



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
CAMPUS IZTACALA

Distribución intracelular del cadmio en  
*Euglena gracilis* cultivada en condiciones  
Fotoheterotróficas.

278927

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
DAVID GUILLERMO MENDOZA COZATL

Directora de Tesis: M. en C. Silvia Devars Ramos



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Si, a tu edad esperan muchas clases de vida. Puedes ir en la dirección que escojas. Puedes ir solo o acompañado, los compañeros quizás caminaran contigo una distancia larga o corta, pero al final de tu vida, no importa cuan llenos hayan estado tus caminos y tus días, habrás tenido que aprender lo que todos aprenden. Será entonces demasiado tarde para comenzar de nuevo, demasiado tarde para todo, excepto el remordimiento. Así es que apréndelo en este momento, ningún hombre ha vivido jamás más que una vida y esa ha sido escogida por el mismo....

*A mi Madre*

## Dedicatorias

A mis padres, por brindarme todo el apoyo necesario para la realización de sueños y proyectos.....

A Ofe y Giorgio, por sus oportunos consejos y sugerencias que han contribuido a mi formación personal.....

A los enanos (Sergio y Nizaya), por aguantar a su hermanito mayor....

A Carlos, Abril, Martha y familiares adjuntos que de alguna forma siempre manifestaron su apoyo y me exhortaron a salir adelante.....

A los titos (Gloria y Alberto), por haberse involucrado y mantenerse al tanto de mis estudios.....

Al tío Bibiano y la tía Lupita, sin duda su apoyo fue clave para mi formación integral....

A todos los biólogos de la familia ( incluida por supuesto la tía Pila, fundadora de la ciencia en la familia) .....

A los Cózatl, de los cuales he aprendido mucho.....

A los amigos, Jesús, Viorel , Paco<sup>2</sup> (Correa y Escobedo), Fer, Lilia y anexas (el orden no altera el producto), gracias por su apoyo.....

..... y mas que dedicatoria, un sincero agradecimiento a Dios.

## **Agradecimientos**

A la M. en C. Silvia Devars y el Dr. Rafael Moreno por contribuir en gran manera a mi desarrollo académico, además de darme la oportunidad de realizar mi trabajo experimental en el Departamento de Bioquímica del I.N.C "I.C" .....

A todo el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología por sus valiosas sugerencias y recomendaciones.....

A la Jefatura de la carrera en Iztacala por el apoyo y la correcta orientación brindada para mi formación profesional... .

A todos aquellos que de alguna manera influyeron en la correcta toma de decisiones a lo largo de mi carrera.. .....

.....sinceramente **GRACIAS.**

## Abreviaturas

<b>DAPI</b>	4,6 - Diamino-2-fenilindol
<b>DCMU</b>	3-(Diclorofenil)1.1-Dimetilurea (Diurón)
<b>DCP</b>	1,5-Difenilcarbohidrazida (Difenilcarbazida)
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)
<b>EDTA</b>	Acido tetraacético de etilendiamina
<b>EGTA</b>	Acido tetraacético de etilenglycol-bis (Eter $\beta$ -aminoetil)
<b>FQ</b>	Fitoquelatinas ( $\gamma$ -Glu-Cys) <sub>2-11</sub> -Gly
<b>GSH</b>	Glutación (forma reducida)
<b>GSSG</b>	Glutación (forma oxidada)
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>MT</b>	Metalotioneinas
<b>NADPH</b>	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (forma reducida)
<b>PCA</b>	Acido Perclórico
<b>RT</b>	Tiempo de retención
<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico
<b>TMPD</b>	(N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina)

## RESUMEN

Los organismos han desarrollado diversos mecanismos, a fin de tolerar una elevación en la concentración de metales *esenciales* o ante la exposición a metales *no esenciales*. Dentro de estos están: la unión del metal a la superficie celular, la alteración de la superficie celular a fin de reducir el transporte de iones, la síntesis de compuestos quelantes, la compartimentalización en organelos celulares, entre otros. El cadmio es un metal *no esencial*. Su utilidad en la industria ha provocado un aumento en su uso y por tanto un aumento en la cantidad de este metal en aguas residuales de industrias y fundidoras. Su toxicidad esta probada para todos los organismos y va desde trastornos leves hasta intoxicaciones crónicas que pueden llevar a la muerte.

Se ha demostrado que *Euglena gracilis* tiene la capacidad de captar y tolerar elevadas concentraciones de cadmio, sin embargo no se conoce el mecanismo que confiere dicha tolerancia, ni tampoco el destino intracelular de los metales. El objetivo de este trabajo es determinar los mecanismos de tolerancia a cadmio en *Euglena*, para lo cual es necesario conocer su distribución intracelular e identificar moléculas que sean sintetizadas en respuesta a la exposición a cadmio, que puedan participar en su quelación.

Mediante centrifugaciones diferenciales y ultracentrifugación, se obtuvieron diversas fracciones enriquecidas con los diversos compartimentos celulares. Se midieron actividades específicas de dichos organelos, a fin de conocer el porcentaje de contaminación de cada una de las fracciones respecto a otros organelos.

Determinamos la distribución intracelular en células cultivadas con cadmio 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Al tercer día de cultivo, la fracción enriquecida con cloroplastos y la fracción del citoplasma contienen (cada una) el 30 % del cadmio internalizado, mientras la fracción nuclear contiene el 25%. Al octavo día de cultivo la distribución cambia, el 50% del cadmio internalizado se encuentra asociado a cloroplastos, el 20% se encuentra en el citoplasma y 15% en los núcleos. El cambio en las distribuciones a través del tiempo sugiere un transporte de cadmio del citoplasma al cloroplasto. No se ha reportado para ningún organismo el transporte de metales pesados al cloroplasto.

En respuesta a la exposición a cadmio, las plantas superiores sintetizan compuestos de bajo peso molecular con grupos tioles derivados del glutatión (fitoquelatinas) las cuales transportan el cadmio del citosol a la vacuola. Extractos ácidos de células de *Euglena* se analizaron por HPLC y se lograron separar compuestos de bajo peso molecular sintetizados en respuesta al cadmio con grupos tioles, los cuales ya habían sido descritos para *Euglena* y que pueden pertenecer al grupo de las fitoquelatinas. Sugerimos que estos compuestos intervengan en el transporte de cadmio al cloroplasto.



# INDICE

	Página
<b>Introducción</b>	
Exposición humana a metales pesados	1
Metales pesados en la evolución	2
Metales esenciales y no-esenciales	3
Abundancia de metales pesados	3
Cadmio	6
Transporte	8
Toxicidad celular	9
Mecanismos generales de tolerancia a metales	11
<i>Euglena gracilis</i>	21
<i>Euglena</i> como modelo de estudio	22
Hipótesis	28
Objetivos	28
<b>Materiales y Métodos</b>	
Cultivo de <i>Euglena gracilis</i>	29
Fraccionamiento celular	30
Medición de proteína	31
Medición de clorofila	31
Enzimas marcadoras	32
Medición de cadmio	35

	<b>Página</b>
Cuantificación de glutatión	36
HPLC	37
<b>Resultados</b>	
Crecimiento celular	38
Enzimas y moléculas marcadoras	39
DNA	39
Actividad del fotosistema II	40
Actividad TMPD-Oxidasa	43
Glucosa-6-6fosfatasa	45
Fosfatasa ácida	45
Distribución intracelular de cadmio	47
Glutatión	49
HPLC	50
Micrografías electrónicas	55
<b>Discusión</b>	59
<b>Conclusiones</b>	72
<b>Perspectivas</b>	73
<b>Bibliografía</b>	75

## Distribución Intracelular del Cadmio en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones fotoheterotóficas.

### INTRODUCCIÓN

#### Exposición Humana a Metales Pesados

Los metales pesados han estado en la corteza terrestre desde la formación de la Tierra y los hombres han estado expuestos a ellos durante toda su existencia. Se desconoce la fecha en que por primera vez el hombre dio un uso a los metales, sin embargo se sabe que el mercurio, el arsénico, la plata y el zinc han sido utilizados desde tiempos remotos. Incluso algunas de las épocas representativas en la historia llevan el nombre del metal del cual se descubre un nuevo uso. La edad de bronce (3500 a.C.) es un ejemplo, sin embargo el uso de los metales pesados tuvo un gran incremento en el siglo XVIII alcanzando niveles superiores en el siglo XIX y dando un giro completo en nuestro siglo con el manejo de la fisión nuclear (Clarkson, 1995). Hoy en día existe una gama impresionante de usos que se le da a los metales pesados en la industria, entre los cuales están el arsénico, telurio, cadmio, aluminio, etc. Incluso la industria prueba aleaciones de metales en combinaciones únicas como GaAs, GaAlAs, CdTe.

De forma general se define a los metales pesados como elementos cuya densidad es 5 veces superior a la de el agua (1mg/ml). En la corteza terrestre se encuentran en forma de yacimientos que pueden ser expuestos al medio ambiente por eventos geológicos pudiendo entrar en contacto con los mantos freáticos alcanzando niveles tóxicos para el hombre, o bien los desechos industriales pueden ser vertidos directamente a fuentes de agua quedando inutilizados para el consumo humano y/o de otros organismos.

## Metales Pesados en la Evolución.

Las células primitivas debieron estar en contacto con un gran número de metales y sus compuestos. La atmósfera primitiva, casi carente de oxígeno, descrita como altamente reductora, tuvo un papel importante en la exposición de metales a los organismos. Muchos metales debieron estar presentes en forma de sulfuros insolubles, limitando sus concentraciones en los océanos primitivos. La escasez de hidrógeno impulsó a las cianobacterias a usar la molécula de agua como último reservorio de hidrógeno, liberando oxígeno como producto final, sin embargo las bacterias anaerobias siguieron existiendo por desarrollar mecanismos protectores contra el nuevo gas tóxico (catalasa, superóxido dismutasa) e inclusive algunas de ellas aprendieron a usar un metabolismo oxidativo incrementando la eficiencia de la síntesis de ATP (Walker *et al.*, 1983). Esta "tormenta de oxígeno" tuvo, entre otras, la consecuencia de incrementar la concentración de metales desde aquella época, los sulfuros insolubles fueron oxidados a sulfatos solubles precipitándose a la superficie terrestre con las lluvias, entonces las células no solo tuvieron que defenderse de aquel ataque de oxígeno, además tuvieron que desarrollar mecanismos de tolerancia a los nuevos compuestos que invadían el ambiente. La respuesta fue similar a lo ocurrido con el oxígeno, lo que en un principio fueron líneas de defensa contra metales tóxicos se convirtieron a la fecha en metales *esenciales* para la vida por formar parte de sitios activos de enzimas haciendo uso de su alta reactividad. No por coincidencia los metales que fueron incorporados al metabolismo fueron los que más abundaban en aquella época y los metales de menor concentración siguen siendo tóxicos hoy en día para la mayoría de los organismos (Clarkson, *op cit*).

## Metales Esenciales y No Esenciales

Los metales pueden considerarse como esenciales o no esenciales dependiendo de la función que tengan dentro de la célula. Los metales esenciales son indispensables para algunas funciones celulares y son requeridos en muy bajas concentraciones. Los metales no esenciales no tienen ninguna función celular sin embargo son capaces de activar mecanismos celulares a fin de evitar una intoxicación debido a su presencia. Por su alta reactividad con los grupos funcionales de las biomoléculas, una elevación en la concentración de cualquiera de los dos tipos de metales (esenciales y no esenciales) resulta tóxica para la célula, de ahí que sean necesarios mecanismos para controlar su concentración intracelular. Dentro de los metales esenciales tenemos al  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , su función principal es como sitios activos de enzimas, participar en la regulación de estas o bien, pueden funcionar como segundos mensajeros ( $Ca^{2+}$ ) activando cimasas o liberando neurotransmisores (Goldstein, 1990). Los metales no esenciales como el  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ag^{2+}$ , no son útiles para la célula pero debido a su parecido con los metales esenciales pueden entrar por los mismos transportadores y una vez dentro generan daño celular a distintos niveles.

### Abundancia de Metales Pesados

De manera natural el Zn y el Cu son los metales más abundantes en cuerpos de agua y pueden alcanzar niveles significativos en los lugares donde la corriente de agua y reflujos son reducidos; los menos abundantes son el Hg y la Ag (Tabla 1). En la atmósfera los metales más abundantes son el Zn, Pb y el Cu, mientras los menos abundantes son el As y el Hg. Los metales presentes en la atmósfera son liberados en zonas industriales siendo transportados por los vientos a lugares distantes. Se ha calculado que la contaminación anual por metales pesados

excede a la contaminación combinada de desechos radioactivos y orgánicos. se pueden detectar niveles tóxicos de metales cerca de los sitios de desperdicio industrial incluyendo suelos de tipo agrícola (Nriagu y Pacyna, 1988) El hombre se ve directa e indirectamente afectado por el constante aumento en el uso metales. la inutilización de cuerpos de agua sería la forma más alarmante de darse cuenta que es necesaria una regulación en su uso, sin embargo la sola presencia de los metales en lagos y ríos favorecen su concentración y acumulación en la cadena alimentaria, a través de los consumidores primarios, llegando a los niveles tróficos superiores sin la necesidad de que estos hayan estado cerca de la fuente contaminante afectando los productos para consumo humano La Tabla 1 muestra la concentración de algunos metales pesados en ambientes contaminados y no contaminados, cabe mencionar que el riesgo de intoxicación por metales varía según su concentración y por su toxicidad intrínseca.

Tabla 1 Concentración de metales pesados en diversas muestras.

Metal	Aguas Intracontinentales		Aguas Oceánicas (g/ml)	Atmósfera (ng/m <sup>3</sup> )	Aguas Negras y Municipales (mg/cápita/día)
	Consideradas	No Contaminadas			
As	0.1-0.5		1.12-1.87	1.5-53	0.45
Ag	-		0.00004-0.0025	-	-
Cd	0.005-0.05		0.00016-0.124	0.5-620	0.05-7.3
Co	1.0		0.007	-	-
Cr	0.1-0.5		0.00016-0.05	1-1100	0.1-36
Cu	0.2-2		0.32-0.57	3-4900	1.2-83
Fe	-		0.014-0.028	-	-
Hg	0.0012		0.001-0.005	0.01-11.2	0.03-3.8
Ni	0.01-1		0.05-0.65	1-120	0.45-36
Pb	0.05-0.5		0.001-0.015	0.2-13000	0.71-50
V	0.1-0.5		0.0046-0.558	-	-
Zn	0.5-5		0.59-1	10-16000	0.6-180

Tomado de Cervantes y Moreno-Sanchez, 1998.

Los metales de mayor emisión por las industrias son **(1) Cadmio**, su principal uso es en la producción de baterías níquel-cadmio (35%) y en el revestimiento de metales (30%). También es usado para la fabricación de pigmentos y colorantes (15%), además como estabilizador de plásticos (10%). **(2) Cromo**, principalmente se usa para endurecer el acero, además como revestimiento de otros metales a fin de producir brillo y prevenir la corrosión. Puede formar múltiples aleaciones útiles, también se usa como catalizador. La industria ha encontrado al cromo útil como moderador de la expansión de los metales por calor y como estabilizador de estructuras cristalinas. Todos los compuestos del cromo son coloridos, los más importantes son el cromato de sodio y potasio y los dicromatos de potasio y amonio los cuales son usados como agentes oxidantes en diversos tipos de análisis. **(3) Níquel** este metal se usa en termoelectrónicas, utensilios domésticos, pinturas, cerámica, aceros, metalurgia, prótesis dentales y en la fabricación de utensilios quirúrgicos. **(4) Plomo**, el cual proviene principalmente de la combustión de la gasolina con plomo y la fundición de metales. Se usa en la fabricación de fertilizantes fosfatados, pinturas con plomo y barro vidreado (American Chemical Society).

Si bien el uso de estos metales y sus derivados, así como el tratamiento de desperdicios ha venido a ser regulado en los últimos años, su uso en la industria difícilmente puede ser reemplazado, de ahí la necesidad de contar con sistemas que permitan amortiguar el impacto ambiental que producen.

## Cadmio

Los metales se han clasificado de acuerdo a la reactividad que tienen respecto a los grupos funcionales de las biomoléculas, los metales *Clase A* reaccionan mas con oxígeno, siguiendo el orden O>N>S entre ellos tenemos al Ca, Al, Sr, La; los de *Clase B* reaccionan de forma inversa S>N>O como el Cu, Hg, Pb y una tercera clase llamada de *afinidad intermedia* en la que se encuentran metales como el Fe, Co, Ni, Zn, As y el Cd (Nieboer y Richardson, 1980) El Cadmio no es el metal con mayor toxicidad ni tampoco es el de mayor abundancia en la superficie terrestre, sin embargo el aumento constante en su utilización ha elevado las concentraciones del metal llegando a niveles significativos (0.05-7.3 mg/cápita/día, Tabla 1) no solo en las zonas industriales, también en las ciudades, al grado de ser necesarios los estudios con el fin de conocer los posibles daños ocasionados por la constante exposición al metal además de dar alternativas para reducir su uso o bien diseñar estrategias para el tratamiento de desperdicios. El cadmio es un metal blanco-azulado, insoluble en agua y en disolventes orgánicos, es relativamente volátil, emite vapores a temperatura bastante inferior a su punto de ebullición y aun en estado sólido, es muy dúctil y maleable, algunas de sus propiedades químicas son: peso molecular 112.4, punto de fusión 321°C, punto de ebullición 767 °C a 760 mmHg, densidad 8.65. A temperatura ordinaria y en seco, el cadmio es un producto estable, se ataca fácilmente por los ácidos, incluso los mas débiles como los presentes en los alimentos, se disuelve lentamente en los ácidos clorhídrico y sulfúrico, con ácido nítrico forma óxidos nitrosos y nítrico además de gases tóxicos, el clorato y bromato de cadmio pueden dar lugar a explosiones bajo la acción del calor, de un choque o por contacto con productos reductores (Brown y Le May, 1985).



Una de las principales fuentes de contaminación no industrial es el consumo de cigarrillos, cada uno tiene alrededor de 1-2  $\mu\text{g}$  de Cd, 14  $\mu\text{g}$  de Cr y de 2-6.2  $\mu\text{g}$  de Ni, de los cuales una parte se elimina durante la combustión y la otra ingresa al organismo. una persona que ha fumado 20 cigarrillos diarios durante 20 años puede acumular hasta 15-30mg de Cd y 29-175 mg de Ni (Galvao y Corey,1987). La toxicidad que presenta el cadmio es variada y depende de la concentración y tiempo de exposición, las intoxicaciones son generalmente debidas a la ingestión de alimentos contaminados, pero la inhalación de sus vapores en la industria puede provocar trastornos de gravedad variable, la penetración percutanea posee una acción mas limitada La *intoxicación profesional* se caracteriza por trastornos respiratorios y efectos bronconeumónicos, además de efectos hepático-digestivos con vómitos, dolores abdominales, diarrea y proteinuria, la cual esta caracterizada por la presencia de elevadas concentraciones de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas y una elevación de un 33 a 40% de proteínas Bence-Jones característica de pacientes con mieloma multiple. La *intoxicación crónica* esta precedida por un periodo de impregnación, durante esta etapa se observa hipertensión, pero el cadmio no aparece en la orina. Además se observa la aparición de una zona dental amarilla por cadmio, esta pigmentación del esmalte empieza en la base y puede llegar a recubrir la mitad del diente. Las manifestaciones patológicas se agrupan en síndromes más o menos complicados, los más característicos son de origen respiratorio y renal, trastornos sanguíneos como anemia, disminución de hemoglobina, trastornos óseos e inclusive trastornos nerviosos que pueden llegar a producir parálisis. El caso más serio por *intoxicación con cadmio* sucedió en Japón después de la Segunda Guerra Mundial cuando los desperdicios de la mina Kamioka contaminaron el río Jintsu el cual regaba sembradíos de arroz. el consumo diario por









persona en ese lugar llegó a ser de 600µg de Cd lo que provocó disfunciones renales en la población que culminó con deformaciones serias en los huesos. En mujeres japonesas se ha detectado la osteomalacia (desmineralización del cuerpo) y daño renal (nefropatía) como consecuencia de la exposición crónica a Cd (Valle, 1972).

