



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE EL METABOLISMO
DE GLUTATION EN *Euglena gracilis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A ;
JIMENA PAOLA MARTINEZ OLIVER



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO. D. F.,

2005.

m 347357





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente Profa. Sobeida Sánchez Nieto
Vocal Profa. Adriana Camacho Villanueva
Secretario Prof. David Guillermo Mendoza Cózatl

1er. Suplente Prof. Salvador Mejía Guerrero
2do. Suplente Profa. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Este tema se desarrolló en

El Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Asesor: Dr. David Guillermo Mendoza Cózatl



Sustentante: Jimena Paola Martínez Oliver



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jimena Paola Martínez Oliver

FECHA: 29. agosto. 2005 =

FIRMA: Jimena Oliver

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE EL METABOLISMO
DE GLUTATIÓN EN *Euglena gracilis*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. David Guillermo Mendoza Cózatl en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Se reconoce la colaboración del Dr. Guillermo Mendoza Hernández, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, en cuyo laboratorio se llevó a cabo la determinación de aminoácidos en muestras de *Euglena gracilis*.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT-México (43811-Q) y DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN215705).

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Nacional Autónoma De México y a la Facultad de Química por permitirme la estancia entre sus sabios recintos y jardines. Por ser en definitiva la mejor educación profesional y académica pero sobretodo personal y humana que pude haber recibido. Mi corazón es azul y mi piel dorada.

A los profesores que en mi camino como estudiante marcaron mi forma de pensar y mi corazón.

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Al Dr. Rafael Moreno Sánchez por la oportunidad para realizar este trabajo, por la orientación y las sonrisas brindadas.

A David G. Mendoza Cózatl. Por toda la paciencia, por toda su preocupación, por que gracias a su esfuerzo y dedicación: hoy es una realidad. Que el futuro sea prometedor.

A la Dra. Herminia Loza y al Dr. Carlos Cervantes por sus aportaciones a este proyecto.

A ti que nunca perdiste la fe en mí y que estás en el mejor lugar de mi corazón.

“Por mi raza hablará el espíritu”

DEDICATORIAS

A Dios. Por las oportunidades. Por ser mi mejor luz, por llenar el cielo de estrellas.

A *Luis y a Araceli, mis padres*. Por lo dado y lo negado, por todo lo que de ustedes he recibido y aprendido, incluso por lo que me he aferrado en no aprender. *Por que lograron lo que soy*. Que todo sea en adelante incluso mejor que hoy. Los amo.

A Rodrigo. Por que sin nuestras diferencias me habría perdido de mucho. Por eso y TODO lo demás GRACIAS. Que caminemos el resto juntos.

A Luis, mi abuelito. Por ser mi mejor consuelo, mi mejor sonrisa, mis más bellos recuerdos.

A Ofelia y Josefina, por ser dos de mis más grandes admirables. Por que con su juventud iluminan mi sonrisa, por que son el vivo ejemplo de que el corazón es incansable. Las adoro.

A Eduardo y Lourdes, mis padrinos. Por ser mi cobijo más grande. A José Eduardo y a María Fernanda por lo que nos une.

A mis eternos, mis 406 amigos, mis 406 hermanos. A los que están y al que se adelantó. Por el montón de palabras no pronunciadas y por lo dicho, por las lágrimas y las carcajadas. Por enseñarme lo que un amigo significa, por entregar el corazón y cambiar mi vida.... Por que ni la distancia ni el tiempo pueden terminar nuestro inmenso cariño.

A Aldo, a Perla y a Estela. Que lo nuestro sea inagotable. A Aldo por enseñarme que siempre hay otra oportunidad. A Estela por enseñarme que hay momentos para preparar el vuelo y otros para sacudir las alas y volar. A Perla por la oportunidad aquel día; por lo que juntas logramos y por su gran sonrisa.

A mis mucho más que compañeras de cancha, a ustedes siete. Que queden muchos juegos y fogatas por compartir. A Fanny y a Alfredo por que siempre han creído en mí.

A los amigos que encontré en los pasillos de la facultad, mis cómplices en los días atareados y las noches de desvelo.

A mis mejores ejemplos, a mi amor chiquito y a mi solecito. Por todos, todos y cada uno de los momentos, sobretodo esos que me han robado el corazón. Por que cuando sea grande seré como ustedes.

Siempre. Jimmie psmath

PD. "Que tus días estén llenos de logros y tus noches de sueños"

I. Contenido

II. Resumen	pág. 1
III. Antecedentes	
3.1. Metales y metales pesados	pág. 2
3.1.1. El cadmio. Propiedades físicas y químicas	
3.2. Contaminación ambiental por metales pesados	pág. 5
3.3. Contaminación de alimentos por metales pesados	pág. 11
3.4. Los metales pesados y su toxicidad para la salud humana	pág. 14
3.5 Los organismos y los metales pesados	pág. 15
3.5.1. Daño por metales pesados a los microorganismos	
3.5.2. Mecanismos de resistencia a cadmio	
3.5.2.1 Metalotioneínas	
3.5.2.2 Fitoquelatinas	
3.6. Metabolismo del glutatión y su respuesta a Cd ²⁺	pág. 22
3.6.1. Aspectos generales del glutatión	
3.6.2. La γ -glutamilcisteína sintetasa	
3.6.3. La Glutatión sintetasa	
3.6.4. La fitoquelatina sintetasa	
3.7. <i>Euglena gracilis</i>	pág. 30
IV. Hipótesis	pág. 35
V. Objetivos	pág. 35
VI. Metodología	
6.1. Cultivo de <i>Euglena gracilis</i>	pág. 36
6.2. Obtención del extracto citosólico	pág. 36
6.3. Medición de las actividades enzimáticas	pág. 37
6.4. Cuantificación de aminoácidos	pág. 39
VII. Resultados	pág. 41
VIII. Discusión de resultados	pág. 61
IX. Conclusiones	pág. 74
X. Perspectivas	pág. 75
XI. Bibliografía	pág. 75
XII. Apartados	pág. 82

II. Resumen

En los últimos años la contaminación por metales pesados es un problema de dimensiones inmensurables que afecta el equilibrio ecológico, dañando la calidad del agua y suelos.

Euglena gracilis es un microorganismo que tiene la capacidad de tolerar y acumular metales pesados. Su IC_{50} por cadmio (Cd^{2+}) es $100 \mu M$ mientras que la de algunas algas es $10 \mu M$. Además, *Euglena* acumula Cd^{2+} en cantidades importantes respecto a su peso seco (3.5%). Por lo tanto, *Euglena gracilis* podría ser utilizado en la biorremoción de metales pesados en cuerpos de agua contaminados.

El glutatión (GSH) es un metabolito ampliamente distribuido en la naturaleza relacionado con el mantenimiento del estado redox de las células; sin embargo, en *Euglena* puede desempeñar otras funciones tales como la síntesis de tripanotión (Try), la inactivación de agentes xenobióticos y la síntesis de fitoquelatinas (FQs). Las FQs son péptidos de bajo peso molecular derivados del glutatión (GSH) asociados a la inactivación de metales como el Cd^{2+} .

El GSH es sintetizado a partir de cisteína (Cys), glutamato (Glu) y glicina (Gly) en dos reacciones catalizadas por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) quien rinde γ -EC y la glutatión sintetasa (GS) quien forma el GSH. Estas dos reacciones de síntesis dependen de ATP-Mg. Otras enzimas relevantes en el metabolismo del GSH son las glutatión transferasas (GSTs) que inactivan xenobióticos conjugándolos con GSH, la glutatión peroxidasa (GPx) que oxida el GSH a GSSG mediante la reducción de un peróxido y la tripanotión sintetasa (TryS) que conjuga espermidina con GSH. Estas últimas (GSTs, GPx, TyrS), participan activamente en el control de la vía por ser quienes consumen al GSH.

La literatura sugiere que en condiciones de no estrés, la γ -ECS es quien ejerce el mayor control sobre la vía pues es retroinhibida por GSH (competitivamente respecto al Glu). Sin embargo, *Euglena* acumula γ -EC durante su crecimiento en cultivos expuestos a concentraciones mayores de $25 \mu M$ de Cd^{2+} , por lo que podemos plantear que la actividad de las enzimas que participan en la vía son diferentes en condiciones control y en condiciones de estrés por Cd^{2+} , particularmente a nivel de la GS pues quien se acumula es su sustrato.

Para determinar el efecto del Cd^{2+} sobre las enzimas que participan en el metabolismo de GSH, se midió la actividad de las enzimas productoras y consumidoras de GSH en extractos citosólicos obtenidos de células cultivadas con y sin $CdCl_2$ ($50 \mu M$) (Cd_{50}). Se encontró que, la V_m de la γ -ECS en extractos de células cultivadas con Cd^{2+} fue 4 veces mayor de la encontrada en extractos control, sugiriendo un aumento en la cantidad de γ -ECS activa. Por otro lado, la actividad de la GS aumentó 2.4 veces y en ambas condiciones su actividad fue mayor o al menos igual que la de la γ -ECS en ambos extractos, sugiriendo que la GS no es limitante en células Cd_{50} . Sin embargo, la GS resultó más sensible a Cd^{2+} que la γ -ECS cuando se sintetizó GSH a partir de Cys, además de ser inhibida por complejos formados con Cd^{2+} como el Glu-Cd. Del bloque de enzimas consumidoras de GSH, las GSTs también aumentaron su actividad en extractos de células Cd_{50} . Este aumento en el consumo de GSH aunado a la acumulación de γ -EC indica que el control de la vía se redistribuyó en las células Cd_{50} . Finalmente, la acumulación de γ -EC durante la exposición a Cd^{2+} puede deberse a una mayor inhibición *in vivo* de la GS y al menor aumento en la cantidad de GS respecto a la γ -ECS en células Cd_{50} .

III. Antecedentes

“La contaminación e intoxicación por metales pesados tal vez tuvo su origen en la prehistoria cuando el hombre descubrió que, al fundirse juntos el cobre y el estaño, producían bronce; esta Edad del Bronce también vio nacer la edad de los residuos tóxicos industriales. Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XIX en que el problema se tornó preocupante. Una muestra de tal preocupación se encuentra en el cuento “Alicia en el país de las maravillas”, escrito por Lewis Carrol (1832-1898), matemático inglés. En este libro, uno de sus personajes centrales, el Sombrerero loco, debe su estado mental al mal uso de un sombrero de fieltro. Es sabido que el fieltro requiere de tratamiento con mercurio para su utilización industrial y que este metal produce daño neurológico, (...)”

Tomado del libro “Contaminación Ambiental por Metales Pesados”.

3.1) Los metales y los metales pesados

En la tabla periódica los elementos pueden dividirse en tres grandes grupos: metales, no metales y metaloides. Un *metal* es un elemento buen conductor del calor y la electricidad. La mayoría de los elementos conocidos son metales (Chang, 1999) y así, los metales son parte intrínseca en el desarrollo de la vida y la tecnología. Los metales a su vez pueden subdividirse en grupos según sus propiedades periódicas, sus características físicas o químicas. Uno de estos grupos son los *metales pesados*.

Para este trabajo, entenderemos por “*metal pesado*” todo elemento que tenga una densidad mayor a 5 g/mL (Cervantes y Moreno, 1999), pudiendo citar a buena parte de los elementos de la tabla periódica; sin embargo, no todos los metales pesados son tan abundantes ni tan usados en la vida o la industria. Algunos ejemplos de metales pesados son el cromo (7.19 g/mL), manganeso (7.43 g/mL), hierro (7.86 g/mL), cobalto (8.9 g/mL), níquel (8.9 g/mL), cobre (8.96 g/mL), zinc (7.14 g/mL), cadmio (8.65 g/mL), plata (10.5 g/mL), mercurio (13.6 g/mL), oro (19.3 g/mL),

platino (21.4 g/mL), plomo (11.4 g/mL) y estaño (7.3 g/mL). Un número reducido de metales en *concentraciones traza son esenciales* para la vida: en el humano, gracias al *hierro* (Fe^{2+}) la sangre transporta el oxígeno, su deficiencia causa anemia nutricional y con esta, disminución en la capacidad física y alteraciones del sistema inmunológico. El *cobalto* (Co^{2+}) es parte fundamental de la molécula de la vitamina B_{12} , su deficiencia es causa de anemia perniciosa, enfermedad que se caracteriza por la disminución del número de células rojas en la sangre. La deficiencia de *zinc* (Zn^{2+}) en el humano produce retraso en el crecimiento y en la maduración sexual, pérdida del apetito, del gusto y el olfato además de anomalías en la piel como mala cicatrización de heridas. Es además, cofactor de muchas enzimas como la deshidrogenasa láctica, la fosfatasa alcalina y la anhidrasa carbónica. El *cobre* (Cu^{2+}) forma parte de varias metaloenzimas que catalizan reacciones de oxido-reducción involucradas en la eritropoyesis, síntesis de catecolaminas y fosforilación oxidativa, como son la citocromo c oxidasa y la superóxido dismutasa citosólica; su deficiencia causa entre otras enfermedades anemia hipocrómica. El *cromo* (Cr^{2+}) está involucrado en el metabolismo de la glucosa como constituyente del “factor de tolerancia al glucosa”. El *manganeso* (Mn^{2+}) participa como cofactor de hidrolasas, descarboxilasas, transferasas y en la superóxido dismutasa mitocondrial, también en la síntesis de glucoproteínas (Lenhinger et al., 2000).

Aún los metales *esenciales*, pueden llegar a ser tóxicos si la ingesta es elevada. Se considera “concentración tóxica” a aquella que inhibe de manera significativa la actividad metabólica y reduce el desarrollo de una célula sin inducir la muerte (Cervantes y Moreno, 1999). Para ciertos metales como el selenio, la línea que divide a las concentraciones tóxicas de las suficientes es muy delgada. Algunos otros

definitivamente no tienen función biológica como son el cadmio (Cd^{2+}), plomo (Pb^{2+}), plata (Ag^+) o mercurio (Hg^{2+}).

3.1.1) El cadmio. Propiedades físicas y químicas

En latín, *cadmia*, y en griego *kadmeia*, que significa "calamina", nombre que recibía antiguamente el carbonato de zinc; fue descubierto en Alemania en 1817 por Stromeyer y por Hermman casi simultáneamente. El cadmio es un metal blanco azulado, dúctil y maleable, tanto que se puede cortar fácilmente con un cuchillo. En algunos aspectos es similar al zinc. Su estado de oxidación más común es el +2 y puede presentar el estado de oxidación +1, pero es muy inestable (Aylett, 1974).

El cadmio puro es un metal blando, de un brillo muy parecido al de la plata. En esta forma no es común encontrarlo en el ambiente, más a menudo se encuentra combinado con otros elementos (tales como oxígeno, cloro o azufre) formando compuestos. Todos estos compuestos son sólidos estables que no se evaporan y sólo el óxido de cadmio se encuentra en el aire en forma de pequeñas partículas suspendidas (Aylett, 1974).

El cadmio es un elemento que está naturalmente pero de forma escasa en la corteza terrestre (López-Artiguez et al., 1993), las menas de cadmio son difíciles de encontrar y suelen estar en pequeñas cantidades. Es en proporción el 67avo elemento más abundante, siendo sólo la 1/500 parte de la abundancia del zinc (Aylett, 1974). El cadmio sustituye con facilidad al zinc en sus minerales debido a su parecido químico, así que no sorprende que el cadmio se obtenga como subproducto en la obtención del zinc. Generalmente el cadmio está en sus minerales como

sulfuros, al tostarlos se obtiene una mezcla de óxidos y sulfatos, de los cuales el cadmio se separa del zinc aprovechando la mayor facilidad para reducirlo (Apartado 1).

3.2) Contaminación ambiental por metales pesados

La contaminación por metales pesados que se registra mundialmente proviene en su mayor parte de la actividad industrial y minera. Industrias como la automotriz, hulera y la química, contienen en sus descargas de aguas residuales metales pesados como cadmio, plomo, mercurio, cromo y arsénico, que al fluir al drenaje municipal incrementan el nivel de contaminación y por consiguiente hacen más costoso el tratamiento de las mismas (Cervantes y Moreno, 1999). Otra de las fuentes más importantes de descarga de metales pesados al medio ambiente es la quema de combustibles fósiles (como carbón o petróleo) o la incineración de la basura doméstica (Wang et al., 2000).

En los años 60's el río Tees, al norte de Inglaterra, fue contaminado por descargas de agua derivadas de la industria acerera. Se estima que, cada día se arrojaban al río 7500 Kg de hierro, 2300 Kg de manganeso, 850 Kg de zinc, 310 Kg de plomo, además de "menores" cantidades de cobre, arsénico, antimonio, tungsteno, uranio, mercurio, vanadio, estaño, titanio, cobalto, cadmio y cromo (Prater, 1975).

El uso de ciertos fertilizantes en Canadá ha derivado en el incremento de metales en la tierra, tales como uranio, antimonio, selenio, cadmio y zinc. Particularmente el cadmio ha aumentado un 66% y el zinc un 25% en el suelo comparado con años anteriores, lo cual produjo en los cereales cultivados en esas tierras un aumento del 50% en su contenido de estos metales respecto a ellos mismos

pero cultivados en otro distrito donde no se usan dichos fertilizantes (Alloway, 1995). Estos fertilizantes tienen en general una concentración de metales más alta que la encontrada naturalmente en las rocas del ambiente, por ejemplo tienen 970 veces más cadmio y 6 veces más molibdeno (Strenstrom y Vahter, 1974).

En Nauru, Australia durante 16 años también se han usado fertilizantes ricos en metales pesados (80 mg de cadmio/Kg). Se calcula que durante estos 16 años, 273 toneladas de cadmio han sido incorporadas al suelo y con ello a los cuerpos de agua cercanos, contaminando también organismos que habitan allí. Organismos que a su vez son consumidos por animales y humanos, por ejemplo los mejillones de agua dulce, lo cual ha producido en los consumidores intoxicación por metales pesados (Bennet-Chambers et al., 1999).

Pequeñas cantidades de cadmio se encuentran naturalmente en el aire, en el agua, en el suelo y en los alimentos; sin embargo, esta exposición natural es mucho menor a la registrada actualmente debida a la contaminación (hasta 468 ppm de Cd^{2+} en el suelo de peso seco). El cadmio está ampliamente distribuido por la corteza terrestre, concentraciones de Cd^{2+} en suelos de diferentes países varía normalmente entre 0.01 y 1.8 ppm de peso. Pero no se encuentra en montos comparables con los de otros minerales como el zinc (Kabata-Pendias y Pendias, 1986). El cadmio es uno de los metales pesados más tóxicos y abundantes, residuo de la actividad industrial. Las industrias de mayor emisión de cadmio son las procesadoras de baterías y acumuladores (utilizan tres cuartas partes del cadmio producido, particularmente las pilas de níquel-cadmio), cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, PVC, colorantes (el sulfato de cadmio se utiliza como pigmento amarillo), fusibles, joyería,

galvanoplastia, semiconductores, y en fabricación de aleaciones de bajo punto de fusión, entre otras (Galvao y Corey, 1987a).

3.2.1) Contaminación por metales pesados en México

Algunos países como Inglaterra, han considerado la contaminación por metales desde hace más de 20 años como un problema de salud pública y no sólo por el daño ambiental ocasionado (*Control of Pollution Act* y *Deposit of Poisonous Waste Act*). En México apenas tenemos normas que regulan lo referente al tema en agua potable, aguas residuales y de riego (tablas 1 y 2), mismas que aumentan sus límites permisibles en algunos metales conforme se agrava la situación al pasar del tiempo -marcadas con negritas- (tabla 3). Estas Normas Oficiales dictan, no sólo la calidad sanitaria del agua potable y de riego sino también las características físico-químicas con que deben de cumplir, entre otras su contenido de metales pesados (tablas 1 y 2).

En el drenaje de la ciudad de México los mismos ductos transportan las aguas residuales y las pluviales. El sistema general del desagüe y el drenaje profundo descargan en el río El Salto, estas aguas llegan al río Tula y a la presa Endhó, donde se utilizan para riego de cultivos. El sistema general del desagüe incluye al Gran Canal de Desagüe y el Canal de Chalco, los Ríos San Javier, de los Remedios, Tlalnepantla, Cuauhtepac y Canal Nacional, así como los ríos entubados de San Buenaventura, Churubusco, la Piedad, Consulado y Gran Canal (<http://www.salud.gob.mx>).

