celular solo disminuye a un 30%, mientras que esta misma concentración del metal corresponde a la IC_{50} de las células que crecieron en peptona.

Así, se puede afirmar que para el crecimiento heterotrófico el medio glutamato+malato es el que confiere mayor resistencia a los diferentes metales pesados utilizados, el Hg^{2+} es el metal que afecta más el crecimiento de las células y que el Pb^{2+} parece tener poco efecto sobre el crecimiento de las poblaciones celulares.

Las curvas de porcentaje de crecimiento de las células autótrofas, en presencia de Cd^{2+} y Pb^{2+} se muestra en la figura 6 en donde podemos observar que las IC_{50} son 180 y $400\mu\text{M}$ respectivamente.

En cuanto al crecimiento heterótrofo y autótrofo de las células en el medio glutamato+malato se encuentra una diferencia significativa en cuanto al crecimiento tanto de las células no expuestas al metal como de las células crecidas en presencia de este. La tabla I muestra los porcentajes de inhibición de las células heterótrofas y autótrofas crecidas en el medio glutamato+malato a diferentes concentraciones de Cd^{2+} y Pb^{2+} . En esta tabla podemos observar que las células crecidas en presencia de luz son más sensibles a las distintas concentraciones de los metales utilizados. Así, por ejemplo, al comparar el crecimiento a la más baja concentración utilizada ($50\mu\text{M}$ Cd^{2+} ó $10\mu\text{M}$ de Pb^{2+}) se encuentra que las células heterótrofas son menos

sensibles que las autótrofas. El metal que inhibe más el crecimiento celular es el Hg^{2+} tanto en células autótrofas (100% de inhibición) como heterótrofas.

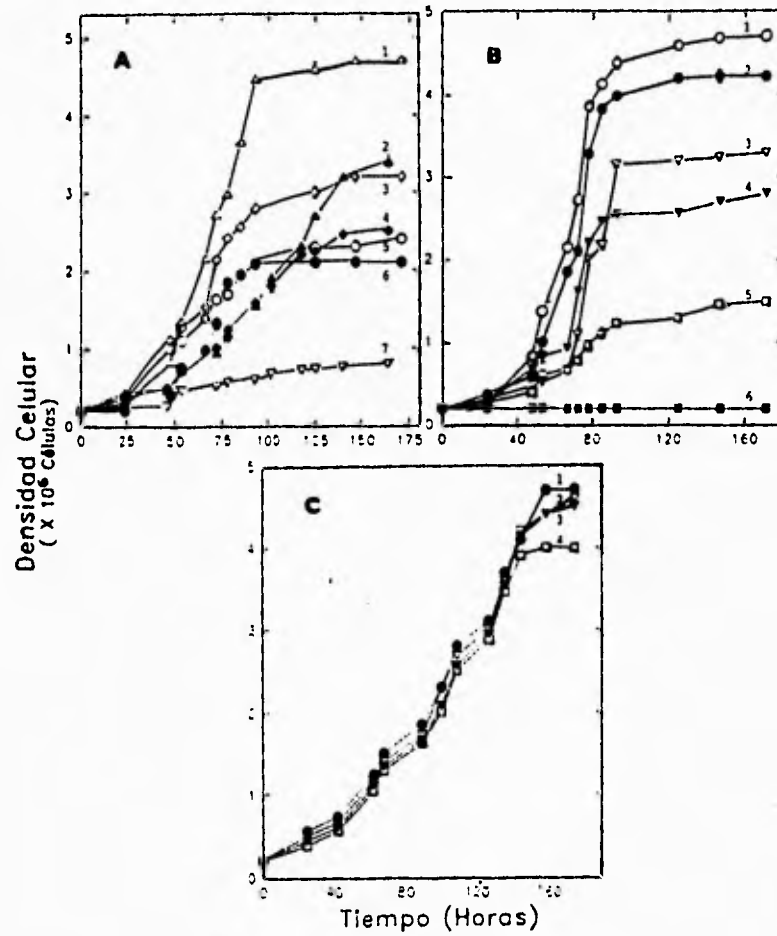


Figura 1: Curvas de crecimiento heterotrófico de células crecidas en el medio glutamato + malato en presencia de concentraciones variables de los metales pesados: Cadmio (A): 0.0µM(1); 10µM(2); 50µM(3); 100µM(4); 250µM(5); 500µM(6) y 1000µM(7)

Mercurio (B): 0.0µM(1); 1.5µM(2); 3.0µM(3); 30µM(4); 100µM(5); 1000µM(6)

Plomo (C): 0.0µM(1); 10µM(2); 100µM(3); 500µM(4)

Las figuras representan la $\bar{X} \pm D.E.$ de tres preparaciones por triplicado

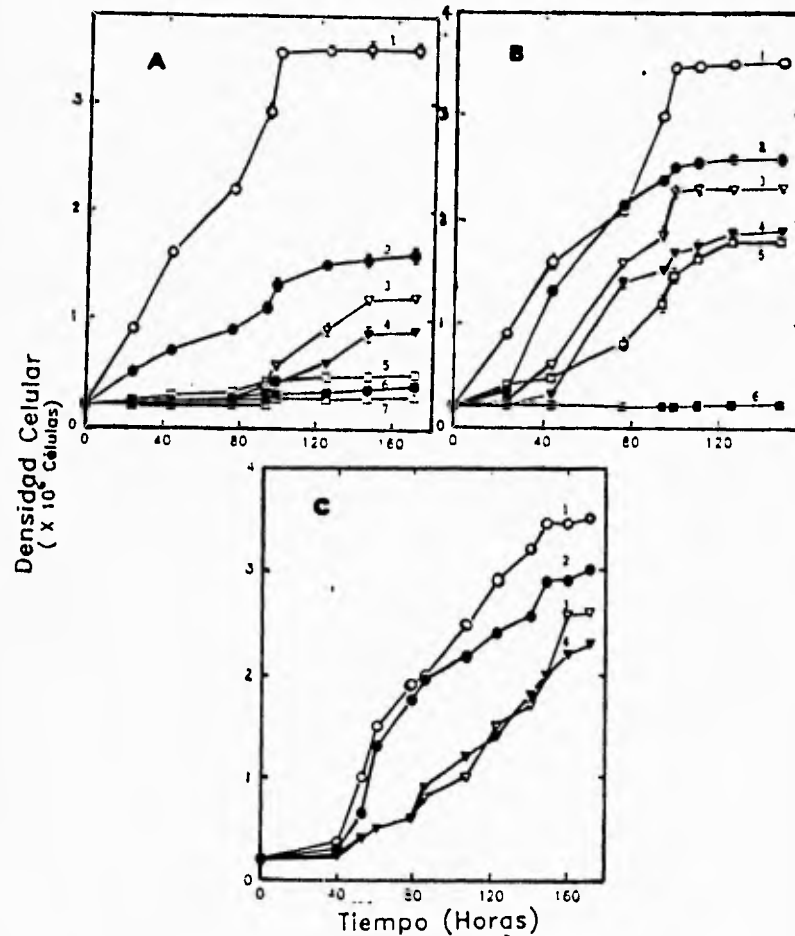


Figura 2: Curvas de crecimiento heterotrófico de células crecidas en el medio láctico en presencia de concentraciones variables de los metales pesados:

Cadmio (A): 0.0μM(1); 10μM(2); 50μM(3); 100μ(4); 250μM(5); 500μM(6) y 1000μM(7).

Mercurio (B): 0.0μM(1); 1.5μM(2); 3.0μM(3); 30μM(4); 100μM(5) y 1000μM(7).

Plomo (C): 0.0μM(1); 10μM(2); 100μM(3) y 500μM(4).

Las figuras representan la $X \pm D.E$ de tres preparaciones por triplicado

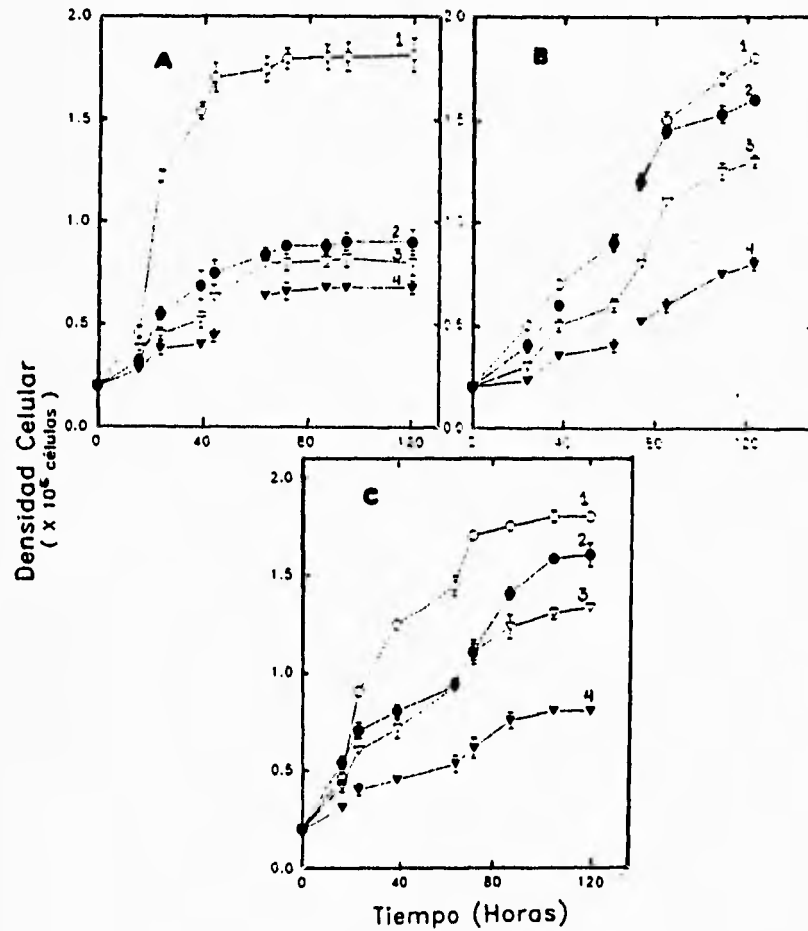


Figura 3: Curvas de crecimiento heterotrófico de células crecidas en el medio peptona en presencia de concentraciones variables de los metales pesados: Cadmio (A): 0.0 μM(1); 50 μM(2); 250 μM(3) y 500 μM(4). Mercurio (B): 0.0 μM(1); 1.5 μM(2); 3.0 μM(3) y 30 μM(4). Plomo (C): 0.0 μM(1); 10 μM(2); 100 μM(3) y 500 μM(4). Las figuras muestran la X±D.E de tres experimentos por triplicado.

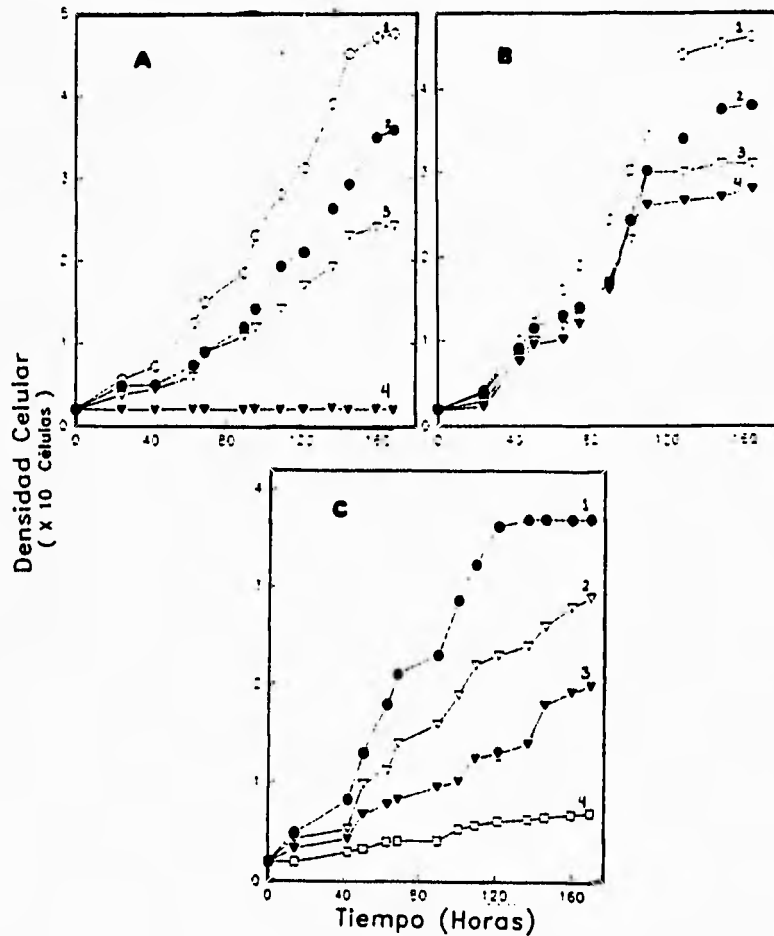


Figura 4: Curvas de crecimiento de células heterótrofas preexpuestas a $1.5\mu\text{M}$ de mercurio (por más de 15 generaciones) con las que se realizaron ensayos de tolerancia cruzada en las siguientes condiciones:

Medio glutamato+malato (A) en presencia de cadmio: $0.0\mu\text{M}$ (1); $10\mu\text{M}$ (2); $100\mu\text{M}$ (3) y $1000\mu\text{M}$ (4).

Medio glutamato+malato (B) en presencia de plomo: $0.0\mu\text{M}$ (1); $10\mu\text{M}$ (2); $100\mu\text{M}$ (3); y $500\mu\text{M}$ (4).

Medio Láctico (C) en presencia de cadmio: $0.0\mu\text{M}$ (1); $10\mu\text{M}$ (2); $100\mu\text{M}$ (3) y $1000\mu\text{M}$ (4).

Las figuras representan la $X\pm\text{D.E.}$ de tres preparaciones por triplicado.