### **Transporte**

La mayoría de los metales pesados no esenciales utilizan los transportadores de los metales esenciales, esto en el caso de que no sean permeables como el Hg, esta característica depende de la similitud entre los elementos y de sus características propias, la tabla 2 muestra una comparación entre diferentes metales esenciales que poseen características similares respecto al cadmio y que se cree influyen en su transporte. Debido a la estructura de su cristal y a su electronegatividad, el Zn es el metal mas parecido al Cd de ahí que en algunos casos utilice el mismo sistema de transporte. En *S. aureus* el Cd entra a la célula por la vía de transporte del ion esencial manganeso, mientras que en *E. coli* lo hace por el sistema de transporte de Zn. En mitocondrias aisladas de mamífero se puede inhibir la captación de cadmio hasta en un 50% con Rojo de Rutenio lo que supone su entrada a través del uniportador de calcio (Uribe, *et al.* 1994), en *Scenedesmus* el cadmio solo manifestó su toxicidad al añadirlo junto a cantidades traza de Cu, por lo que pueden compartir un sistema de transporte, pero además, los factores ambientales pueden influir en la capacidad de los organismos para captar metales, de forma general el aumento en la temperatura y/o la acidificación del medio aumentan la capacidad de captación, mientras que la presencia de cationes monovalentes (K, Na), divalentes (Ca, Mg, Mn, Fe), aniones (acetato, sulfato, fosfato), productos extracelulares

ácidos orgánicos, polisacáridos y péptidos) la disminuyen (Moreno-Sánchez, *et al* 1999). Para el cadmio, en el caso de microalgas, se han propuesto mecanismos de transporte activo y pasivo. Se ha descrito un sistema de captación de alta afinidad en *Chlorella pyrenoidosa*, el cual no es afectado por varios cationes divalentes, pero es inhibido por incubación a 4°C y por la obscuridad. el Mn es un inhibidor competitivo de la captación del Cd y se plantea que posiblemente ambos cationes tienen un sistema de transporte común, como ocurre en algunas bacterias.

**Tabla 2** Características comunes entre algunos metales pesados y el cadmio.

	<b>Cd</b>	<b>Ca</b>	<b>Zn</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Hg</b>
Radio Covalente (Angstroms)	1.48	1.74	1.25	1.36	1.17	1.17	1.47	1.49
Radio Atómico (Angstroms)	1.71	2.23	1.53	1.72	1.79	1.57	1.81	1.76
Electronegatividad (Pa)	1.69	1.0	1.65	1.31	1.55	1.9	2.33	2.00
Cristal								

(Brown y Le May, 1985)

### Toxicidad Celular

Los efectos del cadmio pueden variar entre especies, inclusive puede haber diferencias entre cepas de la misma especie, sin embargo se han caracterizado muchos de los efectos que causa la exposición al cadmio. Este interactúa con monómeros de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina con mayor afinidad que el Na y el Ca, siendo esta una de las bases bioquímicas

que explican su daño en membranas biológicas, otros efectos importantes provienen del hecho de que el cadmio interactúa con cierta afinidad con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, puede sustituir a metales esenciales de los sitios activos de las enzimas e inutilizarlas, desplaza al Zn de su interacción con los ácidos nucleicos, lo que interfiere con el proceso de división celular. puede sustituir al Mg en la molécula de la clorofila inutilizándola, inhibe la fotosíntesis y la fijación de CO<sub>2</sub> en plantas e interfiere en el ciclo de Calvin, altera la composición y concentración de pigmentos, inhibe la actividad de fotosistemas, la fotofosforilación y el transporte de electrones siendo el fotosistema II más sensible que el fotosistema I. A una concentración de 5 μM (0.562 ppm), el cadmio puede inhibir completamente la fosforilación asociada con la oxidación de succinato o citrato en mitocondrias de hígado de rata *in vivo* e *in vitro*, este efecto puede ser revertido por EDTA, ditioles y otros metales como el Mn, Co, Ni, lo cual indica una fuerte interacción del Cd con los grupos SH de las enzimas mitocondriales (Valle y Ulmer, 1972). La toxicidad del cadmio también está asociada con la generación de radicales libres y la activación parcial de la calmodulina por actuar como análogo del Ca, en ratas y ratones induce hipertensión, desarrollo experimental de edema, enfisema, y fibrosis pulmonar debido a su inhalación (Díaz-Barriga, 1991). El cadmio puede inhibir o estimular el crecimiento de algunos microorganismos, inhibe el crecimiento del virus del mosaico del tabaco, mientras que en bajas concentraciones estimula el crecimiento del alga verde *Chlorella*, sin embargo en altas concentraciones lo inhibe (Valle y Ulmer, *op cit*)

Desde hace años se ha estudiado la captación y acumulación de metales pesados en algas y microalgas, especialmente del Cd, pero aun se desconocen los mecanismos específicos

de transporte. Los efectos del Cd no son los mismos en todas las especies de algas. En general se ha establecido que las algas marinas son menos sensibles al Cd que las especies de agua dulce. *Chlamydomonas reinhardtii* es sensible a  $1\mu\text{M}$  de Cd mientras que las algas marinas *Thalassiosira weissflogii* y *Phaeodactylum tricornotum* son menos sensibles e inclusive la inhibición de la fotosíntesis es mínima a  $100\mu\text{M}$  de Cd. La toxicidad del Cd esta en función de la concentración del metal libre. En un estudio acerca de los efectos del Cd en la respiración y la fotosíntesis en *Chlorella* y *Scenedesmus* creciendo en suspensión, se observó una inhibición de ambos procesos, resultando más sensible *Scenedesmus*, también redujo de manera importante la concentración total de clorofila y alteró el fotosistema II al disminuir el transporte de electrones al aceptor  $Q_A$  (Overnell, 1975; Devars *et al*, 1999).

### **Mecanismos Generales de Tolerancia a Metales Pesados.**

Los organismos han tenido que desarrollar diversas estrategias a fin de tolerar una elevación en las concentraciones de metales pesados, ya sean esenciales o no (Fig. 1). Esta tolerancia puede darse por varios mecanismos como son:

1.- Unión del metal a la superficie celular, con lo cual se impide el paso de éste hacia el interior de la célula. Las microalgas producen diferentes sustancias orgánicas extracelulares que proveen a la superficie celular de una gran variedad de sitios para el intercambio iónico, como los grupos amino, fosforilo, sulfhidrilo y carboxilo, que disminuyen la toxicidad de altas concentraciones de metales pesados; se ha demostrado que los polisacáridos de *Phaeodactylum tricornotum* acumulan cantidades importantes de Pb, que el ácido algínico de las algas pardas

atrapa el Sr y que la pared celular de *Chlorella* puede unir Pb, Cu, Cd, Zn, Au, Hg. (Moreno-Sanchez *et al*, 1999, Devars, *et al* 1999).

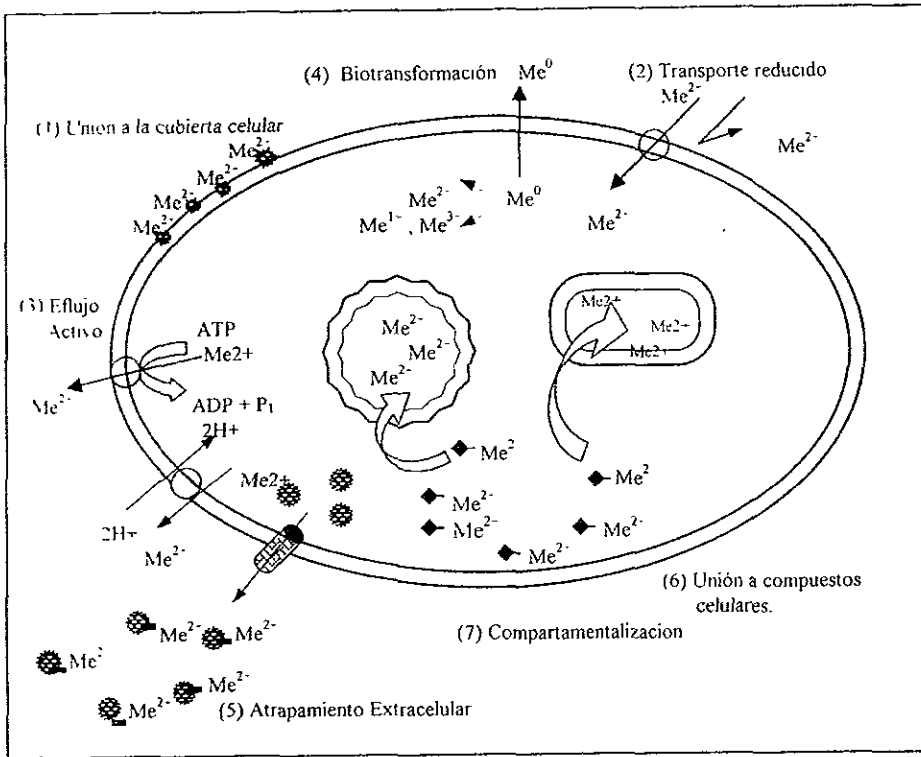


Fig 1 Mecanismos Celulares de protección a metales pesados (Modificado de Moreno-Sánchez, *et al* 1999)

2-Transporte reducido. Este se debe a un cambio en la permeabilidad de las membranas, no es selectivo a los metales tóxicos, inclusive este cambio puede provocar una disminución en la capacidad de captación de nutrientes y compuestos esenciales, sin embargo impide la captación acelerada del metal impidiendo una intoxicación celular letal. La cepa Z fotosintética del protista *Euglena gracilis* puede acumular 3.8 veces mas cadmio que la

cepa B aunque no se han descrito claramente los mecanismos por los que *Euglena* puede tolerar elevadas concentraciones de Cd ( presenta una dosis letal media [LC<sub>50</sub>] de 100  $\mu$ M ) se cree que esta captación disminuida intervenga en la mayor tolerancia al cadmio de la cepa B (Devats *et al.*, 1998)

3 -Flujo activo Este mecanismo expulsa el metal de la célula. El sistema mejor conocido es el del operon *cadA* de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La resistencia al cadmio en estas bacterias grampositivas resulta de la expulsión del Cd por una ATPasa del tipo P codificada por el plasmido *cadA*, esta proteína muestra homología significativa con otras ATPasas del tipo P, tanto bacterianas como de organismos superiores. Consta de 6 a 8 dominios transmembranales que funcionan como un poro por donde es expulsado el Cd, esta enzima posee regiones Cys-X-X-Cys en el extremo amino que probablemente participan en la unión del metal (Nucifora *et al.*, 1989) En *Alcaligenes eutrophus* CH34 se ha descrito un sistema de expulsión activa de metales distinto a la ATPasa de *S. aureus*, se encuentra codificada por el plasmido pMOL30, el cual posee el operón *czc* que confiere resistencia al Cd, Zn, y Co. Consta de tres genes estructurales *czcBCA* y otros genes reguladores de los cuales se conoce muy poco. Las proteínas que participan en la expulsión de los cationes son: el transportador de la membrana interna *czcA*, el transportador de la membrana externa *czcC* y un polipéptido que atraviesa las dos membranas *czcB* (Fig.2) el cual se propone para asegurar la expulsión de los cationes hasta el exterior de la célula evitando que se quede en el espacio periplásmico y sea transportado de regreso al interior de la célula. El mecanismo funciona a través de un intercambio de dos protones por catión divalente. (Diels *et al.*, 1995).

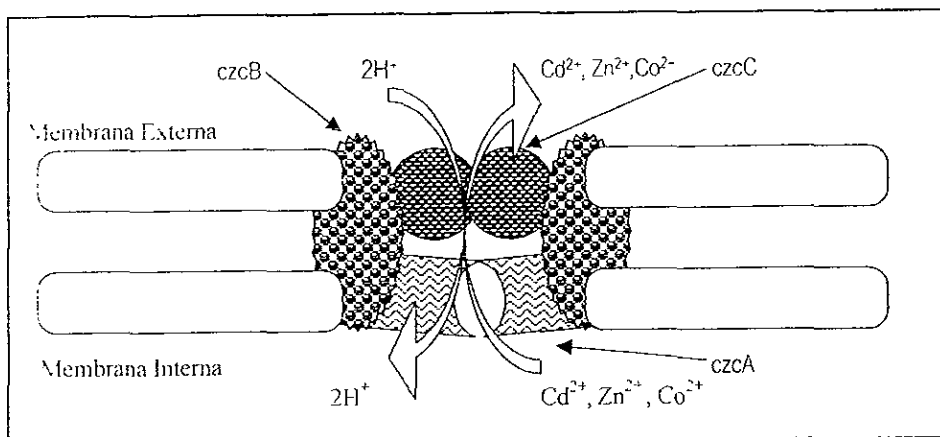


Fig 2. Sistema de antiporte para la expulsión activa de metales pesados en *Alcaligenes eutrophus*. Tomado de Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999.

5 - Atrapamiento Extracelular Los organismos pueden secretar compuestos orgánicos (citrato, malato, oxaloacetato) e inorgánicos (polifosfatos) a fin de precipitar el metal en el medio externo y evitar su entrada a la célula. La afinidad de ligandos por los metales va a depender de factores fisicoquímicos como temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad, luz. Estos factores pueden ser modificados por la fisiología del organismo o por las características del medio externo, la composición de nutrientes como el fósforo puede disminuir la concentración de metal libre disminuyendo la toxicidad de algunos metales. La tabla 3 muestra una relación de la afinidad de diferentes ligandos, que pueden intervenir en la quelación del Cd y el Cu. En algas se ha demostrado la secreción de material extracelular, en *Ecklonia radiata* los exudados que contenían compuestos polifenólicos fijaron Cu, Fe y Zn; la presencia de Fe, ácido cítrico, EDTA o péptidos en el medio de cultivo disminuye los efectos tóxicos del Cu en *Chlorella pyrenoidosa* (Higgins y Mackey, 1987; Rai *et al* 1981)



Tabla 3 Afinidad de diferentes ligandos por  $Cd^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  ( $\text{Log } K_{\text{est}} [\text{MeL}] / [\text{Me}] [\text{L}]$ )

Ligando	$Cd^{2+}$	$Cu^{2+}$
EDTA	17.39; 9.88 (0.3 fM)	18.85; 12.30 (0.01 fM)
EGTA	17.53; 11.38 (8 fM)	18.59; 13.37 (0.7 fM)
Citrato	9.44; 5.56 (4 pM)	5.64; 4.16 (25 nM)
Oxaloacetato	4.22 (0.57 $\mu$ M)	5.36; 2.75 (44 pM)
Malato	2.87; 1.59 (5.7 $\mu$ M)	3.93; 2.25 (1 $\mu$ M)
Gluamato	4.42 (9.7 $\mu$ M)	8.26 (51 nM)
Lactato	1.54; 0.87 (9.6 $\mu$ M)	2.82; 1.49 (6 $\mu$ M)
Sulfuro ( $S^{2-}$ )	6.1 (15 nM)	-----
Fosfato ( $HPO_4^{2-}$ )	-----	3.72 (2.9 $\mu$ M)

Los números entre parentesis indican la concentración calculada de metal libre que resulta de la interacción entre 1mM de ligando [L] con 10  $\mu$ M de metal [Me] a pH 7.0, 25°C y fuerza iónica 0.01. Tomado de Moreno-Sánchez, *et al* 1999

En hongos también se ha descrito la precipitación y el atrapamiento extracelular de metales pesados por la expulsión de compuestos quelantes. El citrato es un eficiente quelante, también el oxalato, el cual interactúa con los metales formando cristales insolubles. La producción de ácido sulfhídrico por algunas levaduras, conduce a la precipitación de metales en la forma de sulfuros insolubles localizados principalmente en el exterior y alrededor de las paredes celulares. Algunos hongos filamentosos y levaduras liberan moléculas con alta afinidad por Fe, llamados sideróforos, sin embargo en este caso los sideróforos entran a la célula lo que sugiere que la función de estos compuestos es la captación del Fe (Winkelmann, 1992)

6 - Unión a compuestos celulares. Las células pueden sintetizar compuestos capaces de quelar al metal en el citoplasma evitando su unión con otras biomoléculas de importancia fisiológica, el metal quelado puede permanecer en el citoplasma, puede ser expulsado o bien ser compartimentalizado en algún organelo celular. Existen dos tipos de compuestos que

participan en la quelación de metales pesados, las metalotioneínas (MT) y las fitoquelatinas (FQ). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (menor a 40 kDa), carecen de aminoácidos aromáticos y poseen uniones Cys-X-Cys o Cys-Cys las cuales intervienen en la unión con el metal. La síntesis de MT se induce a nivel transcripcional y las células seleccionadas para tolerancia a los metales pesados pueden presentar una amplificación de estos genes. Su expresión genética se induce rápidamente por la exposición a metales pesados y en las células de mamífero son inducidas por algunas hormonas y por el interferón. En mamíferos la síntesis de MT se induce durante el desarrollo normal y la diferenciación, sin embargo puede inducirse también por estrés oxidativo. Entre los metales inductores de MT están el Cd, Zn, As y Cu. La concentración óptima para la inducción de MT varía entre organismos, sin embargo es común que la concentración inductora sea más baja que la que causa toxicidad. La cinética con la cual se activa la síntesis varía desde días en algunos mamíferos hasta horas en algunas levaduras, los metales pesados pueden estimular la transcripción de RNAm o actuar durante el procesamiento y degradación de este. Entre las funciones fisiológicas de las MT se encuentra la activación de algunas apoenzimas que requieren de Zn o Cu, además se relacionan con la adaptación a diferentes tipos de estrés. Las MT pueden dividirse en dos grupos, las MT de clase I y clase II. Las de clase I incluye a MT de mamífero y polipeptidos de otros *phyla* relacionados con su estructura primaria, en las de clase II se incluyen aquellas que poseen poca correspondencia con las formas de mamífero, como son las de levadura, procariontes, trigo, erizos de mar etc. (Hammer, 1986)

Las fitoquelatinas (FQ) son péptidos de bajo peso molecular (10kD), sin embargo a diferencia de las metalotioneínas *no son* producto de un gen, son sintetizadas por una enzima ( $\gamma$ -glutamilcisteína transpeptidasa, fitoquelatina sintetasa). Durante algún tiempo se trató a las FQ (fig 3) como una tercera clase de metalotioneínas, sin embargo sus diferencias llevaron a la separación de conceptos, las FQ son características de plantas superiores, algas y algunas levaduras. Sin embargo su función es análoga, participan en la homeostasis de metales esenciales regulando su concentración intracelular y además como quelantes de metales no esenciales. Ahora se conoce de manera clara la vía de síntesis de las FQ, su precursor es el glutatión el cual es producto de dos enzimas, la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa y la glutatión sintetasa, las reacciones de estas dos enzimas requieren de hidrólisis de ATP, no así la fitoquelatina sintetasa, la cual requiere al metal como activador esencial, siendo el Cd su mejor inductor. Esta enzima está regulada por producto (fig 4), al igual que la glutatión sintetasa.