Tabla 1. Según la NOM-127-SSA1-1994. Límites permisibles de características químicas en el agua potabilizada.

CARACTERISTICA	LIMITE PERMISIBLE* (mg/L)
Aluminio	0.20
Arsénico	0.05
Bario	0.70
Cadmio	0.005
Cianuros (como CN ⁻)	0.07
Cobre	2.00
Cromo total	0.05
Dureza total (como CaCO ₃)	500.00
Fierro	0.30
Manganeso	0.15
Mercurio	0.001
Plomo	0.025
Sodio	200.00
Sólidos disueltos totales	1000.00
Zinc	5.00

*Los límites permisibles de metales se refieren a su concentración total en el agua, la cual incluye los suspendidos y los disueltos.

Tabla 2. Según la NOM-001-ECOL-1996. Límites máximos permisibles para metales pesados y cianuros en agua residual para uso en riego agrícola.

CARACTERISTICA	LIMITE PERMISIBLE (mg/L)	LIMITE PERMISIBLE (mg/L)
	Ríos (promedio mensual)	Aguas costeras (promedio mensual)
Arsénico	0.2	0.2
Cadmio	0.2	0.2
Cianuros (como CN-)	2.0	3.0
Cobre	4.0	6.0
Cromo	1.0	1.5
Mercurio	0.01	0.02
Níquel	2.0	4.0
Plomo	0.5	0.4
Zinc	10.0	10.0

Parte de las aguas residuales que se producen en el DF se utiliza para riego en los Estados de Hidalgo y México (Melo-Sánchez et al, <http://www.salud.gob.mx>); en donde se manejan los cultivos de alfalfa, col, chile, frijol, lechuga, avena, pepino, entre otros (INEGI). Un estudio realizado en el valle del Mezquital, Hidalgo en 1996, reveló que la concentración de cadmio en agua usada para riego superó 10 veces el valor máximo permitido por la legislación de 1993 en ese rubro, además de que se incrementó en comparación con reportes anteriores de 1990 (Vázquez-Alarcón et al., 1996).

Tabla 3. Comparación de Normas Oficiales Mexicanas

NOM-CCA-031-ECOL/1993* vs NOM-001-ECOL-1996**

Parámetro	1993 Límite máximo permisible (mg/L)	1996 Límite máximo permisible (mg/L)
Aluminio	10	No determinado
Arsénico	0.5	0.4
Cadmio	0.5	0.4
Cobre	5.0	6.0
Cromo hexavalente	0.5	No determinado
Cromo total	2.5	1.5
Mercurio	0.01	0.02
Níquel	4.0	4.0
Plata	1.0	No determinado
Plomo	1.0	1.0
Zinc	6.0	20.0

* NORMA Oficial Mexicana NOM-CCA-031-ECOL/1993, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las *descargas de aguas residuales* provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

** NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las *descargas de aguas residuales* en aguas y bienes nacionales.

El agua destinada para el riego provoca el detrimento de la salud pública, perjuicio que hasta ahora es sólo detectado a largo plazo cuando las concentraciones acumuladas de metales pesados son excesivas y los problemas de salud notables.

La contaminación ambiental por metales afecta no sólo a los seres que habitan en los ecosistemas donde se arrojan los desechos industriales pues es un problema que se biomagnifica alcanzando grandes dimensiones; es decir, un contaminante que

se introduce a cualquier organismo que forma parte de la cadena alimenticia afecta a todos los seres de dicha cadena. La contaminación por metales pesados llega al hombre sobretodo a través de las plantas comestibles que son regadas con agua contaminada.

3.3) Contaminación de alimentos por metales pesados

Como sabemos las plantas toman del suelo los metales que requieren para nutrirse, hay plantas que tienen capacidad para acumular metales cuando el suelo en el que crecen es rico en ellos. Claro ejemplo de que los metales llegan al hombre a través de las plantas, son las hojas de *Camellia sinensis* con que se prepara té negro, esta bebida es fuente de manganeso (Wenlock et al., 1979) pero la infusión de sus hojas no sólo provee este elemento, ya que esta planta es capaz de acumular aluminio (entre 0.050 y 30 mg /g de peso húmedo según la edad de las hojas) el cual a pesar de no estar considerado como *metal pesado* tiene una gran toxicidad para la mayor parte de los organismos pues no tiene actividad biológica (Baxter et al., 1990).

Cultivos de arroz irrigados con agua contaminada en Japón, acumulan hasta 1 mg de Cd^{2+} /Kg (peso húmedo), cuando la concentración de este metal en el cereal no contaminado está alrededor de 0.05 mg/Kg (peso húmedo) (Asami, 1984).

En México, se determinó en 1996 que el Cd^{2+} aumenta en alimentos como maíz, trigo y alfalfa, cultivos del Edo. de Hidalgo a medida que aumenta el tiempo de uso de agua residual contaminada (Vázquez-Alarcón et al., 1996).

El tabaco aunque no es una planta comestible, es un organismo preciado por la gran industria que de ella depende y es un cultivo que se afecta enormemente debido

a la contaminación por metales pesados. Las hojas de tabaco cultivadas en medios que contienen Cd^{2+} en concentraciones traza, acumulan aproximadamente 0.05 a 0.5 μM de este metal. Plantas de tabaco expuestas a 7.6 μM de Cd^{2+} acumulan de 28 a 340 veces más que las expuestas a concentraciones traza, y cultivos sometidos a 200 μM de Cd^{2+} acumulan 14 mil veces más después de un día de exposición (Rauser et al, 1990). Fuente importante de contaminación por Cd^{2+} al ambiente y al propio humano es el humo de los cigarrillos. Algunos cigarrillos contienen hasta 2.0 μg de Cd^{2+} / g de peso seco, se estima que 20 cigarrillos proporcionan de 0.5 a 2.0 μg del metal (Ostergaard, 1997) y que los fumadores acumulan en la corteza renal 100 mg/Kg (Cervantes y Moreno, 1999).

Los metales pesados no sólo son un problema ambiental y de salud pública, en algunos casos también afecta la calidad tecnológica de los alimentos. Trazas de metales, provocan la peroxidación de ácidos grasos y con ella la rancidez de los lípidos presentes en los alimentos (Wassef, 1993). Lo que trae como consecuencia la disminución en la vida de anaquel de productos como carne, aceite, vinagretas, aderezos, mayonesas, chocolates u oleaginosas frescas que son fuente de ácidos grasos.

En ocasiones el procesamiento de los alimentos disminuye su contenido de agentes tóxicos. Tanto el fraccionamiento de los granos para hacer harinas como su refinación ayudan a disminuir su contenido de metales pesados. Se ha determinado que un grano de trigo contiene hasta 7.4 μg de Cu /g, pero sólo 2.0 μg de Cu /g están en el endospermo (Reilly, 2002) que es la parte del grano con que se produce harina.

En un número menor de veces, el procesamiento de los alimentos los contamina. En la fabricación tradicional de vinos, las láminas de plomo se usaban para reparar los contenedores de fermentación fragmentados, causando sin lugar a dudas la contaminación del vino (Beritic y Stahuljak, 1961). Muchas otras veces, estas contaminaciones son ocasionadas por la falta de seguridad o descuidos en las plantas de producción, el ejemplo típico de estos descuidos son las tuberías de cobre expuestas al contacto con el alimento o con el agua de proceso (Reilly, 2002).

En ocasiones los materiales de empaque son responsables de la contaminación del alimento. Principalmente en el caso de alimentos enlatados, existe la controversia de la presencia o no de estaño en el alimento aún cuando las latas están recubiertas; sobretodo en alimentos con una acidez tal que pueda dañar rápidamente este esmalte, como son las conservas encurtidas o en vinagre. Algunas mediciones hechas en leche evaporada que se almacenó por 2 años, demuestran que la concentración de estaño aumenta en este periodo de 28 a 114 mg/Kg (Board, 1973). En años recientes la tecnología de empaques alimentarios ha mejorado y las latas se fabrican principalmente de aluminio; sin embargo, la controversia existe y la toxicidad del aluminio bien podría sustituir en este tema a la toxicidad del estaño (Jiménez y Kane, 1974). Además las latas de aluminio contienen trazas de otros metales como cobre, zinc, cromo, hierro y manganeso que les confieren ciertas características deseables como material de empaque, causando que la contaminación del alimento pueda no ser sólo por aluminio.

3.4) Los metales pesados y su toxicidad para la salud humana

En 2000, un grupo de investigación concluyó que ciertos tipos de cáncer están asociados a la toxicidad de metales pesados consumidos en frutas y vegetales. Particularmente cromo, cobalto, níquel, cadmio, plomo y arsénico (Türkdoğan et al., 2002).

Ciertamente, a pesar de que hay una gran variedad de elementos que podemos catalogar como metales pesados y que muchos de ellos forman parte del problema de contaminación actualmente, la mayor preocupación son aquellos que no tienen actividad biológica o los que se encuentran en grandes cantidades. El cadmio es uno de los metales que cumplen con ambas premisas.

La toxicidad del cadmio se relaciona con la aparición de radicales libres y a que se asocia a las proteínas impidiendo sus funciones (Díaz-Barriga, 1991). En humanos y animales experimentales que han sido expuestos a dosis crónicas de cadmio el daño principal se observó en riñón causando proteinuria (Vallee y Ulmer, 1972). Los riñones y el hígado son los órganos de mayor acumulación de cadmio y por tanto los más afectados (Webb, 1972). Otro daño observado, particularmente en ratones, es el desarrollo de edema, enfisema y fibrosis pulmonar por inhalación de humos o vapores que contienen cadmio (Sánchez et al., 1994), ya mencionamos que los cigarrillos son una fuente importante de emisión de cadmio.

El cadmio entra al torrente sanguíneo por absorción en el estómago o en los intestinos luego de la ingestión de comida o agua, o por absorción en los pulmones después de la inhalación. Usualmente por la sangre se absorbe alrededor del 1 al 5%

del cadmio que es ingerido por vía oral, mientras que se absorbe alrededor del 30 al 50% del que es inhalado (Reilly, 2002).

Una vez que el cadmio se absorbe es fuertemente retenido principalmente por los riñones; así que incluso bajas dosis de este metal pueden constituir un nivel significativo en el organismo si la exposición se prolonga durante un largo periodo causando principalmente cáncer renal, de próstata o de ovario (Türkdogan et al., 2002). Se estima que la vida “biológica” del cadmio en los túbulos renales de humano varía entre 17 y 30 años, es retenido hasta sobrepasar la capacidad de las células para sintetizar metalotioneínas, proteínas que secuestran metales (ver 3.5.2.1) (Hammer et al. 1971).

3.5) Los organismos y los metales pesados

3.5.1) Daño por metales pesados a los microorganismos

Así como el exceso de metales pesados en el ambiente causa daño al humano, todos los demás seres vivos “enferman” por la misma causa. Según estudios realizados la secuencia de toxicidad para organismos como las algas inicia con el Hg, siguiendo con Cu, Cd, Ag, Pb, siendo menos tóxico el Zn (Trevors et al., 1986).

En general la toxicidad de los metales depende de la concentración a la que esté expuesto el organismo, la edad del cultivo (siendo más tóxica la exposición durante la fase logarítmica), la densidad de población, la forma en que se presente el metal (estado de oxidación, libre o acomplejado, e incluso la presencia de otros metales) (Cervantes y Moreno, 1999).

Se han reportado infinidad de daños causados por metales pesados a los microorganismos cuando están en concentraciones excedentes en el ambiente donde se desarrollan. Particularmente el Cd^{2+} causa tanto a organismos eucariontes como procariontes daños serios, empezando por la disminución de la biomasa en cultivo o su capacidad fotosintética. Ejemplos más puntuales son el daño a la doble hélice de DNA en *E. coli* o la disminución en la captación de NO_3^- en la cianobacteria *Anacystis nidulans* como resultado de la disminución de ATP y el daño en membranas (Trevors et al., 1986). En *Anabaena inaequalis* concentraciones de 0.05 ppm inducen la elongación de sus filamentos, mientras sus células vegetativas se amarillentan. En algas como *Thallosiosira fluviatilis* y *T. weisflogii* el Cd^{2+} afecta la asimilación de Fe^{2+} , disminuyendo drásticamente su población. En *Chlorella vulgaris* el Cd^{2+} causa esporulación irregular y formación de microcolonias, además afecta su nutrición pues compite con la captación de metales divalentes esenciales como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Trevors et al., 1986). A *Chlorella pyrenoidosa* le provoca inhibición en el crecimiento y disminución en su capacidad para fijar CO_2 debido a que al menos dos enzimas participantes en el ciclo de Calvin requieren su grupo sulfhidrilo libre y reducido para la catálisis; también provoca la disminución en su consumo de oxígeno debido probablemente, a que las enzimas que participan en este proceso tienen Fe^{2+} el cual podría estar siendo reemplazado por Cd^{2+} perdiendo su capacidad para transportar electrones (Trevors et al., 1986).

3.5.2) Mecanismos de resistencia

En la naturaleza existen diversos mecanismos de resistencia a metales pesados. Estos mecanismos en general, consisten en la unión del metal a la pared celular o

membrana plasmática, su expulsión activa, o su compartimentalización secuestrado o por acción quelante, también su biotransformación (Cervantes y Moreno, 1999). Las principales funciones de estos mecanismos de resistencia o control de metales son mantener la concentración interna de metales esenciales entre los límites de deficiencia y toxicidad, y a su vez mantener la concentración de los metales tóxicos bajo los umbrales. Sin embargo, no todos estos mecanismos de resistencia permiten a los organismos acumularlos, de hecho algunos de ellos consisten en expulsar de la célula al metal tóxico previa reducción u oxidación (Cervantes y Moreno, 1999).

Frente a intoxicaciones por metales pesados las bacterias y los mamíferos sintetizamos metalotioneínas (MT). Por otro lado, algunas levaduras, plantas y organismos como *Euglena* sintetizan fitoquelatinas (FQs), todos ellos actúan como secuestrantes del agente xenobiótico.

3.5.2.1) Metalotioneínas

Las MT son proteínas pequeñas (menores a 40 kDa) que no tienen aminoácidos aromáticos. En general se clasifican en tres clases según su estructura: la clase I, son MT de mamífero típicas por su estructura primaria rica en grupos tioles y otras que tengan una estructura parecida. La clase II, son MT que no se parecen a las de mamífero estructuralmente pero que tienen la misma función (las sintetizadas por levaduras, algunas plantas y animales no mamíferos). La clase III, que son polipéptidos atípicos que no se codifican como proteínas a través de RNAm y que son llamados también FQs o cadistinas (Rausser, 1990).

Una de las principales funciones de las metalotioneínas es secuestrar al metal no esencial para proteger a la célula del daño que ocasiona, se ha visto que además

están implicadas en otros procesos de resistencia fisiológica (Cervantes y Moreno, 1999).

3.5.2.2) Generalidades de las fitoquelatinas

El catión divalente del cadmio (Cd^{2+}) es un metal que en el metabolismo de los organismos siempre resulta tóxico aún en concentraciones traza, desencadenando en algunos organismos la síntesis de fitoquelatinas (FQs). La estructura general de estos péptidos es γ -(glu-cys)_n-gly (figura 1) donde *n* se refiere a la longitud de la cadena (*n*= 2 a 11) variando de acuerdo a las necesidades de la célula respecto a la concentración de Cd^{2+} o metal pesado a la que se encuentra expuesta o al tiempo de exposición (Rauser, 1990).

Comparado con algunas estructuras, funciones y moléculas que los organismos somos capaces de sintetizar en condiciones de adversidad para adaptarnos y sobrevivir, los polipéptidos de bajo peso molecular son de estudio reciente. Apenas en 1957 se habló de los homólogos de las FQs, las MT y 20 años después saltaron a la vista las FQs (Rauser, 1990).

Las FQs son péptidos derivados del glutatión (GSH) (figura 2), tienen peso molecular menor a 10 kDa, son más pequeñas que sus homólogos encontrados en animales y levaduras (las MT), tienen primordialmente cargas negativas gracias a sus grupos tioles y carboxilatos. Además de sus aminoácidos constituyentes (Glu, Cys y Gly), algunos autores han reportado la presencia de Serina (Ser), Alanina (Ala) y aspártico (Asn) en lugar de Gly. Las FQs que tienen estos aminoácidos se denominan homofitoquelatinas (h-FQs), y derivan del homo-glutatión (h-GSH) (γ -Glu-Cys- β -Ala) (Rauser, 1990).

La exposición de diferentes células y tejidos a metales han dado lugar a un gran número de respuestas, dependiendo justamente del organismo y el metal. Ejemplo de esto es que *S. pombe* en presencia de exceso de Cu^{2+} sintetiza FQ's, mientras el exceso de Zn^{2+} no las induce. Así mismo *Rauvolfia serpentina* produce FQ's cuando se cultiva en presencia de arseniatos de cadmio, plomo, zinc, plata, bismuto y níquel además de selenatos de cobre y estaño, pero no tiene respuesta frente a molibdatos de aluminio, calcio, cobalto, cromo, cesio, potasio, magnesio o manganeso (Rausser, 1990). Sin embargo, lo indiscutible es que en todos los casos donde las células se han sometido a la presencia de Cd^{2+} , se ha observado la prevalencia de complejos de bajo peso molecular.

El aminoácido que hace funcional a las FQ's como quelantes de cationes, es principalmente el grupo tiol dado por la presencia de la Cys. La proporción en que se han encontrado los grupos tioles y los metales pesados, particularmente Cd:Cys es de 1:2 y 1:3 (Rausser, 1990). Debido a que es principalmente el grupo tiol quien mantiene unido al metal, la funcionalidad de las FQ's es dependiente del pH ya que este grupo puede estar protonado o no y es muy susceptible a oxidación. Se ha reportado una constante de disociación para el complejo tiol-Cd (específicamente GS-Cd) del orden de $10^{-10.5}$ M a 25°C (Sillén y Martell, 1964).

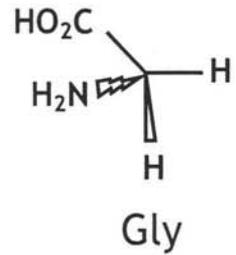
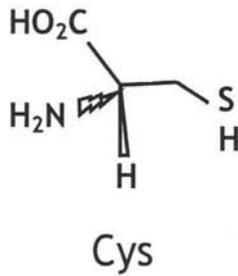
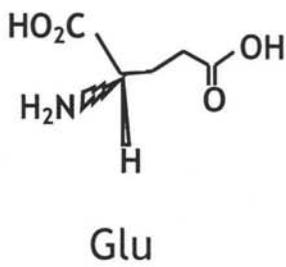
La síntesis de FQ's es secuencial, es decir, es necesario sintetizar la FQ más pequeña ($n=2$), para que sirva como sustrato para formar la FQ $n+1$; la longitud de las FQ's depende sobretodo del tiempo de exposición al metal. Durante los primeros minutos de exposición se sintetizan con preferencia las FQ's más pequeñas ($n= 2, 3$) mientras al aumentar el tiempo de exposición (0.5 a 7 h, dependiendo del organismo) encontraremos polipéptidos largos ($n= 4$ hasta 11). Células de *D. innoxia* tolerantes a

Cd^{2+} que sintetizan FQs, tienen en forma de complejo al 95% del metal entre las 4 y las 24 h de exposición; el tiempo es relevante por que permite a la célula llevar a cabo otros procesos metabólicos importantes de forma cercana a lo normal, tales como la duplicación celular (Rauser, 1990).

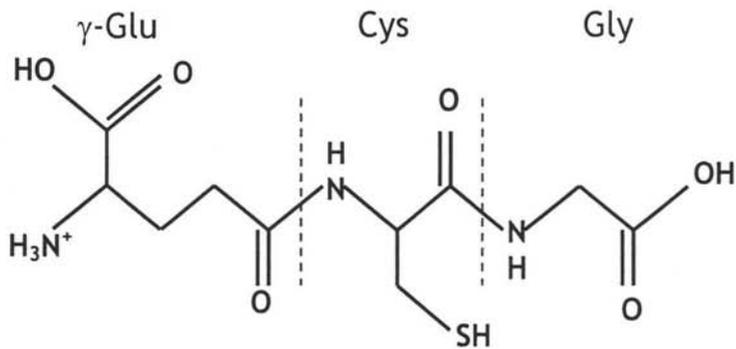
Al igual que otros organismos, *Euglena* utiliza el metabolismo del GSH para sintetizar FQ's; la síntesis de GSH a su vez involucra en una etapa anterior la asimilación de sulfato y su reducción hasta sulfuro (S^{2-}) para formar Cys, que es uno de los aminoácidos requeridos para formar el tripéptido precursor de las FQ's. Está bien estudiado que la vía de asimilación de sulfato aumenta su actividad cuando las células se exponen a Cd^{2+} (Mendoza-Cózatl et al., 2005).