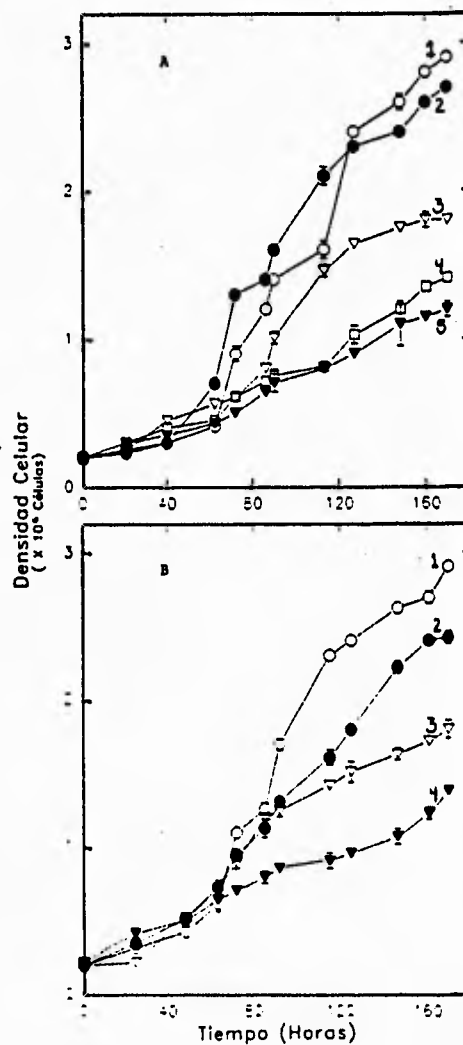


Figura 5: Curvas de crecimiento autotrófico de células crecidas en el medio glutamato+malato en presencia de los metales pesados:

Cadmio (A): 0.0μM(1); 5μM(2); 50μM(3); 250μM(4) y 500μM.

Plomo (B): 0.0μM(1); 10μM(2); 100μM(3) y 500μM(4).

Las células se sometieron a una intensidad de 22μM/m²s. Las figuras representan la X±D.E. de tres preparaciones por triplicado.

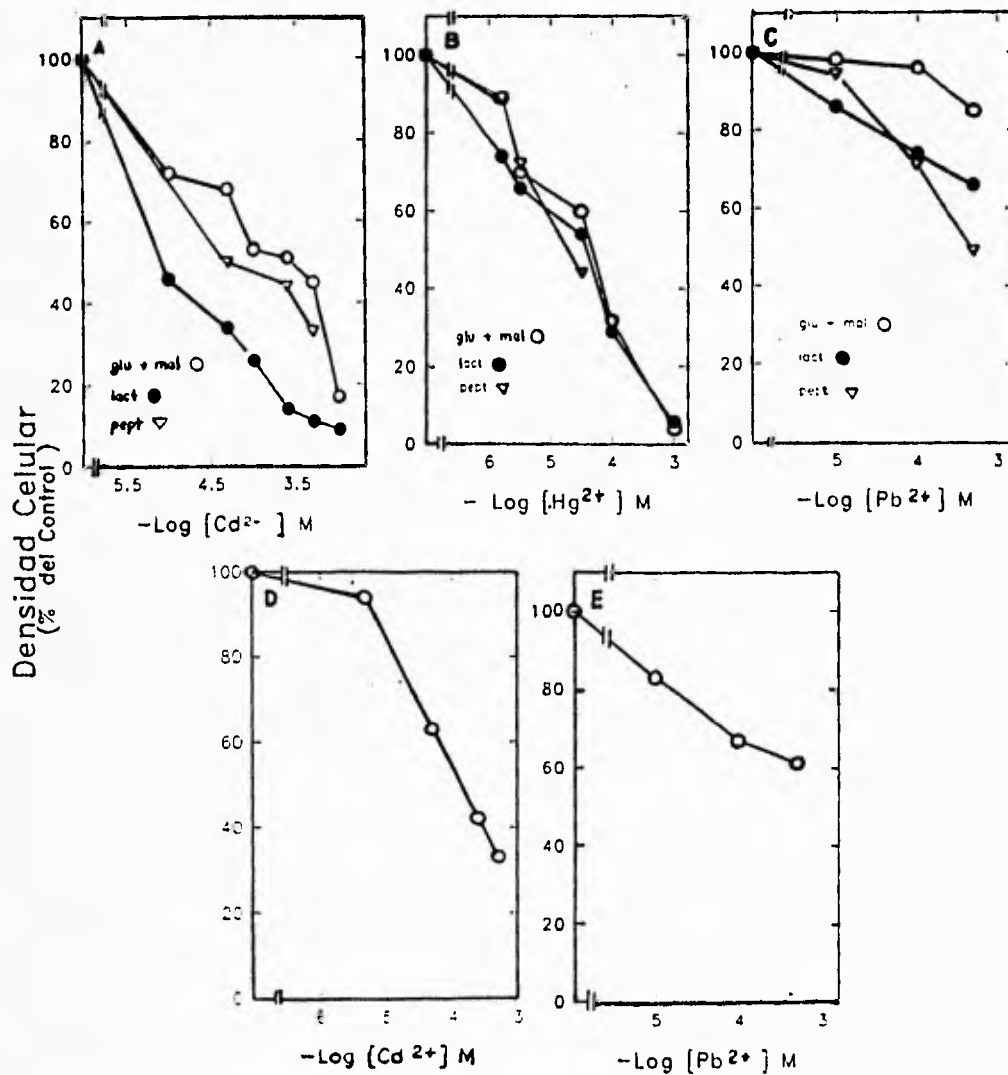


Figura 6: Muestra la disminución del crecimiento con respecto a las células no expuestas a metal pesado (heterótrofas) crecidas en los medios glutamato+malato, láctico y peptona en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} (A), Hg^{2+} (B) y Pb^{2+} (C). Las gráficas muestran la densidad celular en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día). D y E representan la disminución del crecimiento de células autótrofas crecidas en el medio glutamato+malato en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} y Pb^{2+} . La intensidad de la luz fue de $22\mu M/m^2s$. Las graficas representan la $X \pm D.E.$ de tres preparaciones por triplicado.

Tabla 1: Porcentajes de inhibición de células crecidas en el medio glutamato+malato ($\times 10^6$) en ausencia y presencia de luz y a diferentes concentraciones de metales pesados. Las células fueron cosechadas en la fase estacionaria (quinto día). Los datos representan la $X \pm D.E.$ de 9 cultivos diferentes sembrados en tres ocasiones diferentes en grupos de tres.

Células crecidas heterotróficamente.			Células crecidas autotróficamente.		
	% de inh.	No de células		% de inh.	No de células
0.0		4.7 \pm 0.03	0.0		2.9 \pm 0.06
Cd^{2+}			Cd^{2+}		
50.0	32.0	3.2 \pm 0.05	50.0	45.0	1.0 \pm 0.05
250.0	49.0	2.4 \pm 0.05	250.0	59.0	1.2 \pm 0.05
500.0	55.0	2.1 \pm 0.03	500.0	83.0	0.5 \pm 0.06
Pb^{2+}			Pb^{2+}		
10.0	2.0	4.6 \pm 0.02	10.0	14.0	2.5 \pm 0.05
100.0	4.0	4.5 \pm 0.02	100.0	41.0	17 \pm 0.04
500.0	15.0	4.0 \pm 0.02	500.0	55.0	1.3 \pm 0.07
Hg^{2+}			Hg^{2+}		
30.0	40.0	2.8 \pm 0.02	30.0	100.0	0.2 \pm 0.01
100.0	68.0	1.5 \pm 0.04	50.0	100.0	0.2 \pm 0.01
1000.0	100.0	0.2 \pm 0.01	100.0	100.0	0.2 \pm 0.01

RESPIRACION Y FOTOFOSFORILACION.

La respiración endógena se midió tanto en el medio glutamato+malato como en láctico en presencia de los metales Cd^{2+} y Pb^{2+} . Esta resultó más afectada con Cd^{2+} en las células crecidas en el medio glutamato+malato que en las de láctico, al igual que sucede con la estimulación por el donador de electrones artificial TMPD (0.6 mM) [61], en donde se puede observar una estimulación de la respiración hasta de un 292% en el caso de la exposición a 1 mM del metal a comparación con el 196% de estimulación en el medio glutamato+malato como se puede observar en la tabla 2A; de esta tabla también se puede observar que la respiración endógena es más inhibida en el medio glutamato+malato 83% por 1mM de Cd^{2+} comparando con el 59% obtenido en el caso de las crecidas en el medio láctico. Con Pb^{2+} la respiración no se ve significativamente afectada en ninguno de los dos medios, lo cual podría deberse a que las mitocondrias de estas células se encuentran desacopladas ya que presentan una estimulación en la respiración. En el caso del mercurio, al medir la respiración de las células sometidas a concentraciones mayores a $10\mu M$, pudimos observar que esta se encuentra 100% inhibida en todos los casos, por lo cual se sembraron en presencia de concentraciones menores solo en el medio glutamato+malato, encontrando que este metal también ejerce una acción desacoplante por lo cual los valores de respiración obtenidos se encuentran elevados y la estimulación por TMPD es alta.

Cuando se ensayaron las respiraciones en las células preexpuestas a $Hg^{2+} 1.5 \mu M$ (tolerancia cruzada) (Tabla 2B), se pudo observar que la respiración tanto endógena como estimulada por TMPD no se afectaba en comparación con la respiración obtenida en las células no preexpuestas, esto se puede observar al volver a comparar la respiración obtenida en presencia de 1mM de metal en ambos casos. En el caso de las células crecidas en el medio láctico, este fenómeno no se presenta debido quizá a que en este medio no se induce la protección a los metales. Al

realizar estos estudios en el presencia de Pb^{2+} observamos que aunque la respiración se recupera an ambos medios, las células presentan probablemente sus mitocondrias desacopladas ya que los valores de respiración son mayores a los de las células control. Estos datos se muestran en la tabla 2B. Los resultados indican que la preadaptación a un metal induce de alguna manera un mecanismo por medio del cual las células se vuelven más tolerantes a los efectos causados por la exposición subsecuente a los metales pesados, lo cual tiene como consecuencia un incremento en la actividad basal y la estimulada por TMPD.

Tabla 2A: Respiración endógena, porcentaje de inhibición y estimulación de la respiración en células heterótrofas crecidas en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} y Pb^{2+} en los medios glutamato+malato y láctico. Las células se recolectaron en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día). Los valores representan la $x \pm E:S$ del número de experimentos que se muestran entre paréntesis.

Glut+Mal	Respiración			
$\text{Pb}^{2+}(\mu\text{M})$	ngat $\text{O}/10^7$ cel.min	%inh.	+TMPD	%Est.
0.0	216±17(4)		556±42(3)	257
10.0	188(2)	13.0	533(2)	283
100.0	190±17(3)	12.0	413±9(3)	217
500.0	283±34(6)	0.0	598±82(5)	211
$\text{Cd}^{2+}(\mu\text{M})$				
0.0	150±40(5)		295±59(5)	195
10.0	110(2)	27.0	254(2)	231
50.0	79±10(4)	47.0	156(2)	197
100.0	48(2)	68.0	63(2)	131
250.0	67±19(3)	55.0	96(2)	143
500.0	33±5(5)	78.0	60±16(5)	182
1mM	26±5(4)	83	51(2)	196
$\text{Hg}^{2+}(\mu\text{M})$				
0.0	155±37(3)		449±102(3)	289
1.0	256±13(5)	0.0	679±32(5)	265
3.0	293±25(5)	0.0	753±51(5)	257
5.0	247±11(3)	0.0	698±37(3)	282
Láctico				
$\text{Pb}^{2+}(\mu\text{M})$				
0.0	188±10(8)		485±47(7)	258
10.0	191±16(7)	0.0	456±21(6)	238
100.0	250±20(8)	0.0	561±161(4)	224
500.0	241±23(4)	0.0	686(2)	284
$\text{Cd}^{2+}(\mu\text{M})$				
0.0	210±6(5)		526±56(4)	250
10.0	165±5(5)	21.0	481±14(3)	291
100.0	162±15(9)	23.0	402±49(3)	248
1000.0	86±11(4)	59.0	251±15(3)	292

Tabla 2B: Respiración endógena, porcentaje de inhibición y estimulación de la respiración en células preexpuestas a $Hg^{2+}1.5\mu M$ (por más de 15 generaciones) y posteriormente crecidas en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} y Pb^{2+} en los medios de glutamato+malato y láctico. Las células se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día). Los datos representan la $X\pm D.E.$ del número de experimentos que se muestran entre paréntesis

Glut+Mal				
$Pb^{2+}(\mu M)$	Respiración	% inh	+ TMPD	% Est.
0.0	202±5(3)		441(2)	218
10.0	223(2)	0.0	565	253
100.0	194(2)	4.0	509	262
500.0	237(2)	0.0	750	316
$Cd^{2+}(\mu M)$				
0.0	168±31(7)		420±29(6)	250
10.0	237±8(6)	0.0	609±86(6)	291
100.0	208±36(5)	0.0	398±73(3)	191
250.0	205±27(3)	0.0	455±29(3)	222
500.0	56±18(6)	67.0	136±47(6)	242
1.0mM	60±14(6)	64.0	198±54(5)	330
Láctico				
$Pb^{2+}(\mu M)$				
0.0	84±7(3)		284±21(3)	328
10.0	106±32(3)	0.0	360±21(3)	339
100.0	117±22(3)	0.0	394±98(3)	336
500.0	101±22(3)	0.0	299±19	296
$Cd^{2+}(\mu M)$				
0.0	121±15(4)		326±33(4)	269
10.0	174±23(4)	0.0	517±66(4)	297
100.0	154±42(4)	0.0	340±81(4)	223
250.0	68±12(3)	44.0	206±30(3)	303

En el caso de las células crecidas autotróficamente se mide tanto el consumo como la producción de oxígeno (fotofosforilación) en las células, debido a la existencia tanto de mitocondrias como de cloroplastos. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 3 y nos indican que ambos parámetros disminuyeron en presencia de concentraciones crecientes de Cd^{2+} , afectando un 30 y 45% la primera respiración y la producción de oxígeno respectivamente en el caso de 500 μM de metal. De esta tabla también podemos observar que el Pb^{2+} no afecta los parámetros medidos, manteniéndolos relativamente iguales hasta en la concentración más elevada (500 μM).

Las células crecidas en presencia de concentraciones mayores a 10 μM de Hg^{2+} , estas pierden la capacidad tanto de consumir como de producir oxígeno. Este fenómeno se observa en las tres concentraciones de metal utilizadas (10, 20, y 30 μM). Se observó que al exponer a las células a la obscuridad, estas no son capaces de consumir oxígeno y cuando se les somete a un estímulo de luz no hay producción de oxígeno sino su consumo, lo cual puede traducirse como un fenómeno de fotorespiración. La figura 7 muestra un trazo representativo, tanto de células no expuestas al metal como en las células tratadas con la concentración más baja de dicho elemento. En la figura 7D se observa la inhibición de la fotorespiración al apagar la luz.