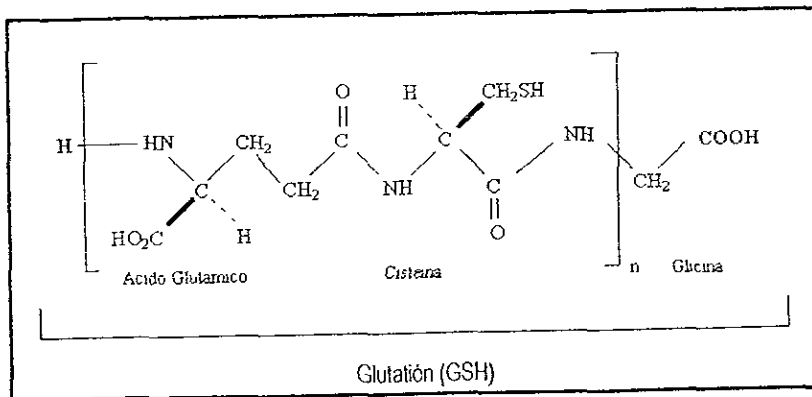


Fig.3 Estructura primaria de una fitoquelatina,  $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ ,  $n = 2-11$

Existen diferentes tipos de fitoquelatinas, sintetizadas por la misma enzima, y su estructura va a depender del sustrato que utilice la enzima. En vez de glutatión puede reconocer al homoglutation, donde la glicina puede ser sustituida por  $\beta$ -alanina, teniendo como resultado *homo*-fitoquelatinas. Si la glicina es sustituida por serina o glutámico, se denominan *Iso*-fitoquelatinas, inclusive esta enzima puede prescindir del glutatión y usar como sustrato  $\gamma$ -glutamilcisteina formando fitoquelatinas carentes de glicina (Zenk, 1996) El Cd ha demostrado ser el mejor activador de la fitoquelatin sintetasa, sin embargo no es el único. El orden de activación por metales puede variar entre organismos pero de forma general el orden de activación es : Cd > Zn > Sb > Ag > Hg > As > Cu > Sn > Au. El glutatión por sí mismo es capaz de conferir resistencia a metales pesados, puede formar complejos con el Cd, ya sea en una relación 1:1 o 2:1, este último complejo llamado bis(glutationato) de cadmio es el que preferentemente se sintetiza en *Saccharomyces cerevisiae* y a él es atribuida la resistencia de la levadura al Cd Sin embargo *Saccharomyces* tiene la capacidad de sintetizar FQ (n = 2), no obstante su línea de defensa principal es el glutatión. Aunque el Hg se ha descrito como un activador de la fitoquelatin sintetasa *in vitro* se ha sugerido que, *in vivo*, es el glutatión el que actúa como quelante del metal. Debido a su fuerte interacción con el Hg, mayor que el Cd, es posible que el glutatión reduzca la concentración de Hg libre en el citoplasma y esta no sea suficiente para activar la síntesis de FQ en la misma proporción que el Cd (Howe y Merchant, 1991) En microalgas, la síntesis de compuestos capaces de unir metales parece ser un mecanismo bastante generalizado. Se han detectado proteínas o péptidos detoxificantes en *Chlamydomonas reinhardtii*, crecida en presencia de varios metales, el Cd induce la

acumulación de oligopeptidos del tipo de las fitoquelatinas, mientras que el Hg induce principalmente la acumulación de *glutación*

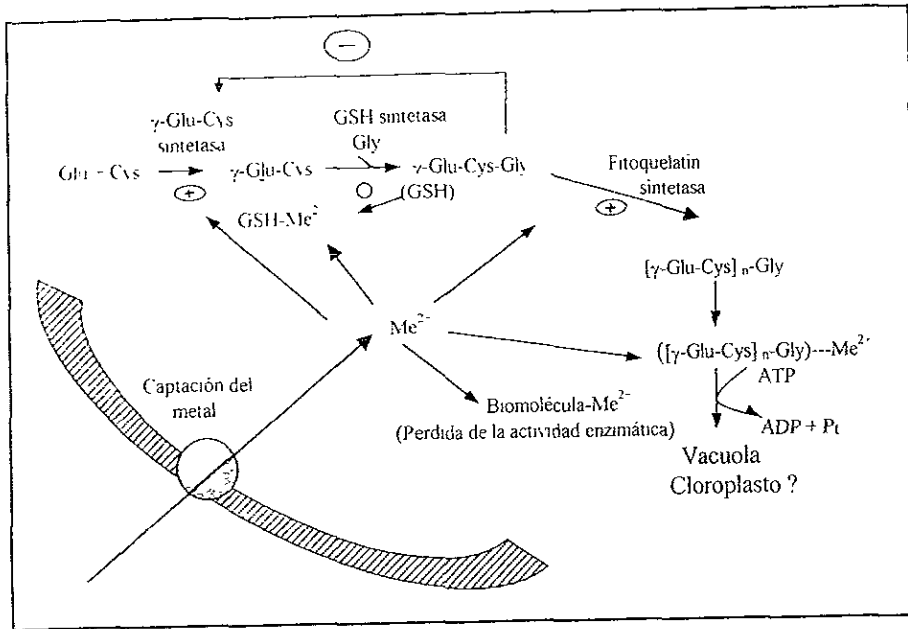


Fig 4 Modelo de detoxificación y metabolismo de metales pesados. Los símbolos + y - muestran los efectores positivos y negativos. Tomado de Howe y Merchant, 1996.

7-Compartimentalización, consiste en atrapar al metal dentro de la célula en algún organelo. El metal puede acumularse en diferentes organelos, sin embargo para que sea considerado un mecanismo de resistencia, el metal no debe interferir o afectar las funciones específicas del organelo. Este mecanismo se encuentra muy relacionado con la unión de metales a compuestos celulares sintetizados en respuesta a la exposición a estos, como fitoquelatinas o metalotioneínas. En plantas superiores las fitoquelatinas juegan un

papel importante en la homeostasis de metales esenciales regulando la disponibilidad de Zn o Cu libre. sin embargo constituyen el principal mecanismo de resistencia por exposicion al Cd. Se ha demostrado que la activación por Cd de la fitoquelatina sintetasa aumenta los niveles de fitoquelatinas en cultivos de *Silene vulgaris* expuestos a concentraciones de 100µM de CdCl<sub>2</sub> (Zenk. 1996), por lo que es considerado un mecanismo de resistencia a metales pesados. El complejo fitoquelatina-metal es transportado activamente a la vacuola, por una ATPasa de tipo V, en donde el cadmio es quelado probablemente por citrato, u otros ácidos orgánicos, posteriormente las fitoquelatinas son degradadas. La compartimentalización vacuolar del Cd está bien caracterizada para plantas superiores y algunas levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae* se demostró la existencia de un transporte activo a la vacuola de bis-glutationato de cadmio (2GSH : 1Cd) sin embargo no se demostró que el glutatión ingrese a la vacuola. En cepas carentes del gen YCF1 (Yeast Cadmium Factor) no se observó acumulación del cadmio en las vacuolas. En extractos enriquecidos con vacuolas de una cepa resistente (DTY165), conteniendo YCF1, solo se observó la acumulación de Cd en presencia de ATP-Mg en concentraciones equimolares, además esta captación fue sensible a desacoplantes como la gramicidina-D o cloruro de amonio lo que supone la existencia de un transportador que utiliza gradientes, tanto  $\Delta pH$  como  $\Delta \Psi$ . En *Saccharomyces* este transportador es independiente del transporte del Cd a la vacuola mediado por fitoquelatinas (n=2), pero se ha sugerido que en otros organismos puedan compartir un transportador (Ze-Sheng *et al*, 1997). Además de plantas superiores y levaduras, la compartimentalización se ha observado en microalgas *Scenedesmus acutiformis* acumula el Cu en vacuolas y núcleo, se desconoce si es mediante

un transporte activo. El Cd se acumula en el núcleo en *Porphyra umbilicalis* y en el cloroplasto en *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel *et al*,1996).

### **Euglena gracilis**

La posición de los Euglenophytos (del griego *eu*, verdadero, *glene*, globo ocular, *phyton*, planta) dentro de la taxonomía, ha sido tema de discusión debido a sus características particulares. Algunos sistemas de clasificación sitúan a los euglénidos dentro de las algas verdes (Phylum Chlorophyta) debido a su característico color verde hierba. Sin embargo se distinguen de ellos por muchas razones, incluyendo sus pigmentos fotosintéticos. Al igual que los clorofitos y las plantas, los plástidos de los euglenofitos contienen únicamente clorofila *a* y *b*. También contienen  $\beta$ -carotenos y algunos derivados como aloxantina, anteraxantina, diatoxantina, diadinoxantina, neoxantina. Algunos de estos derivados, como la diadinoxantina y la diatoxantina, no se encuentran ni en los clorofitos ni en las plantas. Además los euglenofitos no poseen paredes celulósicas rígidas y en su lugar tienen finas películas compuestas de proteína, las cuales son muy flexibles y permiten cambiar su forma con facilidad. En sentido estricto, no son ni plantas ni animales, pertenecen al reino protocista (Margulis *et al*,1990). En este reino se encuentran las células eucariontes más primitivas, las cuales ya tienen núcleo y un sistema interno de membranas. Los protozoarios más primitivos ya con mitocondrias se agrupan en el phylum Euglenozoa, que incluye a las familias de los kinetoplástidos y los euglénidos. Estudios de tipo filogenético han demostrado que el género *Euglena* forma parte de un grupo de organismos poseedores de núcleo que se separó del resto de eucariontes poco tiempo

después de haber adquirido la mitocondria. Parte de esta suposición proviene de la gran similitud, tanto bioquímicamente como en secuencia de nucleótidos, de las mitocondrias de *Euglena* con las  $\alpha$ -proteobacterias, estos hallazgos sustentan la hipótesis de la teoría endosimbiótica que explica el origen de la mitocondria y los cloroplastos (Buetow, 1982). Desde el punto de vista evolutivo, *Euglena* sería un buen modelo para el estudio de posibles etapas intermedias dentro de la adquisición de mitocondrias. Respecto al metabolismo fotosintético de *Euglena*, este parece tener un origen distinto al de la mitocondria. Según estudios, tanto por comparación de genes como por comparaciones estructurales, los cloroplastos de este género son el resultado de una endosimbiosis con un alga clorofita. La presencia de tres membranas, independientes de las tilacoidales, sugiere que la más externa, llamada pericloroplástica, es propia de *Euglena* y las otras dos provienen del endosimbionte (Buetow, 1982).

#### ***Euglena* como modelo de estudio.**

Se han realizado varios inventarios de las especies de algas presentes en cuerpos de agua que reciben el drenaje ácido de la actividad minera, en dichos lugares se han detectado de 24-76 especies de algas, siendo *Euglena mutabilis* la más abundante. En un muestreo de efluentes industriales, la única especie de alga fotosintética detectada fue *Euglena gracilis* (Hargreaves, 1975). A partir de entonces se han venido realizando estudios que demuestran la capacidad de *Euglena gracilis* para tolerar elevadas concentraciones de metales pesados, lo que ha permitido pensar en la utilización de cepas preadaptadas y seleccionadas en la biorremoción de metales pesados de aguas residuales y



contaminadas, o bien en el reciclaje y recuperación de metales con valor comercial que se encuentran en proporciones mínimas en cuerpos de agua. Dentro de las principales ventajas de este grupo de organismos, sobre los métodos existentes, son. 1.- Uso de materiales renovables que pueden producirse a costos relativamente bajos. 2.-Alta selectividad y afinidad por los metales pesados. 3.- Posibilidad de tratar grandes volúmenes de agua u otros residuos. 4.- Capacidad de funcionar bajo amplios límites de factores fisicoquímicos incluyendo pH, temperatura y presencia de otros iones.

Sin embargo para que sea posible un buen aprovechamiento de estos recursos, es necesario conocer como el metal ingresa al organismo, de que manera afecta su metabolismo y el destino final que le da, teniendo así la posibilidad de influir en los mecanismos que favorezcan la captación y acumulación de metales dejando de lado los que intervengan en su expulsión. Los primeros informes a cerca del uso de microalgas en el tratamiento de aguas residuales corresponden a Cadwell (1946) y Oswald (1957), desde entonces varios autores han establecido la utilidad potencial de las algas para la preconcentración, especiación, separación y detección de metales en muestras acuosas (Cervantes *et al.*, 1999).

*Euglena gracilis* reúne la posibilidad de estudiar a todos los niveles celulares los efectos tóxicos de diferentes compuestos, además es la única especie conocida que pueda ser desprovista de cloroplastos sin que esto implique la muerte del organismo, lo que da la posibilidad de estudiar un efecto tóxico bajo distintos tipos de metabolismo (Margulis, 1990). El cambio en la morfología y el retardo en la división celular fueron de los primeros efectos estudiados sobre la toxicidad del cadmio en *Euglena*. Falchuck, demostró que en

medios conteniendo concentraciones equimolares de Cd y Zn, además de glutamato y malato como fuente de carbono, el crecimiento era típico de células crecidas sin Cd. Este resultado indicaba el antagonismo del Cd y Zn. Después se demostró que el Cd podía desplazar al Zn de biomoléculas con las cuales interactuaba, y que además el Cd tenía afinidad por otras que el Zn no reconocía. La división celular también era afectada, durante su fase final la citocinesis requiere de proteínas con grupos -SH libres, y el cadmio puede interactuar con ellos deteniendo el proceso. Esta suposición correspondía con una aparente multinucleación de las células, sin embargo no fue considerada como poliploidía inducida por Cd debido a que las células se dividían después de un periodo de latencia. En microscopías electrónicas de células crecidas en medio deficiente en Zn, más Cd, se observó también una acumulación de paramilo. Se sabe que el Hg puede inhibir la actividad de la  $\beta$ -1,3 glucanohidrolasa, responsable de la degradación del paramilo en *Euglena gracilis*, sin embargo no se sabe si el Cd o el Zn intervengan en la actividad de esta enzima (Falchuck, 1975).

De Filippis (1981) estudió el efecto del Cd, Zn y Hg sobre el metabolismo de *Euglena* y reportó efectos sobre la respiración y fotosíntesis, en mediciones con células enteras, los tres metales inhiben el consumo de O<sub>2</sub>, tanto en células cultivadas en la oscuridad, como en iluminadas. Sin embargo las concentraciones usadas (Cd 100nM, Zn 1 $\mu$ M, Hg 10nM), no parecen ser significativamente altas para el metabolismo de *Euglena*. En el caso de la fotosíntesis, el fotosistema II (PS II) parece ser el más afectado. Cuando los ensayos se midieron utilizando al H<sub>2</sub>O como donador de electrones, existía una inhibición del 40% en células, sin embargo esta inhibición se elimina al usar DCP (1,5-

dimetilcarbazida), el cual dona los electrones justo despues del sitio donde lo hace el  $H_2O$ , esto indica que el primer sitio de recepci3n de electrones es sensible a los metales usados. Dicha inhibici3n solo se observa durante los primeros d1as de tratamiento e inclusive al octavo dia de cultivo se observa una estimulaci3n del PS II en un 30%. El PS I no muestra la misma sensibilidad. Por otro lado, se sabe que la enzima de cloroplasto NADP-oxidoreductasa juega un papel clave en la formaci3n final de NADPH y que esta enzima requiere en su sitio activo del grupo  $-SH$ , por lo que no es sorpresa que el Zn, Cd y Hg interfieran con su actividad afectando el transporte de electrones.

La fijaci3n de  $CO_2$  en *Euglena gracilis*, se ve inhibida por Cd, en al menos 4 enzimas: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBPC), 3-fosfoglicerato cinasa (PGAK), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (NADP-G3PD), ribulosa-5-fosfato cinasa (Ru5PK), los productos metab3licos en las etapas iniciales de la fijaci3n del carbono son especialmente inhibidas durante la fase exponencial de crecimiento. Los productos m1s afectados son aquellos que dependen de la carboxilaci3n o el uso de ATP, mientras que las enzimas dependientes de NADPH o no-dependientes de energ1a son menos afectadas. La actividad fotorespiratoria favorece la producci3n y acumulaci3n de glicolato, pero este producto es normalmente excretado de la c3lula. La presencia de metales pesados, como el Zn y Cd, provocan una acumulaci3n de glicolato. Esta acumulaci3n se relaciona con el decremento en la actividad de la anhidrasa carb3nica, esta enzima requiere de grupos sulfhidrilos para su actividad, sin embargo se sabe que esta enzima puede saturar de  $CO_2$  por 100 o 1000 veces el requerimiento celular y la inhibici3n de esta enzima solo llega al 20-60% comparado con los controles, por lo que la acumulaci3n de glicolato puede estar

relacionado a otros efectos (De Filippis, 1993)

En *Euglena*. cepa Z, blanqueada y cultivada sin iluminación en medio con glutamato + malato, se observó una inhibición del 83% en la respiración celular con 1mM de Cd. En el caso de las células cultivadas fotoheterotróficamente también se observó una inhibición de la respiración y de la fotofosforilación en presencia de concentraciones crecientes de Cd. Con una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de Cd se inhibe un 30% el consumo de oxígeno y un 45% la fotofosforilación. La síntesis de pigmentos fotosintéticos también se ve alterada, dependiendo del metal y la concentración usada. En la cepa Z, después de ocho días de exposición a 50  $\mu\text{M}$  Cd, la concentración de clorofila aumenta, en el caso de clorofila a de 174 a 218  $\mu\text{g Chl}/10^7$  y en el caso de clorofila b de 30 a 41  $\mu\text{g Chl}/10^7$ . El aumento en la concentración de pigmentos puede deberse a la reducción en la cantidad de complejos antena funcionales, lo que conduciría a una síntesis mayor de pigmentos a fin de compensar la inutilización de los existentes. Por otro lado, realizando un barrido espectrofotométrico, de 400 a 700nm, se observaron tres picos a 409, 433 y 465nm. El perfil del barrido de los pigmentos fotosintéticos cambia después de la exposición a Cd, Hg y Pb, siendo el Hg el metal que más modifica el patrón. El crecimiento celular también se ve afectado según la concentración de metales utilizada. En la misma cepa cultivada en presencia de 100 y 500 $\mu\text{M}$  de Cd, se observó una inhibición del crecimiento del 51 y 88 % respectivamente afectando también la viabilidad celular disminuyéndola al 87 y 65 % en cada caso (Navarro, 1995; Devars, 1998). La acumulación de Cd en *Euglena* es un proceso que en parte depende de luz y temperatura. En la cepa Z fotosintética, pero crecida en medio con 35 mM de láctico, se midió la captación de Cd a 2 y 23°C, bajo iluminación y en

obscuridad. La mayor captación, a los cinco días de crecimiento (3.2  $\mu\text{moles Cd/g}$  peso húmedo) se obtuvo con las células iluminadas y a 23°C, además se demostró que sólo ocurre una internalización del metal después de transcurridas 24 horas, pues el 80 % del Cd removido del medio podía ser recuperado lavando las células con una solución de cisteína 2 mM, una vez transcurridas las 24 horas solo se recupera el 10 % del Cd captado. Del total del Cd internalizado, solo el 10% se encontró en la fracción correspondiente a citoplasma y este no se encontraba unido a proteínas del tipo de metalotioncinas (Barraud y Mestre, 1985). Sin embargo, posteriormente se aislaron péptidos de bajo peso molecular sintetizados en respuesta a la exposición a Cd, capaces de unirlo, estas proteínas contenían grupos -SH y se constituían de Glu, Cys y Gly. Estos péptidos fueron aislados e identificados como fitoquelatinas  $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}]$ , preferentemente con  $n = 2$ , sin embargo los niveles de fitoquelatinas totales comparado con el promedio de otras especies de algas es mucho menor (4.8 vs 13.9- 44.8 nmoles FQ/mg prot. [en 10 microalgas estudiadas] Gekeler, 1988). Esta variación puede deberse a varios factores: la concentración a la que fueron expuestas (20  $\mu\text{M}$ ), casi inocua para *Euglena* puesto que su I.C.<sub>50</sub> es de 100  $\mu\text{M}$ , el tiempo de tratamiento (8 días), es probable que el metal ya hubiese sido detoxificado por otros mecanismos como compartamentalización o unión a compuestos celulares como glutatión o citrato. Se sabe que la activación de síntesis de las fitoquelatinas es del orden de minutos u horas y que en plantas superiores y levaduras las FQ son transportadas a la vacuola y degradadas dejando unido el Cd a citrato, o bien que la síntesis de fitoquelatinas no sea la principal línea de defensa en *Euglena* y la detoxificación se lleve a cabo por otros medios. Para conocer con detalle los mecanismos por los cuales

los organismos desarrollan tolerancia a metales pesados, es necesario saber su localización y los efectos que tenga el metal sobre su metabolismo. Nosotros nos proponemos determinar la forma como *Euglena gracilis* detoxifica el Cd, además de identificar su localización subcelular y describir algunos de los posibles mecanismos de tolerancia que haya desarrollado en respuesta a la exposición al metal.