Las enzimas que participan en la síntesis de GSH y FQs a partir de sus aminoácidos constituyentes son: la γ -glutamilcisteína sintetasa o glutamato-cisteín ligasa (γ -ECS) (EC. 6.3.2.2) y la glutatión sintetasa o γ -L-glutamyl-L-cisteín:glicina ligasa (GS) (EC. 6.3.2.3) y la fitoquelatina sintetasa o γ -glutamylcisteín dipeptidil transpeptidasa (FQS) (EC. 2.3.2.15). Siendo las dos primeras productoras de GSH mientras la FQS y las glutatión transferasas (GSTs) (EC. 2.5.1.18) forman parte de las enzimas consumidoras de GSH (Mendoza-Cózatl et al., 2005). Estas últimas a pesar de no estar directamente relacionadas con la síntesis de FQs son de gran importancia ya que la presencia de metales pesados en el cultivo desencadena en la célula procesos metabólicos como estrés oxidativo y generación de compuestos tóxicos que la dañan, y son precisamente las GSTs las enzimas encargadas de inactivarlos.

1.1) Aminoácidos



1.2) Glutathión (Cervantes y Moreno, 1999)



1.3) Fitoquelatina ($n=3$) (Cervantes y Moreno, 1999)

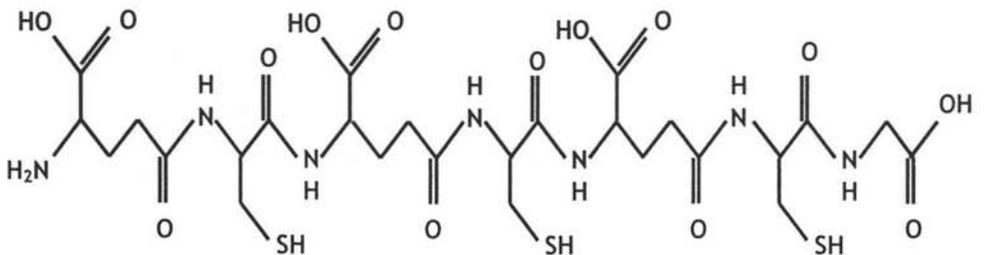


Figura 1. Estructura general de los aminoácidos constituyentes del GSH (Diagrama de Fischer), estructura del GSH y las FQs.

Así mismo, la glutatión peroxidasa (GPx) (EC. 1.11.1.9) y la glutatión reductasa (GR) (EC. 1.8.1.7) acompañan esta labor manteniendo el estado redox de la célula. *Euglena* cuenta además con otra enzima consumidora de GSH, la Tripanotión sintetasa (TryS) (EC. 6.3.1.9) (figura 2) que sintetiza tripanotión (Try). Es reconocido que organismos tripanosomátidos (del Orden Kinetoplastida) como *Euglena* o *Trypanosoma sp.* difieren de otros organismos en su habilidad para sintetizar Try, conjugando GSH con espermidina, un compuesto aminado. El sistema TryPx/TryR ayuda a las células a mantener el estado redox (Oza et al., 2002).

3.6) Metabolismo del GSH

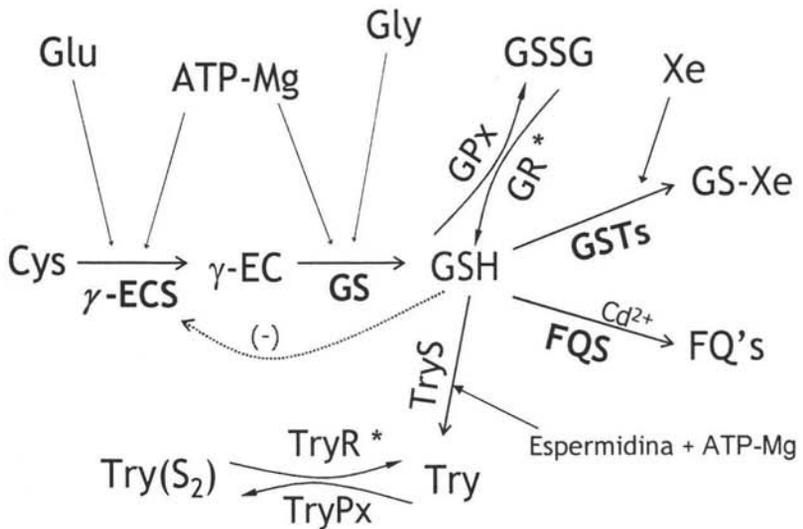
El GSH es sintetizado en dos pasos a partir de sus aminoácidos constituyentes (figura 2). El primero es la formación del dipéptido γ -glutamilcisteína (γ -EC) producido por la unión de Glutamato (Glu) y Cisteína (Cys) que cataliza la γ -ECS a expensas de ATP-Mg mientras el segundo es catalizado por la GS añadiendo una Glicina (Gly) al carboxilo terminal de la γ -EC, también a expensas de ATP-Mg (Mendoza-Cózatl et al., 2004).

Está bien sustentado en la literatura que en condiciones de no estrés esta vía tiene uno de sus mayores puntos de control en la γ -ECS ya que es retroinhibida por GSH (Meister et al., 1995). El GSH es un metabolito muy dinámico y por su importancia se encuentra en grandes concentraciones en todas las células y en cualquiera de sus compartimentos (1-10 mM, Meister et al., 1995; Mendoza-Cózatl et al., 2005).

El metabolismo del GSH está íntimamente ligado al combate del estrés oxidativo y el daño causado por la presencia de metales pesados o agentes

xenobióticos en el entorno de cualquier organismo. El GSH es un metabolito antioxidante, la relación con su especie oxidada (GSSG) provee a la célula una respuesta para mantener su estado redox, interacciona con $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ o NADH/NAD^+ . Este mecanismo permite llevar a cabo normalmente la fosforilación oxidativa, la generación de ATP y en general las actividades anabólicas y catabólicas propias (Pietrini et al., 2003).

Las GSTs son enzimas que se encargan de conjugar cualquier agente xenobiótico electrofílico con el GSH para reducir o anular la toxicidad de la molécula xenobiótica, permitiendo entonces su expulsión o almacenaje. Debido a la gran diversidad de GSTs, están clasificadas según su secuencia, sus propiedades cinéticas, su estructura o incluso su función específica (Smith, 2004).



* La reacción no se presenta estequiométrica y depende de NADPH

Figura 2. Metabolismo de GSH en *Euglena gracilis*

Las GSTs están involucradas en la resistencia a metales pesados los cuales inducen estrés oxidativo y dañan las membranas por la formación de moléculas tóxicas como peróxidos y alquenes.

Los metales pesados inducen incremento del RNA mensajero de algunas de las GSTs presentes en los organismos. Por ejemplo, Smith y colaboradores trabajaron con 7 diferentes GSTs en semillas de *Arabidopsis thaliana*, de las cuales 5 aumentaron su expresión de 3 a 10 veces cuando las semillas fueron cultivadas por 24 h en presencia de 50 μM de CuSO_4 , mientras otros estímulos (como los herbicidas) sólo aumentaron 8 veces la expresión de una de las GSTs. No sólo la traducción de las enzimas aumentó en presencia del Cu^{2+} sino también, el RNAm de los genes que las codifican (Smith et al., 2004).

El Cu^{2+} , así como el Cd^{2+} y otros metales generan un número importante de especies de oxígeno reactivas (ROS) algunas de las cuales influyen la actividad de los promotores de los genes de GSTs (Smith et al., 2004).

Uno de los principales aminoácidos para sintetizar GSH e incluso h-GSH es la Cys. La Cys es obtenida por la vía de asimilación de sulfato (SAP), que utiliza un transportador específico para entrar a las células y a través de una serie de enzimas se reduce hasta sulfuro (S^{2-}); esta vía está regulada por la concentración de Cys ó GSH en la célula. En plantas ocurre principalmente en los cloroplastos de las hojas, las enzimas se hallan mayoritariamente en los plastidios (Leustek, 1996). Se ha reportado que la intoxicación por Cd^{2+} en algunos organismos incrementa el nivel de Cys después de horas de exposición, lo que sugiere una regulación postranscripcional activando la SAP, es sabido que el Cd^{2+} incrementa la transcripción de la mayoría de las enzimas

que participan en la vía (Mendoza-Cózatl et al., 2005). Hasta el momento no se ha considerado que la Cys sea un metabolito limitante para la síntesis de GSH.

3.6.2) Actividad de la γ -ECS y el Cd^{2+}

La γ -ECS es la primera enzima que participa en la síntesis de GSH. Cataliza la reacción entre la Cys y el carbonilo (de la posición gamma) del Glu, para ello depende de la hidrólisis de ATP-Mg. Se ha reportado que su peso molecular corresponde al de un dímero de 60 kDa en plantas superiores como tabaco (*Nicotiana tabacum*). En esta misma planta, el pH de actividad de la γ -ECS se ha encontrado en el intervalo de 6.5 a 9.5 con su punto óptimo en 8 (Hell et al, 1990).

En la literatura disponible podemos encontrar diferentes K_m 's reportadas para los sustratos que requiere: por ATP en bacterias como *E. coli* es de 0.01mM, mientras en protistas como *T. brucei* es de 0.07mM. Por L-Glu en *E. coli* es de 0.5 mM y en el tripanosoma es de 0.24 mM (BRENDA Enzyme Data Base, <http://www.brenda.uni-koeln.de/>).

Al ser una enzima dependiente de ATP sin Mg^{2+} no tiene actividad alguna. Otros metales en concentraciones de 0.2 mM como el Cd^{2+} y el Zn^{2+} la inhiben 64.4% y 84% respectivamente (BRENDA Enzyme Data Base, <http://www.brenda.uni-koeln.de/>).

Más de un estudio ha reportado que la γ -ECS se encuentra localizada tanto en el citosol como en el cloroplasto, tal es el caso del chícharo (*Pisum sativum*) (Klapheck et al., 1987), tabaco (Hell et al., 1988) y frijol (Klapheck et al., 1988). El 72% y el 61% de la actividad de γ -ECS estaban en el cloroplasto en extractos de hojas de chícharo y espinaca (*Spinacea oleracea*) respectivamente.

Como ya se mencionó, la γ -ECS es la enzima con mayor control en la vía de síntesis de GSH en condiciones control según lo reportado en la literatura. Es retroinhibida por GSH de manera competitiva respecto a Glu. Se ha determinado que en extractos citosólicos de tabaco esta retroinhibición presenta una K_i alrededor de 0.42 mM (Hell et al., 1990).

En células de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) naturalmente resistentes a Cd^{2+} , Chen y colaboradores encontraron que la γ -ECS tiene una actividad dos veces mayor en comparación con una línea de jitomates no resistentes. Mientras la actividad de la GS permaneció igual en ambos modelos. Esta mayor actividad de la γ -ECS se relacionó directamente con una mayor síntesis de FQ's y con la tolerancia natural de la línea resistente (Chen et al., 1994).

La sobreexpresión en mostaza (*Brassica juncea*) del gen de *E. coli* que codifica para la γ -ECS resulta en una mayor síntesis de GSH, mientras la sobreexpresión de la GS no aumenta la síntesis del metabolito en ausencia de metales pesados (Zhu et al., 1999a y Zhu et al., 1999b).

3.6.3) Actividad de la GS y el Cd^{2+}

La GS es la segunda enzima que participa en la síntesis de GSH. Cataliza la reacción entre la γ -EC y la Gly, dependiendo de la presencia del complejo de ATP-Mg. Tiene un peso molecular de 85 kDa en chícharo y de 120 kDa en *Schizosaccharomyces pombe* donde se encontró como tetrámero. En *Plasmodium falciparum* la GS es una enzima activa como dímero (sus subunidades son idénticas y corresponden a proteínas

de 77 kDa cada una) y mantenerlo reducido es indispensable para su actividad (Meierjohann et al., 2002). En extractos citosólicos de plantas superiores como tabaco, tiene actividad entre pH 5.5 y 10 con un óptimo de 8 a 9 (Hell et al., 1988).

En extractos de tabaco se encontró que la GS es específica para Gly y para γ -EC, es decir incapaz de sintetizar homoglutación (h-GSH) con β -Ala en el carboxilo terminal o γ -glutamilcisteinil-aminobutirato, un análogo de la γ -EC, respectivamente. Sin embargo, en extractos preparados con *Phaseolus coccineus* el h-GSH sí fue formado, por lo que se reportó la existencia de isoenzimas (Hell et al, 1988).

El mismo estudio antecede que en extractos de chícharo la mitad de la actividad de GS se encuentra en los cloroplastos y la otra mitad en el citosol. Para extractos de tabaco se reporta que del 13 al 24 % de la actividad de GS se localiza en los cloroplastos.

En la literatura disponible encontramos diferentes K_m 's que se han reportado para los sustratos de la reacción que cataliza formando GSH: la K_m por ATP en bacterias como *E. coli* es de 1.8 mM, en plantas como espinaca y chícharo es de 0.17 y 0.25 mM respectivamente. La K_m por L-Gly en *E. coli* es de 0.4 mM, en levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* es de 0.67 mM y en plantas superiores como chícharo es de 0.19 mM (BRENDA Enzyme Data Base, <http://www.brenda.uni-koeln.de/>).

Cuando se sobreexpresó el gen que codifica la GS de *E. coli* en semillas de mostaza y estas se cultivaron en presencia de Cd^{2+} , las raíces obtenidas fueron más resistentes al estrés, pudiendo observar este hecho según su longitud. Además no sólo las raíces sino otros tejidos como las hojas, aumentaron sus niveles de tioles, incluyendo el GSH y FQ's. Esto permitió a los organismos transgénicos tener una mayor

tolerancia y acumulación del metal. Sin embargo, en los mismos organismos transgénicos no ocurrió esta mayor síntesis de GSH y FQs cuando no fueron expuestos al metal (Zhu et al., 1999a). La GS podría ser limitante en la síntesis de GSH y FQs cuando semillas transgénicas de mostaza que la sobreexpresan se exponen a Cd^{2+} .

En la presencia de metales pesados, la vía de síntesis de GSH no es necesariamente controlada en su mayoría por la γ -ECS. Empezando por el hecho de que al sintetizarse FQs el consumo de GSH es mayor, su acumulación es menor y por lo tanto menor es la retroinhibición de la γ -ECS. Por otra parte, se ha demostrado que la GS es más afectada que la γ -ECS por el Cd^{2+} . En raíces de maíz expuestas a este metal se presentó una acumulación de γ -EC y las células quedaron sin GSH. Esto condujo a plantear que la actividad de la GS pudo estar afectada *in vivo* en estas raíces (Rausser et al., 1991). Existen estudios donde ya se ha sugerido que en presencia de metales pesados en la vía de síntesis de GSH se establece un control diferente, pudiendo estar repartido más equitativamente entre la γ -ECS y la GS. Incluso se ha propuesto que la GS es la enzima limitante de la vía en condiciones de estrés por metales pesados en estudios realizados con mostaza (Zhu et al., 1999a).

3.6.4) Actividad de la FQS y el Cd^{2+}

La FQS es una de las enzimas consumidoras de GSH durante la exposición a metales pesados pues es quien sintetiza las FQs usando al GSH como sustrato. La FQS encontrada en semillas de arroz resistentes a $50 \mu M$ de Cu^{2+} se reportó con un peso molecular de 100 kDa, con un pH óptimo de actividad en 7.5 siendo más sensible hacia los pH's alcalinos que a los ácidos (Yan et al., 2000).

La reacción que cataliza involucra una transpeptidación, la transferencia de la mitad de un GSH a otro GSH o a una FQ previamente formada. Se ha dicho que la resistencia a metales pesados está íntimamente ligada a la síntesis de FQ's; sin embargo, cuando se sobreexpresó el gen que codifica para la FQS en *Arabidopsis* contrario a lo que se esperaba, la sobreexpresión produjo plantas más sensibles al Cd^{2+} en algunas líneas, a pesar de que el estímulo debería favorecer la síntesis de GSH y de tioles no proteicos (Lee et al., 2003).

La FQS es una enzima activada por metales, tiene una actividad basal dada por los metales traza con función biológica, se ha encontrado que su expresión es constitutiva en las células que la poseen. Sustento de esto es que la diatomea *Thalassiosira weissflogii* sintetiza FQ's rápidamente en presencia de Cd^{2+} pero al retirar el metal disminuye la síntesis restaurándose un nivel remanente constante (Lee et al., 1996).

Es una enzima peculiar considerando que es activada por metales, sobretudo por metales que para otras enzimas resultan inhibidores. La FQS es activada en proporción diferente según el metal al que se exponga, el primer y mejor activador de la enzima encontrada en *Arabidopsis* es el Cd^{2+} , seguido en orden descendente por el Hg^{2+} , As^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , As^{5+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} probados a $50 \mu M$ (Vatamaniuk et al., 2000). La FQS encontrada en arroz es igual que la de *Arabidopsis*, mayormente activada por Cd^{2+} pero su segundo activador es el Pb^{2+} y después el Fe^{2+} a concentraciones de $10 \mu M$ (Yan et al., 2000).

Se había considerado que tal activación se debía al enlace directo del metal a la enzima; sin embargo, a pesar de que Vatamaniuk y cols. (2000) informaron que el residuo N-terminal de la enzima AtPCS1 de *Arabidopsis* es altamente conservado en

FQS's de diferentes microorganismos y que este residuo posee hasta 5 Cys capaces de quelar metales libres, aún en ausencia de metales libres se sintetizaron FQs *in vitro*. La explicación que proporcionaron a este hecho es que el sustrato o activador de la FQS no es el metal libre, sino la asociación glutatión-metal (GS_2 -Cd) (Vatamaniuk et al., 2000).

La activación de los metales antes mencionados hacia la FQS se afecta si las Cys tienen su tiol en estado reducido u oxidado. En general, la activación resulta mejor después de la reducción de la enzima (Vatamaniuk et al., 2000).

3.7) *Euglena gracilis*

El género *Euglena* pertenece al Phylum de los *Euglenófitos* (del griego *eu*, verdadero; *glene*, globo ocular; *phyton*, planta). La mayoría de los flagelados euglenoides son unicelulares y viven en aguas dulces estancadas, aunque hay algunas marinas y otras coloniales o parásitas (Whittaker y Margulis, 1978). La mayor parte de ellos son fotosintéticos pero algunos carecen de cloroplastos y son únicamente heterótrofos, en ocasiones aún siendo fotosintéticos se alimentan de partículas disueltas o suspendidas (Buetow, 1982).

Es precisamente por tener cloroplastos que algunos autores clasifican a los *Euglenófitos* entre las algas verdes; sin embargo, tienen grandes diferencias con estas, incluso los propios pigmentos fotosintéticos. Además de la clorofila *a* y *b*, así como ciertos derivados del β -caroteno, *Euglena* tiene otros pigmentos que no se encuentran en los clorófitos y las plantas. Por microscopía electrónica se ha visto que los cloroplastos de *Euglena* poseen como envoltura tres membranas, típicas laminillas con tilacoides y estroma.

Algo que los diferencia de las plantas es la fina película flexible compuesta de proteína que podría ser comparable con la pared celular de las algas o las plantas verdes. Es gracias a esta envoltura que pueden adoptar diferentes formas fácilmente.

A diferencia de los clorófitos y las plantas, no almacenan almidón sino paramilo, un polímero de glucosa con enlaces β -1-3 entre monosacáridos. Su locomoción está dada por un flagelo dirigido anteriormente y pueden tener también otro que probablemente contribuye con la respuesta al estímulo de luz (Buetow, 1982). *Euglena* requiere de modo indispensable la presencia de vitamina B₁₂.

Euglena gracilis es un protista fotosintético unicelular de vida libre que mide aproximadamente 50 μm de largo y 10 μm de ancho (Buetow, 1982). Es la única especie de *Euglena* que puede ser desprovista de sus cloroplastos sin matar al microorganismo, de este modo la célula que solía ser fotosintética puede depender completamente de una fuente de carbono para subsistir (Buetow, 1982).