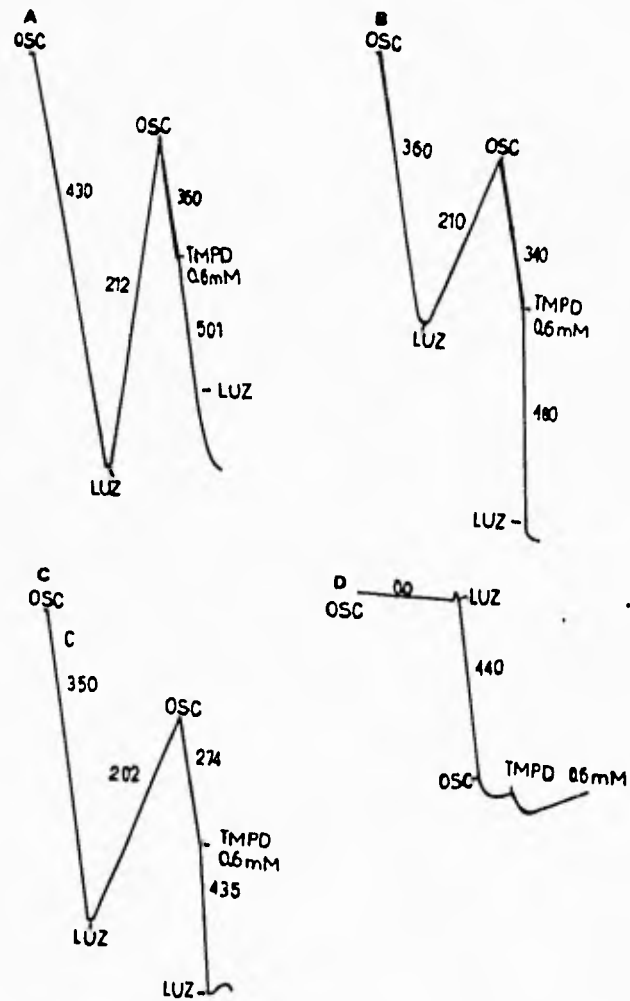


Figura 7: Efecto de los metales pesados sobre la capacidad de fotosforilar en células autótrofas crecidas en el medio glutamato+malato al someterlas a un estímulo de luz actínica ($1350 \mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$). En ausencia de luz se midió la capacidad de consumir oxígeno. Las concentraciones utilizadas fueron: A) 0.0 , B) $10 \mu\text{M Pb}^{2+}$, C) $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ y D) $10 \mu\text{M Hg}^{2+}$. La medición se realizó en células recolectadas en la fase estacionaria de crecimiento.

Tabla 3: Efecto de los metales pesados en el consumo y la producción de oxígeno en células crecidas autotróficamente en el medio glutamato+malato. Se muestra también el % de estimulación del TMPD sobre el consumo O_2 en cada caso. Las células se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento y la medición se realizó en ng átomo de $O/10^7$ células. min, del número de experimentos que se muestran entre paréntesis.

$Cd^{2+}(\mu M)$	Respiración	Fotofosf.	Respiración	+ TMPD	% Est.
0.0	385±29 (24)	276±34 (24)	322±34 (22)	570±61 (15)	177
50.0	319±53 (5)	187±18 (5)	233±32 (5)	544±129(3)	233
250.0	281±26 (5)	107±18 (5)	172±32 (5)	490±66 (3)	285
500.0	264±35 (5)	150±8 (5)	200±50 (4)	367±33 (3)	183
$Pb^{2+}(\mu M)$					
10.0	317±25 (6)	138±17 (6)	315±24 (6)	642±70 (3)	204
100.0	347±32 (6)	141±18 (6)	311±17 (6)	644±110(3)	207
500.0	313±44 (6)	122±11 (6)	282±44 (6)	649±108(3)	230
$Hg^{2+}(\mu M)$	Respiración	Fotorresp.			
10.0	29±7 (14)	437±24 (12)			
20.0	19±7 (9)	228±24 (11)			
30.0	9±3 (8)	436±102(8)			

SINTESIS DE PIGMENTOS

Las células de Euglena poseen la capacidad de sintetizar pigmentos (carotenoides y clorofila). Se ha observado al realizar los experimentos que estos procesos son inhibidos dependiendo del metal y de la concentración utilizada del mismo, lo cual se traduce en el blanqueamiento de las células con la consecuente desaparición tanto de los picos de absorbancia de los carotenoides (en células heterótrofas) como la síntesis de clorofila (en células autótrofas).

CAROTENOIDES.

Se midió la existencia de carotenoides en las células crecidas en los medios glutamato+malato y láctico mediante un barrido espectrofotométrico de 400 a 500 nm. En las células no expuestas al metal se presentan tres picos de absorbancia a 409, 433 y 465 nm y un pico poco pronunciado alrededor de 490 en ambos medios de cultivo. Esto se muestra en la figura 8, en donde también podemos observar el efecto de las distintas concentraciones de Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} sobre las células crecidas en el medio glutamato+malato. Al realizar los espectros se pudo observar que a las concentraciones de 250 y 500 μM de Cd^{2+} se pierde un pico en el espectro en las células crecidas en los dos medios de cultivo. En el caso de las células crecidas en presencia de Pb^{2+} se encontró que a las tres concentraciones utilizadas (10, 100 y 500 μM) se observan los tres picos principales de absorbancia en las células crecidas en ambos medios de cultivo. El Hg^{2+} causa la eliminación de los picos aún a la concentración menor utilizada (30 μM).

En cuanto a los ensayos de Tolerancia cruzada, se conservan los picos de absorbancia cuando las células preexpuestas con Hg^{2+} 1.5 μM se someten a concentraciones variables de Cd^{2+} y Pb^{2+} en el medio glutamato+malato y Cd^{2+} en el medio láctico. Como se puede observar en la figura 9, donde se muestran los trazos obtenidos en el caso de las células crecidas en el medio glutamato+malato a concentraciones de 50, 250 y 500 μM de Cd^{2+} las cuales recuperan la capacidad de

sintetizar el pigmento por lo cual los picos de absorvancia se vuelven a expresar. Así, se puede afirmar que el pretratamiento por varias generaciones ayudó a la célula a recuperar su capacidad de sintetizar el pigmento mediante el desarrollo de algún mecanismo de tolerancia adquirido.

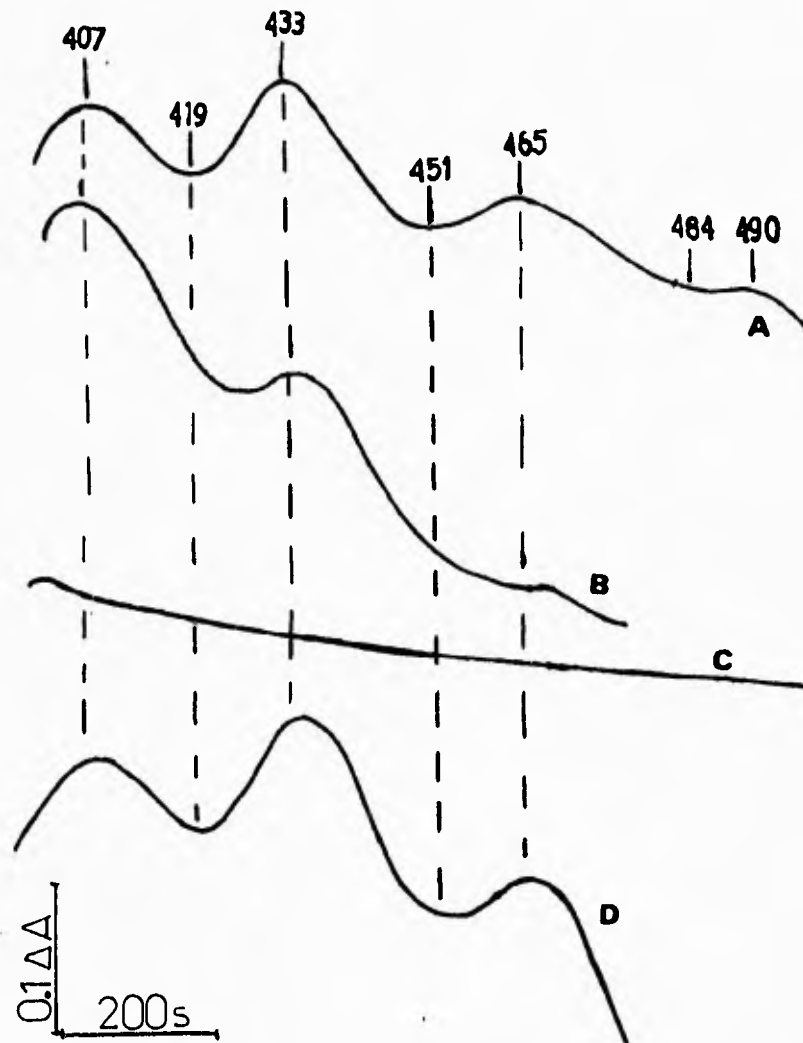


Figura 8: Se muestra un ejemplo del efecto de los metales pesados sobre la síntesis de los carotenos en células heterótrofas sensibles puestas a A) ningún metal, B) $Cd^{2+} 500\mu M$, C) $Hg^{2+} 100\mu M$ y D) $Pb^{2+} 500\mu M$. Las células se crecieron en el medio glutamato+malato y fueron recolectadas en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día). La medición se realizó como se describe en materiales y métodos.

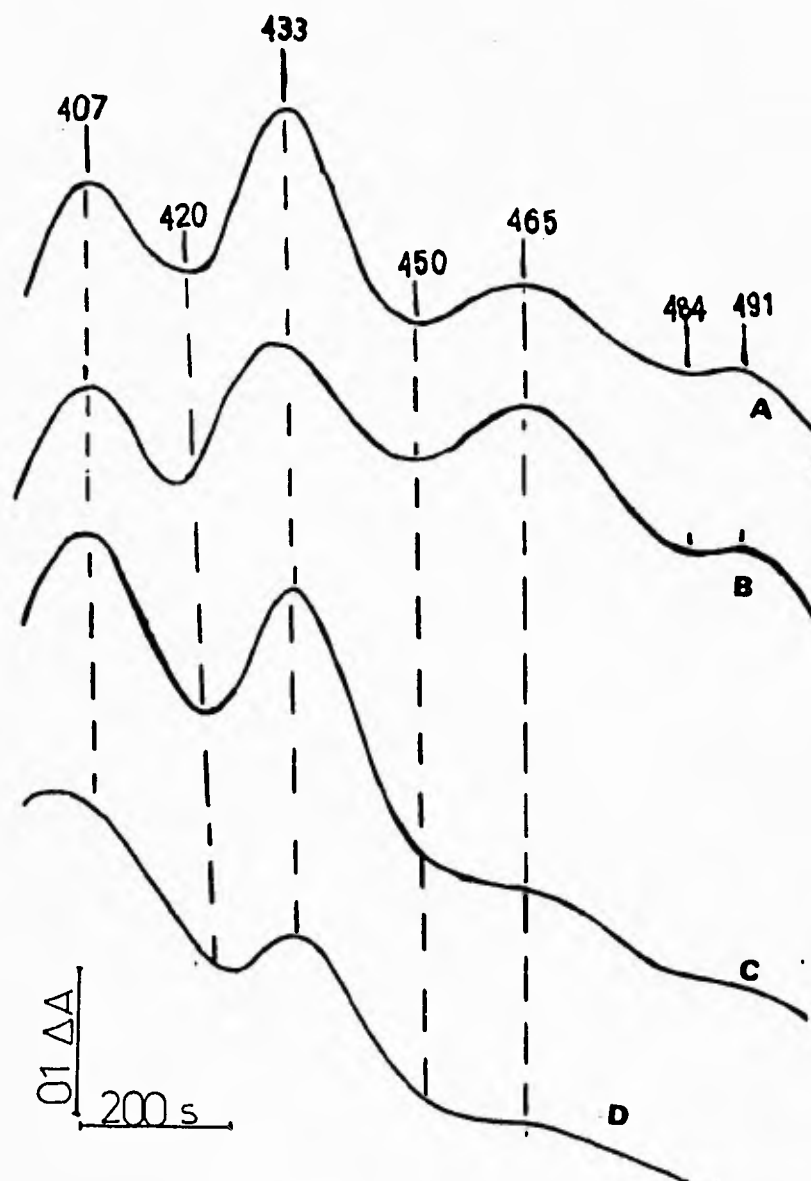


Figura 9: Se muestra un trazo que ejemplifica la presencia de los picos de absorción de carotenos en células preexpuestas a $\text{Hg}^{2+} 1.5 \mu\text{M}$ crecidas en el medio glutamato+malato en presencia de A) 0.0, B) 50, C) 250 y D) 500 μM de Cd^{2+} . La medición se realiza como se describe en materiales y métodos

CLOROFILA.

Se midió el efecto de los metales sobre la capacidad de sintetizar clorofila en las células crecidas de manera autótrofa en el medio glutamato+malato. En el caso del Hg^{2+} aún a bajas concentraciones ($10\mu\text{M}$) existe una inhibición de 77% a comparación del 0.0% de inhibición encontrados tanto para Cd^{2+} ($50\mu\text{M}$) y Pb^{2+} ($10\mu\text{M}$) respectivamente, en donde se observa estimulación en la síntesis de este pigmento a cualquiera de las concentraciones utilizadas. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Se muestra la determinación de clorofila en células crecidas autotróficamente en el medio glutamato+malato en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . Las células se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento (10^7 células). Los datos muestran la $X \pm E.S$ de el número de experimentos que se muestran entre paréntesis. La medición se realizó en μg clorofila/ 10^7 células.

Cd^{2+} (μM)	
0.0	62 ± 6 (5)
50.0	71 ± 26 (5)
250.0	72 ± 13 (4)
500.0	110 ± 18 (5)
Pb^{2+} (μM)	
0.0	52 ± 10 (6)
10.0	80 ± 19 (6)
100.0	73 ± 6 (5)
500.0	74 ± 10 (5)
Hg^{2+} (μM)	
0.0	58 ± 14 (3)
10.0	13.5 ± 6 (3)
100.0	18 ± 11 (3)

CAPTACION DE METALES PESADOS

Se midió la capacidad de captar los metales pesados Cd^{2+} y Pb^{2+} tanto en células heterótrofas como autótrofas.

Se encontró una acumulación incrementada de Cd^{2+} y Pb^{2+} en las células heterótrofas cuando se les creció a concentraciones crecientes de estos metales. Esto se muestra en la figura 10. La capacidad para captar y almacenar metales en células preexpuestas a Hg^{2+} $1.5 \mu\text{M}$ por varias generaciones, y posteriormente cultivadas en presencia de Cd^{2+} o Pb^{2+} se eleva en el medio lactato, aunque esto no sucede en el medio glutamato+malato. Se puede ver que en células crecidas en presencia de $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , la cantidad de Cd^{2+} acumulado fue de $3.3 \mu\text{g}$ (29.6 nmol)/ 10^7 células, mientras que en las células preexpuestas a Hg^{2+} la cantidad de metal captado fue de $13.3 \mu\text{g}$ (119 nmol) $\text{Cd}^{2+}/10^7$ células (figura 10B). Al comparar las células heterótrofas con las autótrofas (figura 10C), encontramos que estas últimas poseen la capacidad de captar más metal que las primeras, así, al comparar de nuevo con $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , vemos que son capaces de captar $31.1 \mu\text{g}$ (227 nmol)/ 10^7 células.

La cantidad de Pb^{2+} acumulada en las células heterótrofas fue de 24 ± 13 (3) y 43 ± 18 (3) $\mu\text{g}/10^7$ células para 100 y 500 μM de Pb^{2+} en el medio glutamato+malato, respectivamente y 8.4 ± 3 (3), 16.5 ± 6 (3) y 43 ± 19 (3) para 10, 100 y 500 μM de Pb^{2+} en el medio lactato. En dos experimentos con células preexpuestas a Hg^{2+} crecidas en el medio de lactato, 77 y 201 μg $\text{Pb}^{2+}/10^7$ células fue captado en células crecidas en presencia de 10 y 100 μM de Pb^{2+} respectivamente.

Falchuk, et al, en 1975 [48] reporta la captación de 0.5 nmol $\text{Cd}^{2+}/10^7$ células en presencia de 10 μM de Cd^{2+} y 10 μM de Zn^{2+} en el medio de cultivo, la eliminación del Zn^{2+} del medio de cultivo induce la elevación de la captación del

metal hasta $89 \text{ nmol}/10^7$ células. En contraste, Albergoni et al (1980) [65], reportaron que en ciclos de 12 hr luz/oscuridad *Euglena* es capaz de captar $0.5 \mu\text{M}$ de $\text{Cd}^{2+}/10^7$ células cuando se crece por seis días en presencia de $89 \mu\text{M}$ de CdCl_2 .

Estos resultados se pueden comparar con los que hemos obtenido en el laboratorio observando que en nuestro caso, la capacidad de acumular el metal aumenta .

Como una mediada de control, las células se lavan con un medio de alta fuerza iónica y EGTA, con lo cual podemos disminuir la fijación inespecífica del metal y por lo cual podemos decir que el metal medido es solamente el que se encuentra dentro de la célula.

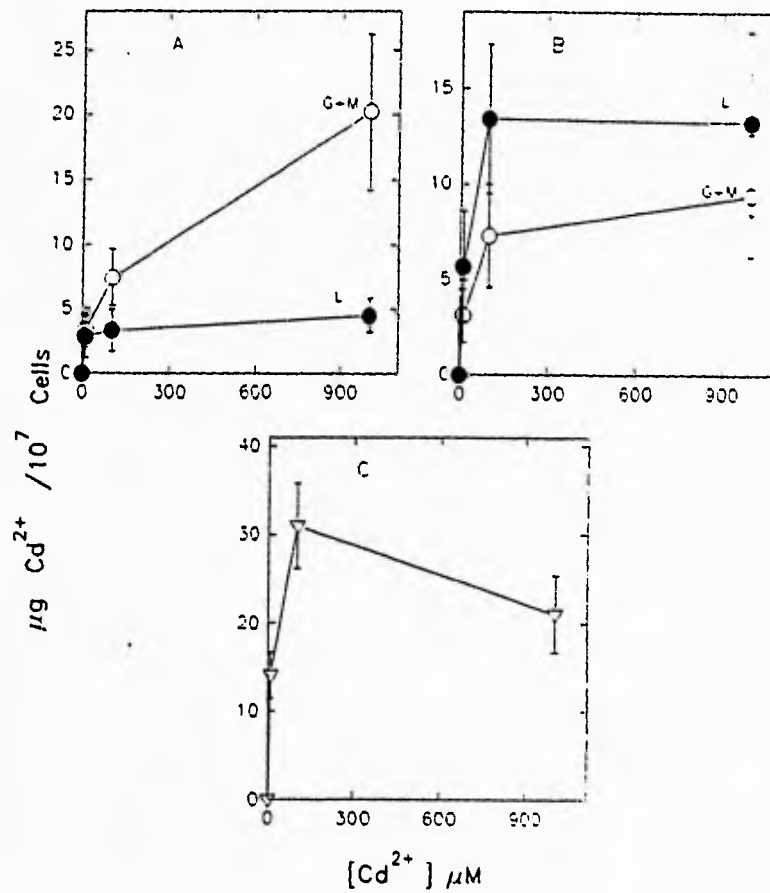


Fig10: Muestra la captación de metales pesados en células crecidas en las siguientes condiciones: A) heterótrofas crecidas en los medios glutamato+malato y láctico en presencia de Cd^{2+} . B) heterótrofas crecidas ensayando tolerancias cruzada en los medios glutamato+malato y láctico en presencia de concentraciones variables de Cd^{2+} y C) autótrofas en presencia de Cd^{2+} crecidas en el medio glutamato+malato. Las células se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento (quinto día) y la determinación se realizó como se describe en materiales y métodos.

FALLA DE ORIGEN

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se tomaron micrografías electrónicas de barrido y de transmisión de las células autótrofas y heterótrofas crecidas en el medio glutamato+malato a diferentes concentraciones de metales pesados. En condiciones normales, las células de Euglena presentan una estructura alargada, poseen flagelo y están cubiertas por una película (lo cual se puede observar en micrografías electrónicas de barrido). Esta estructura general cambia en la fase estacionaria, en donde adquieren una forma circular y generalmente pierden el flagelo, motivo por el cual la movilidad disminuye, a estas estructuras se les conoce como quistes y constituyen una manera de autoprotección cuando se encuentran en condiciones limitadas de alimento. En esta fase también se pueden encontrar células con morfología alargada normal con o sin flagelo (figuras 11A, 11B y 12A, 12B). Dependiendo del metal y la concentración a la cual sea expuesta la célula los cambios que sufre pueden variar. Se comprobó por medio de ambos tipos de micrografías que el metal que menos daña la integridad celular aún a la concentración más elevada (500 μM) es el Pb^{2+} tanto en células heterótrofas como autótrofas, ya que la estructura de la película se conserva al igual que los organelos internos. Se puede ver que a esta concentración los tilacoides de algunos cloroplastos se ven separados, pero el resto de los componentes se encuentran intactos (no mostrado). En el caso del Cd^{2+} (figura 11C y 11D) se puede observar que a las tres concentraciones utilizadas (50, 250 y 500 μM) en ambos tipos de células, se encuentran daños progresivos a manera que aumenta la concentración, observándose deformación de la estructura normal, aumento en el volumen celular, agrietamiento de la película y finalmente rompimiento de las células. En estas células, como se ha observado en los resultados anteriores, las funciones celulares (respiración, fotofosforilación, captación de metales y síntesis de pigmentos) se conservan, lo cual se puede explicar por el hecho de que a cualquiera de las concentraciones utilizadas todavía se pueden encontrar células no afectadas por el

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

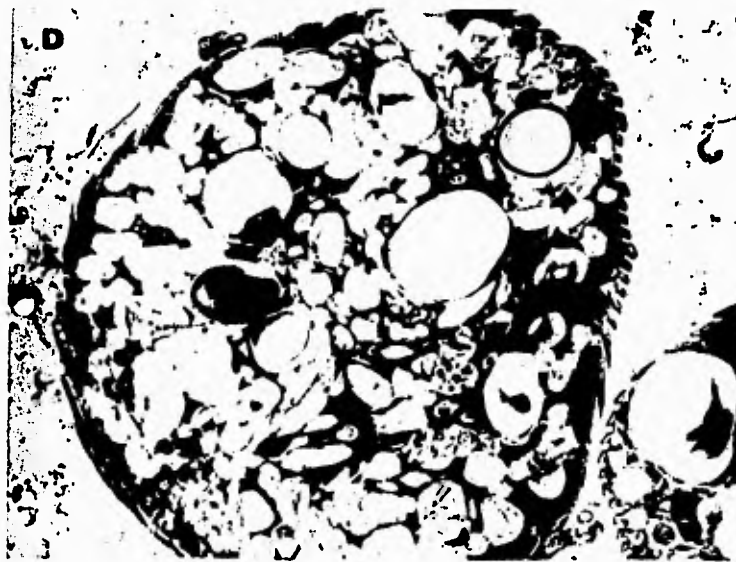
metal, las cuales conservan intactos sus organelos. En el caso del Hg^{2+} (figuras 12C y 12D) las células pierden su estructura general a cualquiera de las concentraciones utilizadas y a diferencia del metal anterior, no se encuentran células con morfología normal, y todas presentan una estructura redonda en la cual se pueden observar grietas en la película y rompimiento celular generalizado, por lo cual se puede explicar que en estas condiciones de crecimiento las funciones celulares desaparezcan. Por medio de las micrografías de transmisión se puede comprobar que las células pierden sus componentes y se pueden encontrar restos tanto de mitocondrias como de cloroplastos o células en las que se ve sólo el resto de la película y el núcleo. Con los resultados obtenidos podemos afirmar que los blancos de acción de los metales son los cloroplastos, las mitocondrias y la película celular.

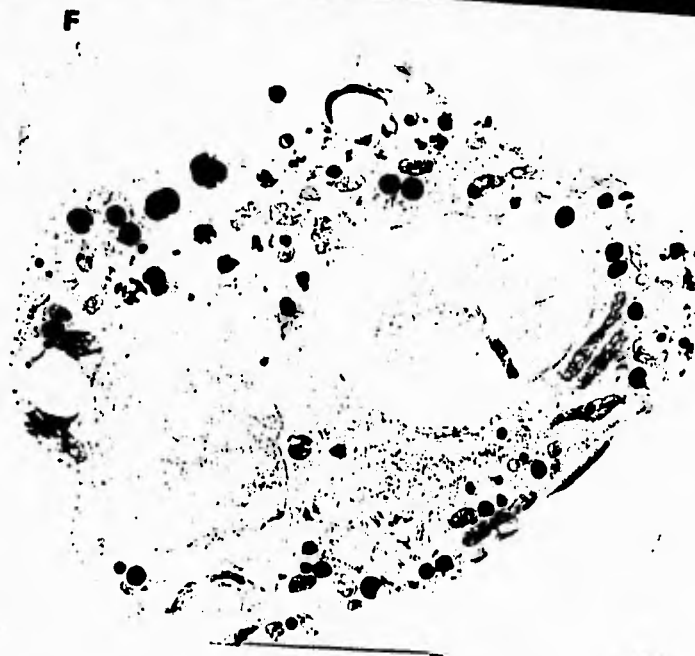
En las células preexpuestas a $\text{Hg}^{2+} 1.5\mu\text{M}$ (figuras 11E y 11F) se recupera la estructura normal y la movilidad flagelar además de la integridad de los componentes celulares y de la película. además de que son capaces de llevar a cabo sus funciones biológicas normalmente. Estas células se utilizaron para llevar a cabo ensayos de Tolerancia cruzada sometiéndolas a 10, 100 y 1000 μM de Cd^{2+} y como se puede observar en estas micrografías, la estructura intracelular se conserva.

Se cuenta con otras dos cepas de células preexpuestas con Cd^{2+} 250 μM y 50 μM por varias generaciones. Se observa que la estructura general se pierde adoptando una estructura redonda y pérdida del flagelo. A pesar de ello y al igual que las células preexpuestas a $\text{Hg}^{2+} 1.5\mu\text{M}$, las mitocondrias aisladas a partir de ambos tipos de células poseen sus funciones metabólicas recuperadas como se explica en el apéndice 3.



Figura 11: Se muestran las micrografías electrónicas de barrido y de transmisión de cón de células heterótrofas no expuestas a ningún metal pesado (A,B), células expuestas a $\text{Cd}^{2+} 250 \mu\text{M}$ (C,D) y células preexpuestas a $\text{Hg}^{2+} 1.5 \mu\text{M}$ por varias generaciones y expuestas a $\text{Cd}^{2+} 1000 \mu\text{M}$ (E,F).





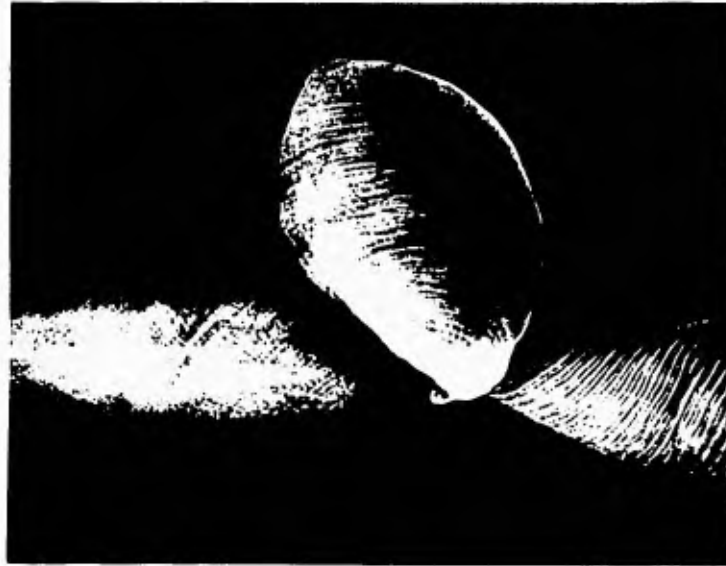


Figura 12: Se muestran las micrografías electrónicas de barrido y de transmisión de células autótrofas crecidas en ausencia de metal pesado (A,B) y en presencia de $\text{Hg}^{2+} 1.5\mu\text{M}$ (C,D).