### **Hipótesis**

Se sabe que solo el 10% del Cd internalizado en *Euglena gracilis* permanece en el citoplasma. Debido a que el Cd afecta la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis, suponemos que el metal puede ser internalizado en organelos como la mitocondria o el cloroplasto.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar los mecanismos de toxicidad y tolerancia a Cd en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones fotoheterotróficas.

### **Objetivos Particulares**

1. Determinar la distribución intracelular de cadmio en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones fotoheterotróficas.
2. Separar e identificar las moléculas sintetizadas en respuesta a la exposición a cadmio.

## Metodología

### Cultivo de *Euglena gracilis*.

Se escogió la cepa Z debido a que en estudios anteriores se ha demostrado que tiene la capacidad de captar mayor cantidad de Cadmio que las cepas B y Sm<sup>r</sup>, sus principales características son 1) tiempo generacional de 10 a 14 horas dependiendo de la fuente de carbono, 2) crecimiento nulo en galactosa y 3) tendencia a blanquearse entre los 34-35°C (Devars,1998 Navarro, 1995) Las células se cultivaron axenicamente en medio Hutner el cual contiene glutamato 35 mM, malato 15 mM, CaCO<sub>3</sub> 0.02%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.08%, ZnSO<sub>4</sub> 0.009%, MnSO<sub>4</sub> 0.008%, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.002%, CoCl<sub>2</sub> 0.00016%, CuSO<sub>4</sub> 0.00039%, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.00028%, NaI 0.000012%, el medio se esteriliza 45 minutos a 20 libras de presión y antes de sembrar se le añade un stock de vitaminas que contiene FeCl<sub>3</sub> (0.0005%, concentración final en el medio), disulfuro de selenio (0.01%), y cianocobalamina (0.005%) previamente filtrado a través de un filtro estéril de 0.22 µm, el pH se ajusta a 3.5 con KOH. En el caso de las células con tratamiento se añadio al medio 100µM y 200µM de CdCl<sub>2</sub> de un stock 25 mM previamente filtrado. Antes de iniciar los experimentos las células fueron activadas a través de resiembras cada 5 días a matraces con 100 ml de medio fresco (Schiff *et al*, 1971, Moreno-Sanchez y Raya, 1987). Los experimentos se realizaron inoculando 1 litro de medio con una alícuota de células con una densidad de 0.4 x 10<sup>7</sup> cels/ml, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 22-27°C con un fotoperiodo de 12 hrs, el crecimiento se siguió tomando alícuotas de 0.2 mililitros en los diferentes días de cultivo y contando las células en una cámara de Neubauer después de la debida dilución e inmovilización celular con HCl 5%.

### Fraccionamiento Celular.

Las células se cosecharon a los 3, 6, y 8 días de iniciado el cultivo centrifugando a 350 rpm durante 10 min. a 4°C, los siguientes pasos se realizaron a esta misma temperatura en el caso de células tratadas con cadmio se tomó 1 ml de sobrenadante para medir la cantidad de metal restante en el medio y se le añaden 50µl de HNO<sub>3</sub> para fijar el metal y evitar contaminación del sobrenadante. El sedimento de células se resuspende en 10 ml de medio con Sacarosa 250mM, HEPES (ácido n-(2-hidroxietyl)piperazin- N-(2-etansulfónico) 10mM, EGTA (etilenglicol-bis(β-amino-etil eter)ácido N,N,N',N'-tetraacetico) 1mM (medio SHE) y se centrifuga una vez mas en las mismas condiciones. Finalmente, el pellet se resuspende en un volumen mínimo de medio SHE, se toma una alícuota de células correspondiente a 10<sup>7</sup> para cuantificar la captación de cadmio, se afora con el mismo medio a 4ml y se añade albúmina de suero bovino delipidada (BSA) a una concentración final de 0.2%, se sonica a una amplitud de 20-22 micrones en un sonicador Branson 450 por intervalos de 10 segundos hasta romper el 70-80% de células, a partir de este momento se tomarán 100-1000 µl de cada una de las fracciones siguientes para cuantificar cadmio (ver apartado correspondiente). La muestra sonicada se afora a 20 ml y se centrifugaba a 500 rpm durante 5 min. para sedimentar núcleos y células enteras, se recupera el sobrenadante y se centrifuga a 4 000 rpm por 10 min. a fin de sedimentar cloroplastos, el sobrenadante recuperado se centrifuga a 10 000 rpm por otros 10 min. para obtener mitocondrias y este último sobrenadante se ultracentrifuga a 45 000 rpm durante 45 minutos para separar citoplasma, fracción microsomal y restos de organelos. A cada uno de los pellets obtenidos y el sobrenadante de la ultracentrifugación se le cuantifica proteína,



clorofita y las distintas enzimas marcadoras y después se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$

### Medición de Proteína

Se determinó proteína por el método Biuret, usando 2ml de NaOH 10%, 100 $\mu\text{l}$  de  $\text{CuSO}_4$  1%, 100 $\mu\text{l}$  de desoxicolato de sodio 0.4%, 600 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  menos el volumen de muestra que por lo general era de 10-20 $\mu\text{l}$  y utilizando BSA como standard 0.5, 1, y 2 mg/ml para eliminar la turbidez por parámetro las muestras se centrifugaron 10 minutos a 3500 rpm en una centrifuga clínica y se midió su absorbencia a 540 nm. En todos los casos se realizaron controles negativos (sin  $\text{CuSO}_4$ ) para eliminar el color debido a la clorofila. Se añadió 1mM de Cd antes y después de agregar el reactivo de cobre y este no afecta la medición de la proteína

### Medición de Clorofila

Se determinó por el método de Arnon, la clorofila se extrajo con 2 ml de acetona al 80% (v/v) a partir de 10-20 $\mu\text{l}$  de muestra, estas se centrifugan a 3500 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y se cubren de la luz, se lee su absorbencia a 663 y 645nm y se calcula la concentración de acuerdo a la siguiente formula .

$$(\text{Abs } 663 \times 8.05) + (\text{Abs } 645 \times 20.29) = X / \mu\text{l extraídos}$$

Se realizaron controles midiendo clorofila en presencia de 1mM de  $\text{CdCl}_2$  y este no afecta las mediciones

## Enzimas Marcadoras

En *Euglena*, más del 90% del DNA total es nuclear (Buetow, 1989), por ello se usó como molécula marcadora de núcleos. Las enzimas del fotosistema II, citocromo oxidasa, fosfatasa ácida y glucosa-6-fosfatasa son las recomendadas como enzimas marcadoras en *Euglena* (Buetow, *op cit.*; De Filippis, *et al.* 1989)

## DNA

Se utilizó una variante del método de Brunk *et al.*(1997), usando DAPI como fluoróforo el cual se intercala en la doble hebra de DNA. A 10µl de muestra, tanto de células como de las diferentes fracciones fue agregado 150µl de NaOH 1N y 1350µl de una solución 0.5µM de DAPI en 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se incubó 10 minutos y se midió la fluorescencia de la solución ( $\lambda_{exc}$ : 360nm,  $\lambda_{em}$ : 450nm, con un slit de 8nm), la concentración de DNA se extrapola de una curva estandar con 0.3 a 6 µg de DNA de alta pureza (Sigma)

## Fotosistema II

La reacción mide el consumo de oxígeno inducido por luz utilizando H<sub>2</sub>O como donador de electrones y metilviologeno como un aceptor artificial el cual reduce al oxígeno resultando en consumo de oxígeno, la reacción se mide con un electrodo tipo Clark, en la cámara utilizamos medio que contiene sacarosa 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 5mM, HEPES 15mM, KCl 10mM, pH 8.0 antes del ensayo se añade metilviologeno 100µM, la muestra se coloca en la cámara del oxímetro cubierta de la luz y la reacción se inicia con luz saturante de un

proyector de diapositivas ( $1000\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para los cálculos solo se toma en cuenta la respiración inhibida por DCMU (diclorofenil dimetil urea) además de la solubilidad del oxígeno a la altitud de la Ciudad de México,  $420\text{ ngatO/ml}$ , calculada en nuestro laboratorio (De Filippis, *et al.* 1989).

### **Citocromo Oxidasa**

La actividad solo se encuentra en mitocondrias, se usa 1-5mg de proteína por ensayo, éste se mide a  $25^\circ\text{C}$  y se lleva a cabo con un electrodo tipo Clark YSI modelo 53 conectado a un oxímetro, el volumen de la cámara (1.5ml) contiene medio KME (KCl 120 mM MOPS 20 mM, 2mM EGTA, pH 7.2 ) con ascorbato 7mM y saturado de  $\text{O}_2$ , citocromo C de caballo 2mM, antimicina 1mM, se coloca la muestra y se induce el consumo de oxígeno con TMPD (N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilén diamina) 2mM, se toma solo en cuenta el consumo de oxígeno inhibido por azida de sodio 10mM. Los cálculos se hacen en base a la solubilidad del oxígeno en la Ciudad de México,  $420\text{ ngatO/ml}$  a  $25^\circ\text{C}$  a 2240 msnm (determinado en nuestro laboratorio; Navarro, 1995).

### **Fosfatasa Ácida**

Hidroliza al grupo fosfato del p-nitrofenil fosfato produciendo p-nitrofenol el cual absorbe luz a 410 nm, esta actividad es específica de lisosomas. Se prepara una solución de reacción 1:1 con p-nitrofenol fosfato (16mM) y acetato de sodio 180 mM pH 5.0, se usa 0.2 ml de solución en tubos de microfuga, se utiliza 10-50 $\mu\text{l}$  de muestra. Se incuba 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , se detiene la reacción con 0.6ml de NaOH 0.25M, se centrifuga 10,000 rpm durante 2 min y se leen en el espectrofotómetro a 410nm. Para cada muestra se utiliza

un control negativo que contiene 0.2 ml acetato de sodio y la misma cantidad de muestra para cada caso. el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol es de 9620 (Graham, 1993)

### Glucosa 6-Fosfatasa

Se utiliza como marcadora de retículo endoplásmico el cual después de la sonicación está en forma de microsomas, se usa una solución de reacción con G-6-fosfato (sal de sodio) 0.1M, buffer de histidina 35mM y EDTA 10 mM en una proporción 2.5:1:1, se prepara un control negativo sin sustrato, solo con histidina y EDTA 3.5:1 para descartar contaminación de los tubos por fosfato y un tubo blanco sin muestra (histidina, EDTA y G-6-P) Se colocan 50 µl de cada muestra y se incuban 30 min. a 37°C, se detiene la reacción con 2.5 ml de TCA 8 % frío y se reposa en hielo 20 minutos, posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min., se toma 1 ml. del sobrenadante se le agrega 1ml de agua, 0.25 ml de molibdato de amonio 2.5% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.1 ml de solución reductora. (0.5 g 1-aminonaftol ácido sulfúrico en 6g de bisulfito de sodio) Se incuban 10 minutos a baño maria y se lee su absorbencia a 820 nm. Los valores obtenidos se extrapolan en una curva con diferentes concentraciones de fosfato 250, 500, 750 ,1000 nmoles/ml además del molibdato de amonio y la solución reductora (Graham, 1993).

### **Medición de Cadmio.**

La captación de cadmio por células y el contenido del metal en las fracciones se midió a la flama en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian spectrAA 640) a una longitud de onda de 228.9 nm. Aliquotas de  $10^7$  células o 100-200 $\mu$ l de las fracciones subcelulares se digirieron en 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 2.5 ml de HNO<sub>3</sub> en una plancha de digestión por 2 horas a 100°C ó hasta que las muestras queden claras y sin fragmentos, cada muestra se aforó a 10ml y se midió la concentración del metal. Se extrapolaron con los datos obtenidos de una curva patrón con 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 ppm del metal (Devars, 1998).

### **Micrografías Electrónicas**

Se tomaron micrografías electrónicas de transmisión para observar los cambios morfológicos que produce el cadmio en las células y en los diferentes organelos, además de corroborar visualmente la existencia de los organelos en las fracciones obtenidas. Se tomaron aliquotas de un mililitro de cada una de las fracciones así como de células enteras, se centrifugaron a 10 000 rpm y se eliminó el sobrenadante con papel absorbente, se le añadió glutaraldehído no polimerizado al 2.5% a pH 7.2. El tratamiento y preparación de las muestras lo llevó acabo Ma Elena Miranda del Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Cardiología.

### ( Cuantificación de Glutación ( Método enzimático )

De cada una de las fracciones obtenidas se tomó una alícuota correspondiente a 10 mg de proteína, se aforó a 1.8ml de KME y se agregó 0.2 ml de PCA 30% frío, a fin de precipitar las membranas, se centrifugó a 3 500 rpm durante 5 min., se tomó 1.6 ml del sobrenadante teniendo cuidado de no resuspender el pellet formado, el sobrenadante acidificado se neutralizó con una mezcla 1:1 de trietanolamina y trifluoroetano, de la cual se añadía 1.2 ml de mezcla por cada ml de sobrenadante, se mezcla en vortex 1 minuto hasta que reaccionen las aminas adquiriendo un color blanco y se centrifuga a 3 500 rpm durante 5 min. El resultado de la centrifugación son tres capas visibles de la cual solo se toma la superior teniendo cuidado de no mezclar las capas, este segundo sobrenadante se ajusta a pH 7.5, los extractos obtenidos se usaron para la cuantificación de glutación, el primer método utilizado fue el de Anderson (1969), para el ensayo se usa 700µl de buffer que contiene fosfato de sodio 143mM y Na<sub>2</sub>-EDTA 6.3 mM, 0.248 mg/ml NADPH, pH 7.5, 100µl de DTNB 6mM, 150µl de H<sub>2</sub>O, 50 µl del extracto neutralizado, la reacción da inicio añadiendo al coctail 5µl de glutation reductasa (266U/ml) y midiendo el cambio de absorbancia a 412 nm en un graficador conectado al espectrofotometro, cada trazo se titula con 1 nmol de GSH para calcular posteriormente la concentración de glutación presente en cada muestra .

### **Medición de Glutación por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Ejecución).**

Los extractos neutralizados se analizaron por HPLC en fase reversa a través de una columna C-18 Waters Nova-Pak. la columna se equilibró con  $H_3PO_4$  al 0.05%, las muestras fueron separadas con un gradiente lineal de 1-20% de acetonitrilo en 0.05% de  $H_3PO_4$  durante 40 minutos a un flujo de 1 ml/min, los grupos sulfhidrilo fueron detectados por su reacción con DTNB (reactivo de Ellman) después de pasar por la columna a un detector y medir los cambios de absorbancia a 412 nm. De igual manera se corrieron estándares de glutación y cisteína y se cuantificó la cantidad de cisteína libre y de glutación comparando las áreas bajo la curva de cada pico detectado comparado con los picos obtenidos de cada muestra (Howe y Merchant, 1992).

## RESULTADOS

### Crecimiento celular

La cepa Z de *Euglena gracilis* entra en fase logarítmica de crecimiento en el día 2 y llega a la fase estacionaria temprana en el día 8 (Fig. 5) alcanzando una densidad celular de  $5.9 \pm 0.5$  millones de cels./ml ( $n = 7$ ,  $\pm$  SD). La presencia de 100 ó 200  $\mu\text{M}$  de cadmio en el medio de cultivo reducen la velocidad de crecimiento dependiendo de la concentración, además hasta el octavo día no se distingue una fase logarítmica de crecimiento. Después de ocho días de cultivo con 100  $\mu\text{M}$  de Cd, la densidad alcanzada fué de  $1.8 \pm 0.4$  millones de cels/ml ( $n = 4$ ,  $\pm$  SD) y con 200  $\mu\text{M}$  de Cd, la densidad alcanzada fue de  $0.9 \pm 0.2$  millones de cels/ml ( $n = 7$ ,  $\pm$  SD).

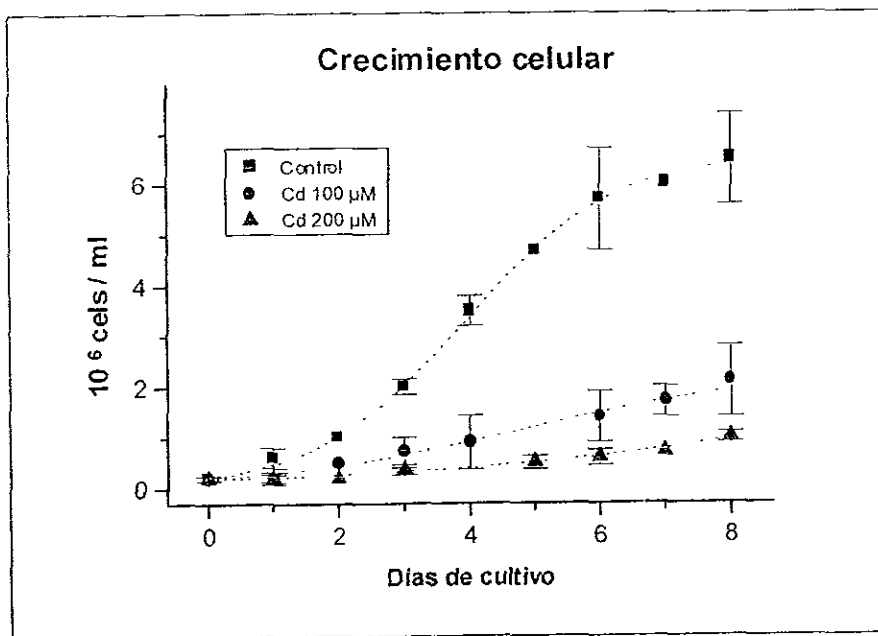


Fig.5 *Euglena gracilis* cepa Z cultivada en medio Hutner (glutamato-malato), con un fotoperiodo de 12 hrs, en ausencia ■ (6) y en presencia de Cd 100  $\mu\text{M}$  ●(3) ó 200  $\mu\text{M}$  ▲(5), Media  $\pm$  SD (n)



Las células tratadas con cadmio presentan una mayor concentración de proteína respecto a las células no tratadas, esta elevación es de 2.5 veces en las células cultivadas con 100  $\mu\text{M}$  de Cd y de 2.6 veces en el caso de 200  $\mu\text{M}$  (Tabla 4). La concentración de clorofila no varía significativamente entre los tratamientos y las células control. Por otra parte, la captación de cadmio fue dependiente de la concentración de cadmio utilizada, las células tratadas con 200  $\mu\text{M}$  Cd captaron 1.4 veces más que las células cultivadas en 100  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 4** Concentración de proteína, clorofila y captación de metal en células de *Euglena* tratadas y no tratadas con cadmio.