En *Euglena* se ha reportado que el Cd²⁺ causa pérdida de la motilidad, alteraciones en la división celular, en la síntesis de proteínas y afecta los componentes del fotosistema II (Trevors et al., 1986), promueve la respiración y la síntesis de clorofilas (Nakano et al., 1978 y Devars et al., 1998).

Euglena gracilis ha resultado en el laboratorio un modelo de estudio interesante pues soporta condiciones de cultivo adversas: baja temperatura o ausencia de fuente de carbono, luz u oxígeno. Algunas de sus funciones biológicas son comparables con las de bacterias, otras con las de algas y levaduras e incluso con organismos complejos como plantas superiores (Buetow, 1982).

Para este trabajo lo que hace a *Euglena gracilis* un microorganismo de gran interés es su elevada tolerancia y acumulación de metales pesados, el 50% del

crecimiento de su población se afecta a concentraciones de 100 μM de Cd^{2+} (Rangel-González et al., 2003), mientras el crecimiento de microorganismos como las algas *Chlorella vulgaris* y *Navicula incerta* tienen IC_{50} de 5.8 μM y 26.7 μM respectivamente (Trevors et al., 1986); además *Euglena* llega a acumular Cd^{2+} hasta el 3.5% de su peso seco (Devars et al., 1998).

Por lo anterior, *Euglena gracilis* podría ser un microorganismo usado en la remoción de Cd^{2+} y posiblemente de otros metales en cuerpos de agua contaminados. Sin embargo, no se conoce claramente en que consiste su mecanismo de resistencia, por lo que el estudio de su metabolismo es importante para su aplicación.

Euglena gracilis como parte de su mecanismo de resistencia y acumulación de metales pesados sintetiza FQ's, péptidos derivados de glutatión que acomplejan al metal que ha sido introducido a la célula para compartamentalizarlo en una forma menos tóxica. Estudios han demostrado que estos complejos, *Euglena gracilis* los acumula mayoritariamente en el cloroplasto (Mendoza-Cozatl et al, 2002), ya que el Cd^{2+} tiene acceso a él usando quizá los transportadores de metales esenciales (Zn^{2+}) (Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005).

Euglena gracilis expuesta a concentraciones mayores de 25 μM de Cd^{2+} en cultivo acumula cantidades significativas de $\gamma\text{-EC}$ (figura 3). Esta acumulación de $\gamma\text{-EC}$ es importante por que la $\gamma\text{-EC}$ es sustrato de la GS, lo que nos lleva a pensar que en condiciones de estrés por Cd^{2+} , la GS puede tener mayor participación en el control de la vía. Es decir, el control de la vía puede ser diferente ya que en condiciones de no estrés por metales, la literatura considera que la $\gamma\text{-ECS}$ es la enzima con mayor control de la vía de síntesis de GSH. Este cuestionamiento nos lleva a explorar si la

acumulación de γ -EC se debe a que la actividad de la GS está más afectada por Cd^{2+} que la actividad de la γ -ECS. Diferentes situaciones explicarían que la GS tenga menor actividad que la γ -ECS en células Cd_{50} : (1) Que la disponibilidad de los sustratos de la GS limiten su actividad o que (2) haya un cambio en la cantidad de γ -ECS y de GS, en este caso hay a su vez tres opciones para que ello ocurra: (i) la presencia del Cd^{2+} en el medio de cultivo induce un incremento diferencial en la expresión de la γ -ECS y de la GS, aumentando más la de la γ -ECS que la de la GS, (ii) que el Cd^{2+} inhiba más la actividad de la GS que la de la γ -ECS y (iii) la combinación de ambas, es decir; que la expresión sea diferencial teniendo más γ -ECS que GS en células Cd_{50} y que además la GS sea más sensible a la presencia del Cd^{2+} que la γ -ECS; (3) que haya un cambio inespecífico en la cantidad de proteína en células Cd_{50} respecto a las células no estresadas.

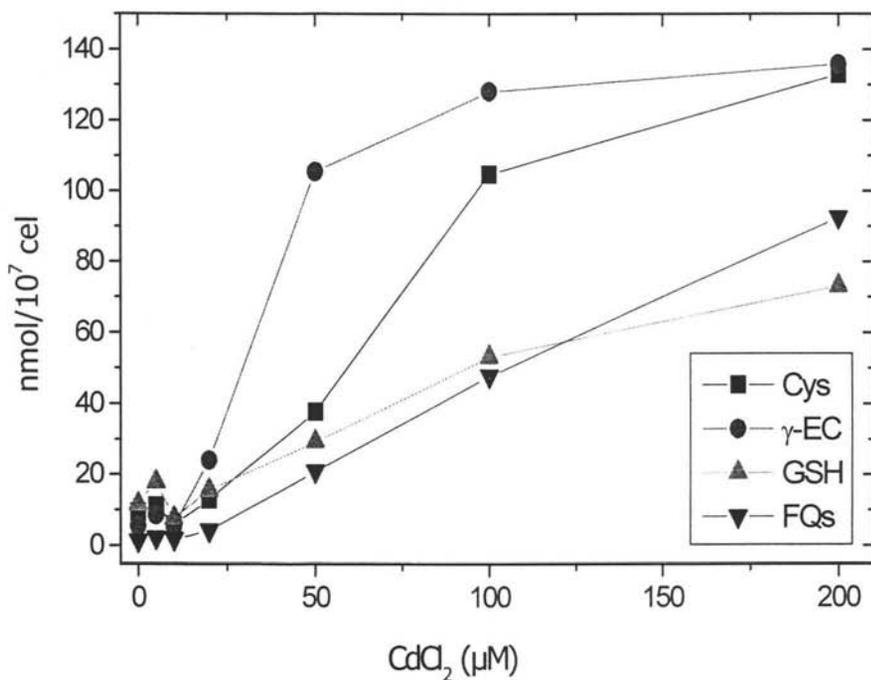


Figura 3. Metabolitos en *Euglena gracilis* durante la fase estacionaria temprana de crecimiento (Rangel-González et al., 2003). Las diferencias en las mediciones son significativas, en la referencia original se presentan como la media \pm dS.

IV. Hipótesis

Debido a que *Euglena gracilis* acumula γ -EC durante su exposición a concentraciones mayores de 25 μM de Cd^{2+} , suponemos que la glutatión sintetasa ejerce mayor control en la vía de síntesis de GSH durante la exposición a Cd^{2+} .

V. Objetivo

Determinar el efecto del Cd^{2+} sobre el metabolismo de GSH en *Euglena gracilis*

Objetivos particulares

- ✓ Determinar la actividad total de las enzimas productoras y consumidoras de glutatión (γ -ECS, GS, FQS, GSTs) medida a través de sus V_m 's, en extractos citosólicos de células control y células expuestas durante su cultivo a 50 μM de CdCl_2 .
- ✓ Determinar el contenido de aminoácidos en células control y células expuestas a 50 μM de CdCl_2 .
- ✓ Determinar la inhibición *in vitro* por Cd^{2+} de las enzimas productoras y consumidoras de glutatión en extractos citosólicos.
- ✓ Determinar la velocidad de síntesis de GSH a partir de Cys en extractos control, Cd_{50} y con Cd^{2+} añadido *in vitro*.

VI. Metodología

6.1) Cultivo de *Euglena gracilis*

Euglena gracilis Z (cepa fotosintética) se cultivó en medio Hutner (Ácido Málico, Ácido Glutámico, CaCO₃, vitaminas y minerales traza), a pH=3.5; con o sin CdCl₂ (ver apartado 2). Los cultivos estuvieron sometidos a un fotoperiodo de 12 h luz-obscuridad a una intensidad de luz blanca fluorescente de 60 -70 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los cultivos se iniciaron con una densidad celular de 0.4×10^6 cel/mL ya que es el inóculo inicial óptimo para el crecimiento de *Euglena gracilis* durante los ocho días que tarda en llegar a la fase estacionaria temprana de crecimiento.

6.2) Obtención del extracto citosólico

Las células se cosecharon el día 4 (durante la fase logarítmica) de crecimiento por centrifugación (10 minuto a $195 \times g$) en un buffer de TRIS 100 mM pH=8, se lavaron tres veces con el mismo buffer. El pellet celular se resuspendió en TRIS 100 mM pH=8, y con 1mM de PMSF, previamente saturado con N₂. Para obtener el citosol, las células se sonicaron como fue descrito en Moreno-Sánchez y Raya (1987), en hielo 10 ciclos durante 15 segundos con descanso de 1 minuto entre ciclos, logrando que al menos el 80% de las células estuvieran rotas, verificando este porcentaje por cuenta en cámara de Neubauer. El proceso de obtención del citosol se llevó a cabo a 4 °C. El sonicado se centrifugó durante 5 minutos a $195 \times g$ para bajar células y núcleos, 10 minutos a $23400 \times g$ para bajar organelos membranosos como mitocondrias y cloroplastos, y finalmente 45 minutos a $226192 \times g$ para bajar fracciones

microsomales, lisosomas y retículo endoplásmico. El sobrenadante fue considerado como el citosol (Mendoza-Cozatl et al, 2002).

El citosol se pasó por una columna de Sephadex G-25 con el fin de desalarlo, donde el buffer de elución fue Tris 100 mM a pH=8 previamente saturado con N₂ para garantizar condiciones libres de O₂. El sistema estuvo acoplado a un detector de UV y este a su vez a un graficador. Sólo la fracción correspondiente a moléculas >25 kDa se colectaron y concentraron para obtener el extracto citosólico para los ensayos enzimáticos.

6.3) Medición de la actividad enzimática

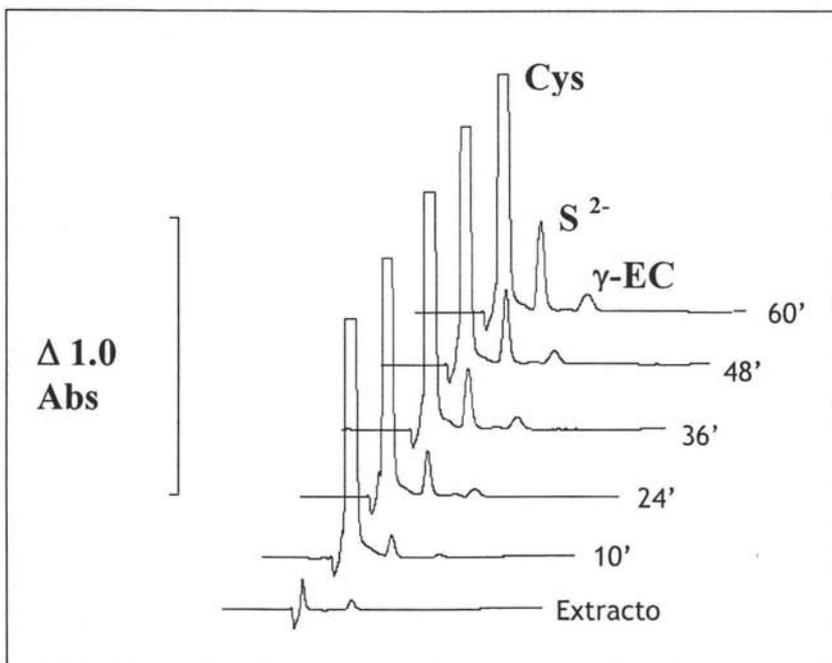
Con el extracto citosólico se cuantificó la actividad de las enzimas mencionadas con base en la formación de su producto, para lo cual se usó un sistema de HPLC. Este equipo cuenta con una columna en fase reversa (C-18 de 4.6mm x 150mm) en la que se usó como fase móvil Ácido Trifluoroacético (TFA) al 0.1% (buffer A), en un flujo total de 1.0 mL/min. Se usó un gradiente lineal discontinuo que iba de 100% de TFA a 20% de Acetonitrilo (ACN) disuelto en buffer A (buffer B), del minuto 10.1 al minuto 50, volvimos al buffer A en 60 minutos. La detección se hizo con una derivatización post-columna con DTNB (1 mM) disuelto en buffer de fosfatos (100 mM, pH= 8), ya que esta molécula reacciona con los grupos tioles, liberando estequiométricamente 1 molécula de TNB por cada tiol. Esta molécula absorbe a 412 nm lo que permite cuantificarla por espectrofotometría (usando un ϵ^{TNB}_{412nm} de 13,600 M⁻¹cm⁻¹).

La actividad de la γ -ECS se midió en un buffer de TRIS (100 mM) a pH= 8 (que es el pH de mayor estabilidad y de mayor actividad de las tres enzimas [Hell y Bergmann,

1998]). La concentración final de sustratos fue: 0 a 1 mM de Cys, 20 mM de Glu, 5 mM de ATP, 8 mM de fosfocreatina, 10 U/mL de creatina cinasa y 50 mM de MgCl₂ (Hell y Bergmann, 1998). El ensayo de la actividad de la GS también se hizo en un buffer de TRIS (100mM) a pH= 8 que contenía: 0 a 250 μM de γ-EC, 10 mM de Gly, 5 mM de ATP, 8 mM de fosfocreatina, 10 U/mL de creatina cinasa y 50 mM de MgCl₂ (Hell y Bergmann, 1998). El ensayo de la actividad de la FQS tenía como concentraciones finales 1 mM de DTT, 3 mM de GSH y 0.2 mM de CdCl₂ en un buffer TRIS (200 mM) ajustado a pH= 8 previamente saturado con N₂ (modificado de Tsuji et al., 2003). Todos los ensayos se prepararon en volúmenes finales de 900 μL y se realizaron a 30 °C durante distintos tiempos y se detuvieron añadiendo 100 μL de ácido perclórico (PCA) al 30% para precipitar toda la proteína. Se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 21893 x g, el SN se filtró con unidades Millex-Millipore (0.45 μm) y finalmente se inyectó en HPLC. Todos los ensayos medidos por HPLC se llevaron a cabo a 30 °C.

Los ensayos para medir la actividad de las GSTs se hicieron en buffer TRIS-MOPS 50 mM a pH= 7.6 con diferentes concentraciones de agente xenobiótico (cloruro de 2,4-dinitro benceno [NBD]) y GSH, midiendo la reacción de conjugación a 340 nm. La metodología utilizada presenta ventajas sobre métodos inmunológicos o la cuantificación de RNAm, ya que mide la actividad de las enzimas por formación de producto (figura 4). Sabemos que no todo el RNAm sintetizado es traducido; así mismo, los métodos inmunológicos cuantifican la cantidad de proteína y esto no necesariamente corresponde con la actividad de las enzimas *in vivo*.

Figura 4. Aparición del producto de la reacción de la γ -ECS a través de tiempo



6.4) Cuantificación de aminoácidos

Se cosecharon las células control y Cd₅₀ por centrifugación (10 minutos a 195 x g) en agua, se lavaron tres veces. Después de que las células fueron contadas y resuspendidas en un volumen mínimo de agua, se les añadió Ácido Tricloroacético (TCA) suficiente para que quedaran en una concentración final de 10%. El precipitado se centrifugó a 4 °C durante 5 minutos a 21893 x g y del sobrenadante se tomaron 100 μ L.

Estos 100 μL se sometieron al siguiente tratamiento:

1. Solución 1: etanol:agua:trietilamina (2:2:1)

2. Solución de derivatización: etanol:agua:trietilamina:fenilisotiocianato
(7:1:1:1)

Las muestras se secaron bajo vacío, se añadieron 20 μL de la solución 1 y nuevamente se secaron bajo vacío. Se añadieron 20 μL de la solución de derivatización, 20 minutos a temperatura ambiente. Se secaron bajo vacío 2 horas.

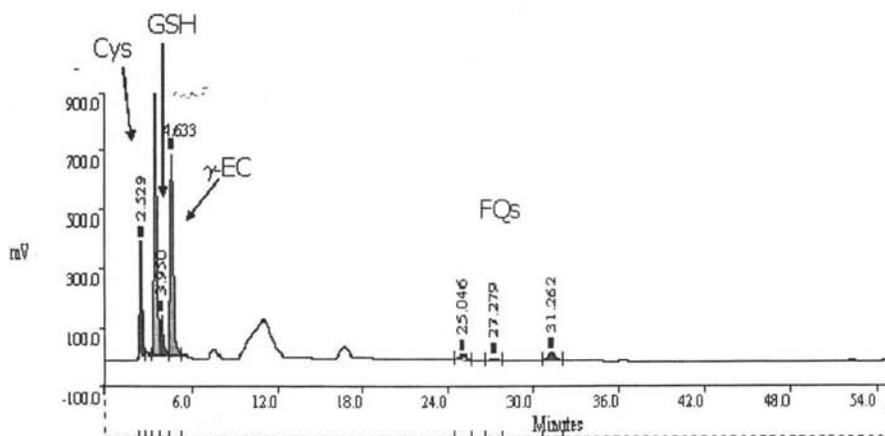
La conversión a **feniltioldiantoin aminoácidos** (PTH aa) se llevó a cabo en 20% de TFA (50 μL) a 80 °C, 10 minutos bajo nitrógeno. Las muestras se secaron bajo vacío con perlas de NaOH en la trampa, resuspendidas en ACN 10 % y los PTH aa derivatizados se identificaron y cuantificaron por HPLC.

Esta cuantificación de aminoácidos se hizo con ayuda del Dr. Guillermo Mendoza Hernández en el Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

VII. Resultados

El hecho que dio origen a este trabajo se presenta en la figura 3 donde se exhibe la acumulación de γ -EC durante la exposición a Cd^{2+} de los cultivos de *Euglena* en la fase estacionaria temprana de crecimiento. Sin embargo, para descartar que la acumulación de γ -EC se deba a la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo se midieron los tioles de *Euglena* en fase logarítmica.

La figura 5 es el cromatograma que presenta el contenido de tioles en un extracto celular de *Euglena gracilis* de células cultivadas con $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 y cosechadas al durante la fase logarítmica de crecimiento donde podemos observar que la γ -EC es el monotiol más abundante.



Cromatograma: $100 \mu\text{M}$ CdCl_2 : acumulación de γ -EC

Figura 5. Acumulación de γ -EC durante la fase logarítmica de crecimiento de *Euglena gracilis* expuesta a $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . Los minutos en el cromatograma representan el tiempo de elución de cada tiol, con la metodología descrita.

Para estandarizar las condiciones en que la actividad de las enzimas iba a ser medida se probaron diferentes pH's, ya que este es un parámetro importante para la actividad de cualquier enzima. En una mezcla de buffers (ácido acético, MES, HEPES, TRIS, TAPS, cada uno a una concentración 100 mM) ajustada a diferentes pH's se realizó el perfil de actividad de la γ -ECS en condiciones de V_m reportadas en la literatura. La figura 6 muestra claramente que el pH óptimo de actividad encontrado es 8, pero el rango de actividad de la γ -ECS de *Euglena* va desde pH 6.5 hasta 8.5.

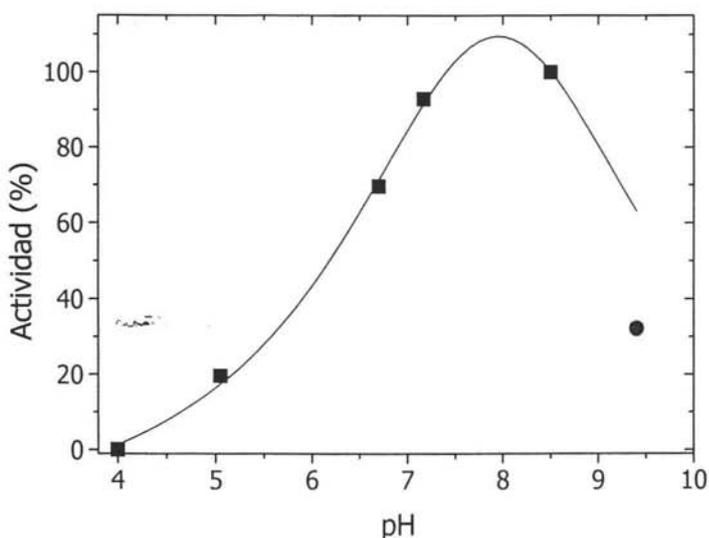


Figura 6. Perfil de actividad de la γ -ECS a diferentes pH's

La figura 7 presenta las velocidades iniciales de actividad de la γ -ECS a diferentes concentraciones de su sustrato tiol, la Cys. Tal como se esperaba la pendiente de las

líneas rectas aumenta conforme aumenta la concentración de Cys, y cada una de ellas tiene una sección lineal (velocidad inicial). Un caso claro es que cuando la Cys es 1.0 mM la linealidad persiste hasta los 10 minutos, pues a los 15 minutos la gráfica claramente tiene una tendencia hiperbólica (figura 7). Para construir la cinética únicamente consideramos las velocidades iniciales.