DISCUSION

Podemos ver que la respuesta de Euglena gracilis hacia la acción de los metales pesados depende de la naturaleza y la concentración utilizada de estos, como ya se ha reportado por varios autores, [46,64,65] causando efecto sobre la movilidad, estructura, [48,50] crecimiento y el metabolismo celular [49,51,67]. Estos parámetros también fueron medidos en el presente trabajo, por lo cual se puede afirmar que el metal que más daño causó fué el Hg^{2+} tanto en células crecidas de manera heterótrofa en cualquiera de los medios de cultivo utilizados, como en el caso de las células crecidas de manera autótrofa. En ambos casos se encontró que las células pierden su movilidad y estructura general como se observa en las micrografías electrónicas tanto de barrido como de transmisión. También se afecta el crecimiento celular, observándose en algunos casos el mismo número de células al inicio y al final del crecimiento. La capacidad de respirar y fotofosforilar es perdida completamente aún a las concentraciones más bajas utilizadas ($10\mu\text{M}$) por el gran daño causado tanto en mitocondrias como en cloroplastos, razón por la cual las células son incapaces de sintetizar pigmentos (carotenos y clorofila respectivamente). La toxicidad de este elemento puede ser explicada por sus características como son la capacidad de formar compuestos que son capaces de atravesar las membranas y que son derivados de formas como HgCl_2 (que además también posee la capacidad de atravesar las membranas), HgCl_3^- y HgCl_4^- [13]. De los tres elementos estudiados, el Hg^{2+} es el que posee mayor afinidad por los grupos $-\text{SH}$ de proteínas, además de poseer la capacidad de formar radicales libres, los cuales resultan tóxicos para la célula, además de que es capaz de colapsar los gradientes iónicos y de pH a través de las membranas biológicas, como ya se ha reportado en algunos trabajos [7,8]. Se ha crecido a las células autótrofas en concentraciones más bajas de Hg^{2+} ($1,3$ y $5\mu\text{M}$) y se ha observado que tienen la capacidad de crecer y de sintetizar clorofila, por lo cual podemos decir que si son

capaces de resistir la acción de este metal pero a bajas concentraciones. Además se podrían preexponer células a Hg^{2+} por varias generaciones utilizando alguna de las concentraciones señaladas y obtener cepas que recuperen sus funciones metabólicas como se realizó en el caso de las células heterótrofas preexpuestas a $1.5\mu\text{M}$ de Hg^{2+} .

En cuanto a los otros dos metales estudiados, su efecto tanto en el crecimiento como en las funciones celulares depende de la concentración utilizada, siendo el Pb^{2+} el que afecta menos estos parámetros, lo cual podría explicarse por el hecho de que este elemento afecta principalmente la síntesis del grupo Hemo y prácticamente todas las funciones relacionadas con su síntesis [2], aunque también se ha reportado su acción sobre grupos -SH formando mercaptidos [24], al igual que la inhibición en funciones como la fotosíntesis y el transporte de electrones mitocondrial [24] a concentraciones de 0.1 a 1 mM. Las concentraciones que nosotros utilizamos fueron 10, 100 y 500 μM y pudimos observar que las células de *Euglena* fueron capaces de crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas y la inhibición que causó en estos fenómenos fue menor comparada con los otros dos metales. A concentración de 500 μM se pudo observar un efecto en la estructura de los cloroplastos, en los cuales se produce la separación de los tilacoides pero los demás organelos celulares se encuentran intactos al igual que la película, además de que las células no pierden su movilidad a comparación de otras especies estudiadas como el alga *Chlorella vulgaris* [2]. El Cd^{2+} es el elemento intermedio, ya que causa daño dependiendo de la concentración utilizada, este elemento se ha estudiado ya por otros autores en *Euglena* [46,47,48,49,50]. Estos autores han hecho estudios de crecimiento celular, en los cuales han utilizado diferentes concentraciones y al igual que los datos que hemos encontrado, este proceso se afecta de manera inversa a la concentración; la acumulación del metal también ha sido medida pero no se han dado valores de captación, sólo se afirma que la acumulación es mayor en el caso de las células

sensibles, esto se debe de comparar con una cepa que haya sido expuesta por varias generaciones a Cd^{2+} , cosa que falta por realizarse. Además se afirma que una cepa resistente a Cd^{2+} es capaz de soportar concentraciones elevadas de otros elementos, Este fenómeno lo hemos comprobado pero con una cepa resistente a Hg^{2+} 1.5 μM . Los cambios morfológicos reportados por estos autores los hemos observado. Ellos son el aumento en el tamaño de las mitocondrias, aunque no observamos aumento en los cloroplastos pero sí oscurecimiento de estos, además, pudimos ver que la célula pierde movilidad por pérdida del flagelo y cambia su estructura normal por una estructura redonda. Se reporta que este metal induce la síntesis de clorofila, fenómeno que también encontramos en nuestros resultados. La capacidad de captar el metal sigue un compartamiento proporcional en relación a la concentración utilizada de este en el medio de cultivo. Se observó que la capacidad de acumular el metal aumenta con el pretratamiento de las células a otro metal pesado, en este caso el cadmio, por lo cual podemos decir que la célula lleva a cabo un proceso por medio del cual se vuelve resistente a los metales expuestos y además de que puede almacenarlos y seguir viviendo.

En el caso de las células heterótrofas pretratadas con Hg^{2+} , pudimos observar que todos los parámetros medidos se recuperan (excepto el crecimiento). Este hecho nos permite afirmar que la célula lleva a cabo un mecanismo por medio del cual adquiere tolerancia a los efectos del metal y es capaz para soportar concentraciones elevadas de otros elementos. Comparando las curvas de crecimiento de estas células con las de las células sensibles o expuestas por primera vez al metal, podemos observar que, la capacidad de captar estos dos metales aumenta. Se observa, además, recuperación de la síntesis de pigmentos y la estructura celular se reestablece observándose los componentes celulares intactos. En estas células también se puede observar la acumulación de cuerpos de inclusión en el citoplasma y en mitocondrias. Al observar los resultados obtenidos con estas células y las micrografías

obtenidas, podemos afirmar que existen varios procesos por medio de los cuales las células de *Euglena* adquieren la capacidad para desarrollarse en medios que contienen concentraciones elevadas de metales pesados. Estos pueden ser su acumulación dentro del citoplasma dentro de vacuolas y/o la síntesis de proteínas ó péptidos que le permiten a la célula secuestrar al metal pesado, como pueden ser metalotioninas o fitoquelatinas. Se ha reportado la existencia de péptidos que unen metales pesados en las células preexpuestas a Cd^{2+} , los cuales no han sido identificados, estos son capaces de expresarse tanto en las células heterótrofas [52]. Por consiguiente un siguiente paso en el estudio de los efectos de metales pesados sería determinar el o los mecanismos por medio de los cuales las células adquieren tolerancia y/o resistencia a los metales. Esto se haría mediante la localización y caracterización de péptidos y/o proteínas sintetizadas por la célula en el caso de que este fuese el mecanismo de detoxificación. Un factor que debe tomarse en cuenta es que, de cierta manera, el contacto sucesivo de la célula con el metal ocasiona que se active el o los mecanismos responsables de conferirle tolerancia. Entre los candidatos más posibles se encuentra la síntesis de péptidos de bajo peso molecular, inducidos alostéricamente, a concentraciones elevadas de metales pesados conocidos como fitoquelatinas; estas se han encontrado en otros microorganismos entre los que se encuentran hongos, bacterias, levaduras y algunas algas.

Como se ha podido observar las células crecidas de manera heterótrofa son las que más se han estudiado, por lo cual falta realizar otros estudios en las células autótrofas. Estos serían el comportamiento en otros medio de cultivo, (ya que como se puede observar al comparar el crecimiento en el medio glutamato+malato de ambos tipos de células, encontramos que las células fotosintéticas crecen menos que las células oxidativas). Por ello podemos afirmar que, el medio de cultivo tiene algún efecto en el crecimiento. Además se podría utilizar un medio fotosintético como es el de Cramer-Mayers, en el cual posiblemente el crecimiento celular se

recuperaría y se podría estudiar el efecto de los metales sobre todos los parámetros medidos. En plantas, se ha establecido que, los metales inhiben sitios específicos de algunos procesos, como son: el transporte de electrones a través de los fotosistemas, el ciclo de Calvin y la síntesis de clorofila (efectos causados principalmente por el Cd^{2+}). En Euglena, los sitios de acción de los metales pesados, tanto en las células autótrofas como heterótrofas no se han estudiado, aunque por las características de los metales pesados, se podría establecer un efecto generalizado en todos los procesos, hipótesis que estaría sujeta a confirmación.

Por todas las características señaladas, se puede considerar que Euglena podría ser empleada como un microorganismo capaz de captar metales pesados de aguas contaminadas, ya que, aún en células expuestas por primera vez al metal pesado, se observa la captación de estos por la célula, la cual mejora en el caso de células preexpuestas como se pudo ver en los resultados obtenidos.

Como continuación a los estudios que se realizaron en la presente tesis, se tiene pensado realizar los mismos pero en células expuestas a dos o tres metales pesados al mismo tiempo y medir los mismos parámetros que se midieron en el caso de la exposición a un sólo metal. Se cuenta en el laboratorio con una cepa preexpuesta a $50 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} con la cual se realizarán estudios de Tolerancia cruzada, exponiendo a las células a uno o dos metales a diferentes concentraciones. Ya se han obtenido algunos resultados bajo las condiciones mencionadas: lo que podemos decir es que Euglena sigue conservando la capacidad de tolerar concentraciones variables de metales pesados. Otro de los puntos a perseguir es exponer a las células a concentraciones más bajas de Hg^{2+} como 1, 3 y $5 \mu\text{M}$ y observar si hay más daño celular. Otro punto que se abordaría es el aislamiento de mitocondrias y cloroplastos para estudiar el daño causado por ellos. Además se pretende estudiar más a fondo la inducción de la fotorrespiración inducida por Hg^{2+} (10, 20 y $30 \mu\text{M}$). Finalmente se desea identificar el o los mecanismos que confieren

a la célula la capacidad de tolerar metales pesados; para ello se tratará de identificar la existencia de las enzimas involucradas en la síntesis de fitoquelatinas, así como la presencia o ausencia de metalotioninas. El paso siguiente consistirá en realizar estudios de biología molecular identificando el RNAm de las células, para posteriormente clonarlo y obtener una cepa capaz de superproducir los péptidos o proteínas involucrados en el fenómeno de Tolerancia a metales pesados.

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones:

1) Euglena gracilis es un microorganismo que ofrece varias ventajas para su estudio ya que tiene la capacidad de crecer de manera autótrofa como heterótrofa llevando a cabo diferentes procesos. Tiene también la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono para su crecimiento al igual que crecer en un intervalo amplio de pH.

2) El pretratamiento de una cepa con un metal tiene como consecuencia la inducción de uno o varios mecanismos responsables de otorgar a la célula la capacidad de reestablecer sus funciones así como de tolerar concentraciones elevadas de otros metales, lo cual es una de las características necesarias para el tratamiento con recursos biológicos de aguas contaminadas con metales pesados.

3) Euglena gracilis es capaz de tolerar concentraciones variables de metales pesados tanto en células sensibles como en células preexpuestas.

4) El desarrollo de Tolerancia obtenido en las células de Euglena fué satisfactorio, aunque falta comprobarlo con los estudios que se realizaran en las células preexpuestas a $Cd^{2+}50\mu M$. Mediante estos datos se podrá saber que metal es el mejor inductor de tolerancia a metales en el microorganismo estudiado.

5) El efecto de los metales en las funciones fisiológicas de las células de Euglena se encuentra en función del tipo de metal al que se exponga y a la concentración utilizada del mismo.

6) Se puede introducir a Euglena gracilis dentro de los mecanismos de descontaminación de efluentes industriales en los cuales participan tanto los procesos anaerobios como los aerobios. La participación de este microorganismo sería la etapa de eliminación de metales en las aguas en donde ya se ha eliminado la materia orgánica con el uso de microalgas y bacterias específicas. Esto constituye la parte aplicativa de este proyecto de investigación.

7) Los resultados obtenidos nos aportan conocimientos sobre la existencia de organismos capaces de sobrevivir en condiciones de alto estrés, desarrollando mecanismos mediante los cuales se sintetizan proteínas, se disminuye el transporte, se forman vacuolas, etc; todos ellos con la finalidad de conferir resistencia a los microorganismos, lo cual se traduce como sobrevivencia.

8) Después de realizar todo el estudio microbiológico, un paso importante en el desarrollo de este proyecto será su aplicación a nivel piloto, ensayando la capacidad de estos microorganismos para sobrevivir en ambientes naturales contaminados y observar su respuesta al ser expuestos a condiciones reales en aguas residuales contaminadas con metales pesados.

PERSPECTIVAS

En la actualidad el problema de la contaminación de aguas causada por desechos industriales y agroindustriales ha cobrado gran interés tanto por organismos gubernamentales como particulares, por lo cual se están estudiando las posibles soluciones para disminuir la contaminación causada tanto por desechos orgánicos como por metales pesados. Con el objeto de dar a conocer los avances en cuanto a técnicas empleadas para este propósito se realizó el "Taller Internacional Procesos Novedosos para el Tratamiento Biológico de Efluentes Industriales y Agroindustriales" organizado por el Instituto de Ecología A.C. en Veracruz los días 10 y 11 de febrero de 1994. A continuación se presenta un resumen de las pláticas ofrecidas.

Se sabe que el metabolismo microbiano puede dividirse tanto en aerobio como en anaerobio con sus variables, al igual que las reacciones que pueden llevar a cabo, las cuales son anabólicas y catabólicas. Con base en estos conocimientos el problema de la contaminación del agua puede abordarse utilizando técnicas de digestión anaerobia, la cual se ha considerado superior a la digestión aeróbica, aunque ambas se emplean conjuntamente. Entre las ventajas que presenta la digestión anaerobia se encuentran la producción de CH_4 y CO_2 (90%) y una baja masa celular (10%) en comparación con la producción de H_2O y CO_2 (35%) y 65% de masa celular.

La digestión anaerobia se puede definir en términos generales como la conversión biológica de sustancias orgánicas en biogas (CH_4) llevada a cabo específicamente con bacterias anaerobias estrictas.

La degradación de la materia orgánica se realiza en tres etapas principales:

1) La materia orgánica (proteínas, lípidos, carbohidratos, etc) se somete a hidrólisis y fermentación con la subsecuente producción de ácidos grasos volátiles, ácidos mono y dicarboxílicos, etanol y ácidos grasos.

2) A partir de los compuestos anteriores, se lleva a cabo el proceso de acetogénesis para la obtención de acetato, en este proceso intervienen bacterias acetogénicas, hidrofílicas y metanogénicas, las cuales requieren cuidados especiales como relación con otras bacterias como las metanogénicas y las sulfato-reductoras, las cuales catalizan la reacción: $\text{SO}_4^- + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$. Las bacterias metanogénicas son las que requieren más cuidados ya que se trata de bacterias primitivas conocidas como arqueobacterias. Las reacciones que llevan a cabo este tipo de bacterias se dividen en dos clases: a) oxidación incompleta del sustrato a acetato y b) oxidación completa del acetato: $\text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 9\text{H}^+ + 8\text{e}^-$. En esta etapa se produce el H_2 el cual se intercambia con las bacterias de la primera etapa, las cuales lo requieren para llevar a cabo sus funciones. Otra de las características de esta etapa es que las reacciones que no son termodinámicamente posibles, en el reactor se convierten en reacciones favorables.

3) El acetato se convierte en metano mediante el proceso conocido como metanogénesis, el cual se lleva a cabo por bacterias hidrogenotrofas (77%) y metanotrofas (10%).

Existen muchos tipos de reactores, de los cuales en México se utilizan el reactor de lecho de lodos (55%), las lagunas de estabilización (23%) y otros reactores (22%). Entre las características de las bacterias que se encuentran en los reactores están: funcionan a una temperatura óptima de 36°C, necesitan metales traza como Co, Ni, Mo en concentraciones nM. pH de 6.5 a 7.5 y conservación de la alcalinidad en el propio reactor la cual puede ser obtenida por el equilibrio $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ /ácidos grasos volátiles.

Los tratamientos que se pueden dar con los reactores son de tres tipos:

1) Paralelo: dependen de la proporción de sólidos en la muestra, los procesos que se pueden llevar a cabo son la digestión de sólidos o tratamiento directo de agua libre de sólidos.

2) Serie: depende del grado de conversión de la muestra.

3) Por pasos: depende del perfil de fermentación, en donde se llavan los procesos de acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

La biomasa utilizada en un reactor se puede encontrar en tres estados:

1) Biomasa resuspendida no inmovilizada.

2) Biomasa inmovilizada en la cual se pueden utilizar filtros anaerobios (en donde se utilizan reactores de flujo ascendente empacado) y autoinmovilización de la biomasa (reactores de lecho de lodos y reactores híbridos). Este tipo de biomasa es la más utilizada.

3) Biomasa inmovilizada más fluidificación.

Las industrias que más utilizan la digestión anaerobia son la industria del café (en la cual las fases contaminantes son tanto el despulpado como el lavado) y la porcicultura. En esta última se utilizan los procesos tanto anaerobio en primer lugar como el anaerobio en segundo lugar. Se utiliza el alga Spirulina máxima, la cual tiene como ventajas la producción de biogas, biomasa no tóxica que sirve como alimento animal y humano, producción de compuestos utilizados en la industria farmacéutica (clorofila, xantofinas y carotenos, los cuales son utilizados para prevenir el cáncer), y productos utilizados en la industria cosmética. El costo de producción se reduce 10 veces, requiere de poca superficie para generar toneladas de peso (0.03 hectáreas), se puede utilizar en la acuicultura, etc. Se puede utilizar el cultivo semicontinuo y en dos fases, entre los factores que afectan estos cultivos se encuentran: la disponibilidad de CO_2 , O_2 , luz, solubilidad, agitación, concentración tanto de nutrientes como de iones y el pH.

Otros microorganismos que se están utilizando para el mismo fin son la cianobacterias, las cuales, remueven además PO_4^- y NH_3 , producen metabolitos muy utilizados, requieren de nutrimentos simples y se pueden utilizar en matrices de inmovilización tanto de geles como de polímeros no tóxicos.

En España se utiliza el sistema de algas inmovilizadas para remover nitritos y metales pesados, mediante la inmovilización en esponjas de 2-3 mm de diámetro, las cuales se ponen en contacto con el agua contaminada y las algas proceden a captar los contaminantes.

El tratamiento de los metales pesados se ha abordado con el uso de plantas acuáticas. Se consideran metales pesados aquellos cuya gravedad específica es mayor a 4.5, entre estos se encuentran el Cd y el Pb, los cuales son capaces de originar el fenómeno conocido como bioacumulación. Se ha encontrado que en suelos agrícolas existe contaminación causada por Al, Cu, Zn y Pb y se ha visto que la exposición a Al causa alteración en el proceso de fijación de N y en la captación de Ca por la planta. Los metales pesados pueden encontrarse en varias formas, de las cuales dependerá tanto su toxicidad como su tratamiento, entre estas formas se encuentran: intercambiable, absorbido, unido a compuestos orgánicos como carbonatos, nitratos, etc de manera soluble o precipitados. Se ha utilizado el lirio acuático con el fin de absorber los metales pesados ya que se ha encontrado que es capaz de captar los metales tanto en las raíces como en las hojas de la siguiente manera:

raíz: Zn>Cu>Pb>Cd>Al>Cr.

hoja: Zn>Cu>Cd>Pb>Al>Cr.

El lirio acuático tiene la capacidad de sintetizar péptidos de bajo peso molecular con alto contenido de cisteína localizados en la raíz, cuando la planta se encuentra expuesta a cantidades elevadas de metales pesados. Se ha encontrado que la capacidad de captar el metal aumenta cuando se aumenta el pH. Entre los problemas encontrados en el uso de esta planta se incluyen el proceso de eliminación sin liberación del metal captado. Por esta razón se ha comenzado a utilizar un mineral conocido como zeolite el cual tiene la capacidad de captar Cu, As, Cr, Cd,

Pb, nitrógeno amoniacal, etc, con la característica de cambiar de conformación estructural dependiendo del elemento que se una a este.

En España se utiliza el alga Pharmidium laminosum para remover metales pesados. Este organismo puede crecer en la naturales a 60°C y en el laboratorio entre 45 y 50°C por lo cual es posible evitar la contaminación por otros microorganismos. Se ha observado que esta alga pierde la viabilidad al absorber el metal. Entre sus ventajas se encuentran: elevada capacidad de captación de metales pesados aún en presencia de concentraciones elevadas de Ca (aguas duras), se requiere un volumen pequeño de agua, son saturables y baratas. Los metales que puede remover son: Fe, Cr, Cd, Pb y Zn. Se ha observado que la acidificación o basificación aumentan la captación del metal, por lo cual su eliminación resulta también un problema.

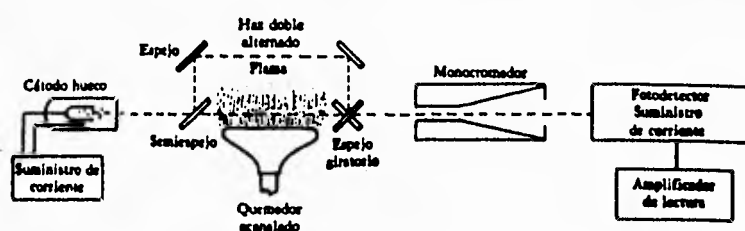
Entre los procesos expuestos para tratar el agua, nosotros proponemos a Euglena gracilis como un microorganismo que puede participar en la tercera fase de descontaminación, en el cual el agua ya ha sido tratada tanto por los procesos anaerobios como aerobios y se somete a la eliminación de los metales pesados, en donde este microorganismo podría jugar un papel importante, ya que reúne las características necesarias para ser utilizado como material biológico empleado en el tratamiento de aguas contaminadas ya que como se reporta en este trabajo tiene la capacidad de crecer en presencia de concentraciones elevadas de metales pesados además de poder sobrevivir de manera heterótrofa como autótrofa y por esta razón crecer en medios de cultivo con diferente fuente de carbono. Puede desarrollarse en un rango amplio de pH (3.5 a 6.8), lo cual le da ventaja sobre otros microorganismos. Es un microorganismo fácil de cultivar, no tóxico, barato y con gran capacidad de captación de metales.

A P E N D I C E S

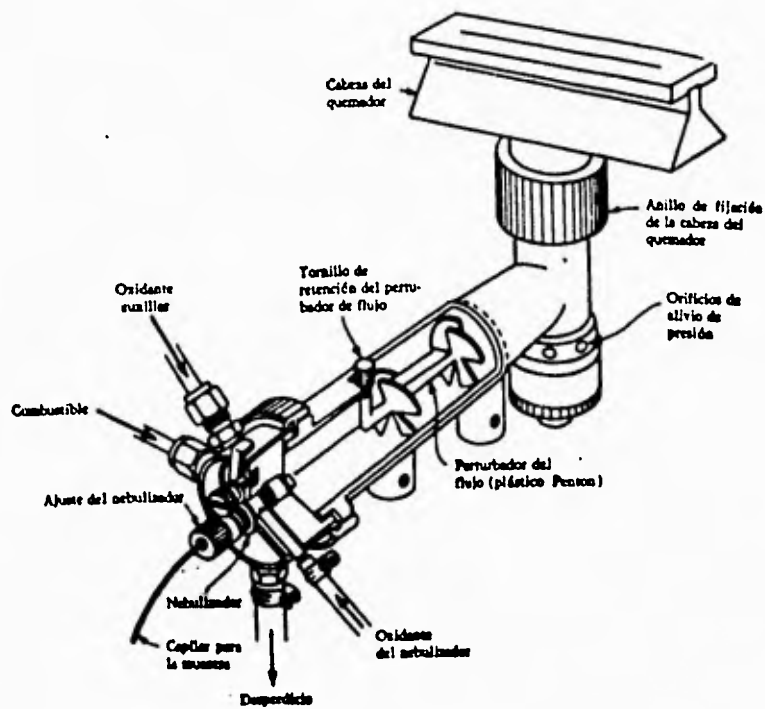
APENDICE 1

Espectroscopía de absorción atómica.

En éste método se hace pasar por la flama la radiación de una fuente externa de luz, que emite la(s) línea(s) espectral(es) correspondiente(s) a la energía necesaria para la transición electrónica del estado normal al estado excitado. Los gases de la flama se consideran como en medio que contiene átomos libres y no excitados, capaces de absorber radiación de una fuente externa, cuando dicha radiación corresponde exactamente a la energía requerida para una transición del elemento investigado de un estado electrónico normal a un estado mayor de excitación. La radiación no absorbida pasa entonces através del monocromador, que aísla la línea espectral exitante de la funte de luz y se envía hacia el detector. La absorción de radiación de la fuente de luz depende de la población del estado normal, la cual es proporcional a la concentración de la solución rociada en la flama. La absorción se mide por medio de la diferencia entre las señales transmitidas en presencia y en ausencia del elemento analizado. A continuación se presenta un diagrama esquemático de la técnica de medición [68]:



Esta técnica requiere de los siguientes componentes: reguladores de presión, rotámeros para el combustible y los gases oxidantes; sistema de quemador y nebulizador; sistema óptico y detector(es) fotosensible(s); y el amplificador y el sistema de lecturas con sus respectivas fuentes de energía. Además, se necesita una fuente de luz apropiada para cada elemento que se vaya a determinar; frecuentemente se coloca un interruptor de luz entre la fuente de luz y la flama. A continuación se muestra un quemador de ranura con cámara de expansión y las partes que lo conforman [68]:



Entre los aspectos más importante de esta técnica se encuentra lograr una buena flama, la cual se utiliza para: 1) transformar la sustancia analizada del estado líquido o sólido al estado gaseoso-vaporización, 2) para la conversión de las entidades moléculares a vapor atómico-atomización y 3) en los estudios de emisión, para la excitación de emisión del vapor atómico y molecular. Los dos requisitos necesarios para una flama satisfactoria es que esta tenga la temperatura apropiada, o la proporción adecuada de combustible y oxidante para llevar a cabo las diferentes funciones de la flama, y que el espectro de la propia flama no interfiera con la observación de la característica de emisión o absorción que se esté midiendo.

Se pueden formar varias mezclas para obtener una buena flama, a continuación se da una tabla de flamas y temperaturas alcanzadas:

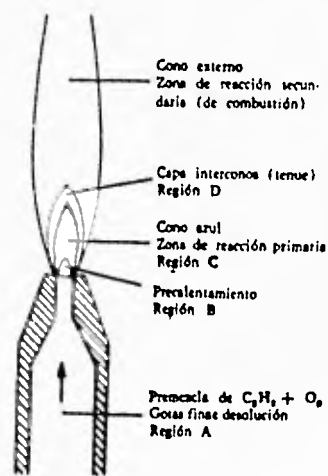
Tabla 1: Temperaturas adiabáticas de flama y velocidades de quemado de flamas premezcladas comunes:

<u>Combustible</u>	<u>Oxidante</u>	<u>Temperatura °C</u>	<u>Vel de quemado en cm/seg</u>
Gas natural	Aire	1700-1900	55
Propano	Aire	1925	--
Propano	Oxígeno	2800	--
Hidrógeno	Aire	2000-2025	340-440
Acetileno	Aire	2120-2400	160
Hidrógeno	Oxígeno	2550-2700	915
Acetileno	Oxido		
	nitroso	2600-2800	460
Acetileno	Oxígeno	3050-3130	1100

Se la flama temperatura adiabática de una flama cuando esta ha alcanzado los equilibrios térmico y químico.

La estructura de una flama premezclada se muestra en la figura siguiente. Al salir de la región A, la mezcla no quemada de hidrocarburo gaseoso, pasa a la región sin calor de 1 mm de grueso (región B), en la cual se calienta por conducción y

radiación de la región de la reacción C, y por difusión de radicales, lo que hace que inicie la combustión. Los gases de la flama se desplazan hacia arriba de la zona de reacción con velocidades del orden de 1-10 mm/seg. Los gases que emergen de la región C consisten principalmente de CO , CO_2 y H_2O (y N_2 cuando uno de los gases originales es el aire), con cantidades menores de H_2 , H , O y NO . La composición real de los gases varía con la composición inicial de la mezcla. En el cono interno, los gases no están en equilibrio térmico, pues las cantidades de radicales son muy elevadas (los precursores de las reacciones de excitación química). El equilibrio térmico se logra casi completamente en la región D. La combustión se completa en la cara externa, auxiliada por el arrastre del aire cercano. Las flamas de hidrógeno no muestran evidencia de un cono interno:



Uno de los problemas en las mediciones espectrales son las interferencias, las cuales se encuentran estrechamente asociadas con el poder de resolución del sistema óptico empleado.

La interferencia espectral puede ser causada por emisiones de líneas adyacentes cuando la sustancia problema y la de interferencia tienen casi la misma longitud de onda y no son analizadas por el monocromador. En este caso se leerán las líneas al mismo tiempo en proporción al grado de superposición.

Las interferencias físicas se relacionan con las partículas de materia en la flama, las cuales son responsables de la dispersión de la luz y la absorción molecular. Esto puede originarse en las gotas no evaporadas, pero más probablemente se debe a partículas de sales no evaporadas o refractarias que no han sido desolvatadas. Las correcciones se hacen midiendo la absorbancia a longitudes de onda adyacentes a la línea de resonancia, usando una línea no absorbida de la lámpara, por otra parte, se puede medir la emisión continua de una lámpara auxiliar de deuterio que pasa alternativamente a través de la flama.

Otro tipo de interferencia es la conocida como interferencia química en la fase condensada. Esta resulta cuando se mezcla un concomitante con el elemento problema para formar un compuesto, el cual, después de haberse cristalizado de las gotas de aerosol, se vaporiza con dificultad, o, tal vez se convierte al estado gaseoso con más facilidad de lo que haría el elemento analizado en ausencia del concomitante. Por ejemplo, las sales de compuestos de alto punto de fusión tales como los óxidos refractarios, no se convierten rápidamente al estado gaseoso. El uso de agentes liberadores o agentes quelantes protectores normalmente evita o disminuye este tipo de interferencia, como ejemplos tenemos lantano y EDTA respectivamente.

Dos de los aspectos más importantes dentro de la espectrofotometría son el límite de detección y la sensibilidad. El primero se define como la concentración (μ

M/ml) de un elemento que desplazará la absorción de la señal en una cantidad igual al ruido de pico a pico de la línea base (o señal de fondo). La segunda se define como la concentración de elemento de prueba en solución (o la cantidad en unidades de peso por peso de muestra) que produce una absorbancia de 0.0044 (1% de absorción). Normalmente se expresa como $\mu\text{g/g/1\% Abs}$).

Entre los métodos de evaluación se encuentran las curvas de calibración, el método de adición patrón y los métodos de control interno.

Generalmente se prepara una serie de soluciones concentradas, cada una de las cuales contiene, por ejemplo, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de un solo elemento. Es conveniente preparar estos patrones con HClO_4 o HNO_3 , para reducir al mínimo los efectos de los aniones, y con metales de alta pureza o materiales químicos de grado reactivo. A partir de estas soluciones se preparan las diluciones a las concentraciones deseadas según se vayan necesitando. Para almacenarlas se recomienda que se usen botellas de polietileno o de vidrio resistente. Se debe tener cuidado en el manejo de muestras y patrones diluidos, evitando el contacto con pipetas contaminadas, jeringas, cristalería y partículas de polvo en el aire.

APENDICE 2

Se tomaron microscopías electrónicas de barrido y de transmisión de las células tanto expuestas como no expuestas a metales pesados. Las células fueron sometidas a varios pasos de preparación.

Primeramente, se separan las células del medio de cultivo mediante centrifugación a 170xg por 15 min. Posteriormente se lavan una vez con el medio SHE y dos veces con el medio SHEA (ambos descritos en materiales y métodos) a 327xg por 5 minutos cada vez. Después se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en un medio que contiene SHEA más glutaraldehído no polimerizado al 2.5% y se agitan a 120 rpm durante una hora.

Posteriormente se llevaron al Departamento de Microscopía Electrónica (un lapso no mayor a 2 horas) y fueron fijadas en formol al 10%, en el que permanecieron por tiempos variables hasta su tratamiento posterior.

El paso siguiente consiste en cortar las células (en el caso de las destinadas a microscopía de transmisión) y cambiadas a glutaraldehído al 2.5% en un buffer de fosfatos a pH 7.4 por dos horas. Se lavaron en el mismo buffer tres veces y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, a continuación se desecaron por la técnica de punto crítico con CO₂ [66], se montaron en portaespecímenes de aluminio con pintura de plata y fueron recubiertas con oro platinado ionizado por 10 minutos a 1.2 KV.

Por último, se realizó una valoración de cada preparación por dos o tres observadores en un microscopio de barrido Zeiss DSM-950 operado a 15 KV, observando los cambios morfológicos causados por la exposición a los metales pesados.

En el caso de las microscopías de barrido, se examinaron los cambios en la morfología general, los daños causados en la película celular como grietas,

rompimiento, etc, y la existencia o no del flagelo. En las micrografías de transmisión se pudieron observar los cambios sufridos en los organelos intracelulares.

APENDICE 3

Efecto de los metales pesados sobre la funcionalidad mitocondrial.

A partir de las células heterótrofas preexpuestas a las concentraciones indicadas tanto de Hg^{2+} como de Cd^{2+} se aislaron mitocondrias y se midió el control respiratorio, la relación ADP/O, la respiración en presencia de diferentes sustratos, la actividad de la citocromo oxidasa y el potencial de membrana.

Control respiratorio.

Se midió el control respiratorio tanto de células sensibles como preexpuestas a los metales indicados. Se consideran células sensibles a aquellas que se exponen por primera vez al metal. En este caso no se observa estimulación con ADP, en comparación con las segundas, las cuales recuperan la capacidad de sintetizar ATP. Se encontró que el sustrato con el cual responden mejor al ADP es el 2-oxoglutarato (10mM), en el caso de las células preexpuestas, ya que en el caso de las células crecidas en ausencia del metal, el mejor sustrato es el lactato (10mM). Los controles de las células preexpuestas se muestran en la figura 1 y en la tabla 1 se recopilan los valores de control respiratorio y de la relación ADP/O.

Tabla 1: Control respiratorio de mitocondrias aisladas de células heterótrofas crecidas en presencia y ausencia de los metales pesados $Hg^{2+}1.5\mu M$ y $Cd^{2+}250\mu M$ por varias generaciones (células preexpuestas) en el medio glutamato+malatpo (1mg/ml de proteína mitocondrial). Las células se cosecharon en la fase logarítmica de crecimiento. Los resultados representan la $X\pm D.E$ de cuatro experimentos.

	Control respiratorio ng átomoO/mg min	Relación ADP/O
0	3.5 ± 0.55	2.6 ± 0.43
$Hg^{2+}1.5\mu M$	2.8 ± 0.58	2.2 ± 0.25
$Cd^{2+}250\mu M$	5.1 ± 1.7	2.5 ± 0.65

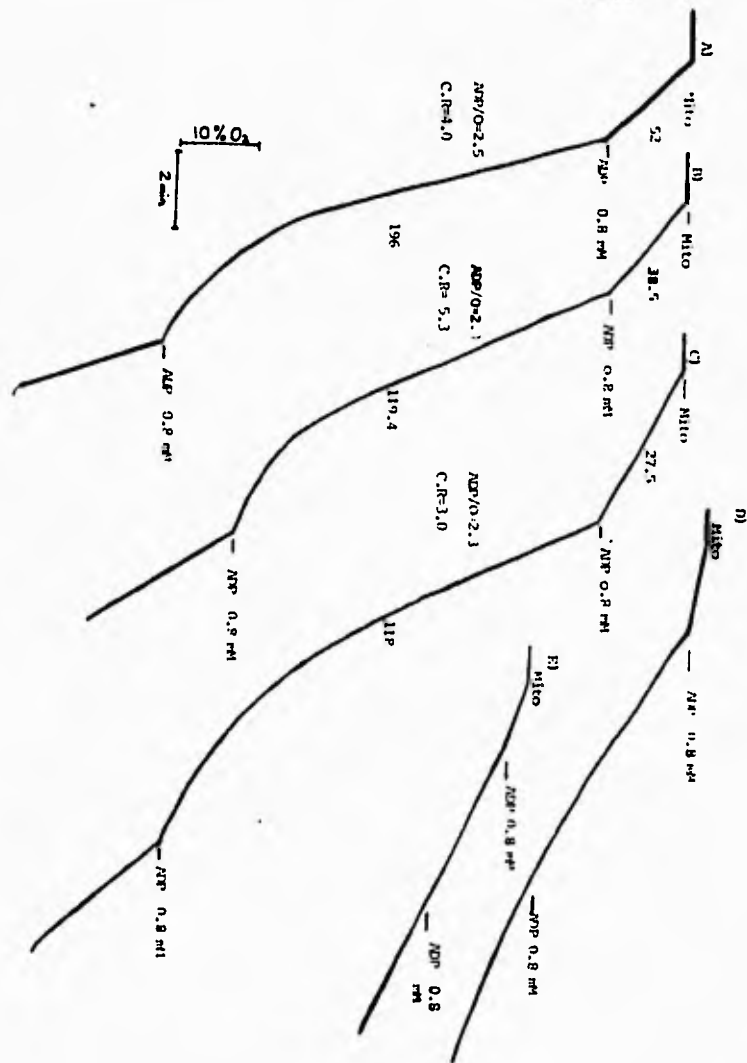


Figura 1: Control respiratorio de mitocondrias aisladas de células: a) no expuestas a metal pesado, células preexpuestas a b) $\text{Cd}^{2+}250\mu\text{M}$, c) $\text{Hg}^{2+}1.5\mu\text{M}$. El sustrato utilizado fué 2-oxoglutarato (10mM). La medición se realizó como se explica en materiales y métodos. La figura muestra un trazo representativo.

Respiración mitocondrial.

En mitocondrias de células sensibles se observó que la capacidad de respiración frente a los sustratos exógenos: lactato (10mM), succinato (10mM), NADH (1mM), 2-oxoglutarato (10mM) y glutamato+malato (7.5 y 15 mM) es mínima al contrario de lo encontrado en mitocondrias de células preexpuestas por varias generaciones al metal. Esta capacidad de respiración se muestra en la tabla 2 en donde también se presenta la respiración de las mitocondrias de células no expuestas a metales pesados (llamadas células control) con las cuales se puede comparar la actividad de las células preexpuestas. Las células que se recuperan más son las pretratadas con Hg^{2+} en relación con las preexpuestas a $Cd^{2+}250\mu M$.

Tabla 2: Respiración de mitocondrias de células preexpuestas a los metales Hg^{2+} y Cd^{2+} en el medio glutamato+malato en presencia de sustratos exógenos. Las mitocondrias se recolectaron en la fase logarítmica de crecimiento y con una concentración de 1mg/ml de proteína. Los datos representan la $X \pm D.E$ de cuatro experimentos.

Sustrato	Respiración ng átomo O/mg min		
	O	Hg ²⁺ +1.5 μ M	Cd ²⁺ +250 μ M
Lactato	92 \pm 2.60	88 \pm 3.10	85 \pm 3.78
Succinato	72 \pm 2.50	69 \pm 3.30	21 \pm 2.40
2-oxoglutarato	51 \pm 2.50	26 \pm 4.70	14 \pm 2.00
Glu/Mal	61 \pm 2.90	32 \pm 5.60	24 \pm 3.00
NADH	42 \pm 3.90	30 \pm 2.40	33 \pm 2.80

Actividad de la Citocromo Oxidasa.

La actividad de la citocromo oxidasa de mitocondrias sensibles y preexpuestas a los metales estudiados se estimuló en presencia de un donador artificial de electrones (TMPD 0.6 mM) y se inhibió con azida de sodio (como se describe en materiales y métodos). La actividad se recupera en la células preexpuestas y se inhibe totalmente como se puede observar en la figura 2. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3 Actividad de Citocromo oxidasa en mitocondrias aisladas de células crecidas en ausencia y presencia de metal pesado en el medio glutamato+malato, en fase logarítmica de crecimiento (tercer día). La medición se realizó con 1mg/ml de proteína mitocondrial n=4

	Actividad ng átomo O/mg min
0	480 ± 5.7
Hg ²⁺ 1.5μM	500 ± 8.0
Cd ²⁺ 250μM	261 ± 8.1

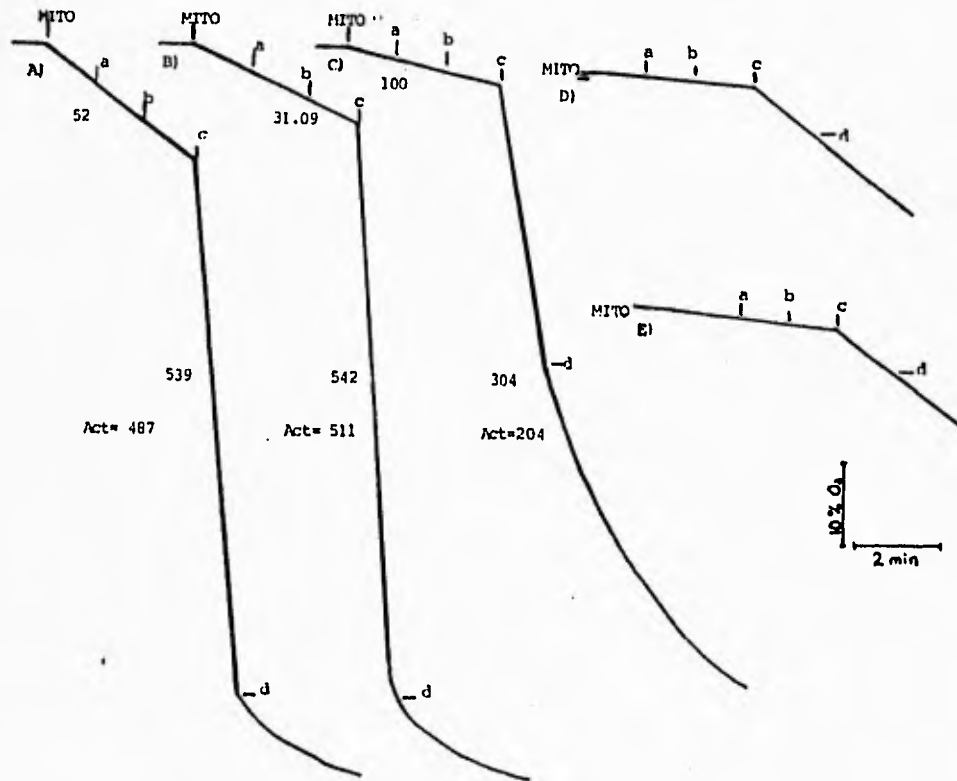


Figura 2: Medición de la actividad de la Citocromo Oxidasa en mitocondrias aisladas de células: A) no expuestas a metal pesado; B) de células preexpuestas a $\text{Hg}^{2+} 1.5 \mu\text{M}$ y C) $\text{Cd}^{2+} 250 \mu\text{M}$. Se midió también en mitocondrias de células sensibles a D) $\text{Cd}^{2+} 250 \mu\text{M}$ y E) $\text{Hg}^{2+} 1.5 \mu\text{M}$. Se adicionó en cada caso: a) antimicina $5.5 \mu\text{M}$, b) CCCP $1.1 \mu\text{M}$, c) TMPD 1 mM y d) azida de sodio 1 mM .

Medición del Potencial de Membrana.

Como último parámetro se midió la capacidad de generar potencial de membrana en las mitocondrias tanto de células sensibles como preexpuestas y se encontró el mismo comportamiento. Las mitocondrias de células crecidas en presencia del metal por varias generaciones recuperan la función en tanto que las sensibles la pierden por completo como se puede observar en la figura 3 y en la tabla 4 en la cual se muestra el cambio de absorbancia de 511-533 nm.

Tabla 4: Medición del potencial de membrana en mitocondrias de células preexpuestas a metales pesados, crecidas en el medio glut+mal recolectadas en la fase logarítmica de crecimiento. Se muestra el cambio de absorbancia de 511-533 nm en presencia de los sustratos: lactato 10mM (n=5), succinato 10mM (n=4), 2-oxoglutarato 10 mM (n=4), glutamato+malato 7.5/15 mM (n=5) y NADH 1 mM (n=2); adicionando: CaCl₂ 0.2 mM, ADP 0.4 mM y CCCP 3 μM. La concentración de proteína mitocondrial es de 1 mg/ml.

	+Lactato	+CaCl ₂	+ADP	+CCCP
0	0.083±0.006	0.042±0.018	0.007±0.004	0.062±0.017
Cd ²⁺ 250μM	0.079±0.009	0.019±0.013	0.009±0.006	0.053±0.025
Hg ²⁺ 1.5μM	0.061±0.031	0.028±0.024	0.010±0.005	0.053±0.006
	+Succinato	+CaCl ₂	+ADP	+CCCP
0	0.092±0.005	0.013±0.002	0.011±0.004	0.072±0.010
Cd ²⁺ 250μM	0.074±0.011	0.011±0.006	0.015±0.006	0.041±0.023
Hg ²⁺ 1.5μM	0.079±0.012	0.015±0.001	0.022±0.003	0.044±0.027
	+2-Oxoglutarato	+CaCl ₂	+ADP	+CCCP
0	0.087±0.003	0.013±0.003	0.008±0.003	0.042±0.015
Cd ²⁺ 250μM	0.079±0.017	0.011±0.005	0.016±0.006	0.044±0.029
Hg ²⁺ 1.5μM	0.079±0.012	0.012±0.001	0.017±0.009	0.051±0.015
	+glut/mal	+CaCl ₂	+ADP	+CCCP
0	0.085±0.006	0.014±0.004	0.008±0.003	0.027±0.007
Cd ²⁺ 250μM	0.086±0.004	0.013±0.006	0.011±0.007	0.043±0.022
Hg ²⁺ 1.5μM	0.077±0.010	0.013±0.001	0.013±0.009	0.048±0.011
	+NADH	+CaCl ₂	+ADP	+CCCP
0	0.080	0.032	0.006	0.046
Cd ²⁺ 250μM	0.084	0.013	0.017	0.054
Hg ²⁺ 1.5μM	0.041	0.011	0.014	0.036

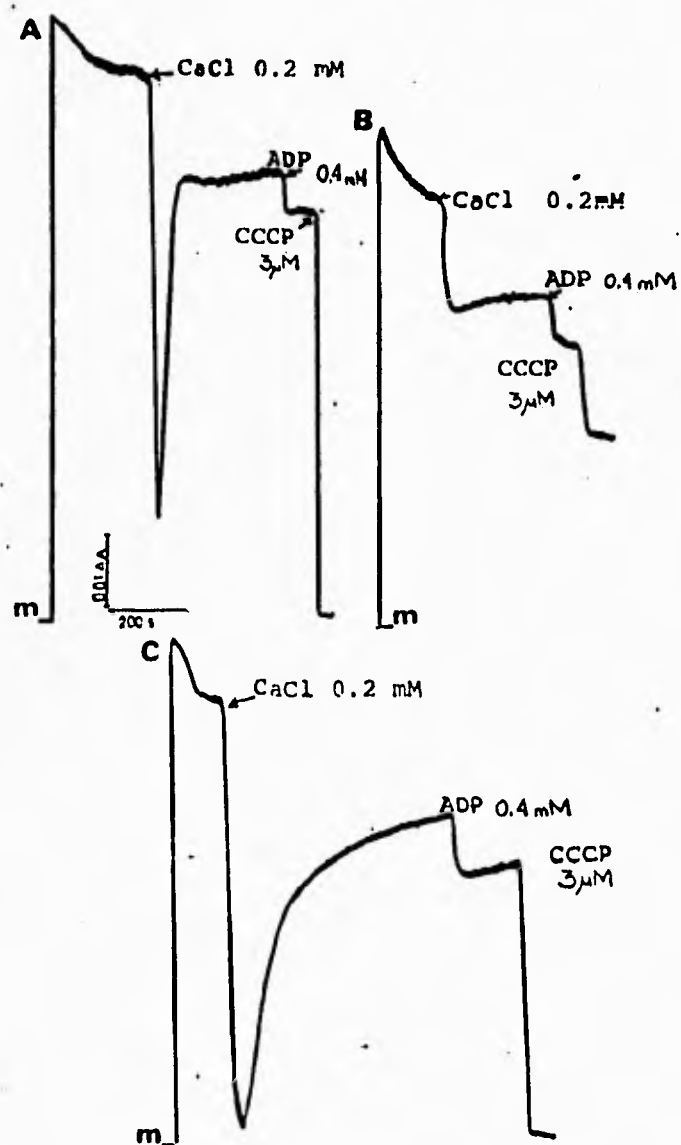


Figura 3: Medición del potencial de membrana de mitocondrias aisladas de células A) no expuestas a metal pesado y preexpuestas a B) $\text{Cd}^{2+} 250 \mu\text{M}$ y C) $\text{Hg}^{2+} 1.5 \mu\text{M}$. El sustrato utilizado es el lactato (10mM). La medición se realiza como se explica en materiales y métodos.

BIBLIOGRAFIA

- 1] Trevors, J.T., Stratton, G.W. y Gadd, G.M. (1986). *Can. J. microbiol.* 32: 447-464.
- 2] Valle, B.L. y Ulmer, D.D. (1982). *Ann. Rev. Biochem.* 41: 91-117.
- 3] Martell, A.E. y Burlington, G.S. (1971). *Stability constants of metal complexes*. The Chemical Society. Burlington House, London.
- 4] Anderegg, G. (1964). *Helv. Chim. Acta.* 47: 1801.
- 5] Jolk, V. y Majer, J. (1965). *Chem. Zvesti.* 19: 249.
- 6] Koikr, Y. y Hamaguchi, H. (1967). *J. Inorg. Nuclear. Chem.* 6: 2038.
- 7] Karniski, L.P. (1992). *J. Biol. Chem.* 26: 19218-19225.
- 8] Gutnecht, J. (1981). *J. Membrane. Biol.* 61: 61-66.
- 9] Smith, M. W., Ambugkar, I.S., Phelps, P.C., Regec, A.L. y Trump. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* 931: 130-142.
- 10] Nieminen, A.L., Gores, G.T., herman, B. y Lemasters, J.J. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 2399-2408.
- 11] Chávez, E. y Holguín, J.A. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 3582-3587.
- 12] Chávez, E., Zazueta, C., Díaz, E. y Holguín, J.A. (1989). *Biochem. Biophys. Acta.* 986: 27-32.
- 13] Endo, T. y Kimura, R. (1988). *Pharmacol. Toxicol.* 63: 361-368.
- 14] Clarkson, T.W. (1990). *N.E.J. medicine.* 323: 1137-1139.
- 15] Weinberg, J.T., Harding, P.G. y Humes, H.D. (1981). *J. Biol. Chem.* 257: 60-67.
- 16] Baszinski, T. (1986). *Acta. Soc. Bot. Pol.* 55: 291-304.
- 17] De Filippis, L.F., Hampp, R. y Ziegler, H. (1981). *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 37-47.
- 18] Lucero, H.A., Andreo, C.S. y Vallejo, R.M. (1976). *Plant. Sci. Lett.* 6: 309-313.

- 19] Atal, N., Saradhi, P.P. y Monhanty, L. (1991). *Plan. Cell. Physiol.* 32: 943-951.
- 20] Trevors, J.T., Stratton, G.W y Gadd, G.M. (1986). *Can. HJ. Microbiol.* 32: 447-464.
- 21] Kaplan, L.A. y Pesce, A.J. (1984). *Clinical Chemistry, analisis and correlación.* MOSBY, St Louis Missouri. Pag 1273.
- 22] Bazzas, F.A., Rolfe, G.L. y Wildle, P. (1974). *Environ. Qual.* 3: 156-158.
- 23] Carlson, R.W., Bazzas, F.A. y Rolfe, G.L. (1975). *Environ. Res.* 10: 113-120.
- 24] Bittel, J.E., Koeppe, D.E. y miller, J.R. (1974). *Physiol. Plant.* 30: 226-230.
- 25] Hampp, R., Ziegler, H y Ziegler, I. (1973). *Biochem. Physiol. Pflanz.* 164: 588-595.
- 26] Niagru, J.O. y Pacyna, J.M. (1988). *Nature.* 333: 134-139.
- 27] Trefry, J.H., Metz, S. y Trocine, R.P. (1985). *Science.* 230: 439-441.
- 28] Steffens, J.C. (1990). *Annu. rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 41: 553-575.
- 29] Tomsett, A.B. y Thurman, D.A. (1988). *Plant. Cell. Environ.* 11: 383-394.
- 30] Rauser, W.E. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* 59: 61-86.
- 31] Grill, E., Winnacker, E.L. y Zenk, M.H. (1986). *proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 439-443.
- 32] Steffens, J.C., Hunt, D.E. y Williams, B.G. (1986), *J. Biol. Chem.* 261:13879-13882.
- 33] Grill, E. (1989). En: *Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry.* New York. LISS. 283-300.

- 34] Grill, E., Winnacker, E.L. y Zenk, M.H. (1975). *Science*. 230:674-676.
- 35] Kägi, J.H.R. y Valle, B.L. (1960). *J.Biol.Chem.* 235: 3460-3465.
- 36] Kägi, J.H.R. y Schäffer, A. (1988). *Biochemistry*. 27: 8509-8515.
- 37] Kojima, Y. y Kägi, J.H.R. (1978). *Trends. Biochem. sci.* 3:90-93.
- 38] Hamer, D.H. (1986). *Annu. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- 39] Piccini, E. y Cappellotti, O. (1982). *Comp. Biochem. Physiol.* 71:135-140.
- 40] Delhaize, E., Jackson, P.T., Luján, L.D. y Robinson, N.J. (1989). *Plant. Physiol.* 89:700-706.
- 41] Jackson, P.J., Roth, E.J., McClure, P.R. y Naranjo, C.M. (1983). *Plant. Physiol.* 75: 914-918.
- 42] Mutoh, N. y Hayashi, Y. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151:32-39.
- 43] Mitra, R.S., Gray, R.H., Chin, B. y Bernstein, I.A. (1975). *J. Bacteriol.* 121: 1180-1188.
- 44] Kempner, E.S. (1982). En: *The Biology of Euglena*. Buetow, D.E.. Ed. Vol. III. Academic Press. N.Y. 197-247.
- 45] Duret, S., Bonaly, J., Bariaud, A., Vannereau, A. y Mestre, J.C. (1984). *Environ. Res.* 39:96-103.
- 46] Baruaud, A. y Mestre, J.C. (1984). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32:597-601.
- 47] Bariaud, A., Bury, M. y Mestre, J.C. (1985). *Physiol. Plant.* 63:382-386.
- 48] Falchuck, K.H., Fawcett, D.W. y Valle, B.L. (1975). *J.Submicr. Citol.* 7:39-152.

- 49] De Fillipis, L.F., Hampp, R. y Ziegler, H. (1981). Arch. Microbiol. 128:407-411.
- 50] Stallwitz, E. y Häder, D.P. (1993). j. photochem. Photobiol. B. Biol. 18: 67-74
- 51] De Filippis, L.F. y Ziegler, H. (1993). Plant. Physiol. 142: 167-172.
- 52] Gingrich, D.J., Weber, D.N., Shaw, C.F., Garvey, J.S. y Petering, D.H. (1986). Environ. healt. Persp. 65: 77-85.
- 53] Gekeler, W., Grill, E., Winn, E.L. y Zenk, M.H. (1988). Arch. Microbiol. 150: 197-202.
- 54] Wilde, E.W. y Benemann, J.R. (1993). Biotech. Adv. 11:781-812.
- 55] Buetow, D.E. (1968). En: The Biology of Euglena. Buetow, D.E., Ed. Vol I. Academic Press. N.Y. 109-184.
- 56] Cook, J.R. En: The Biology of Euglena. Buetow, D.E. Ed. Vol I. Academic Press. N.Y. 244-614.
- 57] Hutner, H.S. y Bach, K.M. (1985). J. Protozool. 3:101-112.
- 58] Arnon, D.I. (1949). Plant. Physiol. 24:1-5.
- 59] Moreno-Sánchez, R. y Raya, J.C. (1987). Plant. Sci. 48:151-157.
- 60] Uribe, A. y Moreno-Sánchez, R. (1992). Plant. Sci. 86:21-32.
- 61] Devars, S., Torres-Márquez, M.E., González-Halpen, D., Uribe, A. y Moreno-Sánchez, R. (1992). Plant. Sci. 82:37-46.
- 62] Gornall, G.A., Bardawill, J.C. y David, M.M. (1949). J. Biol. Chem. 77:757-766.
- 63] Akerman, K.E.O. y Wikstrom, M.K.F. (1976). FEBS. LETT. 68:191-197.

- 64] Simeray, J., Delcourt, A. y Mestre, J.C. (1977). *Société de Biologie de Strasbourg*. 901-906.
- 65] Albergoni, V., Piccinni, E. y Coppellotti, O. (1980). *Comp. Biochem. Physiol.* 67:121-127.
- 66] Lewis, E.R. y Nemanic, M.K. (1973). *Scan. Electron. Microsc.* 1:767-774.
- 67] Kone, B. C., Brenner, R.M. y Gullans, S.R. (1990). *J. Membrane Biol.* 113:1-12.
- 68] Willard, H.H., Merrit, L.L. y Deand, J.A. (1988). *Métodos Instrumentales de Análisis*. Ed. Continental. Séptima Impresión . México.