Cd $\mu\text{M}$	Proteína mg / $10^7$ cels	Clorofila $\mu\text{g Chl} / 10^7$ cels	Cadmio nmoles Cd / $10^7$ cels
0	4 $\pm$ 0.7 (5)	42.5 $\pm$ 10 (5)	-
100	10.1 $\pm$ 0.7 (4)	48.5 $\pm$ 9 (4)	183 $\pm$ 30 (3)
200	10.4 $\pm$ 0.8 (4)	55 $\pm$ 15 (4)	272 $\pm$ 55 (5)

Las células fueron cultivadas 8 días en presencia o ausencia de Cd como se indica en Materiales y Métodos, (n)  $\pm$  SD.

### Identificación de fracciones subcelulares. Actividad de enzimas y moléculas marcadoras.

#### DNA

Se midió DNA como molécula marcadora de la fracción nuclear, tomando en cuenta el número de células que sedimentaron a 500 rpm y conociendo la cantidad de DNA en  $10^7$  células pudimos restar el DNA perteneciente a células enteras, las cuales no se rompieron durante la sonicación. En ninguna otra fracción se observaron células enteras. La distribución de DNA fue similar en las tres condiciones de cultivo, encontramos que el DNA se encuentra distribuido

principalmente en dos fracciones, el pellet de 500 rpm y el pellet de 45000 rpm, sin embargo en los tres casos, en ausencia y en presencia de cadmio, la primera fracción (500 rpm) muestra una mayor cantidad de DNA que la fracción membranal, aproximadamente el 50% (Fig. 6). La fracción recuperada de la ultracentrifugación (45 000 rpm) contiene del 35-40 % del DNA y el resto se divide en las fracciones subsecuentes. De modo que consideramos a la fracción que sedimenta a 500 rpm como la fracción enriquecida con núcleos.

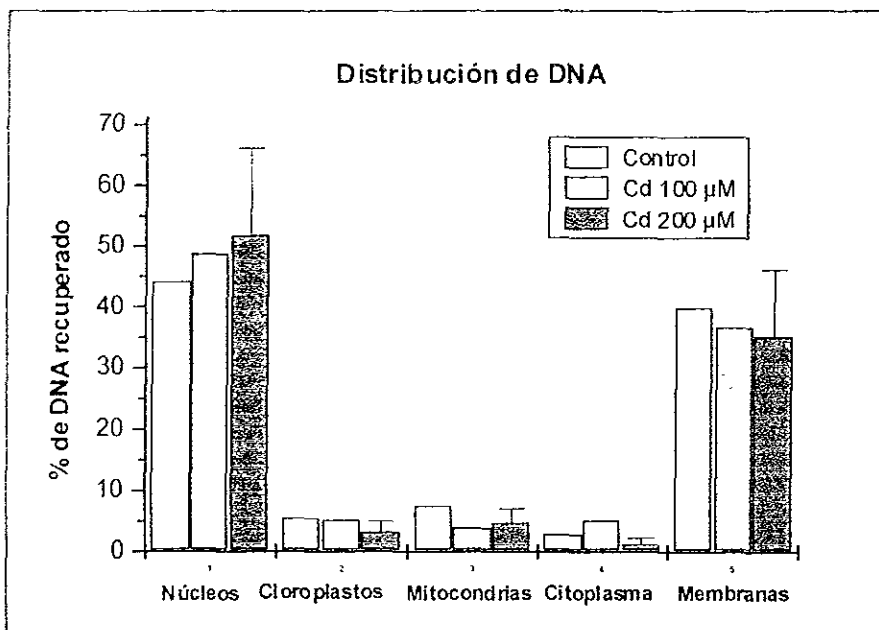


Fig. 6 Distribución de DNA en las fracciones obtenidas de las centrifugaciones diferenciales. Control (□, promedio de 2), Cd 100µM (□, promedio de 2), Cd 200 µM (■, n = 3 ± SD)

### Actividad del fotosistema II

La actividad del fotosistema II se usó como actividad marcadora de cloroplastos, en el caso de las células tratadas con Cd, la actividad del fotosistema II se encuentra estimulada, en ambos casos la fracción que sedimenta a 4 000 rpm es la que muestra mayor actividad

(Fig 7), las células tratadas con 200  $\mu\text{M}$  de Cd, muestran una mayor estimulación del fotosistema II (6.1 vs 4.9 ngAtO/min/ $\mu\text{g}$  Chl) En el caso de las células control no se observa un máximo de actividad como en las células tratadas: en la fracción de 4 000 rpm tenemos una actividad de 1.72 ngAtO/min/ $\mu\text{g}$  Chl., 3 veces menor que la misma fracción de las células tratadas con 200 $\mu\text{M}$  de cadmio, sin embargo micrografías electrónicas de esta fracción muestran que se encuentra enriquecida con cloroplastos. Debido a que el metilviológeno, aceptor artificial de electrones del fotosistema I, no es permeable a las células enteras no fue necesario eliminar esta actividad de la fracción enriquecida con núcleos, de cualquier manera existe actividad del fotosistema II en las fracciones enriquecidas con núcleos, mitocondrias y membranas y la alteración del organelo por cadmio permitió el mejor seguimiento de la actividad.

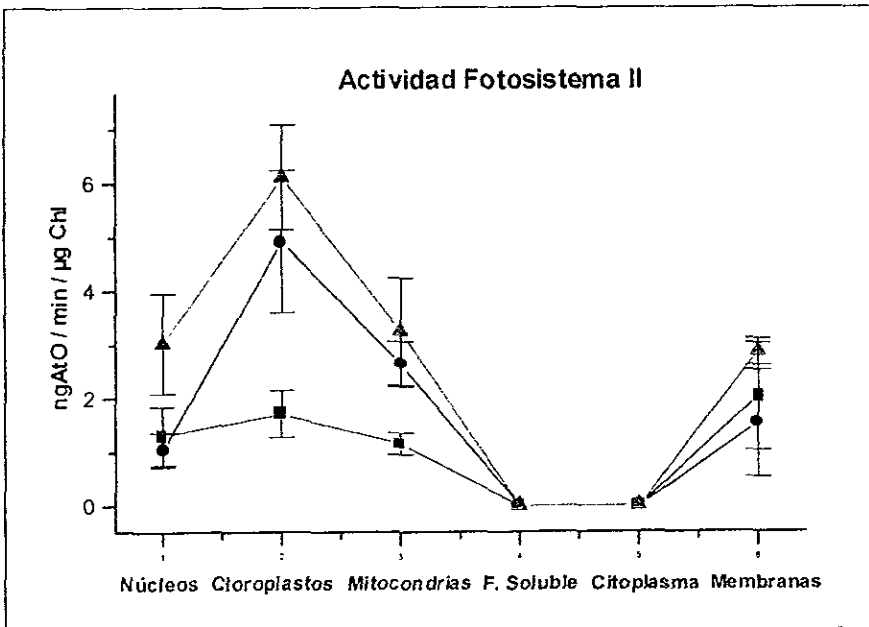


Fig. 7 Actividad del fotosistema II. Medición con metilviológeno como aceptor artificial de electrones y sensible a DCMU, control (■), Cd 100  $\mu\text{M}$  (●) y Cd 200  $\mu\text{M}$  (▲), ( $n = 5$ ;  $\pm$  SD)

Por otro lado, la determinación de clorofila en las distintas fracciones de las células cultivadas con cadmio, muestra que entre 45-55 % del total fue recuperado en la fracción de 4000 rpm (Fig 8). sin embargo la fracción enriquecida con núcleos, la mitocondrial y membranal contienen clorofila lo que nos indica que una parte de los cloroplastos sedimentaron en esas fracciones, de estas la fracción nuclear es la que contiene mayor cantidad de clorofila 30-40 % respecto a las fracciones membranal y mitocondrial siendo ésta la que menor cantidad de clorofila contiene, el citoplasma no se muestra en la gráfica debido a que no contiene clorofila. En el caso de las células control la distribución de clorofila fue similar en las fracciones enriquecidas con núcleos y la fracción de 4000 rpm, 30 % en ambos casos, lo que indica una mayor sedimentación de cloroplastos en la fracción nuclear y de igual manera la clorofila restante se distribuye entre la fracción mitocondrial y la fracción membranal, siendo esta última la que menor cantidad de clorofila contiene.

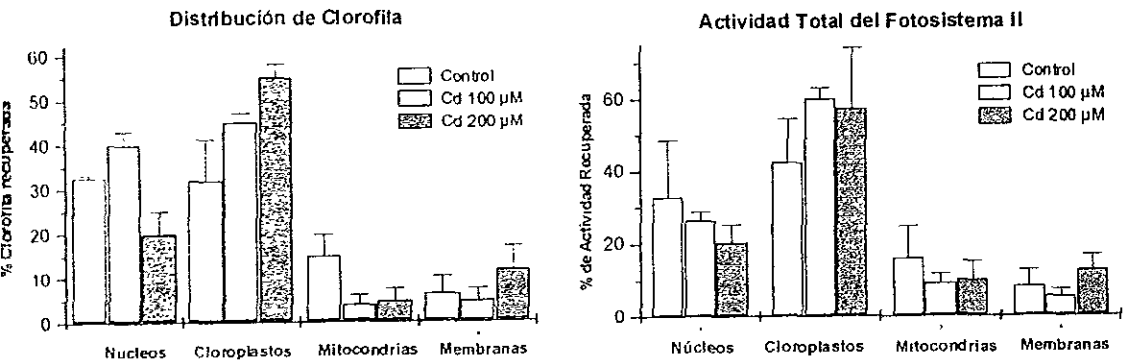


Fig 8 Distribución total de clorofila y actividad total del fotosistema II, para las células control ( $n = 3 \pm SD$ ), para las cultivadas con  $100\mu\text{M Cd}$  ( $n = 3 \pm SD$ ), para células cultivadas con  $200\mu\text{M Cd}$  ( $n = 4 \pm SD$ )

En todos los casos, la fracción de 4000 rpm contiene la mayor actividad recuperada del fotosistema II, entre 50-60 % (Fig. 8). Las células cultivadas con Cd 100  $\mu$ M muestran la mayor actividad recuperada (60 %), siguiendo las células cultivadas con Cd 200  $\mu$ M (57 %) y por último las células control (40 %), estas también presentan la mayor contaminación por cloroplastos en la fracción nuclear (32%) mientras que las células cultivadas con cadmio solo presentan el 27 y 20 % de contaminación en la misma fracción. En la fracción mitocondrial y membranal existe actividad del fotosistema II, aunque en menor proporción que la fracción nuclear y la propia cloroplástica, lo que indica también su contaminación por cloroplastos.

#### **Actividad de TMPD-Oxidasa**

La actividad de la citocromo oxidasa, usando TMPD como donador artificial de electrones, se usó como marcadora de la fracción mitocondrial. Para el caso de las células control, existe un incremento en la actividad específica entre las fracciones desde la primera centrifugación (500 rpm. 14 ngAtO/min/mg) alcanzando la máxima actividad en la fracción que sedimenta a 10 000 rpm (34.9 ngAtO/min/mg), que es la fracción donde esperábamos recuperar la mayor actividad mitocondrial (Fig.9), la fracción que contiene las membranas también muestra una actividad importante, 20 ngAtO/min/mg, similar a la fracción enriquecida con núcleos y la que contiene células enteras. Debido a que esta actividad se midió mediante un donador artificial de electrones (TMPD) y este es permeable a la célula entera, una parte de la actividad en la fracción nuclear es atribuible a células

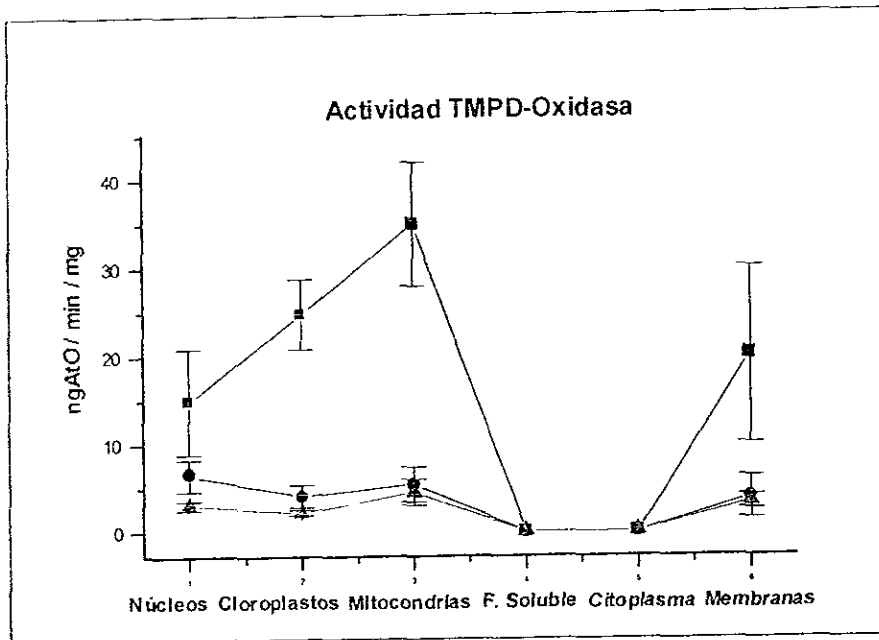


Fig. 9 Actividad de Citocromo Oxidasa sensible a azida de sodio, usando TMPD como donador artificial de electrones, control ■, Cd 100 µM ● y Cd 200 µM ▲, (n = 5; ± SD).

Por otra parte, el tratamiento con cadmio inhibió la actividad de la citocromo oxidasa por lo que no se observaron máximos de actividad en ninguna de las fracciones, sin embargo las micrografías electrónicas mostraron que las fracciones que sedimentaron a 10 000 rpm, en ambos casos tanto de células tratadas con 100 como con 200µM de Cd, estaban enriquecidas con mitocondrias, de modo que esta fracción se consideró como *mitocondrial*.

A fin de conocer el efecto del cadmio sobre las enzimas de las cuales se midió su actividad, se tomaron las fracciones de las células control enriquecidas con cloroplastos y mitocondrias (4000 y 10000 rpm) y se titularon con diferentes concentraciones de cadmio (Tabla 5), la actividad mitocondrial fue más sensible al cadmio que la actividad del fotosistema II, con 100 µM de Cd, la actividad de la citocromo oxidasa se inhibió en un 50%, y con 200 µM

Cd, la inhibición fue mayor al 60%. El fotosistema II resultó menos sensible y no mostró diferencia entre las diferentes concentraciones de cadmio utilizadas, manteniendo una inhibición de la actividad entre 4 y 10 %, sin embargo no se observó la estimulación del fotosistema observada después de ocho días de cultivo con cadmio

Tabla 5 Inhibición de la actividad de la citocromo oxidasa y el fotosistema II por cadmio

Cd ( $\mu\text{M}$ )	Citocromo oxidasa ngAtO / min / mg		Fotosistema II ngAtO / min / $\mu\text{g}$ Chl	
		% Inhibición		% Inhibición
0	47.3 $\pm$ 17		31 $\pm$ 1.5	
10	44.5 $\pm$ 3.7	5.8 %	ND	ND
50	27.1 $\pm$ 4.2	42.7 %	3 $\pm$ 0.07	4 %
100	23.0 $\pm$ 5.6	51.3 %	2.8 $\pm$ 0.2	9 %
200	17.3 $\pm$ 1.5	64 %	2.9 $\pm$ 0.09	6 %

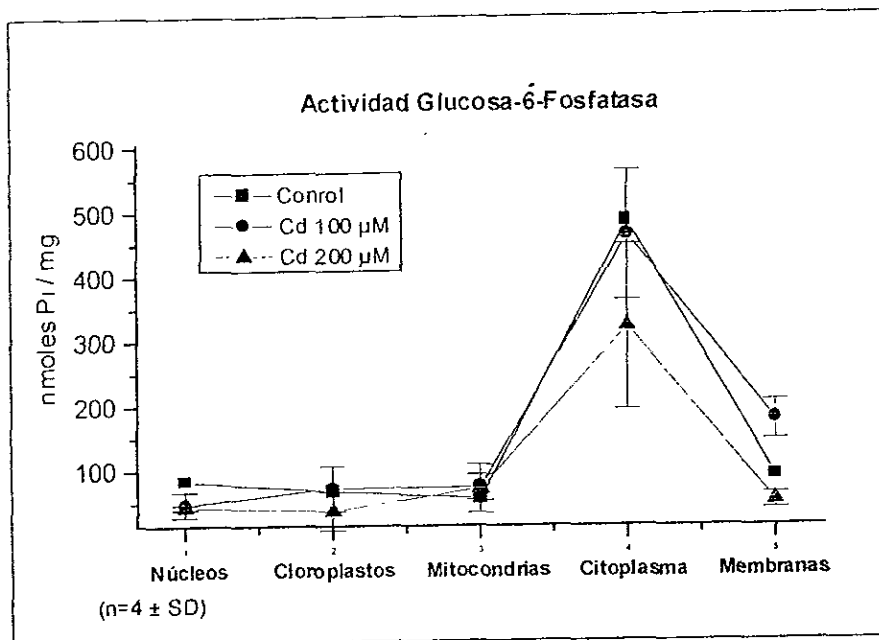
La actividad de citocromo oxidasa fue determinada en la fracción que sedimenta a 10,000 rpm y la del fotosistema II en la fracción que sedimenta a 4000 rpm. (ND, No Determinada, n= 4,  $\pm$  SD)

#### Actividad de Glucosa-6-Fosfatasa y Fosfatasa Ácida.

El retículo endoplásmico puede formar microvesículas en los homogenados celulares y algunas de ellas pueden sedimentar a altas velocidades, esta fracción se conoce como fracción microsomal y se utiliza la enzima glucosa-6-fosfatasa como enzima marcadora de esta fracción. El cadmio no afectó la actividad de esta enzima, por lo que el patrón de actividad en las fracciones es el mismo en las tres condiciones de cultivo. La fracción que contiene la mayor actividad es el sobrenadante de la ultracentrifugación, fracción que también contiene al citoplasma, en los tres casos la actividad oscila entre 350-400 nmoles de

P<sub>i</sub> mg (Fig 10)

En ninguna de las fracciones restantes se observan picos evidentes. sin embargo cada una de ellas presenta contenido de fosfato el cual varía entre 50-80 nmoles P<sub>i</sub>/mg. esta cantidad de fosfatos no implica la actividad de la enzima, puede ser producto de fosfatasas inespecificas presentes en las diversas fracciones.



**Fig. 10** Actividad de la enzima Glucosa-6-Fosfatasa, marcadora de reticulo endoplásmico, en las diferentes fracciones subcelulares, las muestras fueron incubadas durante 30min. en presencia del sustrato

Para el caso de la fosfatasa ácida, marcadora de lisosomas, el cadmio tampoco afectó la actividad de la enzima (Fig 11). En las tres condiciones de cultivo, encontramos un máximo de actividad en la fracción del citoplasma, entre 130 y 150 µmoles de P<sub>i</sub>/mg, sin embargo las fracciones enriquecidas con mitochondrias y las fracciones membranales estan



contaminadas con lisosomas mostrando una actividad importante de esta enzima. La contaminación de lisosomas en la fracción mitocondrial y membranal es mas evidente en las células cultivadas con cadmio, en la fracción mitocondrial existe una actividad de la enzima que oscila entre 80 y 120  $\mu\text{moles Pi/mg}$ , mientras en la fracción membranal existe una actividad similar a la encontrada en el citoplasma, la cual en el caso de las células cultivadas en presencia de cadmio oscila entre 100 y 130  $\mu\text{moles de Pi/mg}$  (Fig. 11).