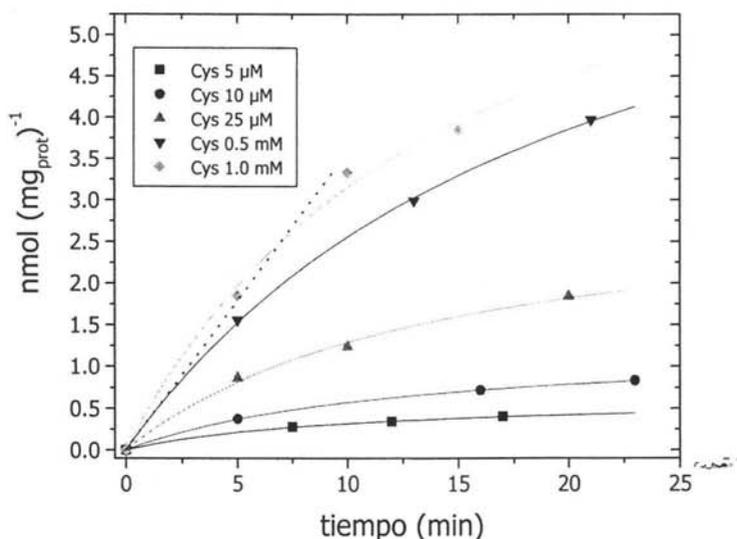


Figura 7. Curso temporal de la actividad de la γ -ECS a diferentes concentraciones de Cys

La figura 8 es la cinética de la actividad de la γ -ECS respecto a Cys en un extracto de células Cd_{50} . Es una cinética Michaeliana de donde obtuvimos una K_m por Cys de 20 μM y resultó idéntica a la encontrada en extractos de células control.

Por su parte también probamos diferentes concentraciones de Glu para obtener a partir de velocidades iniciales una K_m de la γ -ECS por el Glu (figura 9).

También se construyó la cinética de la siguiente enzima productora de GSH, la GS. La figura 10 muestra la producción de GSH a través del tiempo, donde podemos observar que la linealidad de esta relación se mantiene hasta los 10 minutos a las concentraciones de γ -EC probadas.

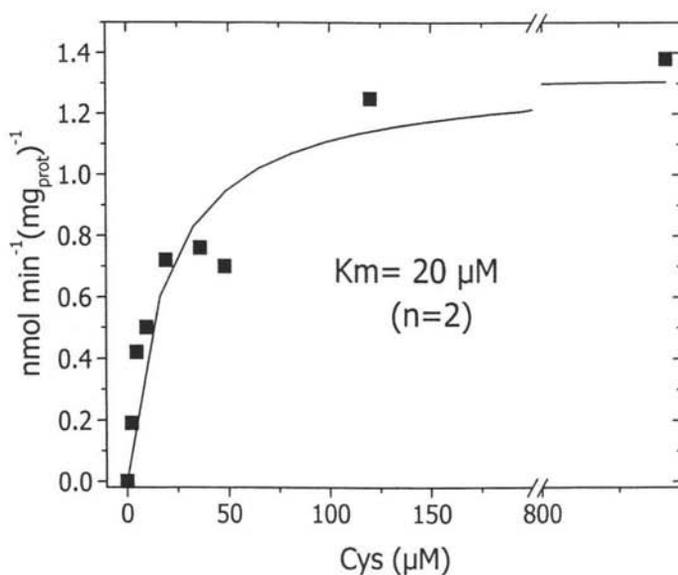


Figura 8. Cinética de la γ -ECS en extracto de células Cd_{50}

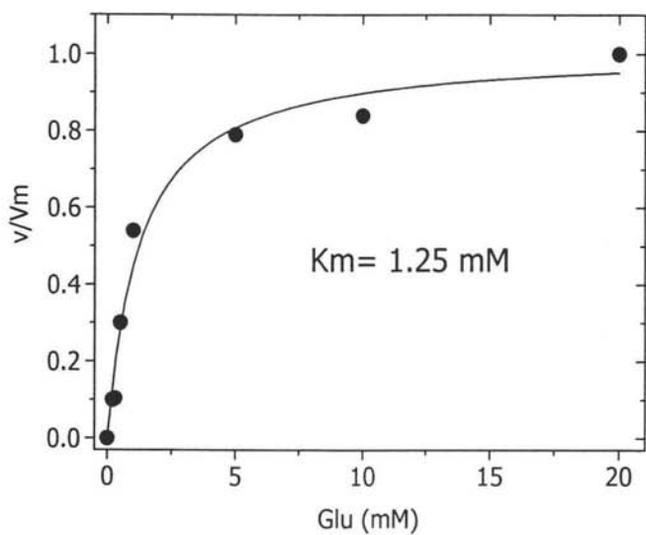


Figura 9. K_m de la γ -ECS por Glu en extracto de células Cd_{50}

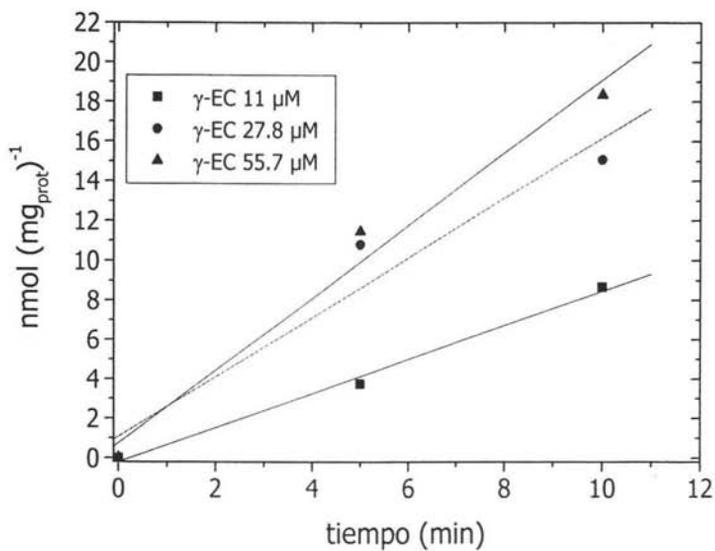


Figura 10. Curso temporal de la actividad de la GS donde se muestran las velocidades iniciales

La figura 11 es la cinética que se obtiene de la actividad de la GS en extractos de células Cd₅₀. Tanto en extractos de células control como de células Cd₅₀ la cinética es Michaeliana. La obtenida en células control muestra una Km de 24 μM por γ-EC y la hecha en extractos de células Cd₅₀ de 13 μM. Debido a que la concentración de γ-EC, tanto en células control como células Cd₅₀, es muy superior a 500 μM, no consideramos esta diferencia con relevancia fisiológica.

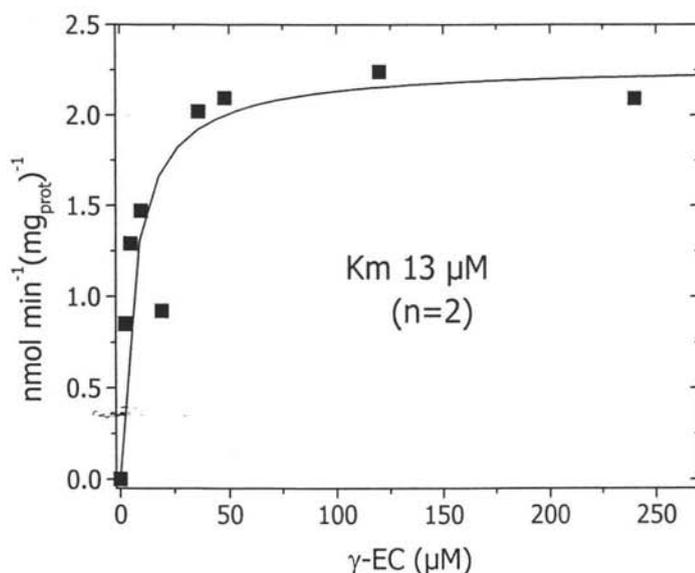


Figura 11. Cinética de la GS en extractos de células Cd₅₀

Por su parte, la Km del aminoácido que sirve como sustrato a la GS es mostrada en la figura 12 tiene un valor de 32 μM como promedio de dos mediciones.

La actividad de las enzimas depende directamente de la disponibilidad de cada uno de sus sustratos. En la figura 13 se presenta el contenido de la mayoría de los aminoácidos en *Euglena*, en células control y células Cd₅₀. Ahí podemos observar que el Cd₅₀ induce un incremento global en la concentración de aminoácidos, excepto por Aspártico y Asparagina. Los aminoácidos que participan en la síntesis de GSH aumentan cuando las células se exponen 50 μ M de CdCl₂.

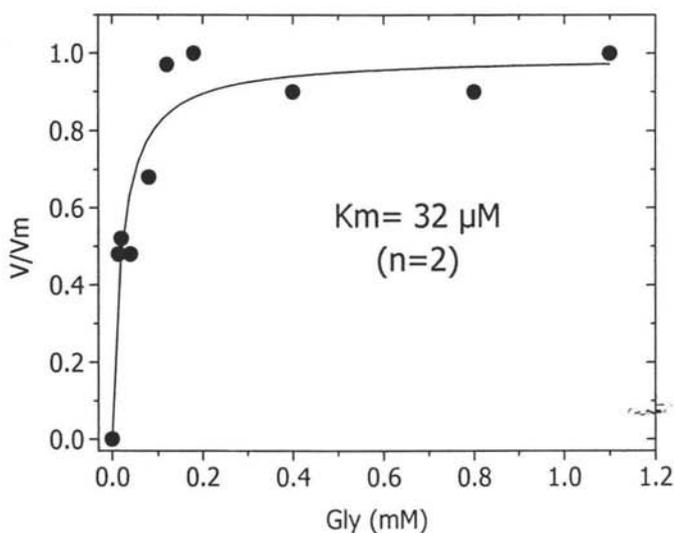


Figura 12. Km de la GS por Gly en extracto de células control

Debido a que las GSTs son enzimas consumidoras de GSH y tienen un papel crucial durante el estrés por metales, su cinética también fue evaluada. Las GSTs, tienen cinética Michaeliana. Debido a que se usa una reacción colorimétrica con un sustrato xenobiótico artificial, NBD, general para todas las glutatión transferasas, la *Km*

obtenida de $14.6 \mu\text{M}$ (figura 14), representa el promedio de todas las transferasas presentes en el extracto de *Euglena*. A través de la misma reacción pero variando la concentración de GSH obtenemos una K_m por GSH de $13 \mu\text{M}$ (figura 15). En la tabla 4 podemos observar que la actividad de este grupo de transferasas aumenta en extractos de células Cd_{50} respecto a la actividad máxima que tienen en extractos de células control.

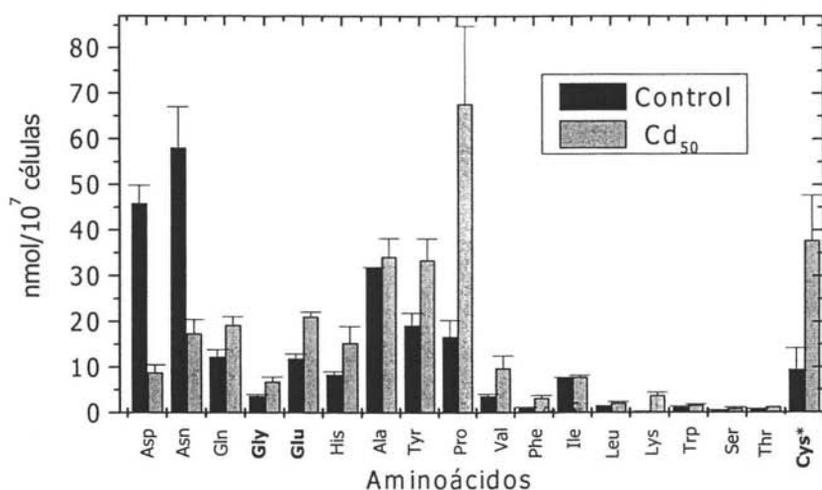


Figura 13. Contenido total de aminoácidos en células control y Cd_{50} . Los valores se presentan como media \pm ES (n=3). *La Cys está medida por separado usando una reacción con DTNB.

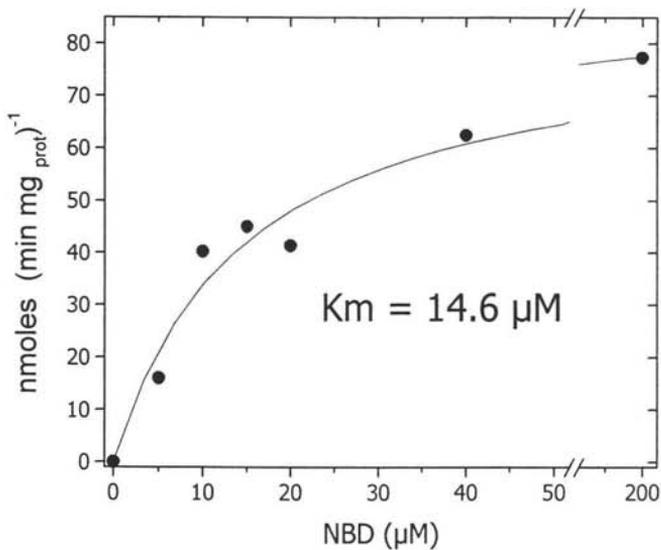


Figura 14. Cinética de las GSTs en extractos de células control (K_m por NBD)

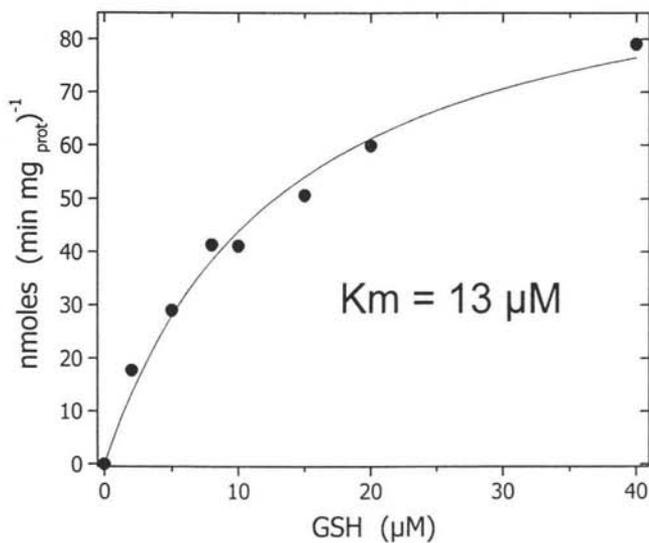


Figura 15. Cinética de las GSTs en extractos de células control (K_m por GSH)

Otra enzima consumidora de GSH, la FQS tiene una actividad significativamente menor que las dos enzimas productoras de GSH y no comparable con la actividad de las GSTs. Aunque no caracterizamos cinéticamente a la FQS de *Euglena*, determinamos su velocidad en condiciones similares a lo reportado en la literatura (Tsuji et al., 2003) obteniendo velocidades iniciales hasta los 60 minutos (figura 16).

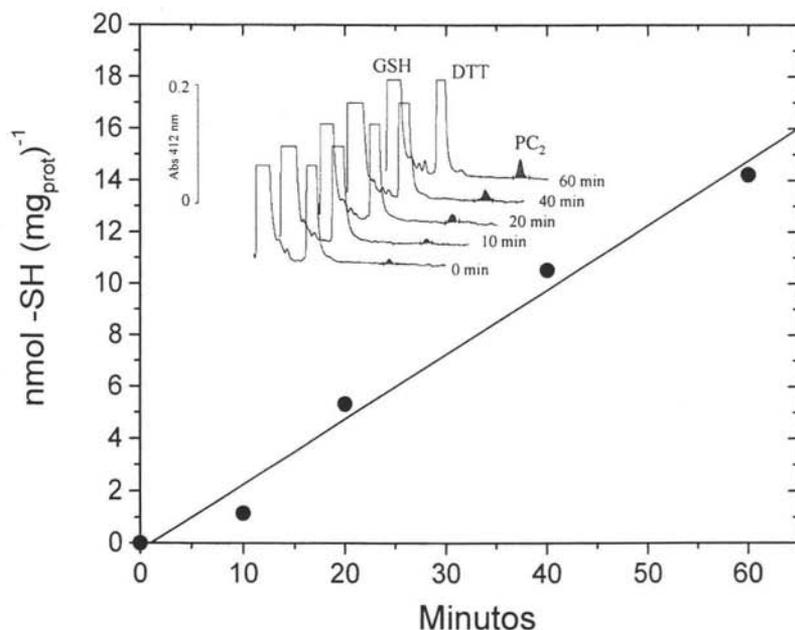


Figura 16. Velocidad inicial de la FQS en extractos de células control

Un parámetro importante para estudiar a las enzimas es su V_m pues está directamente relacionada con la concentración de enzima, según: $V_m = k_{cat}[E]$. En la tabla 4 podemos comparar la V_m de la γ -ECS y la de la GS en las dos condiciones estudiadas (células control y células Cd₅₀), notamos que en ningún caso la actividad de la GS es menor que la actividad de la γ -ECS. Por otro lado, en los extractos Cd₅₀ se

incrementó la actividad de las enzimas productoras de GSH y de las transferasas, mientras la FQS parece estar inhibida o disminuida en esta condición. Para completar este estudio faltaba observar que efecto tiene el Cd^{2+} sobre la actividad de las enzimas, en la figura 17 se presentan los ensayos de la inhibición de las GSTs y en la figura 18 los ensayos separados de la inhibición de la γ -ECS y la GS por Cd^{2+} .

Tabla 4. Velocidad máxima de las enzimas productoras y consumidoras de GSH.

	Velocidad máxima (nmol (min mg _{prot}) ⁻¹)			
	γ -ECS	GS	GSTs	**FQS
Extracto control	0.65 ± 0.03 (n= 5)	1.17 ± 0.05 (n= 4)	84 ± 17 (n= 4)	0.25±0.09 (n=4)
Extracto Cd ₅₀	2.65 ± 0.05* (n=3)	2.85 ± 0.6 [®] (n=3)	158 ± 43 [®] (n= 3)	0.09±0.06 (n=5)
Veces de aumento	4.08 x	2.43 x	1.88 x	0 x

*Diferencias significativas respecto al extracto control, P<0.001. **La enzima se midió según lo reportado en la literatura, lo cual puede no reflejar la Vm de la enzima en *Euglena*. [®] Diferencias significativas respecto al extracto control, P<0.005. Los valores se presentan como prom ± DS.