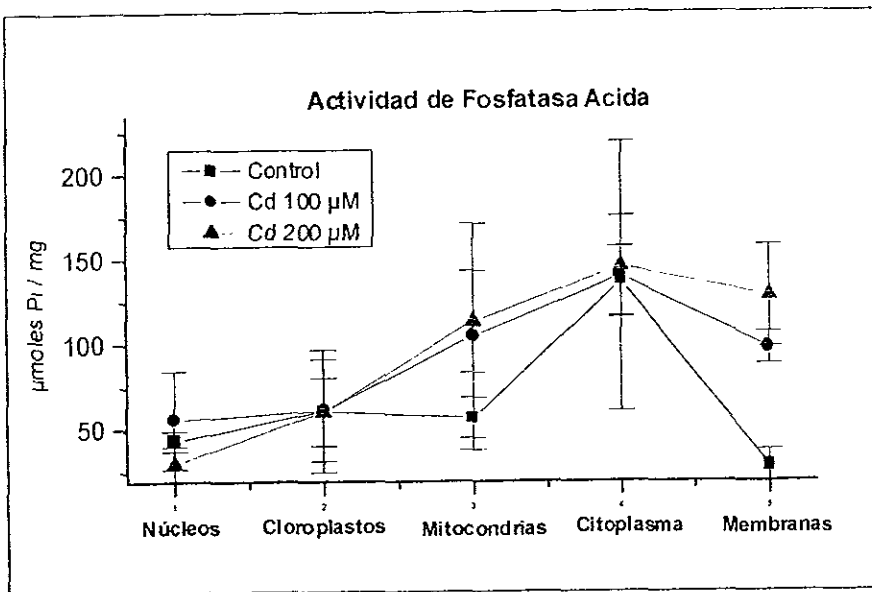


Fig 11 Actividad de la enzima fosfatasa ácida, marcadora de lisosomas, en las diferentes fracciones subcelulares ( $n = 4 \pm \text{SD}$ ).

### Distribución intracelular de cadmio

Para calcular la distribución de cadmio en las fracciones, se restó a la fracción enriquecida en núcleos, el cadmio y la clorofila que pertenecía a células enteras. Calculamos

la relación de cadmio/clorofila en la fracción enriquecida con cloroplastos (1.5 nmoles Cd /  $\mu\text{g}$  Chl) y pudimos restar el cadmio que pertenecía a cloroplastos sedimentados en las fracciones enriquecidas con núcleos y mitocondrias y sumarla a la enriquecida con cloroplastos. Encontramos una distribución similar en los dos tratamientos. en ambos casos el 50% del cadmio esta asociado a la fracción de cloroplastos (Fig 12), en el caso de las células tratadas con 100  $\mu\text{M}$ , la fracción nuclear contiene 30% del cadmio y el citoplasma 12%, esta relación varia con el tratamiento de 200 $\mu\text{M}$ , donde el el citoplasma contiene el 20% del cadmio recuperado y la fracción nuclear solo el 12 %, en ambos casos la fracción mitocondrial contiene solo el 10% del cadmio y las membranas el restante

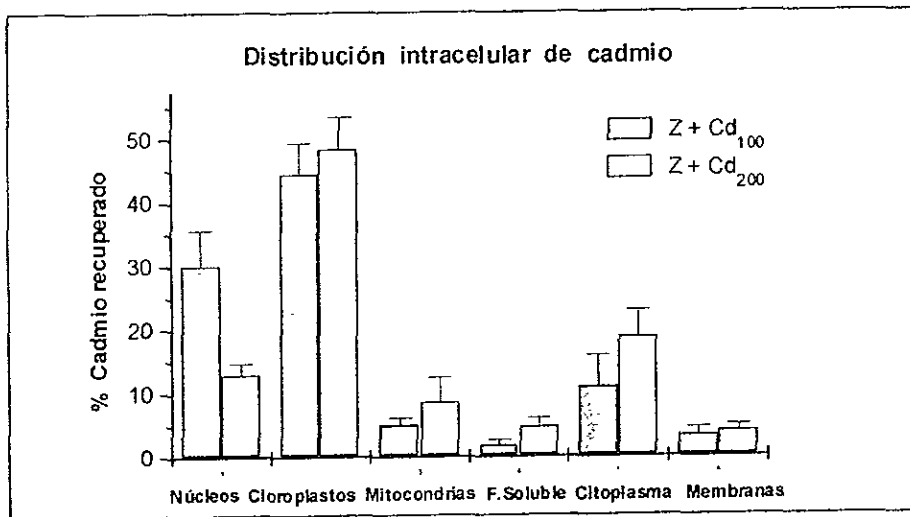


Fig 12 Distribución intracelular de cadmio en células de *Euglena* cultivadas con 100 $\mu\text{M}$  Cd ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ) y 200  $\mu\text{M}$  Cd ( $n = 5 \pm \text{SD}$ ) y cosechadas a los 8 días de cultivo

Se midió también la distribución de cadmio en células cosechadas al tercer día de cultivo (Fig. 13), en el caso de las células cultivadas con Cd 100  $\mu\text{M}$ , las fracciones de citoplasma y cloroplasto contienen la mayor cantidad de cadmio 30 % En ambas fracciones, esta

cantidad cambia respecto a las células cosechadas el octavo día, en donde el 45 % del cadmio se localiza en la fracción enriquecida con cloroplastos, y el citoplasma solo contiene el 15 % del metal recuperado, la fracción nuclear permanece sin cambio aparente y conserva el 30 % del cadmio. De igual manera, en las células cultivadas en presencia de Cd 200  $\mu\text{M}$ , la distribución del cadmio cambia cuando las células se cosechan al tercer día. En este caso las fracciones nuclear, mitocondrial y cloroplástica contienen cantidades similares de cadmio, mientras que al octavo día el 50% del cadmio se encuentra asociado a la fracción de cloroplastos, la fracción nuclear solo presenta el 15 % del cadmio y el citoplasma el 20 %

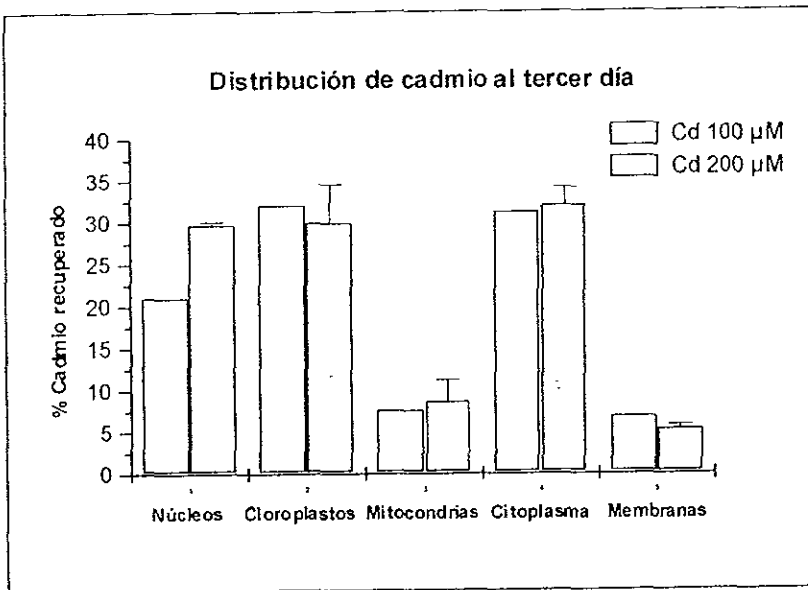


Fig. 12 Distribución intracelular de cadmio en células cultivadas con Cd 100  $\mu\text{M}$  (n = 2) ó Cd 200  $\mu\text{M}$  (n = 3) y cosechadas al tercer día

### Glutación

Se midió el glutatión presente en cada una de las fracciones y se encontró que el tratamiento con cadmio induce un aumento en la concentración intracelular de glutatión

(Fig 13) En las tres condiciones de cultivo la mayor cantidad de glutatión se encontró en el citoplasma. aunque las otras fracciones muestran una concentración de glutatión que oscila entre 2 y 5 nmoles de GSH/mg El tratamiento con *cadmio* incrementa la concentración de glutatión dependiendo de la concentración de cadmio utilizada, y este aumento se da exclusivamente en el citoplasma. En las células tratadas con 100µM Cd, el glutatión se incremento de 15nmoles GSH/mg a 31 nmoles/mg y con 200 µM de cadmio, se incremento hasta 51 nmoles GSH/mg proteína.

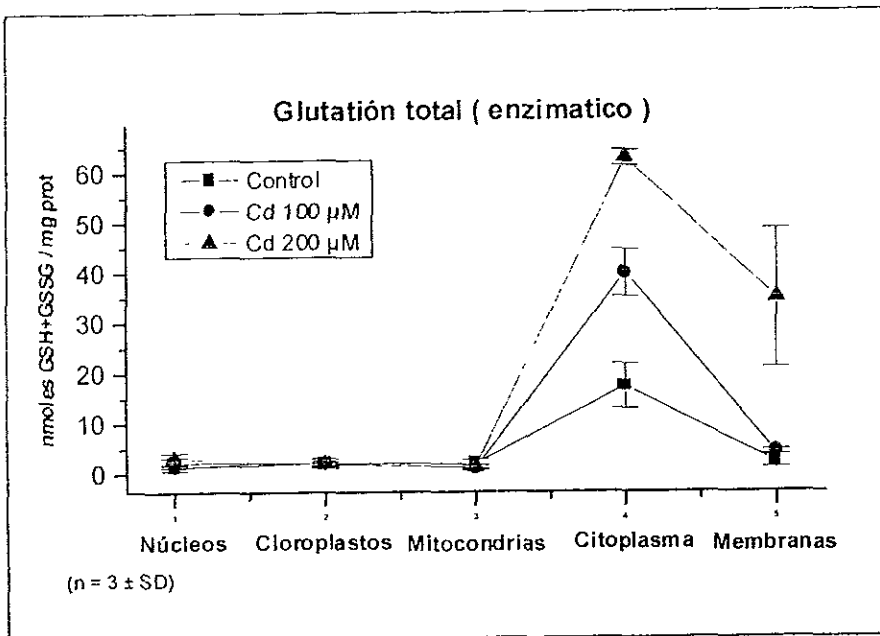


Fig. 13 Concentración de glutatión total (GSH+GSSG) en cada una de las fracciones obtenidas usando el método enzimático.

### Detección de Glutatión y Fitoquelatinas (HPLC)

A fin de separar e identificar moléculas que fuesen sintetizadas en respuesta a la exposición a cadmio, se analizaron extractos con ácido perclórico de citoplasmas de células

control y células cultivadas con 200 $\mu$ M de Cd. Se analizaron por HPLC en un gradiente de 0 a 20 % de acetonitrilo en 0.05% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, derivatizando con 1 mM de DTNB a fin de reaccionar los grupos -SH monitoreando su absorbencia a 412nm, usando estándares a la cisteína y al glutatión (100 $\mu$ M). Encontramos que bajo las condiciones de este gradiente, la cisteína tiene un tiempo de retención (RT) de 2.5  $\pm$  0.1 min (n = 4  $\pm$  SD; Fig 14), el glutatión tiene un RT de 5.0  $\pm$  0.2 min (n = 4  $\pm$  SD, Fig.15). En las células control se puede observar, además de las señales de cisteína y glutatión (Fig.16), un componente intermedio con RT de 3.9  $\pm$  0.18 (n = 3  $\pm$  SD) que puede corresponder al precursor del glutatión ( $\gamma$ -Glu-Cys) o bien a su producto de degradación (Cys-Gly). Después del glutatión no se detectan otros componentes

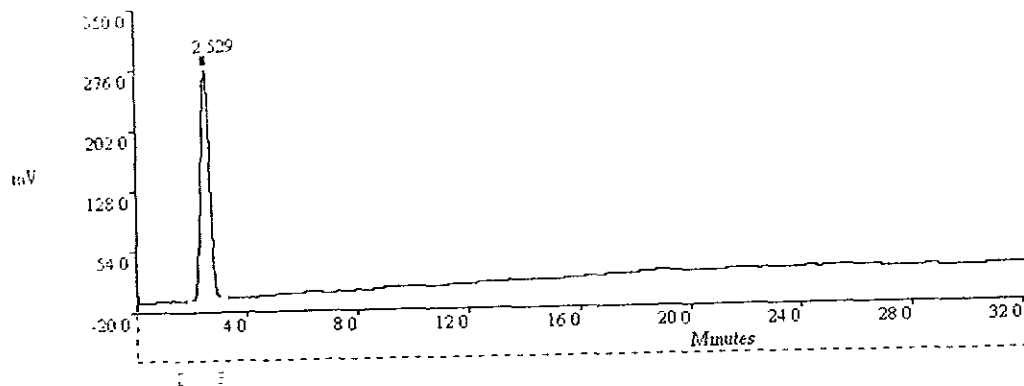


Fig.14 Cromatograma HPLC de un estándar de cisteína. (7 nmoles, escala DO 0.5).

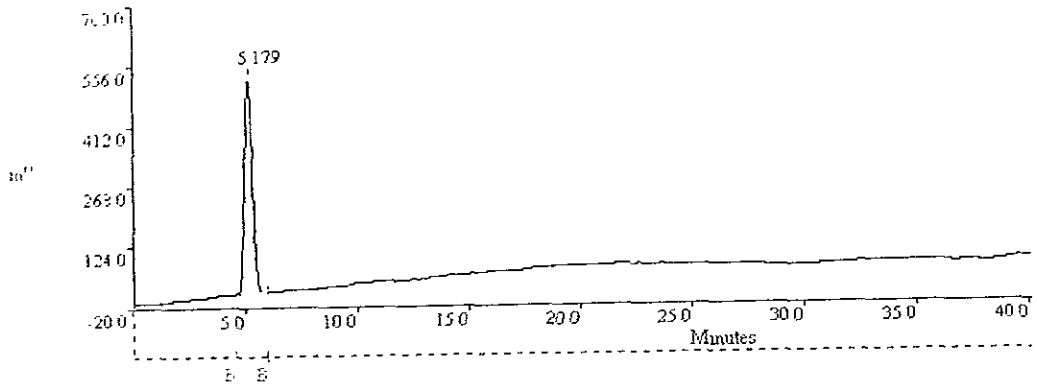


Fig. 15 Cromatograma HPLC con un estándar de 5 nmoles de glutatión (DO 0 2)

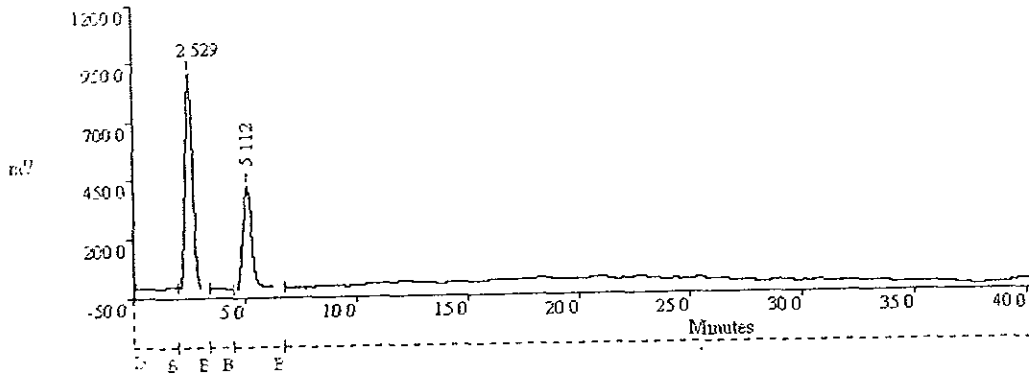


Fig. 16 Cromatograma HPLC con un etandares de cisteína (7nmoles) y glutatión (5nmoles) DO 0.2.

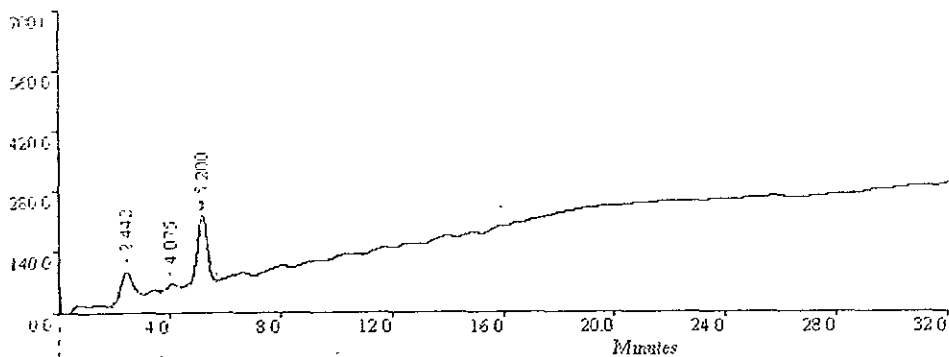


Fig. 17 Extracto perclórico de la fracción citoplásmica de células de *Euglena gracilis*. (DO 0.1)

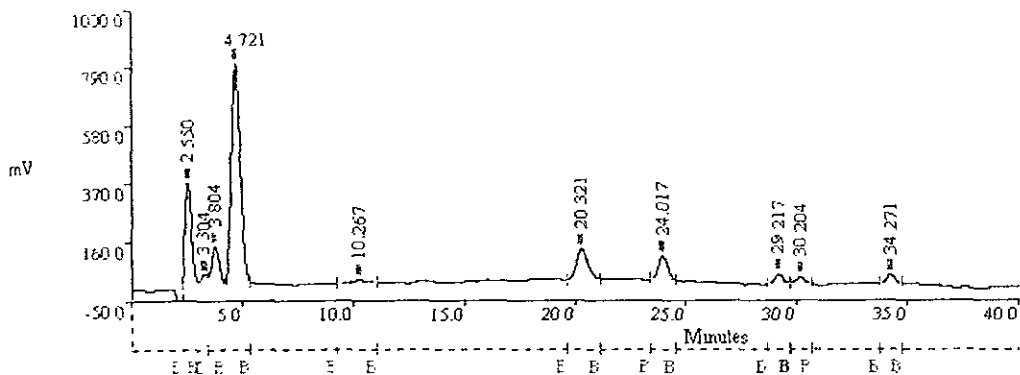


Fig.18 Extracto perclórico de la fracción citoplásmica de *Euglena gracilis* cultivada con 200  $\mu$ M de cadmio y cosechada al octavo día (DO 0.2)

La medición por HPLC muestra un aumento en las concentraciones de cisteína y glutatión en el citoplasma de células cultivadas en presencia de Cd 200  $\mu\text{M}$ , en el caso de la cisteína este aumento fue de 2.6 veces (Tabla 6) respecto al citoplasma de las células control. En el caso del glutatión existe un aumento de 2.5 veces en su concentración respecto al citoplasma de las células control, este aumento es menor que el encontrado midiendo el glutatión enzimáticamente. Además, el tratamiento con 200  $\mu\text{M}$  de Cd induce la síntesis de péptidos de bajo peso molecular con grupos -SH (Fig.17), estos componentes tienen un tiempo mayor de retención que el glutatión (Tabla 6) y sus RT son de  $10.26 \pm 0.02$  min,  $20.42 \pm 0.52$  min,  $24.46 \pm 0.88$  min y  $34.56 \pm 0.81$  min.

Tabla 6 Péptidos de bajo peso molecular con grupos -SH analizados por HPLC.

Metabolito	Tiempo de retención (min)	Citoplasma control nmoles -SH / mg	Citoplasma Cd 200 $\mu\text{M}$ nmoles -SH / mg
Cisteína	$2.5 \pm 0.1$	$4.5 \pm 2.8$	$11.7 \pm 5.8$
a	$3.9 \pm 0.2$	$0.3 \pm 0.3$	-
Glutatión	$5.0 \pm 0.2$	$11.6 \pm 6.3$	$30 \pm 9.8$
b	$10.2 \pm 0.02$	-	$1.1 \pm 0.4$
c	$20.4 \pm 0.5$	-	$1.5 \pm 2.3$
d	$24.4 \pm 0.8$	-	$1 \pm 1.4$
e	$34.5 \pm 0.8$	-	$0.59 \pm 0.4$

(n = 3  $\pm$  SD)





**Micrografía 1.** *Euglena gracilis* cultivada en medio Hutner (glutamato +malato) con un fotoperiodo de 12hrs. y cosechada al octavo día de cultivo (células control)



**Micrografía 2.** Células cultivadas con Cd 200  $\mu$ M y cosechadas al octavo día (3150x)



**Micrografía 4.** Fracción obtenida por centrifugación a 10 000 rpm. Dicha fracción se encuentra enriquecida con mitocondrias (16 000x).



**Micrografía 3.** Fracción obtenida por centrifugación a 4 000 rpm. Dicha fracción se encuentra enriquecida con cloroplastos (6 300x).

## Discusión

### Crecimiento celular

En la curva de crecimiento de *Euglena gracilis*, cepa Z (Fig 5) se puede observar que la fase *lag* de crecimiento dura 24-48 horas, posteriormente el cultivo entra en fase logarítmica de crecimiento llegando a la fase estacionaria temprana al octavo día, la adición de cadmio al medio de cultivo tanto 100 como 200  $\mu\text{M}$  reduce significativamente la velocidad de crecimiento y durante los ocho días de cultivo no se distingue la entrada a una fase logarítmica de crecimiento. Esta disminución en la velocidad de crecimiento se ha atribuido, tanto a daños o alteraciones en el metabolismo del DNA (replicación, reparación y recombinación) como en los procesos envueltos en la división celular Falchuck *et al.* (1975) determinaron el contenido de DNA en células de *Euglena* expuestas y no expuestas a cadmio, encontraron que las células expuestas detenían su ciclo celular en fase S ó G<sub>2</sub>, además las células contenían de 2 a 3 veces más cantidad de DNA que las células no preexpuestas a cadmio en fase G<sub>1</sub> (fase estacionaria de crecimiento, día trece de cultivo), por lo que discuten la posibilidad de que el cadmio interaccione con grupos -SH de proteínas que confieren elasticidad a la célula deteniendo así el proceso de división. Otros reportes corroboran que el cadmio detiene a las células en fase G<sub>2</sub> del ciclo celular, es decir justo después de la replicación y a punto de entrar en mitosis (Fase M), sin embargo no es claro si el cadmio interactúa con proteínas necesarias para la replicación del DNA o con el mecanismo de división propio de la célula (Bonaly, 1980, Nakano, 1978). Se sabe que la DNA pol III, principal responsable de la replicación, contiene grupos -SH e interactúa con iones metálicos como el Zn, por lo que el cadmio pudiese afectar su actividad. La inhibición de esta enzima se ha comprobado para metales como el plomo y cadmio y se ha

demostrado que estos metales se unen a la enzima y no al molde de DNA, a los *primers* ni a los nucleótidos trifosfato. Por otro lado ciertos factores de transcripción (*zinc fingers*) requieren de interacción con zinc y el cadmio puede reemplazarlo afectando su función (Mildvan, 1981). Adicionalmente, se ha comprobado que el cadmio interfiere con los procesos de reparación del DNA, sobre todo con aquellos involucrados en la remoción de daño causado por agentes alquilantes o radiación UV. En células hepáticas de ratón, el cadmio inhibió a la O<sup>6</sup>-Metilguanina DNA metiltransferasa (MGTasa), la cual protege a las células de agentes alquilantes al recibir el grupo metilo de la O<sup>6</sup>-Metilguanina revirtiendo y reparando así el daño por agentes alquilantes (Hartwig, 1993). El daño causado por el cadmio en el metabolismo del DNA explica en parte el porque las células no entran en una marcada fase logarítmica de crecimiento en los primeros ocho días de cultivo. Sin embargo se ha observado, en la cepa Z de *Euglena gracilis* cultivada en medio láctico y 0.5 mM de CdCl<sub>2</sub>, que después de un periodo de latencia y detoxificación que dura aproximadamente 10 días, existe una fase logarítmica de crecimiento que culmina en una fase estacionaria apenas por debajo de las células cultivadas en ausencia de cadmio (Bonaly, *op.cit*).

La inestabilidad de algunos metales en los medios de cultivo se ha relacionado con el aparente reestablecimiento de los cultivos celulares. Por ejemplo, la toxicidad del Cr y Hg está directamente relacionada con su estado de oxidación, para el mercurio, la especie tóxica es en forma de Hg<sup>2+</sup> y para el cromo es Cr<sup>6+</sup>, estas especies son inestables y los dos pueden reducirse tanto química (reaccionando con compuestos del medio de cultivo) como biológicamente (enzimas que catalizan estas reacciones como mecanismos de tolerancia). El Hg<sup>0</sup> es volátil y desaparece del medio de cultivo y el Cr<sup>6+</sup> se reduce a Cr<sup>3+</sup> el cual es mucho menos tóxico (Summers y Silver, 1978; Ishibashi *et al*, 1990). Estos cambios

favorecen las condiciones para que las células que lograron sobrevivir durante los días que se llevaron a cabo estas transformaciones logren reestablecer el cultivo entrando en una fase logarítmica y posteriormente llegando a una fase estacionaria. A diferencia de estos metales, el cadmio en el medio de cultivo es estable y no se ha reportado su transformación. Tampoco se ha reportado en algas, como para otros organismos, su expulsión fuera de la célula lo que hace suponer mecanismos celulares internos de captación (quelación o redistribución) del cadmio que permitan el reestablecimiento y el crecimiento del cultivo.

### Proteína

Otra característica que resulta del cultivo en presencia de cadmio es un aumento en la concentración de proteína por célula, de 2.5 veces en el caso de las células cultivadas con Cd 100  $\mu$ M y de 2.6 en el caso de 200  $\mu$ M (Tabla 4), se sabe que el cadmio puede interactuar con los grupos -SH de las proteínas disminuyendo su actividad o inutilizándolas por completo, de modo que la célula debiera sintetizar nuevamente estas proteínas, además de las que debe sintetizar como parte de los mecanismos de tolerancia. En *Arabidopsis* se ha demostrado que el cadmio y el cobre inducen la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo del glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa, glutatión sintetasa, glutatión reductasa), este metabolito está relacionado con diversos mecanismos de tolerancia a metales (Xiang, 1998). En *Brassica juncea* también se estudió la transcripción de los RNAm de las enzimas involucradas en la síntesis de glutatión además de la última enzima involucrada en la biosíntesis de cisteína, la OAS(thiol)lisisa, se encontró un aumento en la cantidad de RNAm de todas las enzimas estudiadas en respuesta a la exposición a cadmio,

sin embargo el aumento más evidente fue en el gen que corresponde a la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa (Holger, 1998) Un aumento en la transcripción de genes (cantidad de RNAm) no significa un aumento en la cantidad de proteína debido a que el RNA esta sujeto a diversos procesos de maduración, sin embargo si es evidencia indirecta que puede sugerir un aumento en la cantidad de proteína y además sugiere un mecanismo de respuesta a nivel transcripcional por exposición al metal que involucra a enzimas cuyo producto es precursor de fitoquelatinas (Xiang, *op cit*)

### Clorofila

Se sabe que el cadmio afecta la biosíntesis de clorofila, nosotros no encontramos una diferencia significativa entre las concentraciones de las células cultivadas en presencia o ausencia de cadmio (Tabla 4). En experimentos *in vitro* se ha demostrado que el cadmio afecta la enzima protoclorofilida reductasa, una enzima clave en la biosíntesis de la clorofila, esta enzima es igualmente inhibida por N-etilmaleimida lo que sugiere la presencia de grupos -SH que pueden ser ocupados por el cadmio, la acumulación de ácido  $\delta$ -aminolevulínico y de porfirinas sugiere que este metal afecta también a las enzimas  $\delta$ -aminolevulinato deshidratasa y la porfobilinógeno desaminasa, las cuales también requieren de grupos -SH para su catálisis (Stotbar, 1985)

Navarro *et al* (1997) tampoco reportaron diferencia significativa en la concentración de clorofila de células de *Euglena gracilis* cultivadas en presencia de CdCl<sub>2</sub> 50 y 250  $\mu$ M, pero si se encuentran diferencias cuando las células son cultivadas con Cd 500  $\mu$ M, donde las células tienen una concentración de clorofila 1.9 veces más alta que las células control. Devars *et al* (1998) reportaron un aumento no significativo en la concentración de clorofila *a* (174 $\pm$ 24 vs 218 $\pm$ 19;  $\mu$ g/10<sup>7</sup> cels.) y un aumento significativo de clorofila *b* (30 $\pm$ 3 vs



41:3.  $\mu\text{g } 10^7$  cels ) en células de *Euglena gracilis* cultivadas con Cd 50  $\mu\text{M}$ . En células heterotrofas cultivadas en presencia de Cd 500 $\mu\text{M}$  se ha reportado la pérdida de la capacidad de producir carotenoides lo cual se refleja como la desaparición de picos en el espectro de absorción de estos, 400-500nm, donde el pico característico de 465nm desaparece en las células cultivadas con cadmio (Navarro, 1995).

### **Identificación de fracciones subcelulares.**

#### **Núcleos**

Usamos el DNA como molécula marcadora de la fracción nuclear, su distribución en células cultivadas en presencia o ausencia de cadmio fue similar, entre el 45 y el 50% del DNA fue encontrado en la fracción que sedimenta a 500 rpm (Fig 6). El método de Brunk *et al* usando DAPI como fluoróforo para DNA es confiable debido a que solo fluoresce cuando se intercala en DNA de doble hebra eliminando la posible contaminación por RNA de doble hebra o DNA de cadena sencilla. Además las centrifugaciones a baja velocidad son usadas en otros protocolos donde se han aislado núcleos de *Euglena gracilis* (Buetow, 1989), de modo que esta fracción fue considerada como nuclear. Las micrografías electrónicas de esta fracción no muestran estructuras que asemejen núcleos, se pueden observar células enteras, cloroplastos, mitocondrias. Algunos de estos organelos se muestran dañados por lo que suponemos que estos junto con los núcleos puedan romperse o fragmentarse durante la sonicación y sedimenten a altas velocidades arrastrando consigo una parte del DNA, de ahí que el pellet de la ultracentrifugación contenga el 30-37% de DNA restante. Se sabe que el DNA hemimetilado (recién replicado) puede embeberse en membranas lipídicas y que el DNA de organelos como la mitocondria o el cloroplasto

contienen un solo sitio de iniciación de la replicación y este está anclado a la membrana por lo que restos de organelos y membranas rotas con DNA unido solo sedimentarían a altas velocidades (Harrison, 1989; Skarstad 1994)

### Actividad del fotosistema II

El cadmio en el medio de cultivo, tanto 100 como 200  $\mu\text{M}$ , estimuló la actividad del fotosistema II lo que permitió un mejor monitoreo de la actividad (Fig. 7). En ambos casos la mayor actividad se encuentra en la fracción que sedimenta a 4 000 rpm. De Filippis *et al* (1981) midieron la actividad del fotosistema II en *Euglena gracilis* cultivada en presencia de cadmio 0.1  $\mu\text{M}$  usando metilviológeno como aceptor artificial de electrones y encontraron que durante los primeros días de tratamiento la actividad estaba disminuida, sin embargo a partir del cuarto día de cultivo la actividad se estimulaba respecto a las células control alcanzando su máxima estimulación al día 10 (69 vs 179  $\mu\text{mol O}_2/\text{h}\cdot\text{mg Chl}$ ), si bien la concentración de cadmio es mucho más baja que la usada en este trabajo, nosotros también encontramos una estimulación del fotosistema II al octavo día de cultivo, lo que permitió un mejor monitoreo de la actividad. En el caso de las células control no se distingue un pico de actividad en las fracciones sin embargo por las micrografías electrónicas del pellet de 4 000 rpm y debido a que en esta fracción se encuentra la mayor cantidad de la actividad total del fotosistema II y clorofila recuperada, consideramos que era una fracción enriquecida con cloroplastos. Adicionalmente, las micrografías electrónicas (ver páginas finales de resultados) muestran, que tanto en las células control como las tratadas con cadmio, los cloroplastos se encuentran dañados probablemente debido a la sonicación. Los cloroplastos sedimentaron desde la primera centrifugación (500

rpm). en la fracción nuclear se encuentra entre el 20-25% de la actividad restante del fotosistema II además del 20-30% de la clorofila recuperada lo que indica que esta contaminada con cloroplastos

### Actividad TMPD-Oxidasa

En el caso de las células control, la mayor actividad de esta enzima la encontramos en el pellet de 10 000 rpm (Fig 9), sin embargo en las células cultivadas con cadmio no se pudo distinguir un pico de actividad entre las fracciones. Se sabe que el cadmio afecta a las enzimas de la cadena respiratoria, particularmente a la succinato deshidrogenasa debido a que requiere grupos -SH para su actividad, en mitocondrias de hígado de rata 5 $\mu$ M de cadmio es suficiente para inhibir la fosforilación asociada con la oxidación de succinato o citrato, mas no se conoce la forma como el cadmio pudiese afectar a la citocromo oxidasa. La estructura tridimensional de esta enzima muestra la presencia de metales como el Cu, aparte del Fe que compone a los grupos hemo, por lo que se ha especulado en estos sitios como blanco donde pudiese actuar el cadmio (Calhoun, 1994). Para conocer el efecto de este metal sobre la citocromo oxidasa de *Euglena*, titulamos con cadmio la fracción enriquecida con mitocondrias de las células control (Tabla 5) Encontramos que una concentración de 100 $\mu$ M es suficiente para inhibir 50% su actividad lo que explica el porque no obtuvimos actividad con las fracciones de las células cultivadas con cadmio. Navarro *et al* (1995) reportaron una inhibición de la misma proporción pero en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* cultivadas heterotróficamente (en una cepa carente de cloroplastos). Sin embargo las micrografías electrónicas (ver páginas finales de resultados) muestran que los pellets de 10 000 rpm estan enriquecidos con mitocondrias

por lo que consideramos, en todos los casos, a esta fracción como mitocondrial.

#### **Glucosa-6-fosfatasa y fosfatasa ácida.**

El cadmio no afectó la actividad de estas enzimas. En el caso de la glucosa-6-fosfatasa la mayor actividad la obtuvimos en el sobrenadante de la ultracentrifugación (100 000g) junto con el citoplasma (Fig.10). Durante la ruptura celular, el retículo endoplásmico tiende a formar vesículas, lo que se conoce como fracción microsomal (Buetow, 1989). Estas vesículas sedimentan a altas velocidades, sin embargo en este caso solo algunas de ellas sedimentaron en la ultracentrifugación. En el caso de los lisosomas encontramos que la mayor actividad de la fosfatasa ácida se encuentra en la fracción soluble. En el caso de las células cultivadas con cadmio encontramos además, una actividad importante de esta enzima en las fracciones enriquecidas con mitocondrias y membranas (Fig. 11) Se sabe que los lisosomas y las mitocondrias pueden unirse, e inclusive embeber sus membranas, lo que explica porque la fracción mitocondrial pueda estar contaminada con lisosomas, otros métodos donde se ha intentado aislar mitocondrias de *Euglena* también han encontrado contaminación con lisosomas, lo que dificulta obtener preparaciones puras de ambos organelos (Buetow, *op cit*).

#### **Distribución Intracelular del Cadmio**

Tanto en las células cultivadas con 100 y 200  $\mu\text{M}$  de cadmio, el 40 y el 50% del metal recuperado se encuentra asociado a la fracción enriquecida con cloroplastos. Sin embargo en otras fracciones la distribución cambia según la concentración de cadmio

usada, en el caso de las células cultivadas con 100  $\mu\text{M}$ , la fracción nuclear contiene el 30% y el citoplasma poco más del 10%, a diferencia de las células cultivadas con 200  $\mu\text{M}$ , donde el citoplasma contiene el 20% del cadmio recuperado y la fracción nuclear solo el 12%. Es posible que la fracción nuclear de las células cultivadas con 100  $\mu\text{M}$  estuviese más contaminada con cloroplastos que la misma fracción de células cultivadas con 200  $\mu\text{M}$  lo que explicaría la diferente distribución. Esta suposición se basa en la cantidad de clorofila (no perteneciente a células enteras) en la fracción nuclear de ambos tipos de cultivo. La fracción nuclear de las células cultivadas con Cd 100  $\mu\text{M}$  contiene más clorofila que las células cultivadas con 200  $\mu\text{M}$  (Fig.8). Debido a que el medio en el cual fueron centrifugadas las células (SHE) contiene EGTA (1mM) y este es un quelante de metales pesados, podemos asegurar que el cadmio en esta fracción se encuentra internalizado y no unido a carboxilos en la parte externa de la membrana cloroplástica. Se ha demostrado que el cadmio puede ser compartimentalizado en diferentes organelos, en plantas superiores se transporta a la vacuola por medio de fitoquelatinas (Zenk, 1998), al igual que en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida glabrata* (Ze-Sheng, 1997). En algas la distribución intracelular del cadmio es más heterogénea, en *Porphyra umbilicalis* y *Fucus vesiculosus* se acumula en el núcleo mientras que en *Chlamydomonas reinhardtii* se acumula en cloroplastos (Lignell *et al.*, 1982, Nagel *et al.* 1996). Si bien existe poca relación filogenética entre *Euglena* y *Chlamydomonas*, es en el metabolismo fotosintético donde se encuentra la mayor relación. Estos dos organismos presentan similitudes en los pigmentos fotosintéticos y algunos carotenos, además la presencia de tres membranas en el cloroplasto de *Euglena* sugiere la posibilidad de una endosimbiosis con un alga clorofita, como lo es *Chlamydomonas* (Buetov, 1982)

Existe también un cambio en la distribución del cadmio a través del tiempo (Fig. 12). Tanto en las células cultivadas con 100 como con 200  $\mu\text{M}$ , al tercer día de cultivo hay más porcentaje de cadmio en el citoplasma (30% en ambos casos) que al octavo día (10 y 20%) y menor porcentaje en los cloroplastos al tercer día (30% en ambos casos) que al octavo (40 y 50%). En las fracciones restantes el porcentaje se mantiene similar. Este cambio en la distribución sugiere su transporte del citoplasma al cloroplasto. En levaduras se ha reportado la existencia de un transportador de cadmio (codificado por el gen YCF1), el cual transporta al metal del citoplasma a la vacuola en forma de (bis)glutatonato de cadmio (2 GSH: 1Cd) a expensas de ATP, este transportador no es específico para cadmio-glutación pues su expresión coincide con tolerancia a ciertas drogas. Además, en la misma levadura se ha reportado el gen HMT1 el cual codifica para otro transportador vacuolar específico para fitoquelatinas con  $n=2$  (Ze-Sheng, 1997). Ni en *Chlamydomonas* ni en ninguna otra alga se ha reportado la existencia de un transporte de cadmio del citoplasma al cloroplasto, sin embargo la presencia de fitoquelatinas tanto en el citoplasma como en el cloroplasto de *Chlamydomonas* sugiere su transporte (Nagel, 1996).