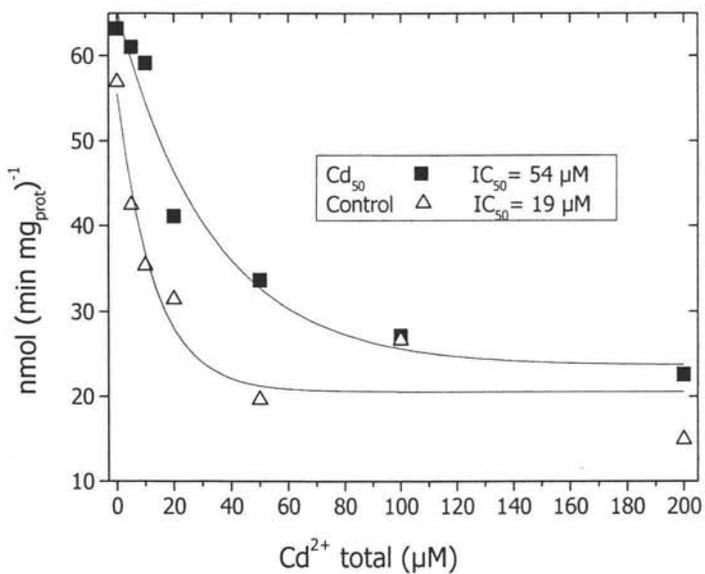


Figura 17. Inhibición por Cd²⁺ de las GSTs presentes en *Euglena*

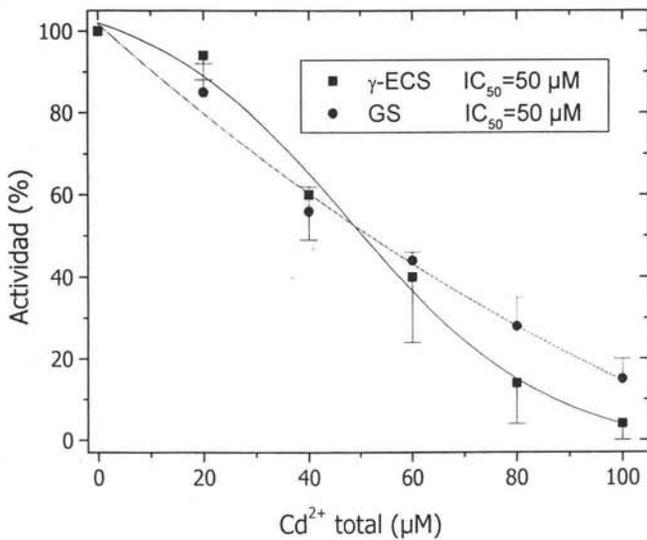


Figura 18. Inhibición *in vitro* de las enzimas productoras de GSH en extractos Cd₅₀

Las GSTs son afectadas *in vitro* por la presencia del Cd^{2+} . En los experimentos realizados vimos como este grupo de enzimas consumidoras de GSH modificaron su resistencia cuando fueron sometidas a diferentes concentraciones de Cd^{2+} en el ensayo. La concentración de Cd^{2+} que inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC_{50}) de las transferasas presentes en extractos de células control fue más pequeña ($19 \mu\text{M}$) comparada con la IC_{50} de transferasas presentes en extractos de células Cd_{50} ($54 \mu\text{M}$), es decir las transferasas de la células sometidas a estrés por $50 \mu\text{M}$ de CdCl_2 en el medio de cultivo son más resistentes al metal (figura 17).

La inhibición de las enzimas productoras de GSH es probablemente donde se resuelve parte de la explicación a la acumulación de $\gamma\text{-EC}$ en células Cd_{50} . La inhibición de la $\gamma\text{-ECS}$ resultó ser sigmoideal mientras la GS se inhibió de manera exponencial ajustándose a un decaimiento de primer orden en los extractos Cd_{50} , donde se ensayaron (figura 18).

Con el software Chelator (Shoenmakers et al., 1992), pudimos calcular las concentraciones de cada complejo formado con Cd^{2+} durante los ensayos de inhibición (tablas 5.1 y 5.2) dadas las condiciones para cada enzima (ver en la metodología). Para ello se consideramos algunas constantes de estabilidad, mismas que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5.0 Constantes usadas en los cálculos de especies formadas en los ensayos de inhibición de las enzimas productoras de GSH

Temperatura	Quelante		Afinidad (K_{est}) Molar
23 °C	Cys	COO ⁻ por H ⁺	10^2
		Tiol por H ⁺	$10^{8.53}$
		Amino por H ⁺	$10^{10.36}$
25 °C	Cys	Tiol por Cd ²⁺	$10^{9.89}$
25 °C	GSH	COO ⁻ por H ⁺	$10^{3.59}$
25 °C	Glu	α -COO ⁻ por H ⁺	$10^{2.18}$
		R-COO ⁻ por H ⁺	$10^{4.18}$
		Amino por H ⁺	$10^{9.64}$
	Glu	Cd ²⁺	$10^{3.9}$
		Mg ²⁺	$10^{3.17}$
18 °C	PPi	H ⁺	$10^{1.96}$, $10^{6.54}$ y $10^{8.44}$
19 °C		Mg ²⁺	$10^{5.7}$
		Cd ²⁺	$10^{5.6}$
25 °C	Gly	H ⁺	$10^{9.58}$
		Cd ²⁺	$10^{3.95}$
		Mg ²⁺	$10^{1.34}$

Tabla 5.1 Concentraciones calculadas de las especies presentes en los ensayos de inhibición de la γ -ECS. Se consideraron las concentraciones de metabolitos usadas en los ensayos de inhibición: 5 mM de ATP (sin sistema regenerante), 250 μ M de Cys, 20 mM de Glu y 50 mM de Mg^{2+} .

(M)	γ -ECS				
	Cd^{2+} 20 μ M total	Cd^{2+} 40 μ M total	Cd^{2+} 60 μ M total	Cd^{2+} 80 μ M total	Cd^{2+} 100 μ M total
Cd^{2+} libre	1.15×10^{-11}	2.23×10^{-11}	4.19×10^{-11}	6.24×10^{-11}	8.84×10^{-11}
Glu-Mg	1.95×10^{-12}				
Glu-Cd	4.72×10^{-11}	1.03×10^{-10}	1.72×10^{-10}	2.56×10^{-10}	3.62×10^{-10}
Mg^{2+} libre	2.55×10^{-2}				
ATP-Mg	4.99×10^{-3}				
ATP-Cd	1.79×10^{-12}				
Tiol-Cd	2×10^{-5}	4×10^{-5}	6×10^{-5}	8×10^{-5}	10×10^{-5}
Tiol libre	2.3×10^{-4}	2.1×10^{-4}	1.91×10^{-4}	1.7×10^{-4}	1.5×10^{-4}

Tabla 5.2 Concentraciones calculadas de las especies presentes en los ensayos de inhibición de la GS. Se consideraron las concentraciones de metabolitos usadas en los ensayos de inhibición: 5 mM de ATP sin (sistema regenerante), 250 μ M de γ -ECS, 10 mM de Gly y 50 mM de Mg^{2+} .

(M)	GS				
	Cd^{2+} 20 μ M total	Cd^{2+} 40 μ M total	Cd^{2+} 60 μ M total	Cd^{2+} 80 μ M total	Cd^{2+} 100 μ M total
Cd^{2+} libre	2.83×10^{-12}	6.2×10^{-12}	1.03×10^{-11}	1.53×10^{-11}	2.17×10^{-11}
Gly-Mg	4.68×10^{-3}				
Gly-Cd	1.34×10^{-10}	2.94×10^{-10}	4.87×10^{-10}	7.26×10^{-10}	1.03×10^{-10}
Mg^{2+} libre	4.5×10^{-2}				
ATP-Mg	4.99×10^{-3}				
ATP-Cd	2.79×10^{-13}	6.11×10^{-13}	1.01×10^{-12}	1.51×10^{-12}	2.14×10^{-12}
Tiol-Cd	2×10^{-5}	4×10^{-5}	6×10^{-5}	8×10^{-5}	10×10^{-5}
Tiol libre	2.3×10^{-4}	2.1×10^{-4}	1.91×10^{-4}	1.7×10^{-4}	1.5×10^{-4}

Según las tablas 5.1 y 5.2, la concentración libre de Cd^{2+} está en el rango de picomolar (pM). El ATP aunque tiene la misma afinidad por el Mg^{2+} que por el Cd^{2+} forma muy poco complejo ATP-Cd gracias a la concentración de Mg^{2+} y a la alta afinidad del tiol por el Cd^{2+} que es el grupo que se queda con la mayor parte del Cd^{2+} . Cambios en la concentración de los complejos tiol-Cd se deben al aumento en la concentración de Cd^{2+} en cada punto del ensayo tanto para la Cys como para la γ -EC. La Gly por tener como cadena lateral un H tiene capacidad para formar complejos como Gly-Cd sólo gracias a su carboxilo. A diferencia de la Gly, el Glu forma fácilmente un complejo con Cd^{2+} , la especie Glu-Cd se forma de manera exponencial (figura 19). De los posibles complejos formados es el único que aparece de manera no lineal y que podría corresponder con la inhibición de la γ -ECS de tipo sigmoideo mostrada en la figura 18.

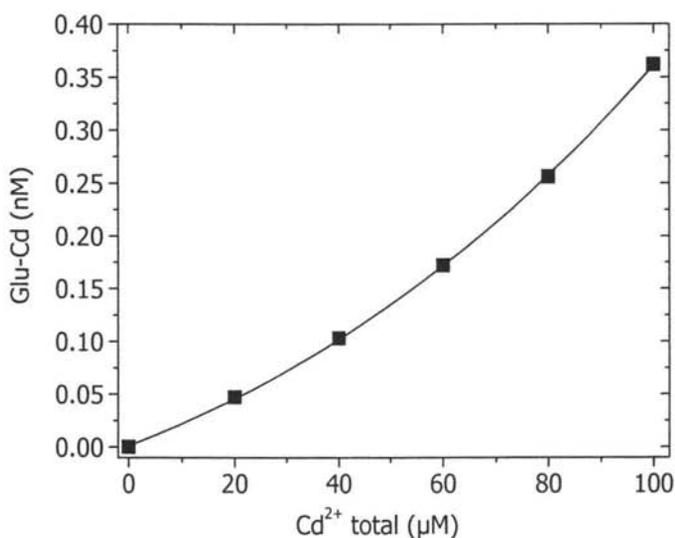


Figura 19. Aparición del complejo Glu-Cd en los ensayos de inhibición de la γ -ECS

Las enzimas de una vía trabajan conjuntamente dentro del sistema vivo, es por eso que aún cuando se estudiaron por separado es necesario saber como se comportan cuando interaccionan dentro de la vía, cercano a las condiciones fisiológicas. Para ello nuestro siguiente experimento se dirigió a observar la síntesis de GSH a partir de sus tres aminoácidos, integrando así la actividad de las dos enzimas productoras de GSH en extractos de células control, de células Cd_{50} y añadiendo Cd^{2+} *in vitro* al extracto Cd_{50} (tabla 6).

Tabla 6. Velocidades iniciales de síntesis de γ -EC y GSH a partir de Cys.

	Velocidades iniciales (nmol (min mg _{prot}) ⁻¹)		
	Control	Cd ₅₀	Cd ₅₀ + Cd ²⁺
Síntesis de γ -EC	0.316 ± 0.04 (n=5)	0.516 ± 0.1 (n=4)	*0.73 ± 0.13 (n=3)
Síntesis de GSH	0.223 ± 0.02 (n=5)	‡ 0.514 ± 0.03 (n=4)	**0.42 ± 0.03 (n=3)

Los valores que se presentan son prom ± ES

* Diferencia significativa respecto al extracto control. P> 0.05

** Diferencia significativa respecto al extracto control. P> 0.01

‡ Diferencia significativa respecto al extracto control. P>0.001

A pesar de que la inhibición *in vitro* por Cd²⁺ de la γ -ECS y la GS son iguales en presencia de Cd²⁺ total (figura 18), según los resultados de la tabla 6, la GS es más lenta que la γ -ECS lo que nos llevaría a la acumulación de γ -EC. Así, seguramente la sensibilidad se debe a alguna variable que no es el Cd²⁺ total añadido en los ensayos de inhibición. Considerando otros factores presentes en esos ensayos de inhibición encontramos que la GS es más sensible a Cd²⁺ en forma de ion libre presente en los ensayos, comparada con la sensibilidad que presenta la γ -ECS. La figura 20 muestra el porcentaje de actividad graficado en la figura 18, pero esta vez graficando la concentración de Cd²⁺ libre presentada en las tablas 5.1 y 5.2.

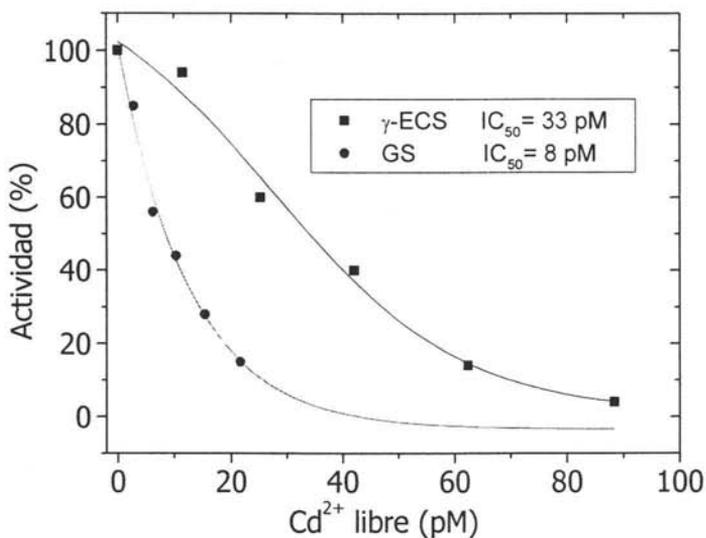


Figura 20. Inhibición de las enzimas productoras de GSH por Cd^{2+} libre en extractos Cd_{50}

La tabla 7 sirve como control para comprobar que la actividad de las enzimas es en realidad afectada por un compuesto cuya concentración este en el rango de pM (como el Cd^{2+} libre), pues la actividad se restaura al incluir una cantidad mínima de EGTA (1 μM) en los ensayos de inhibición.

Como ya habíamos dicho, es importante averiguar cuales son las características que se perdieron al realizar las inhibiciones en ensayos aislados. Además de las diferencias en Cd^{2+} libre, notamos que el ensayo separado de las enzimas dejaba una variable para explorar y era precisamente el comportamiento de las enzimas en presencia de los complejos formados con Cd^{2+} y las especies que no son sus sustratos (p. ej. glutamato

para la GS). En la figura 21 presentamos la inhibición de la GS por el complejo Glu-Cd; en la misma figura observamos que la GS no se inhibió por Glu libre.

Tabla 7. Restauración de la actividad de las enzimas productoras de GSH con EGTA

	Actividad (%)	
	γ -ECS	GS
Sin Cd^{2+} sin EGTA	100 (n=2)	100 (n=2)
50 μM Cd^{2+} sin EGTA	76 (n=2)	61 (n=2)
50 μM Cd^{2+} 1 μM EGTA	101 (n=2)	136 (n=2)

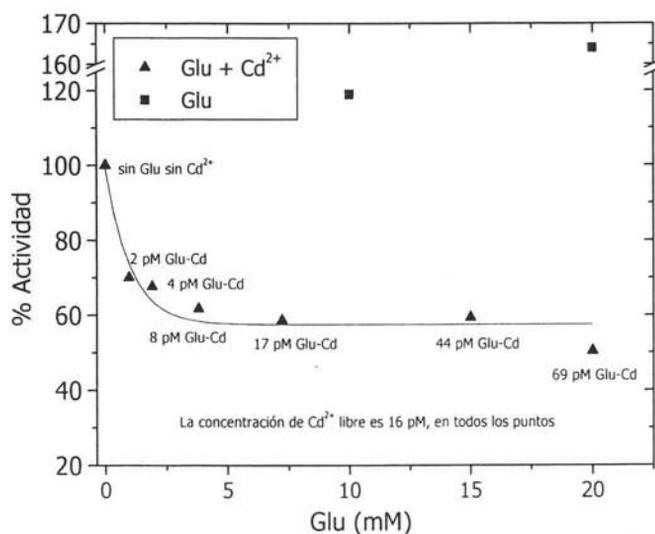


Figura 21. Actividad de la GS en presencia de Glu y el complejo Glu-Cd

VIII. Discusión de resultados

La γ -ECS es una enzima que participa en la síntesis de GSH y este metabolito debido a su función es indispensable en al menos dos de los compartimentos celulares (cloroplasto y citosol). Se ha descrito que el 72% de la actividad de γ -ECS está presente en el cloroplasto del chícharo (Hell et al., 1987), en este organelo se alcanza un pH ligeramente alcalino en el estroma durante la fotofosforilación (Lenhinger et al., 2000), por lo que el pH será un parámetro determinante en la actividad de las enzimas dependiendo si se encuentran en el citosol o en el cloroplasto de un organismo. El pH óptimo de actividad encontrado en nuestros ensayos (pH= 8) concuerda con lo establecido en la literatura para otras γ -ECS's como la encontrada en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Hell et al, 1987). Además, es probable que el pH óptimo de actividad encontrado en este trabajo refleje la existencia de una isoenzima que también se encuentra en el cloroplasto, considerando que algunos autores definen el pH del citosol como 7.2 (Lenhinger et al., 2000) y que 0.8 unidades de pH son significativas en la actividad de la γ -ECS de *Euglena*, ya que disminuye 14%, según la curva de la figura 6.

La actividad que se encontró en pH de 9.4 no concuerda con lo esperado atendiendo a la forma de la curva (figura 6). Es probable que la drástica disminución en la actividad de la γ -ECS se deba a una inestabilidad de la enzima al pH en la zona alcalina. Es decir, que el efecto del pH en ese punto sea sobre la estabilidad de la enzima más que sobre su catálisis. En esta tesis no se estudió la estabilidad de la γ -ECS a diferentes pH's.

Euglena gracilis acumula γ -EC cuando se expone a 50 μM de CdCl_2 , una posible explicación a esta acumulación es que la actividad de GS sea menor que la cantidad de actividad de la γ -ECS. En este trabajo usaremos la V_m como medida de la cantidad de enzima pues según la ecuación de Michaelis-Menten, la cantidad de enzima activa es directamente proporcional con su velocidad máxima, demostrado en la ecuación (Lehninger et al., 2000):

$$V_m = k_{\text{cat}} [E]$$

La V_m encontrada para la γ -ECS en extractos de células que no fueron expuestas a Cd^{2+} y de células Cd_{50} es diferente (tabla 1); la V_m de la γ -ECS de extractos Cd_{50} es 4 veces mayor. Este aumento en la velocidad máxima podría deberse a diversas razones: (1) a que haya una mayor cantidad de γ -ECS activa, (2) a que en las células Cd_{50} haya un cambio inespecífico en la cantidad de proteína respecto a las células control ó (3) a que aunque hay la misma cantidad de γ -ECS, la enzima es más activa debido a una modificación por covalencia. De las tres posibilidades, sugerimos que el aumento en la V_m es definitivamente reflejo de un aumento en la cantidad de enzima activa pues, aunque se reportó una modificación por covalencia para la γ -ECS de riñón de rata, la fosforilación disminuía su actividad (Griffith y Mulcahy, 1999); por su parte la concentración de proteína total es igual en células estresadas con Cd^{2+} y células control (6.3 $\text{mg}_{\text{prot}}/10^7\text{cels}$ y 6.5 $\text{mg}_{\text{prot}}/10^7\text{cels}$ respectivamente) (Mendoza-Cózatl DG, Rangel-González E y Moreno-Sánchez R, datos no publicados).

Para comparar la V_m máxima encontrada en la cinética de la γ -ECS en los extractos citosólicos de *Euglena*, debemos considerar el tratamiento que hicimos en la obtención de los mismos, son extractos celulares totales desalados a los que no se les aplicó

ningún tratamiento de purificación. Por ello la comparación sólo es válida contra extractos crudos de otros organismos tal como lo hacemos en la tabla 8 (Hell et al., 1990, Irzyk and Fuerst, 1993, y Riechers et al, 1997), de donde podemos concluir que la actividad de la γ -ECS de *Euglena* se parece a la actividad antes reportada para γ -ECS's encontradas en plantas superiores.

Otro parámetro que podemos encontrar a partir de la cinética es la K_m , nosotros encontramos un valor de 20 μ M (promedio de $n=2$) para la Cys tanto en extractos citosólicos de células control como de células Cd_{50} . Esta similitud en la K_m de ambos extractos puede significar la misma identidad para la γ -ECS en ambos extractos o, en caso de que hubiera una mezcla de isoenzimas, la proporción de la mezcla se mantiene de los extractos control a los extractos de células Cd_{50} .

Comparando la K_m de la γ -ECS de *Euglena* por Cys con las K_m 's de otros organismos, podemos notar que la γ -ECS de *Euglena* es mas afin por Cys, aún comparando con protistas como *T. brucei* incluso por un orden de magnitud (tabla 9).

Tabla 8. Comparación de las velocidades máximas de las enzimas productoras y consumidoras de GSH en diversos organismos

Organismo	nmol (min mg _{prot}) ⁻¹		
	γ -ECS	GS	GSTs
bacteria	12.5	8.3	
Maíz			0.095
Tabaco	0.960	2.03	
Chícharo	0.601	0.214	
Espinaca	0.454	0.444	
Trigo	0.499	0.530	0.18
<i>Euglena</i>	0.650	1.17	84

Por su parte la GS tiene ligeras diferencias en sus Km's comparando los extractos de células control con los extractos de células Cd₅₀; sin embargo, no consideramos significativa la diferencia entre estas dos Km's basándonos en el hecho de que la γ -EC no es un metabolito que limite la síntesis de GSH debido a su concentración en ambas células (2.3 mM y 35 mM en fase estacionaria) (figura 3). Hecho este planteamiento, tal como lo dijimos para la γ -ECS es posible que la GS sea la misma enzima en ambos extractos o que se mantenga la proporción de isoenzimas en los extractos Cd₅₀ respecto a los extractos control, en caso de que las hubiera.

Tabla 9. Comparación de K_m 's de algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo de GSH en diferentes organismos

Organismo	K_m (mM) de las enzimas involucradas en el metabolismo de GSH por su sustrato tiol		
	γ -ECS por Cys	GS por γ -EC	GSTs por GSH
<i>Euglena</i>	0.02	0.024	0.016
bacteria	0.09	0.63	
protista	0.69	0.107	
levadura	0.40	0.30	
planta	0.19	0.35	0.292

Comparando la K_m encontrada para γ -EC por la GS en *Euglena* con las encontradas por otros autores como Macnicol (1987) en diferentes organismos tales como chícharo podemos decir que la GS de *Euglena* es muy afín por γ -EC (tabla 5.0). En chícharo la K_m es de 0.35 mM, es decir casi 18 veces menos afín que la de *Euglena* (Macnicol, 1987).

Las GSTs tienen K_m 's también muy afines por su sustrato tiol comparadas con las de otros organismos (tabla 9). Con ellas concluimos que tanto las enzimas productoras como las consumidoras de GSH en *Euglena* son muy afines.

La primera posibilidad planteada para que la GS tuviera una actividad menor comparada con la actividad que tiene la γ -ECS que explique la acumulación de γ -EC, es que los sustratos de la GS sean limitantes para sintetizar GSH. Podemos precisar que la actividad de las enzimas no está limitada por la disponibilidad de su sustrato no tiol: la Gly y el Glu. En la figura 13 se muestra que la Gly y el Glu dentro de la célula aumentan cuando las células son expuestas a 50 μ M de CdCl₂ en cultivo. Considerando que en ambas condiciones el volumen intracelular de *Euglena* es igual (3 μ L / 10⁷ cels), la concentración de Gly es de 1.21 mM en células control y 2.29 mM en células Cd₅₀,

mientras las de Glu son 3.97 mM y 7.04 mM respectivamente. En principio, la GS está saturada (incluso en células control) por Gly pues su $K_{m_{Gly}}$ es de 32 μ M (figura 12). Relevante es que la Pro tiene un aumento significativo en las células Cd₅₀ respecto al contenido en células control y aunque no participa directamente en la síntesis de GSH, permite que el GSH permanezca disponible para la detoxificación de xenobióticos y síntesis de FQs; ya se ha descrito que la Pro es un aminoácido capaz de contener contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) causadas por la presencia del Cd²⁺ particularmente sobre la aparición y reactividad del oxígeno singulete (Siripornadulsil et al., 2002).

La velocidad máxima de la GS encontrada en *Euglena* es de 1.17 nmol (min mg_{prot})⁻¹ en extractos de células control y 2.85 nmol (min mg_{prot})⁻¹ en extractos de células Cd₅₀ (tabla 1). Por las mismas razones explicadas para la γ -ECS, el aumento en la cantidad de enzima activa dada por la presencia del Cd²⁺ en el medio de cultivo sugerimos puede deberse a una mayor expresión de la proteína.

Hasta ahora con lo planteado, sólo hemos demostrado que debido al CdCl₂ añadido al medio de cultivo, se incrementa la cantidad de la γ -ECS y GS activas. Además, es un cambio diferencial; es decir, la γ -ECS aumenta 4 veces mientras la GS sólo 2.4 veces (tabla 4). Podemos comparar la V_m de la γ -ECS y la de la GS en las dos condiciones estudiadas (células control y células Cd₅₀) y notamos que ni en los extractos control ni los extractos Cd₅₀ la actividad de la GS es menor que la actividad de la γ -ECS, lo que en principio parecería descartar la hipótesis planteada aún cuando se presentó un incremento diferencial en las enzimas productoras de GSH; sin embargo, las condiciones del ensayo no son necesariamente iguales a lo que sucede *in vivo*,

partiendo del hecho de que en estos ensayos donde se midió la V_m se usan extractos citosólicos desalados que por lo tanto no tienen una concentración significativa de Cd^{2+} , además sabemos que en pocas ocasiones las enzimas están a velocidad máxima en condiciones fisiológicas y sobre todo por que en la vía de síntesis de GSH sólo hay dos enzimas productoras, así que si una estuviera a V_m seguramente la otra debería estar muy controlada.

En este trabajo los resultados obtenidos serán analizados aplicando conceptos del Análisis de Control Metabólico, el cual ha demostrado que el control de flujo de una vía es independiente del control de la concentración de los metabolitos de esa vía. Además, consideraremos la Teoría de Síntesis-Demanda (Hofmeyr y Cornish-Bowden, 2000), con la cual la vía puede dividirse en un bloque de enzimas productoras de GSH y un bloque de enzimas consumidoras de GSH. Es el enfoque de la Teoría de Síntesis-Demanda la que demuestra mecánicamente que la retroinhibición en la vía de síntesis de GSH juega un papel central de homeostasis en el control de la vía.

Son los propios datos de la tabla 4 y la acumulación de γ -EC durante la exposición a Cd^{2+} , quienes sugieren que el control de la vía de síntesis de GSH es diferente en las células Cd_{50} que en las células control. En condiciones de no estrés, las enzimas de bloque consumidor de GSH ejercen una alta influencia en el control de la vía transfiriendo información a través de la retroinhibición de la γ -ECS por GSH. Es decir, durante una baja demanda de GSH, las enzimas consumidoras de GSH provocan que la concentración del tripéptido alcance la K_i de la γ -ECS por GSH. Un incremento en la demanda de GSH, disminuirá dicha inhibición incrementado el flujo de la vía; el flujo se incrementó debido al incremento en la demanda, es por ello que la demanda de

GSH controla mayoritariamente el flujo de la vía a través de la retroinhibición de la γ -ECS. Si la demanda excede la capacidad del bloque de síntesis, las enzimas consumidoras pierden parte del control que ejercían y este recaerá en la ó las enzimas más lentas del bloque productor de GSH. Sin embargo, si durante el incremento en la demanda de GSH, el bloque productor es capaz de restaurar la concentración original de GSH, aun cuando haya redistribución del control entre el bloque de síntesis y el de demanda, la mayor parte del control del flujo seguirá residiendo en la demanda. En células Cd₅₀ aumenta la actividad de las enzimas consumidoras (es bien sabido que la presencia del Cd²⁺ desencadena la formación de ROS, aumentando el estrés oxidativo y los sustratos para las GSTs); es decir el GSH está en una etapa de alta demanda lo que provoca que las enzimas consumidoras de GSH pierdan parte del control que ejercían, trasladándose este al bloque de las enzimas productoras de GSH (de entre ellas, la que finalmente tenga una menor actividad, la GS). No debemos perder de vista que la concentración de GSH es mayor en células Cd₅₀ que en células control (figura 3), por lo que aún cuando el bloque consumidor perdió parte del control del flujo de la vía aún ^{ejerce} más control que el bloque de enzimas productoras. *In vivo* también es cierto que aumentó la concentración de Glu y debemos recordar que la retroinhibición de la γ -ECS está controlada por la competencia entre GSH y Glu. Por lo anterior en las células Cd₅₀ la retroinhibición es más insensible pues ahora se requiere más GSH para inhibir a la γ -ECS. Algo también importante es que dentro de las células Cd₅₀ no todo el GSH está disponible y sólo el GSH libre sirve para retroinhibir a la γ -ECS, el GSH no disponible está asociado en complejos de alto peso molecular (ver más adelante).

En principio ya sabemos que la GS se aumentó menor número de veces en comparación con las veces que lo hizo la γ -ECS pero como ya dijimos, también es cierto que las Vm's no son necesariamente reflejo de la actividad de las enzimas *in vivo*. Comparando las veces que aumentó la actividad de las enzimas productoras de GSH (4.08 y 2.43 veces, respectivamente) con el aumento en la actividad de las GSTs, es notable que las transferasas tienen un menor incremento (1.88 veces) (tabla 4); sin embargo, aún en extractos control su actividad es mucho mayor que la actividad de las enzimas productoras de GSH con una *Km* de similar magnitud, lo cual indirectamente refleja que las GSTs son enzimas eficientes para detoxificar a la células de los agentes xenobióticos producidos en condiciones control y por la presencia de Cd^{2+} . Por lo anterior y por la cantidad de GSH presente en las células Cd_{50} podríamos deducir que la actividad *in vivo* de las GSTs ha de estar controlada y/o limitada por la cantidad de agentes xenobióticos y especies tóxicas a conjugar, ya que además no requieren ATP, poder reductor o algún otro sustrato.

Por su parte la FQS que es otra enzima consumidora de GSH y que juega un papel importante en la resistencia a metales, paradójicamente tiene una actividad menor en los extractos de células Cd_{50} (tabla 4), por ello creemos que en estas células está inhibida.

La razón por la que no todo el GSH medido en la figura 3 está disponible para la retroinhibición de la γ -ECS es que los tioles de bajo peso molecular se asocian entre sí para hacer más eficiente la inactivación y compartimentalización del Cd^{2+} . En estos complejos (HMWC), también hay sulfuro (S^{2-}) que es abundante en *Euglena* y que tiene la capacidad de quelar al Cd^{2+} , pudiendo dejar a la FQS sin metal disponible para la

formación del complejo $(GS)_2\text{-Cd}$, su sustrato (Vatamaniuk et al., 2000), pues para la FQS el Cd^{2+} no es un inhibidor sino un activador.

Para completar el estudio de la actividad enzimática, faltaría observar que efecto tiene *in vitro* el Cd^{2+} sobre la actividad de las enzimas, tanto de las productoras como de las consumidoras. Particularmente en el caso de las enzimas productoras de GSH la inhibición es importante para saber cual de las dos enzimas ha ganado control sobre la vía involucrada en el metabolismo de GSH. Comenzaremos con las enzimas consumidoras de GSH que son quienes en los extractos de células Cd_{50} incrementaron menos en proporción su actividad.

Un parámetro que se usa habitualmente para destacar que un sistema es más sensible que otro a algún estímulo es la IC_{50} , definida como la concentración de un agente que inhibe el 50% de un proceso.

Propusimos que las enzimas productoras de GSH tienen la misma identidad en células control que en células Cd_{50} por las K_m 's encontradas; las GSTs son enzimas diferentes en ambos extractos, esto es evidente en la figura 17, donde se presenta la actividad de las GSTs con la adición *in vitro* de diferentes concentraciones de Cd^{2+} total en el ensayo. La IC_{50} es diferente para cada extracto, las enzimas de los extractos de células Cd_{50} son más resistentes a Cd^{2+} y en ambos extractos la inhibición de las enzimas presenta un decaimiento exponencial de primer orden. La mayor resistencia de las enzimas proporciona a la célula una mejor defensa contra los agentes xenobióticos que se generan con la presencia del Cd^{2+} . Es sabido que el Cd^{2+} desencadena estrés oxidativo y formación de moléculas tóxicas derivadas de este (Smith et al., 2004).

Una posibilidad para que las transferasas presentes en las células control y las Cd_{50} sean diferentes es que el Cd^{2+} induzca una respuesta en la expresión de genes que codifican para la síntesis de GSTs resistentes. Algo similar fue encontrado en *Arabidopsis* donde concentraciones tóxicas de Cu^{2+} inducen la síntesis de GSTs resistentes (Smith et al., 2004).

Por su parte, la inhibición de las enzimas productoras de GSH tienen tendencias diferentes (sigmoideal y decaimiento exponencial respectivamente), pero las IC_{50} son idénticos para ambas enzimas; es decir, pareciera que la γ -ECS y a GS son igualmente sensibles a la presencia del Cd^{2+} .

Dada la forma de la curva de inhibición de la actividad de la γ -ECS, su inhibidor tendría que comportarse o aparecer de manera complementaria, es decir inhibir poco en los primeros puntos de la curva e inhibir mucho más en los siguientes puntos hasta alcanzar un máximo en su poder inhibitorio o en su concentración. La formación del complejo Glu-Cd se adapta a lo referido ya que se forma de manera exponencial (figura 19). Además es el único de los complejos con Cd^{2+} que se forma de manera no lineal.

Destacable es que, al ser ensayos de inhibición separados no sabemos que efecto tienen los complejos formados por el Cd^{2+} sobre la actividad de las enzimas en un sistema completo, por ejemplo el efecto del Glu-Cd ó Cys-Cd ó la probable formación de otros complejos mayores como Glu-Cd-Cys sobre la actividad de la GS. O incluso los sustratos mismos de los ensayos sobre las enzimas que no los consumen, tal como es el caso del Glu sobre la GS.

Cuando se estudian sistemas separados del todo en el que existen, se puede conocer características muy propias de ellas como su dependencia por los sustratos, su

estabilidad frente a la temperatura o el pH, etc.; sin embargo, se pierden en el intento otras características que dependen de su interacción con el sistema para el que trabajan. Es necesario entonces explorar la síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos para conocer como responde la vía de síntesis de GSH en su conjunto al Cd^{2+} .

En la tabla 6 están recopiladas las velocidades iniciales de síntesis de γ -EC y GSH a partir de Cys, con Glu, Gly y ATP saturantes. La tendencia general de los resultados en las tres condiciones es hacia la menor velocidad de síntesis de GSH que de γ -EC, probablemente debido a que mientras la Cys es saturante la γ -EC se va sintetizando y no logra una concentración saturante para la GS. Comparando las velocidades de síntesis entre los extractos control y los Cd_{50} en estos últimos es mayor, reflejando lo planteado para las velocidades máximas (tabla 4): hay un incremento en la cantidad de enzimas. Comparando los resultados (diferentes significativamente) del extracto control con los extractos $Cd_{50}+Cd^{2+}$ que son los dos casos que se acercan a las condiciones fisiológicas, la actividad de ambas enzimas está aumentada poco más de 2 veces; sin embargo, la relación γ -EC/GSH es mayor en las células $Cd_{50}+Cd^{2+}$ respecto al mismo extracto sin Cd^{2+} añadido *in vitro*, evidenciando que la GS está más inhibida que la γ -ECS (γ -EC/GSH de 1.0 y 1.72, respectivamente). También es en $Cd_{50}+Cd^{2+}$ donde la acumulación de γ -EC puede ser mostrada pues la actividad de la γ -ECS tiende a ser mayor que la de la GS y aunque esto mismo ocurre en los extractos control ahí no habría acumulación de γ -EC debido a que la retroinhibición de la γ -ECS por GSH está habilitada. Tal como lo mencionamos, en células Cd_{50} la concentración de Glu aumenta de 3.6 mM en células control a 7.2 mM dando como resultado una menor sensibilidad

de la γ -ECS a la retroinhibición por GSH. Si bien la acumulación de γ -EC es discreta en ensayos de velocidad inicial, hay que recordar que la acumulación de γ -EC en *Euglena* se da durante días de cultivo, mientras los ensayos sólo muestran unos minutos de actividad de las enzimas.

Buscando razones para que la GS esté más inhibida que la γ -ECS, encontramos que la concentración de Cd^{2+} libre que se espera en el citosol de una planta expuesta a suelos contaminados es nM (Salt and Wagner, 1993). Fue entonces que consideramos que una concentración pM de Cd^{2+} libre en los ensayos de inhibición (figura 18) no es despreciable. Así pues, en la figura 20 podemos ver que las IC_{50} obtenidas por Cd^{2+} libre son por media orden de magnitud diferentes entre la GS y la γ -ECS, siendo más sensible la GS. Esta inhibición es entonces muy probablemente debida al Cd^{2+} libre ya que además la actividad de las enzimas se recupera si en el ensayo de inhibición añadimos 1 μM de EGTA, quien tomará al Cd^{2+} que pueda estar libre sin alterar otros complejos cuya concentración esta en el orden de μM (tabla 7).

Otra cosa que faltaba por considerar es que al ser ensayos de inhibición separados (figura 18) las enzimas no estuvieron en presencia de los complejos que se forman con las especies que no son sus sustratos; claro ejemplo de esto que la GS no estuvo en presencia del complejo formado por el Glu con el Cd^{2+} . En la figura 21 podemos ver que la GS se inhibe en presencia de Glu-Cd pero no se inhibe por Glu. Esta es otra razón para considerar que la GS es más sensible al Cd^{2+} que la γ -ECS.

IX. Conclusiones

1. El flujo de la vía (velocidad de síntesis de GSH) en células Cd_{50} aumenta debido al incremento en la actividad de las enzimas tanto del bloque consumidor como las del bloque productor de GSH.

2. El control de flujo de la vía puede ser diferente en células Cd_{50} que en células no estresadas. La acumulación de GSH en células Cd_{50} sugiere que la mayor parte del control de flujo de la vía sigue residiendo en las enzimas consumidoras de GSH. Por otro lado, la acumulación de γ -EC también sugiere que parte del control del bloque consumidor pudo ser transferido al bloque productor y que dentro de este, la GS ganó influencia en el control del flujo la vía.

3. La acumulación de γ -EC en células Cd_{50} se debe a (i) el incremento mayoritario de la γ -ECS respecto a la GS y (ii) a la mayor sensibilidad de la GS por Cd^{2+} .

X. Perspectivas

Aún cuando en este trabajo no se ha explorado la actividad de todas las enzimas que participan en el metabolismo de GSH en *Euglena gracilis*, particularmente de las encargadas de mantener el estado redox de la célula, la pregunta que dio origen a este trabajo sí pudo ser contestada. Sabemos que el análisis de los resultados obtenidos sería más completo si supiéramos datos importantes como la distribución de los metabolitos en los diferentes compartimentos celulares o la K_i de la γ -ECS por GSH. También complementaría los resultados averiguar si la FQS está completamente inhibida *in vivo* en *Euglena* y definitivamente establecer los coeficientes de control de flujo de cada una de las enzimas que participan en la vía; así como su reconstrucción en presencia y ausencia de Cd^{2+} .

El estudio del metabolismo de GSH tiene como objetivo final que *Euglena gracilis* contribuya con al tratamiento de agua contaminada a través de la biorremediación. Así entonces se deja abierta la posibilidad de estudiar a fondo la genética de las enzimas que participan en el metabolismo de GSH, para sobreexpresar aquellas que permitan a *Euglena* participar de manera eficiente en estos procesos, ahora que sabemos que el control de flujo se distribuye de manera diferente en células estresadas por metales.

Saber con certeza si existen o no isoformas de las enzimas estudiadas y si existe una regulación genética diferencial de estas isoenzimas que podrían estar presentes en diferentes compartimentos celulares, también ayudaría a mejorar la resistencia de *Euglena* o su capacidad para acumular metales pesados.

XI. Bibliografía

- Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils. Segunda edición. Ed. Chapman and Hall, London.
- Apontoweil P, Berends W (1975) Glutathione Biosynthesis in *Escherichia coli* K 12 properties of the Enzymes and Regulation. *Biochem et Biophys Acta.* 399: 1-9.
- Asami MO (1984) Pollution of soil by cadmium. En: *Changing Metal Cycles and Human Health* (1984) Ed. Nriagu. Springer Verlag, Berlín. Pp.95-111.
- Aylett BJ (1974) Group IIB. En: Bailar JC, Emeléus HJ, Nyholm R, Trotman-Dickenson AF (1974) *Comprehensive Inorganic Chemistry*. Ed. Pergamon Press. Great Britain. Primera edición. Pp. 187-275.
- Baxter MJ, Burrell JA, Massey RC (1990) The aluminium content of infant formula and tea. *Food Addit Contam.* 7: 101-107.
- Bennet-Chambers M, Davies P, Knott B (1999) Cadmium in aquatic ecosystems in western Australia. A legacy of nutrient-deficient soils. *Journal Environmental Manage.* 57: 283-295.
- Beritic T, Stahuljak D (1961) Lead poisoning from pottery vessels. *Lancet*, i, 669.
- Board PW (1973) The chemistry of nitrate-induced corrosion of tinplate. *Food Technology Australia.* 25: 16-17.
- Buetow D (edit) (1982) *The biology of Euglena*. (USA: Ed. Academic Press). Vol III.
- Cea Bonilla A, del Arenal Mena IP, Riveros Rosas H, Vázquez-Contreras E (eds) (2002) *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVI. Depto Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM, México.
- Cervantes C, Moreno R (eds). (1999) *Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos*. (México: AGT Editor). P.p 1-153. ISBN 968-463-093-X
- Chang R (1999) Átomos, moléculas e iones. En: Chang R. *Química*. Ed. Mac Graw Hill. 6ta. Edición. México. P.p. 46 -47.
- Chen J, Goldsbrouhg P (1994) Increased Activity of γ -Glutamylcysteine Synthetase in Tomato Cells selected for Cadmium Tolerance. *Plant Physiol.* 106:233-239.

- De Filippis L, Pallaghy C (1994) Heavy metals: Sources and Biological Effects. En: Rai LC, Gaur JP, Soeder CJ, Eds. Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution. Cap 2, 31-77. E. Schweizerbartsche Press, Stuttgart.
- Dennda G, Kula MR (1986) purification and evaluation of glutathione-synthesizing enzymes from *Candida boidinii* for cell-free synthesis of GSH. J Biotechnol. 4: 143-158
- Devars S, Hernández R, Moreno -Sánchez 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.
- DGCOH (1998) El sistema de drenaje profundo de la Ciudad de México. 4ta. edición, México D.F.
- Díaz-Barriga F (1991) Principios de la toxicidad del cadmio. Ciencia y desarrollo. 14: 61-68.
- Filipi DS, Peters T, Adams VD, Middlebrooks EJ (1979) Residual heavy metal removal by an algal-intermittent sand filtration system. Water Res. 13: 305-313.
- Friberg L, Vahter M (1983) Assessment of exposure to lead and cadmium through biological monitoring of a UNEP/WHO global study. Environ Res. 30: 95-123.
- Galvao LAC, Corey G (1987a) Cadmio. Serie Vigilancia No. 4. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, Metepec, Edo. de México.
- González M, Banderas JA, Baez A, Belmont R (1997) Salivary lead and cadmium in a young population residing in Mexico city. Toxicol Lett. 93: 55-64.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999) The enzymes of GSH synthesis: γ -ECS. En: Purich D (editor) Advances in Enzymology and related areas of molecular biology. Vol 73: Mechanism of Enzyme action. Ed. John Wiley and sons. Part A.
- Hammer DI, Finklea JF, Creason JP (1971) Cadmium exposure and human health effects. In: Trace substances in Environmental Health (ed. D.D. Hempill). P.p. 269-288.
- Hell R, Bergmann L (1988) Glutathione synthetase in tobacco suspension cultures: catalytic properties and localization. Physiol Plant. 72: 70-76.
- Hell R, Bergmann L (1990) γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. Planta. 180: 603-612.

- Hofmeyr JHS, Cornish-Bowden A (2000) Regulating the cellular economy of supply and demand. *FEBS Lett.* 476:47-51.
- Irzyk GP, Fuerst P (1993) Purification and Characterization of a Glutathione S-Transferase from Benoxacor-treated Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 102: 803-810.
- Jiménez MA, Kane EH (1974) Compatibility in of Aluminum for Food Packaging. American Chemical Society. Washington . DC.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1986) Trace elements in Soils and Plants. CRC press. Boca Ratón, Florida.
- Klapheck S, Latus C, Bergamann L (1987) Localization of glutathione synthetase and distribution of glutathione in leaf cells of *Pisum sativum*. *J Plant Physiol.* 131:123-131
- Klapheck S (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant.* 74: 727-732.
- Lee J, Ahner B, Morel F (1996) Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environ Sci Technol.* 30: 1814-1821.
- Lee S, Moon J, Ko T, Petros D, Glodsborough P, Korban S (2003) Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiol.* 131: 656-663.
- Lehninger A, Nelson DL, Cox MM (2000) Ed. Worth Publishers (Tercera edición). NY. P.p 1-1152
- Leustek T (1996) Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol. Plant.* 91: 411-419.
- López-Artiguez M, Soria MI, Camean A, Repetto M (1993) Cadmium in the diet of the local population of Seville (Spain). *Bull. Environ Contam Toxicol.* 50: 417-424.
- Meierjohann S, Walter RD, Muller S (2002) Glutathione synthetase from *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 636: 833-838.
- Melo-Sánchez FM, Márquez Estrada C, Juárez-Juárez M, Martínez-Martínez FJ, Miranda-Reyes P, Esquivel-Ruiz LF, Juárez-Juárez M. Depto. de Química, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, I.P.N.
(<http://www.salud.gob.mx/unidades/retomex/fulltxt/ANALISIS%20DE%20METALES%20PESADOS.pdf>)

- Mendoza-Cózatl D, Devars S, Loza-Tavera H, Moreno-Sánchez R (2002) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol Plant*. 115: 276-283.
- Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R (2005) Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta*. 1706: 88-97.
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev*. 29: 653-671.
- Meister A (1995) Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*. 251:3-13.
- Meuwly P, Rauser W (1992) Alteration of Thiol Pools in Roots and Shoots of Maize Seedlings Exposed to Cadmium. *Plant Physiol*. 99: 8-15.
- Moreno-Sánchez R, Raya JC (1987) Preparation of coupled mitochondria from *Euglena gracilis* by sonication. *Plant Sci*. 48:151-157.
- Nakano Y, Okamoto K, Toda S, Fuwa K (1978) Toxic effects of cadmium on *Euglena gracilis* grown in a zinc deficient and zinc sufficient media. *Agric Biol Chem*. 42: 901-907.
- Nwankwo JN, Elinder CG, Piscator M, Lind B (1977) Cadmium in Zambian cigarettes: an interlaboratory comparison in analysis. *Zambian Journal of Science and Technology*. 2: 1-4.
- Ostergaard K (1977) Cadmium in cigarettes. *Acta Medica Scandinavica*. 202: 193-197.
- Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR., Warnon SS, Fairlamb AH (2002) A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 277: 35853-35861.
- Pietrini F, Iannelli M, Pasqualini S, Massacci A (2003) Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol*. 133: 829-837.
- Prater BE (1975) Water Pollution in the River Tees. *Water Pollution Control*. 74: 63-76.
- Rangel-González EA, Martínez-Oliver JP, Mendoza-Cozatl DG, Moreno-Sánchez R (2003) Cadmium removal from culture medium by *Euglena gracilis*. *Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas* (Poster). Acapulco, Gro., México.
- Rauser W (1990) Phytochelatin. *Annu Rev Biochem*. 59:61-86.

- Rauser W, Schupp R, Rennenberg H (1991) Cysteine, γ -Glutamylcysteine and Glutathione Levels in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 97:128-138.
- Rauser W, Meuwly P (1995) Retention of Cadmium in Roots of Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 109: 195-202.
- Rayment GE, Best EK, Hamilton DJ (1989) Cadmium in fertilisers and soil amendments. Chemical International Conference, Brisbane, Australia, 28 August - 2 September. Royal Australian Chemical Institute, Australia.
- Reilly C (2003) Metal Contamination of food. Blackwell Science. Tercera edición. Pp.1-253. SBN 0-632-05927-3.
- Riechers DE, Irzyk GP, Jones SS, Fuerst EP (1997) Partial Characterization of Glutathione S-transferases from Wheat (*Triticum spp.*) and purification of a Safener-Induced Glutathione S-Transferase from *Triticum tauschii*. *Plant Physiol.* 114: 1461-1470.
- Rodríguez-Milord D (1991) Níquel. Serie de Vigilancia No. 10. Centro panamericano de Ecología Humana y salud, OPS, OMS. Metepec, Edo. de México.
- Sánchez CI, López MI, Fortoul TI, Saldivar OL, Tovar TA, Antuna BS, Roldán ZA (1994) Inhalación de dos dosis de cloruro de cadmio y modificaciones en la estructura pulmonar. VII Congreso Nacional Estudiantil de Investigación en el Área de la Salud. Gaceta Médica de México.
- Shoenmakers TJM, Visser GJ, Flik G, Theuvenet APR (1992) CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *BioTechniques.* 12: 870-879.
- Sillén LG, Martell AE (1971) stability constants of metal-ion complexes. The chemical Society. Special publication No. 25. Supplement No. 1. SBN 85186-019-2.
- Smith A, DeRidder B, Guo W, Seeley E, Regnier F, Goldsbrough P (2004) Proteomic Analysis of *Arabidopsis* Glutathione S-transferases from Benoxacor- and Copper-treated Seedlings. *J Biol Chem.* 279: 26098-26104.
- Strenstrom T, Vahter M (1974) Heavy metals in sweage sludge for use on agricultural soil. *Ambio.* 3: 91-92.

- Siripornadulsil S, Traina S, Verma D, Sayre R (2002) Molecular mechanisms of Proline mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. *Plant Cell*. 14: 2837-2847.
- Trevors J, Stratton G, Gadd G (1986) Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can J Microbiol*. 32: 447-464.
- Türkdogan MK, Kilicel F, Kara K, Tuncer I, Uygan I (2002) Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 175-179.
- Vallee BL, Ulmer DD (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann Rev Biochem*. 41: 87-94.
- Vatamaniuk O, Mari S, Lu Y, Rea P (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of Phytochelatin Synthase. *J Biol Chem*. 275: 31451-31459.
- Vázquez-Alarcón A, Justin-Cajuste L, Siebe-Grabach C, Alacántar-González G, de la Isla de Bauer ML (2001) Cadmium, Nickel and Lead concentrations in wastewater, soil and crops in the Mezquital Valley, Hidalgo, Mexico. *Agrociencia*. 35: 267-274.
- Wassef W (1993) Lípidos. En: *Química de los Alimentos*. Fenemma O (ed). Ed. Acribia. Zaragoza. Cap 4.
- Wang Q, Shen WG, Ma ZW (2000) Estimation of mercury emission from coal combustion in China. *Environ Sci Technol*. 34: 2711-2713.
- Webb M (1972) Binding of cadmium ions by rat liver and kidney. *Biochem Pharmacol*. 21: 2751
- Wenlock RW, Buss DH, Dixon EJ (1979) Trace nutrients. 2. Manganese in British Foods. *Br J Nutr*. 41: 253-261.
- Whittaker RH, Margulis L (1978) protest classification and the kingdoms of organisms. *BioSystems*. 10: 3-18.
- Williams CH, David DJ (1973) Heavy metals in Australian soils. *Australian Journal of Soil research*. 11: 43-50.
- Yan SL, Tsay ChCh, Chen YR (2000) Isolation and characterization of phytochelatin synthase in rice seedlings. *Proc Natl Sci Counc*. 24: 202-207.

Zhu YL, Pilon-Smits E, Jouanin L, Terry N (1999a) Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhanced cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:73-79.

Zhu YL, Pilon-Smits E, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing γ -Glutamylcysteine Synthetase. *Physiol Plant.* 121: 1169-1177.

<http://economia.gob.mx/noms>

<http://www.inegi.gob.mx>

<http://www.brenda.uni-koeln.de>

<http://www.una.com.mx/content/sanidad/031ecol.pdf>

<http://www.salud.gob.mx>

Apartado 1. A cerca del cadmio.

General	
Nombre, símbolo, número atómico	Cadmio, Cd, 48
Serie química	metal de transición
Ubicación en la tabla periódica	Grupo IIB Periodo 5 Bloque d Familia 12
Densidad	8.65 g/mL
Apariencia	gris metálico

Propiedades atómicas	
Peso atómico	112.411 uma
Radio atómico calculado	161 pm
Configuración electrónica	[Kr]4d ¹⁰ 5s ²
Estados de oxidación (óxido)	+2 (levemente básico)

Propiedades físicas	
Estado de la materia	Sólido
Punto de fusión	594.22 K
Punto de ebullición	1040 K
Entalpía de vaporización	100 kJ/mol
Entalpía de fusión	6.192 kJ/mol
Presión de vapor	14.8 Pa a 597 K
Calor específico	233 J/(Kg*K)

Apartado 2. Preparación de soluciones

1. Medio Hutner:	Ácido glutámico	5 g/L
	Ácido málico	2 g/L
	Ca ₂ (CO ₃) ₂	0.2 g/L
	Minerales traza:	
	Stock M, N y A	2mL/L
	Stock K	4mL/L
	Stock B	1mL/L

Se pesan los reactivos sólidos y se mezclan con agua destilada hasta su disolución con agitación constante, se añaden los minerales traza y enseguida se ajusta el pH a 3.5 con NaOH o KOH. Finalmente se afora a un litro y se esteriliza durante 45 min a 20 lb. de presión y 121 °C.

2. Minerales traza:

2.1. Minerales traza A (50 mL):	ZnSO ₄	2.2 g
	MnSO ₄	2.0 g
	Na ₂ MoO ₄	0.5 g
	CoCl ₂	0.04 g

2.2. Minerales traza B (100 mL):	CuSO ₄	0.078 g
	H ₃ BO ₃	0.057 g
	NaI	0.024 g

2.3. Stock K: 2 g de KH₂PO₄ en 10 mL

2.4. Stock M: 5 g de MgSO₄ en 20 mL

2.5. Stock N: 2 g en (NH₄)₂HPO₄ en 10 mL

3. Solución de vitaminas (100 mL):	Vitamina B ₁	0.01 g
	Vitamina B ₁₂	2x10 ⁻⁶ g
	FeCl ₃	0.05 g

Se esteriliza agua destilada y un matraz Erlen Meyer a 20 lb. de presión y 121 °C durante 45 minutos. En la campana de flujo laminar, se disuelven los reactivos en agua destilada en el menor volumen posible, esta solución se filtra hacia el matraz Erlen Meyer estéril a través de una membrana con tamaño de poro de 0.2 µm,

tomándola con una jeringa estéril. Se lleva al volumen deseado con el agua previamente esterilizada.

4. Reactivos para medición de proteína por el método de Biuret:

3.1. Sulfato de cobre 0.1% p/v

3.2. NaOH 10% p/v

3.3. DOC 0.4% p/v

5. Preparación de TRIS 100 mM (pH=8):

$(0.1 \text{ M})(1 \text{ L})(121.4 \text{ g/mol}) = 12.14 \text{ g}$

Se pesan 12.14 g de TRIS y se disuelven en 800 mL de agua destilada. Se ajusta el pH con NaOH o KOH y se completa el volumen a un litro de solución.

6. Stock de ATP:

$(0.5 \text{ M})(0.005 \text{ L})(605.2 \text{ g/mol}) = 1.52 \text{ g}$.

Se pesan 1.52 g de la sal de sodio y se disuelven en 5 mL de agua destilada, se alicuotéa en diferentes tubos eppendorfs y se almacena a -70°C .

7. Stock de fosfocreatina (PC):

$(0.5 \text{ M})(0.005 \text{ L})(327.1 \text{ g/mol}) = 0.816 \text{ g}$

Se pesan 0.816 g de fosfocreatina y se disuelven en 5 mL de agua destilada, se alicuotéa en diferentes tubos eppendorfs y se almacena a -70°C .

8. Stock de glutamato:

$(0.85 \text{ M})(0.01 \text{ L})(148 \text{ g/mol}) = 1.26 \text{ g}$

Se pesan 1.26 g de ácido glutámico y se les añaden 7 mL de agua destilada, se agita hasta disolverlos. Se ajusta el pH a 8 y finalmente se afora a 10 mL. Se almacena a -20°C .

9. Stock de glicina:

$(100 \text{ mM})(0.01 \text{ L})(75.07 \text{ mg/mmol}) = 75.07 \text{ mg}$

Se pesan 75 mg de glicina y se disuelven en 10 mL de agua destilada. Se almacena a -20°C .

10. Stock de NADP:

$(0.1 \text{ M})(0.001 \text{ L})(841.4 \text{ g/mol}) = 0.084 \text{ g}$

Se pesan 0.09 g de NADP y se disuelven en 1 mL de agua destilada. Se almacena a -20°C .

11. Stock de cisteína:

$$(0.04 \text{ g de Cys}) / (3.3 \text{ mL}) = 100 \text{ mM}$$

Se pesan 0.04 g de Cys y se disuelven en agua destilada previamente burbujeada con nitrógeno para evitar su oxidación. Esta solución se prepara fresca y se cuantifica con DTNB en el espectrofotómetro a 412 nm.

12. Stock de γ -EC:

$$(0.5 \text{ M})(0.003 \text{ L})(250.3 \text{ g/mol}) = 0.38 \text{ g}$$

Se pesan 0.38 g de γ -EC y se disuelven en agua destilada previamente burbujeada con nitrógeno para evitar su oxidación. Se alicuotéa y se almacena a -70°C . El stock preparado sólo es usado una vez después de estar congelado.

13. Stock de GSH:

$$(0.45 \text{ M})(0.003 \text{ L})(307.3 \text{ g/mol}) = 0.41 \text{ g}$$

Se pesan 0.41 g de GSH y se disuelven en agua destilada previamente burbujeada con nitrógeno para evitar su oxidación. Se alicuotéa y se almacena a -70°C . El stock preparado sólo es usado una vez después de estar congelado.

14. Stock de fluoruro de para-metil sulfonilo (PMSF).

$$(0.1 \text{ M})(0.005 \text{ L})(174.2 \text{ g/mol}) = 0.09 \text{ g}$$

Se pesan 0.09 g de PMSF y se disuelven en 5 mL de etanol (grado HPLC). Se almacena a -20°C .

15. Stock de ditioneitol (DTT):

$$(0.5 \text{ M})(0.005 \text{ L})(154.25 \text{ g/mol}) = 0.38 \text{ g}$$

Se pesan 0.38 g de DTT y se disuelven en agua destilada. Se alicuotéa para almacenarlo a -70°C . Esta solución una vez descongelada no se puede volver a almacenar para su reuso.

16. Stock de CDNB:

$$(0.1 \text{ M})(0.001 \text{ L})(202.6 \text{ g/mol}) = 0.02 \text{ g}$$

Se pesan 0.02 g de CDNB y se disuelven en 1 mL de agua destilada. Esta solución es de preparación en fresco cada día que se utiliza y se mantiene en hielo.

17. Stock de Tritón X-100 10% v/v

Se toman 9 mL de agua destilada y se colocan en tubo con tapa, se añade 1 mL del detergente y se agita suavemente hasta que la solución es homogénea. Se almacena a -20°C .

18. Solventes para la fase móvil y el detector del HPLC:

18.1. Ácido Tifluoroacético (TFA) 0.1%

Se añade 1 mL de TFA a 999 mL de agua. Antes de ser usada en el HPLC, la solución es filtrada en un equipo Millipore con una membrana para solventes hidrofílicos con tamaño de $0.45\ \mu\text{m}$ y sonicada durante 10 min. en un sonicador Branson.

18.2. Acetonitrilo 100% (ACN). Reactivo Baker para HPLC.

Antes de ser usada en el HPLC, el disolvente es filtrado en un equipo Millipore con una membrana para solventes orgánicos con tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$ y sonicada durante 10 minutos en un sonicador Branson.

18.3. Buffer de fosfatos (KH_2PO_4)

$$(0.1\text{M})(0.5\ \text{L})(136.09\ \text{g/mol}) = 6.8\ \text{g}$$

Se pesan 6.8 g de fosfatos de potasio y se disuelven en 400 mL de agua, se ajusta el pH a 8 y finalmente se afora la solución a 500 mL. Antes de ser usada en el HPLC, la solución es filtrada en un equipo Millipore con una membrana para solventes hidrofílicos con tamaño de poro de $0.45\ \mu\text{m}$ y sonicada durante 10 minutos en el sonicador Branson. Durante su uso en el HPLC se mantiene en hielo.

18.4. DTNB (Reactivo de Ellman)

$$(0.001\ \text{M})(0.5\ \text{L})(396.3\ \text{g/mol}) = 0.2\ \text{g}$$

Se pesan 0.2 g de DTNB y se disuelven en 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), mismos que se añaden al buffer de fosfatos. La solución debe estar protegida de la luz aún cuando ya se añadió al buffer.

18.5. Acetonitrilo 20%

Se mezclan 200 mL de ACN 100% (grado HPLC) con 800 mL de TFA 0.1%. La solución se filtra en un equipo Millipore con membrana para disolventes acuosos de poro $0.45\ \mu\text{m}$ y se sonica durante 10 minutos en un sonicador Branson.