### Glutación

Existe un aumento significativo de glutación en las células cultivadas en presencia de cadmio (Fig 13), este aumento es proporcional a la concentración de cadmio usada y solo se da en la fracción que contiene al citoplasma y en el caso de las células cultivadas en Cd 200  $\mu\text{M}$  también se da en la fracción que contiene las membranas. Tomando en cuenta que el 50% del cadmio se encuentra asociado a la fracción de los cloroplastos y que en estos la cantidad de glutación no se eleva significativamente respecto a las células

control, podemos suponer que el glutatión no interviene en el transporte del cadmio al cloroplasto o si interviene, el glutatión no ingresa al cloroplasto unido al cadmio como sucede en las vacuolas de *Schizosaccharomyces* (Ze-Sheng, 1997). Se sabe que el cadmio es activador de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa, cuyo producto es precursor del glutatión ( $\gamma$ -glutamilcisteína) por lo que puede intervenir en el aumento de este. Además el cadmio es el más potente activador de la fitoquelatína sintetasa, la cual utiliza glutatión como sustrato, lo que pudiese favorecer la activación de la glutatión sintetasa al consumir la poza de glutatión, sin embargo se conoce que el cadmio es un inhibidor de esta enzima (glutatión sintetasa) pero debido a que la síntesis de glutatión es regulada a múltiples niveles, no se descarta una activación final debida a la presencia del cadmio. Este metal también actúa a nivel transcripcional aumentando los niveles de mRNA de todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de glutatión, particularmente se ha encontrado un aumento en los niveles de mRNA de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa lo que sugiere que el cadmio además de activar a las enzimas, activa su transcripción (Xiang, 1998). La función del glutatión, en *Euglena*, pudiese ser la de quelar al cadmio en el citoplasma impidiendo que interaccione con otras biomoléculas inactivando así su función, además de servir como sustrato para la síntesis de fitoquelatínas

### **Cromatografías en HPLC**

Una vez identificados los tiempos de retención para la cisteína y glutatión pudimos calcular su concentración en los extractos citoplásmicos. Existe un aumento tanto en la cantidad de cisteína como en la cantidad de glutatión (Tabla 6). En el caso de la cisteína, ya se ha comentado que el grupo de Holger (1998) encontró un aumento en la cantidad de mRNA de la enzima OAS(thiol)lasiase la cual participa en la última reacción de la síntesis de

cistema, sin embargo no hay reportes acerca de la activación de esta o de otras enzimas involucradas en la síntesis de cisteína por cadmio. Coppellotti (1989) describió, en *Euglena gracilis*, un aumento en el contenido de tioles solubles en ácido (AST) después de una exposición a 44.5  $\mu\text{M}$  de cadmio, Devars *et al* (1998) también reportaron un aumento en el contenido de AST por la exposición a 100 y 500  $\mu\text{M}$  de Cd. Se sabe que la mayor concentración de  $-\text{SH}$  dentro de la célula es en forma de glutatión y en menor proporción de cisteína por lo que un aumento en los AST se reflejaría directamente en estos metabolitos (Meister, 1976). El aumento en los AST debido a la exposición al cadmio se ha atribuido a una activación de la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa, por formar conjugados glutatión-Cd que impiden que el glutatión inhiba a esta enzima, (Cherian y Vostal, 1977) o porque el cadmio active directamente a esta enzima, como se ha propuesto para el plomo (Hsu, 1981). El glutatión medido por HPLC refleja un aumento, inducido por cadmio, menor respecto al medido enzimáticamente, sin embargo la cantidad de glutatión en citoplasma de células control, es la misma medida por los dos métodos (enzimático y HPLC). Esta disminución la hemos atribuido a que el método enzimático detecta el glutatión total, reducido más oxidado, mientras en HPLC solo se detecta el glutatión reducido. Sabemos que en condiciones normales, tanto en células animales como vegetales y *Euglena* (Buetow, 1982), la mayor cantidad de glutatión se encuentra en forma reducida gracias a la actividad de la glutatión reductasa, sin embargo no conocemos esta situación cuando las células son expuestas a 200  $\mu\text{M}$  de cadmio, de cualquier manera existe un aumento de 2.7 veces en la cantidad de glutatión en el citoplasma de estas células.

La finalidad de hacer HPLC fue encontrar péptidos de bajo peso con grupos  $-\text{SH}$  del tipo de las fitoquelatinas usando el gradiente propuesto por Gekeler (1988). En los citoplasmas



de células control, después del glutatión no es detectable ningún compuesto con las características antes señaladas, sin embargo en los citoplasmas de las células cultivadas con  $200\mu\text{M}$  de cadmio (Fig.16) existen compuestos con diferentes tiempos de retención (Tabla 6) y debido a que estos son sintetizados en respuesta a la exposición a cadmio y poseen tiempos de retención mayores a los del glutatión, suponemos que son del tipo de las fitoquelatinas. No podemos asegurar que su estructura sea  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , debido a que no conocemos su secuencia de aminoácidos, sin embargo sabemos que contienen grupos –SH por su reacción con DTNB y particularmente el pico con un tiempo de retención de 20.4 min coincide con el reportado por Al-lahham (1999) para una fitoquelatina con  $n=3$ . Para conocer la identidad de estas moléculas es necesario aislarlas y secuenciarlas o analizar por HPLC estándares conocidos de fitoquelatinas y comparar los tiempos de retención entre las moléculas.

## CONCLUSIONES

De los siguientes resultados podemos concluir.

1 - Como ya se había reportado, la exposición a 100 y 200  $\mu\text{M}$  de cadmio reduce la velocidad de crecimiento en *Euglena gracilis* dependiendo de la concentración; a los ocho días de cultivo no existe un reestablecimiento del cultivo, por lo que no se observa una fase logarítmica de crecimiento. Además la captación de cadmio es dependiente de la concentración, las células cultivadas con 200 $\mu\text{M}$  de cadmio captan más metal que las cultivadas con 100  $\mu\text{M}$

2 - La actividad de la citocromo oxidasa es inhibida por cadmio, una concentración de 100 $\mu\text{M}$  es suficiente para reducir su actividad en un 50%

3 - El cadmio estimula la actividad del fotosistema II a los ocho días de cultivo, esta estimulación es dependiente de la concentración y en este caso 200  $\mu\text{M}$  es la que más estimulación presenta

4 - Mas del 50% del cadmio internalizado, a los ocho días de cultivo, se localiza en los cloroplastos

5 - La exposición a cadmio induce un aumento en el contenido de glutatión dependiente de la concentración de cadmio utilizada y este aumento solo se da en el citoplasma.

6 - La exposición a cadmio induce la síntesis de péptidos de bajo peso molecular con grupos tioles. Algunos de ellos pertenecen al grupo de las fitoquelatinas.

## PERSPECTIVAS

Este trabajo, al igual que otros realizados anteriormente sobre el tema, han tenido siempre en mente la utilización de *Euglena gracilis* en la biorremoción de metales pesados de aguas contaminadas. El uso de microorganismos para este propósito ya ha sido estudiado y se han comprobado ventajas sobre las técnicas no-biológicas de recuperación de metales. Dentro de estas ventajas están: uso de material renovable, fácil producción y mantenimiento de cultivos, además de bajos costos de producción. Sin embargo para llegar a la correcta utilización de este recurso es necesario conocer los mecanismos que intervienen en la acumulación de metales a fin de llevarlos a su máxima capacidad y no desaprovechar el recurso. Este trabajo ha dado evidencia acerca de los mecanismos por los cuales *Euglena* es capaz de tolerar elevadas concentraciones de cadmio y en donde es que lo acumula, lo que da pauta a posteriores estudios que se ocupen de determinar el porque el cadmio es internalizado en los cloroplastos. La elevación en las concentraciones de glutatión da otra evidencia de como se puede mejorar la capacidad de quelación del cadmio dentro de este organismo, haciendo necesario el estudio de la vía biosintética del glutatión a fin de detectar las enzimas clave de esta vía que puedan ser sujetas a regulación y sobreexpresión y que puedan favorecer la síntesis de fitoquelatinas. La baja concentración de estas en *Euglena*, respecto a otras algas hace pensar en la posibilidad de sobreexpresar la fitoquelatina sintetas favoreciendo una elevación en la concentración de estas lo que pudiera reflejarse en una mayor acumulación, mayor tolerancia y probablemente un mayor transporte del cadmio al cloroplasto.

Si bien existen estudios en otros organismos sobre la expresión de los genes involucrados

en la síntesis de glutatión, no se conoce nada acerca de ellos en *Euglena*. Se conoce poco, comparado con otros organismos, acerca de la forma de expresión genética en este organismo y se cree que puede haber diferencias en los mecanismos de regulación y expresión, tanto a nivel de RNA como de traducción y transporte de proteínas. El trabajo a futuro consistirá en un análisis molecular, por medio de sondas fabricadas contra las secuencias más conservadas de las proteínas que participan en la síntesis de compuestos capaces de quelar al cadmio y que ya han sido descritas en otros organismos, a fin de ubicar los genes que codifican para las mismas proteínas en *Euglena*, se estudiará su expresión bajo diferentes condiciones, sin cadmio y con distintas concentraciones de este a fin de conocer su regulación por metales pesados. Por otra parte se buscará el vector ideal para *Euglena* capaz de mantener estable el DNA externo que contenga el gen o los genes de las proteínas clave, identificadas previamente, y que pueda ser regulado y expresado mediante factores externos controlados por el investigador a fin de “activar” la cepa y que esta sea capaz de concentrar metales favoreciendo el sanamiento de aguas contaminadas. Y no solo se busca limpiar aguas contaminadas, este tipo de tecnología serviría también para concentrar metales de importancia industrial, como oro, plata u otros metales preciosos que se encuentran en mínimas concentraciones en cuerpos de agua.

## Referencias

- Atal N, Sradhi PP, Mohanty L. 1991 Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of weath seedlings with low concentrations of cadmium. *Plant Cell Physiol.* 32, 934-951.
- American Chemical Society En su pagina <http://www.acs.com> actualizada el 19-dic-1999.
- Bazzas MB, Govindjee. 1974 Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. *Environ Lett.* 6, 1-12.
- Baszynski T. 1986 Interference of  $Cd^{2+}$  in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants. *Acta Societatis Botanicorum* 55, 291-304.
- Bonaly J, Bariaud A, Duret S, Mestre J. 1980 Cadmium cytotoxicity and variation in nuclear content of DNA in *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 49:286-290.
- Bariaud A, Mestre JC . 1984 Heavy metal tolerance in cadmium-resistance population of *Euglena gracilis*. *Bull. environ. Contam. Toxicol.* 32, 597-601.
- Brown, T., LeMay,H. 1985 Química. Prentice-Hall Hispanoamericana. p. 70-85.
- Brunk UT, Dalen H, Roberg K. 1997 Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 23(4):616-26
- Buetow DE, 1982. *The Biology of Euglena* . Vol. III. Academic Press Inc. 636p
- Buetow DE, 1989. *The Biology of Euglena* . Vol. IV. Academic Press Inc. 527p.
- Calhoun MW, Thomas JW, Gennis RB. 1994 The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Review. TIBS* 19 325-330.
- Cervantes C, Moreno-Sanchez R, Cañizares-Villanueva, Gutierrez-Corona F, Gonzales-Moreno S, Devars RS, Sosa-Luna L. 1999 Biorremediación de los desechos contaminados por metales pesados. Cap.7 –en *Contaminación ambiental por metales pesados*. (Moreno-Sanchez R.y Cervantes C. Ed.) AGT. México.117-153p.
- Cherian MG, Vostal JJ. 1977 Biliary excretion of cadmium in rat. Effects of chelating agents and change in the intracellular thiol content on biliary transport and tissue distribution of cadmium. *J. Toxic. Environ. Hlth.* 6, 379-391.
- Clarkson,T. 1995 Health effects of Metals: A role for Evolution? *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 1):9-12.

- Coppellotti, O 1988 Gluthatione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* exposed to copper and cadmium. Comp. Biochem. Physiol. Vol 94C, No 1 35-40
- Covián GM, 1999 Purificación y caracterización del complejo bc<sub>1</sub> de mitocondrias de *Euglena gracilis*, Tesis de Licenciatura Biología, Facultad de Ciencias. UNAM. Mexico 119p.
- Devars RS, Gonzalez-Moreno S, Cañizares-Villanueva O, Sosa-Luna L, Moreno-Sanchez R, 1999 Tolerancia a los metales pesados en algas. Cap.4 -en Contaminación ambiental por metales pesados. (Moreno-Sanchez R.y Cervantes C. Ed.) AGT. México.61-78p
- Devars S, Hernández R, Moreno-Sanchez R. 1998 Enhanced Heavy Metal Tolerance in Two Strains of Photosynthetic *Euglena gracilis* by Preexposure to Mercury or Cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 128-135.
- De Filippis, LF. Hampp R. Ziegler, H. 1981 The effects of Sublethal Concentrations of Zinc, Cadmium and Mercury on *Euglena*. Arch Microbiol 128:407-411
- De Filippis LF, Hamp R, Ziegler H 1993 Effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. Plant Physiol. 142 : 162-167.
- Diaz-Barriga F 1991 Principios de la toxicidad del cadmio. Ciencia y Desarrollo. 17; 61-68.
- Diels L, Dong Q, Baeyens W. 1995 The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34; from resistance mechanism to removal heavy metals . J. Indust. Microbiol. 14, 142-453.
- Falchuck KH, Fawcett DW, Vallee BL 1975 Competitive antagonism of cadmium and zinc in the morphology and cell division of *Euglena gracilis*. J. Submicr. Cytol. 7, 139-152.
- Galvao LAC, Corey G.1987 Cadmio. Serie Vigilancia. No 4. Centro panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Edo de Mexico.
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1988 Algae sequester heavy metals via phytochelatin complexes. Arch. Microbiol. 150: 197-202.
- Goldstein GW. 1990 Lead poisoning and brain function. Environ Health Perspect 89: 91-94.
- Graham J y Higgins J. 1995 Biomembrane Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press. 313p.
- Hammer DH 1986 Metallotioneins. Ann.Rev.Biochem. 55,913-951.
- Hargreaves JW, Lloyd EJH, Witton BA. 1975 Chemistry and vegetation in highly acidics streams. Freshwat. Biol. 5,563-576.

- Harrison, RG 1989 Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. TREE vol 4 no 1 January 6-14
- Hartwig, A. Role of DNA repair inhibition in Lead- and cadmium-induced genotoxicity: A review. Presented at the Second International Meeting on Molecular Mechanism of Metal Toxicity and Carcinogenicity held 10-17 January 1993 in Madonna di Campiglio, Italy
- Hiang C, Oliver DJ 1998 Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. Plant Cell. 9:1539-50
- Higgins HW, Mackey DJ 1987. Role of *Ecklonia radiata* in determining trace metal availability in coastal waters. Trace metals speciation. Aust. J. Mar. Freshwat. Res. 38, 317-328.
- Howe G, Merchant S 1991 Heavy Metals-Activated Synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant. Physiol. 98, 127-135.
- Hsu JM. 1981 Lead toxicity as related to glutathione metabolism. J. Nutr. 111, 26-33
- Ishibashi Y, Cervantes C, Silver S 1990 Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. Appl Environ. Microbio. 56, 2268-2270.
- Lucero HA, Andreo CS, Vallejo RM. 1976 Sulfidryl groups in photosynthetic energy conservation III. Inhibition of photophosphorilation in spinach chloroplasts by CdCl<sub>2</sub>. Plant Sci. Lett 6, 309-313.
- Margulis L, Schwartz K 1981. Cinco Reinos. Serie "por una educación popular", Facultad de Ciencias. UNAM. 335p.
- Meister A, Tate SS 1976 Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. A. Rev. Biochem. 45, 559-604.
- Mildvan AS, Loeb LA. The role of metal ions in the mechanism of DNA and RNA synthesis. In Metal Ions in Genetic Information Transfer (Eichhorn GL, Marzilli LG, eds). New York Elsevier 1981; 103-123.
- Moreno-Sanchez R, Devars RS 1999 Abundancia de los metales pesados en la biosfera. Cap. 1 -en Contaminación ambiental por metales pesados. (Moreno-Sanchez R. y Cervantes C. Ed.) AGT. México. 1-10p.
- Moreno-Sanchez R, Diaz-Barriga F, Devars RS 1999 Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. Cap. 2 -en Contaminación ambiental por metales pesados. (Moreno-Sanchez R. y Cervantes C. Ed.) AGT. México. 11-40p.
- Nagel K, Adelmeier U, Voigt J. 1996 Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Plant Physiol. Vol. 149; 86-90

- Nakano, Y., Okamoto, K., Toda, S. & Fuwa, K. 1978 Toxic effects of cadmium on *Euglena gracilis* grown in zinc deficient and zinc sufficient media. *Agric. Bio Chem.* 42: 901-907.
- Navarro L. 1995 Desarrollo de tolerancia a metales pesados por el protista *Euglena gracilis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México D.F.
- Navarro L, Torres-Marques ME, Gonzales-Moreno S, Devars S, Hernandez R, Moreno-Sanchez R. 1997 Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells. *Comp Biochem Physiol.* 116 (3); 265-272
- Nieboer E, Richardson DHS 1980 The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut. (Ser.B.)*. 1-3
- Nucifora G, Chu L, Silver S. 1989 Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3544-3548
- Nriagu JO, Pacyna JM. 1988 Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333, 134-139.
- Overnell J 1975 The effect on heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae *Dumaliella tertiolecta* and *Pheodactylum tricoratum*. *Mar. Biol.* 29, 99-103.
- Rai LC, Gaiser JP, Kumar HP 1981 Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 56-99-151.
- Ramos A 1992 Bioacumulación de Zinc y su influencia en el desarrollo de diferentes cepas de microalgas. Conferencia. 2° Curso internacional de tópicos selectos en el cultivo de microalgas-Junio 1992 CINVESTAV-IPN. México.
- Rodriguez Milord d. 1991 Niquel Serie Vigilancia No 10. Centro panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Edo de Mexico.
- Schafer HJ, Hagg-Kerwer A, Rausch T. 1998 cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* : evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology* 37: 87-97.
- Schiff JA, Lyman H, Russel G 1971 Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Meth Enzimol* 23 : 143-162.



- Skarstad, K Boye, E. 1994 The initiator protein DnaA: evolution, properties and function. Review Biochimica et Biophysica Acta 1217 111-130
- Stotbar AK, Griffiths TW, Ameen-Bukhari I, Sherwood RP 1985 The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiol. Plant. 63 : 293-298.
- Uribe A, Chávez E, Jiménez M, Zazueta C, Moreno-Sánchez R. 1994. Characterization of Ca<sup>2+</sup> transport in *Euglena gracilis* mitochondria Biochimica et Biophysica Acta 1186: 107-116.
- Summers AO, Silver S 1978 Microbial transformation of metals. Annu. Rev. Microbiol. 32: 637-672.
- Valle BL, Ulmer DD 1972 Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann.Rev. Biochem 41,91-128.
- Walker JCG, Klein C, Schidlowski M, Stevenson DJ. 1983 Enviromental evolution of the Archean-early Proterozoic Earth. In : Earth's Earliest Biosphere. Princeton University Press, 260-290.
- Winkelmann G. 1992 Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamato and coplexone type iron binding ligands. Mycol. Res. 96, 529-534.
- Ze-Sheng Li, Yu-Ping Lu, Rui-Guang Zhen, Dennis J. Thiele.1997 A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalizaed transport of bis(glutathionato) cadmium. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94,42-47
- Zenk MH 1996 Heavy metal detoxification in higher plants- a review. GENE 179,21-30

ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA