



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Aumento de la capacidad de acumulación de cadmio
mediante el pre-acondicionamiento con zinc
en *Euglena gracilis* fotosintética.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSINA SÁNCHEZ THOMAS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JORGE DONATO GARCÍA GARCÍA



2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
APORTE CIENTÍFICO Y SOCIAL	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Contaminación ambiental por metales pesados. Situación de México	7
2.2. Toxicidad del Cadmio	9
2.3. Métodos fisicoquímicos para tratamiento de aguas contaminadas	12
2.4. <i>Euglena gracilis</i> : Mecanismos de resistencia y acumulación a Cadmio	17
2.5. Estrategias para aumentar la capacidad de acumulación de Cadmio en <i>E. gracilis</i>	21
2.5.1. Aumento de la biosíntesis de Cys y GSH	23
2.5.2. Favorecer la actividad de la fitoquelatina sintasa (FQS)	26
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	28
4.1. General	28
4.2. Particulares	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. Cultivo de <i>E. gracilis</i> fotosintética	29
5.1.1. Células control (<i>EgZn₂₀</i>)	29
5.1.2. Células pre-acondicionadas con Zinc (<i>EgZn</i>)	30
5.1.3. Conteo celular y determinación de viabilidad	30
5.2. Exposición al Cadmio	31

5.3. Determinación del consumo y producción de oxígeno	32
5.4. Determinación de Cd, Zn, Cu, Co, Mn, Fe, y Mg por EAA	33
5.5. Determinación de tioles	35
6. RESULTADOS	36
6.1. Pre-acondicionamiento con Zinc	36
6.1.1. Susceptibilidad al Zinc	36
6.1.2. Acumulación de Zinc	37
6.1.3. Análisis ionómico	37
6.1.4. Respiración y Fotosíntesis en células pre-acondicionadas	38
6.1.5. Contenido de Cys, γ -EC, GSH y FQs	39
6.2. Capacidad de acumulación de Cadmio	41
6.2.1. Susceptibilidad al Cadmio en células <i>EgZn₂₀</i> y <i>EgZn₄₀₀</i>	41
6.2.2. Acumulación de Cadmio en <i>EgZn₂₀</i> y <i>EgZn₄₀₀</i>	42
6.2.3. Efecto del Cadmio en el estatus ionómico de la célula	48
6.2.4. Contenido de tioles en <i>EgZn₂₀</i> y <i>EgZn₄₀₀</i>	51
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES	68
9. PERSPECTIVAS	69
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Abreviaturas

Cys	Cisteína
DTNB	Ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
γ -EC	Gamma-glutamíl-cisteína
γ -ECS	Gamma-glutamíl-cisteína sintetasa
EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EGTA	Ácido tetra-acético etilenglicol
<i>EgZn</i> ₂₀	Células de <i>E. gracilis</i> cultivadas en 20 μ M de Zn ²⁺
<i>EgZn</i> ₄₀₀	Células de <i>E. gracilis</i> cultivadas en 400 μ M de Zn ²⁺
GSH	Glutación
GS	Glutación sintetasa
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de crecimiento
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio
KOH	Hidróxido de Potasio
FQS	Fitoquelatina sintasa
FQs	Fitoquelatinas
PCA	Ácido perclórico
VAA	Vía de asimilación de azufre
TFA	Ácido Trifluoroacético
MTs	Metalotioneínas
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
KME	Buffer compuesto de KCl, MOPS y EGTA

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la capacidad de acumulación de Cd^{2+} en células de *E. gracilis* pre-acondicionadas con Zn^{2+} , bajo la hipótesis de que el aumento intracelular de zinc favorecería la síntesis de FQs. Trabajos previos indicaron que: 1) hay una correlación entre la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cd^{2+} y las concentraciones de Zn^{2+} en el medio de cultivo; 2) La fitoquelatina sintasa de *E. gracilis* (enzima clave en el mecanismo de acumulación de Cd^{2+}) alcanza su máxima actividad en presencia de Zn^{2+} y 3) El pre-acondicionamiento de *E. gracilis* a Hg^{2+} aumenta la capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

Los resultados mostraron que las células pre-acondicionadas de 200-1,000 μM Zn^{2+} por más de 10 generaciones aumentaron su contenido intracelular de Zn^{2+} 37- 46 veces; sin embargo bajo estas condiciones también modifica la concentración de otros iones al disminuir 30-50% la concentración intracelular de Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} y Mg^{2+} , y aumentan la de Cu^{2+} 50% (en concentraciones de Zn^{2+} <1000 μM), siendo el cambio más importante la disminución de 500 nmol/10⁷cel de Mg. Sin embargo la respiración no se vió afectada en ninguna condición pero, sí la fotosíntesis al usar 500 y 1,000 μM Zn^{2+} . Respecto a la síntesis de tioles con capacidad de quelar metales pesados, las células pre-acondicionadas tuvieron los mismos niveles de Cys, γ -EC, GSH y fitoquelatinas totales (FQs_{Totales}) que las células control (crecidas con 20 μM Zn^{2+}), aunque las pre-acondicionadas con 500 y 1,000 μM Zn^{2+} tuvieron 50% menos FQs.

A partir de lo anterior se evaluó la capacidad de acumulación de Cd^{2+} en las células pre-acondicionadas a Zn^{2+} . Los resultados muestran que en todas las condiciones de pre-acondicionamiento se incrementa la capacidad de acumulación, sin embargo en las células pre-acondicionadas con $400 \mu\text{M Zn}^{2+}$ (EgZn_{400}) expuestas a $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$ durante 8 días la acumulación fue más importante, ya que se observó un aumento de 78% en la acumulación de Cd^{2+} con respecto a las células control (EgZn_{20}). Esta acumulación correlacionó con un aumento del 50% en la síntesis de $\text{FQs}_{\text{Totales}}$ en las células EgZn_{400} respecto a EgZn_{20} , mientras que la Cys, $\gamma\text{-EC}$ y GSH tuvieron un comportamiento similar. Un análisis más detallado reveló que la proporción de FQs canónicas (FQ_2 , FQ_3 y FQ_4) solo representa el 10-15% de las $\text{FQs}_{\text{Totales}}$ mientras que el otro 85% corresponde a polímeros de GSH aún sin identificar por completo, donde se logró determinar a la homo-fitoquelatina-2 (homo- FQ_2), iso-fitoquelatina-2 (iso- FQ_2) e hidroximetil-fitoquelatina-2 (hidroximetil- FQ_2).

APORTE CIENTÍFICO Y SOCIAL

Con base al problema social que representa la contaminación por metales pesados, este trabajo muestra la posibilidad de aumentar la capacidad de acumulación de Cd^{2+} de *E. gracilis* mediante estrategias de presión de selección nutricional.

La presente tesis proporciona información que demuestra que el pre- acondicionamiento con Zn^{2+} aumenta la capacidad de acumulación de Cd^{2+} en *E. gracilis*, por un aumento en la síntesis de FQs. Esto sugiere la posibilidad de diseñar proyectos piloto con aguas sintéticas, utilizando cepas de *E. gracilis*. Lo cual, después podría ser aplicado por primera vez en efluentes y aguas residuales que se generan día con día en nuestro país, y para el tratamiento de las cuales no existen soluciones 100% eficientes.

El contacto de los metales pesados con los seres humanos es una de las principales causas por las cuales se generan enfermedades graves, tales como el cáncer. Se propone el uso de microorganismos en los tratamientos de aguas residuales contaminadas por metales pesados en México; ya que estas estrategias son más eficientes y limpias, para contender con la contaminación por metales pesados y con ellas se podría disminuir gradualmente el impacto de estos en la salud humana.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados generalmente se definen como aquellos elementos cuya densidad es mayor a 5 g/mL (Moreno-Sánchez y Devars, 1999; Jarüp, 2003). Algunos metales son importantes en el funcionamiento y metabolismo de los seres vivos como micronutrientes, sin embargo otros como el cadmio (Cd), el mercurio (Hg) o el plomo (Pb) al no ser esenciales pueden tener implicaciones tóxicas en los organismos, sobre todo si sus niveles son elevados (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007).

En México la exposición a metales pesados se deriva principalmente de actividad industrial y minera, a lo que se suma la evidencia de que algunos cuerpos de agua residual confinados, después son empleados directamente en la agricultura, lo cual agrava el problema (Méndez-García *et al.*, 2000; Vázquez-Alarcón *et al.*, 2001; Pérez-Olvera *et al.*, 2008; Mancilla-Villa *et al.*, 2012).

Por ejemplo se sabe que los habitantes del estado de Hidalgo consumen aproximadamente 240 g/día de maíz por persona; se considera que en el Valle del Mezquital de esta misma región desde hace más de 100 años se utiliza el agua residual proveniente de la zona metropolitana de la Ciudad de México con fines agrícolas. Un estudio realizado en el 2001 estimó que considerando como base las concentración de Cd^{2+} en granos de maíz, quienes consumen este cereal producido en esta región podrían estar adquiriendo 293 μg Cd/día (Vázquez-Alarcón *et al.*, 2001); valor que rebasa hasta 12 veces más los 25 μg Cd/mes establecidos por la Organización Mundial de la Salud como límite máximo de consumo.

En México la NOM-127-SSA1-2000 indica los métodos fisicoquímicos y los límites máximos permisibles a los cuales se debe disminuir la concentración de metales pesados en un cuerpo de agua contaminado (≤ 0.05 ppm para Cd^{2+}); sin embargo la literatura indica que dichos métodos son poco eficientes a concentraciones ≤ 20 ppm ($180 \mu\text{M}$ Cd^{2+}).

En éste sentido, *E. gracilis* es un protista que posee la capacidad de resistir y acumular cadmio a concentraciones cercanas a $180 \mu\text{M}$, por lo que tiene el potencial microbiológico y metabólico para completar los métodos fisicoquímicos. Por lo anterior, distintos grupos de trabajo se han interesado en caracterizar los mecanismos por los cuales *E. gracilis* puede resistir y acumular altas concentraciones de metales pesados como Cd^{2+} (De Filippis *et al.*, 1981; Navarro *et al.*, 1997; Devars y Moreno-Sánchez *et al.*, 1998; Danilov y Ekelund, 2000; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2004; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a; García-García *et al.*, 2012), Hg^{2+} (De Filippis *et al.*, 1981; Devars y Moreno-Sánchez, 1998; Devars *et al.*, 2011), Cr^{6+} o Cr^{3+} (Gajdosava y Reichrtova, 1996; Roccheta *et al.*, 2003; García-García *et al.*, 2009; Jasso-Chávez *et al.*, 2010; Lira-Silva *et al.*, 2011), Zn^{2+} (De Filippis *et al.*, 1981; Gingrich *et al.*, 1984; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a), Pb^{2+} (Navarro *et al.*, 1997, Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a) y Ni^{2+} (Gajdosava y Reichrtova, 1996; Ahmed y Donat-Häder, 2010).

La comunidad científica en el área de la biorremediación a nivel de ciencia básica ha buscado aumentar la capacidad de acumulación de los organismos mediante ingeniería genética. En el caso de *E. gracilis* este objetivo se ha perseguido mediante el estudio de la vía de asimilación de azufre (SAP), síntesis de GSH y el metabolismo de las fitoquelatinas. A partir de esto, se ha utilizado Hg^{2+} como presión de selección con el fin de aumentar la vía de síntesis de glutatión y fitoquelatinas. En el presente estudio se implementaron otras estrategias de presión de selección similares.

2. ANTECEDENTES

2.1. Contaminación ambiental por metales pesados. Situación de México.

Los metales pesados pueden estar presentes de forma natural o depositados de manera excesiva en el ambiente como consecuencia de las actividades humanas; esto ha provocado un problema de contaminación por metales pesados a nivel mundial, que ha incrementado gradualmente en paralelo con el desarrollo de la economía global (Chao *et al.*, 2014). La depositación excesiva de estos contaminantes proviene principalmente de la liberación atmosférica, el riego con aguas residuales, el mal manejo de los residuos industriales, alimenticios, agrícolas, ganaderos y forestales, la actividad minera, el uso de pesticidas y/o fertilizantes; esto implica que la dispersión de metales pesados puede darse entre medios aéreos, sólidos y acuosos (Zhang *et al.*, 2011). Principalmente la confinación de los desechos industriales y la composición de los suelos, puede generar un transporte facilitado de los metales pesados hacia cuerpos de agua, ya que al entrar en contacto con la lluvia se forman lixiviados y estos pueden llegar hasta los mantos acuíferos. De igual forma, a este proceso habría que sumarle los contaminantes producidos por las zonas urbanas, con actividades tales como el uso de transporte automotor y el desecho de aguas residuales de tipo sanitario principalmente (Chao *et al.*, 2014).

En el Cuadro 1 se muestra una recopilación de monitoreos realizados en el territorio mexicano de productos agrícolas y organismos acuáticos de consumo humano,

en los que se midió la cantidad de Cd²⁺ acumulado. La comparación de la cantidad de Cd²⁺ acumulado en estos organismos con los límites máximos permisibles de distintas normas establecidas en nuestro país muestra que la contaminación en México por Cd²⁺ es un problema de salud pública real y vigente.

Cuadro 1. Acumulación de Cadmio en organismos vegetales y animales en México.

Sitio de estudio	Organismo	Cd ²⁺ (mg.kg ⁻¹)	Límites máximos permisibles (mg.kg ⁻¹)
Valle Mezquital, Hidalgo ^{a, g}	<i>Zea mays</i> ; (Maíz)	2	0.2 (Legislación, UE ^h)
	<i>Medicago sativa</i> ; (Alfalfa)	1-2	
	<i>Triticum aestivum</i> ; (Trigo)	1-2	
	<i>Phaseolus vulgaris</i> ; (Frijol)	0.5	
	<i>Cucurbita pepo</i> ; (Calabaza)	0.8	
Mixquic Tláhuac, D.F ^b	<i>Brassica oleraceae</i> ; (Brócoli)	5	
Golfo de California, Sinaloa ^c	<i>Crassostrea gigas</i> y <i>C. corteziensis</i> ; (Ostión)	10-14	2 (NOM-242-SSA1 2009)
Lago Tamiahua, Veracruz ^d	<i>C. virginica</i> ; (Ostión)	12±1	
Golfo de California, Sinaloa ^e	<i>Anchoa spp</i> ; (Pez Boquerón)	12	0.5 (NOM-242-SSA1-2009)
Laguna Tampamachoco, Veracruz ^f	<i>Neritina reclivat</i> ; (Gasterópodo)	2±1	

Fuente: **a.** Vázquez-Alarcón *et al.*, 2001; **b.** Pérez-Olvera *et al.*, 2008; **c.** Osuna-Martínez *et al.*, 2011; **d.** Lango-Reynoso *et al.*, 2010; **e.** Quintero-Álvarez *et al.*, 2012; **f.** Godínez-Campos *et al.*, 2007; **g.** Vázquez-Alarcón *et al.*, 2005. **h.** Legislación de la Unión Europea, emitida por la Centros de Asistencia Técnica e Inspección de Comercio Exterior en Valencia 2014.

En este sentido, la importancia ecológica de los metales pesados en el medio está completamente relacionada con la toxicidad que generan hacia los seres vivos con los

que entran en contacto. A partir de esto la Secretaría de Salud (SS) junto con la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), han establecido distintas normas con el objetivo de regular el desecho y manejo de estos contaminantes, basándose en las concentraciones que ponen en riesgo la salud del ser humano y que han sido emitidas por la Organización Mundial de la Salud (WHO).

Específicamente para el agua se han establecido límites máximos permisibles de metales pesados dependiendo de la procedencia o uso del bien, esto con el objetivo de hacerla apta para uso y consumo humano. Por tanto la NOM127-SSA1-1994 modificada en el 2000, establece que la concentración máxima de Cd^{2+} en el agua para consumo humano en el territorio mexicano debe ser de 0.05 mg/L.

2.2. Toxicidad del Cadmio

El Cd es un metal de la familia IIB de la tabla periódica que se ha clasificado como metal pesado, con número atómico 48 y una masa atómica de 112.4 g/mol. Este elemento pertenece al bloque *d* y grupo 12 de la tabla periódica, por lo que es considerado un metal de transición. La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ha definido a los metales de transición como elementos que se caracterizan por tener una subcapa u orbital *d* incompleto y que puede dar lugar a la unión con donadores de electrones (www.iupac.org). Por lo tanto la configuración electrónica del elemento Cd de forma estable correspondería a $[\text{Kr}]4d^{10}5s^2$, el cual suele perder sus electrones de valencia *s* y no de su orbital *d* al formar compuestos por lo que su estado de oxidación más estable es 2+, convirtiéndolo al igual que otros elementos de

su grupo en un excelente ácido de Lewis para formar enlaces covalentes coordinados (Atkins y Jones, 1999; Cobb, 2008). El Cd como ion divalente puede poseer números de coordinación como 4, 5, 6 y 7 en sus complejos, aunque el más común es 4 (Cotton y Wilkinson, 1999). Además el Cd^{2+} posee una afinidad intermedia con los grupos funcionales de moléculas que poseen azufre, nitrógeno y oxígeno, por lo que se clasifica en el grupo C de afinidades de los metales (Nieboer y Richardson, 1980), indicando que el Cd^{2+} es capaz de reaccionar con prácticamente cualquier biomolécula. Las estructuras de los cristales de Cd^{2+} en la formación de complejos muestran tres ligandos de importancia biológica que se resumen en 3 clases: 1) los donadores con grupos nitrogenados como las bases pirimídicas o puricas del ADN y sus derivados, 2) las moléculas con grupos carboxilato como los α -aminoácidos, vitaminas solubles o los compuestos policarboxilados como el EDTA y 3) los donadores sulfídrico como las moléculas con grupos tiol o ditiocarbamatos. Es importante mencionar que el radio iónico del Cd es de 0.92 Å el cual es muy similar al radio iónico del zinc (Zn) 0.69 Å, por lo tanto, aunque el cadmio se reconoce como un metal con una gran similitud con el Zn, la gran afinidad a distintas moléculas debido a su configuración electrónica determinan que el primero sea no-esencial y el segundo si lo sea en los organismos (Sigel *et al.*, 2006).

La contaminación de Cd^{2+} por fuente antrópica incluye las emisiones industriales, la fabricación de baterías, herramienta eléctrica, su aplicación en fertilizantes y la depuración de lodos hacia tierras agrícolas, generando contaminación del suelo y el agua principalmente. Esta liberación y desecho del Cd^{2+} conlleva a la captación de este metal por cultivos y organismos acuáticos que habitan en contacto con este metal, lo que

en paralelo aumenta su relación con el ser humano. Un ejemplo de esto fue observado en una zona en Bélgica contaminada por Cd^{2+} , donde se hizo una estimación de la exposición de la población humana al Cd^{2+} a través de los alimentos, como frutas, verduras y productos animales que habían estado expuestos por más de 18 meses a esta zona; la cuantificación de Cd^{2+} en estos alimentos mostró que la concentración era de hasta 9 y 2 veces más alta en vegetales y carne bovina respectivamente en comparación con cultivos de otras regiones en Bélgica (Vromman *et al.*, 2007).

Otro ejemplo es una de las principales fuentes de exposición directa del ser humano a Cd^{2+} , el consumo de cigarrillo. Debido a que las hojas de la planta del tabaco acumulan una gran cantidad de este metal; sin embargo en la mayoría de las ciudades la principal forma de contacto con el Cd^{2+} es mediante la ingesta de comida (Jarüp *et al.*, 1998). Los principales efectos nocivos en la salud emitidos por la ingesta de Cd^{2+} se centran en el daño crítico al riñón debido a su acumulación, en donde puede tener una vida media de 10-35 años. Su acumulación involucra una disfunción del tubo renal, lo cual generalmente es irreversible (Jarüp, 2003). Además se sabe que la ingesta de Cd^{2+} también puede afectar el metabolismo del Ca, incrementando la incidencia en el ablandamiento de huesos en personas que habitan en zonas contaminadas con este metal. La enfermedad "Itai-Itai" está presente principalmente en mujeres mayores de 50 años en Japón, la cual se caracteriza por osteomalacia, osteoporosis, fracturas óseas dolorosas y disfunción renal; la incidencia de esta enfermedad se debe a que el suelo de esta zona ha sido contaminado con Cd^{2+} por minas de Zn/Pb afectando los cultivos de

arroz principalmente (Jarüp *et al.*, 1998; Arao *et al.*, 2010), cereal que representa la base de la alimentación para este país.

Por otro lado un alta exposición a la inhalación de CdO_2 por la liberación de residuos industriales, se considera letal ya que puede llegar a generar pneumonitis aguda junto con edema pulmonar; lo cual a largo plazo se asocia con cambios pulmonares caracterizados principalmente por una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Jarüp *et al.*, 1983; Seidal *et al.*, 1993; Barbee *et al.*, 1999).

Adicionalmente, la International Agency for Research on Cancer (IARC) ha clasificado al Cd^{2+} dentro del Grupo 1 (compuestos y elementos carcinogénicos para humanos), lo que sugiere que existe suficiente evidencia de que su toxicidad está relacionada con la incidencia del cáncer en seres humanos (<http://www.inchem.org>). Esto permitió que la Organización Mundial de la Salud en el 2010 estableciera nuevas regulaciones con respecto al consumo de Cd^{2+} por humanos, donde con la ayuda de otras instituciones se implementó que en alimentos la ingesta mensual tolerable debe ser de 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, en agua el consumo máximo sea de 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ y que en aire el cadmio no debe rebasar los 5 ng/m^3 anualmente.

2.3. Métodos fisicoquímicos para tratamiento de aguas contaminadas

La norma NOM-127-SSA1-1994, sugiere métodos de tratamiento para la posible potabilización o purificación de aguas cuando los contaminantes biológicos, las características físicas y los constituyentes químicos del agua exceden los límites máximos permisibles establecidos por dicha norma. En el caso del Cd^{2+} y otros metales

los tratamientos que la norma indica para disminuir su concentración en el agua son coagulación, floculación, sedimentación, filtración, intercambio iónico u ósmosis inversa.

De manera general la precipitación química es un método donde se adicionan compuestos que reaccionan con los iones metálicos formando precipitados insolubles, los cuales pueden ser separados por coagulación, floculación, sedimentación o filtración; lo cual implica el uso de otros compuestos de precipitación para alterar el estado físico de los sólidos disueltos, coloidales o suspendidos a fin de facilitar su remoción (Rao *et al.*, 2011 y Ahmaruzzaman, 2011). Con respecto al intercambio iónico este consiste en la remoción de iones o cationes específicos disueltos a través de su reemplazo por otros provenientes de un medio de intercambio natural o sintético con el que se pone en contacto el agua. La adsorción consiste en la remoción mediante una solución que presenta afinidad a un medio de forma que son separadas de la solución (NOM-127-SSA1-2000). Por último la ósmosis inversa es un proceso esencialmente físico de remoción, donde por medio de altas presiones se fuerza el paso del agua por una membrana semi-permeable de porosidad específica reteniéndose en dicha membrana los iones o moléculas de mayor tamaño (Fenglian y Wang, 2011; NOM-127SSA1-2000). Sin embargo, como cualquier tratamiento, para cada uno de estos se ha reportado en la literatura las ventajas y desventajas de su uso (Cuadro 2)

Cuadro 2. Métodos de tratamiento para aguas contaminadas con metales pesados.

Técnica de tratamiento	Químico	pH	Ventajas	Desventajas	Eficiencia %
Precipitación Química	Hidróxido -Ca(OH) ₂ - NaOH	8-11	- Fácil operación. - Bajo costo - La adición de coagulantes eleva la eficiencia.	- Anfotericidad dependiendo del pH, que afecta tratamientos donde hay mezclas de distintos metales.	99
	Sulfuro -H ₂ S -SO ₃ H	3	- La solubilidad de los sulfuros de metal, es mucho menor que los hidróxidos. -No hay anfotericidad - Uso de bacterias	- Producción de humos tóxicos H ₂ S. - Los precipitados son difíciles de separar por filtración o coagulación.	92-100
	Quelantes - C ₃ N ₃ Na ₃ S ₃ -Di-thiocarbonato de Na/K	3-6	- Alta eficiencia -Posible síntesis de compuestos	- Manejo peligroso. - Inseguridad al ambiente. - Costo elevado. - Falta de sitios de unión molecular.	99
Intercambio iónico	Resinas con grupos: - SO ₃ H -COOH	4-7	- Gran capacidad de tratamiento (volumen) -Alta eficiencia de remoción -Rapidez	Eficiencia depende de: - pH. - Temperatura. - Concentración inicial del metal. - Tiempo de contacto. - Alto costo.	55-100
Adsorción	Carbón Activado	ND	- Poros de tamaño variable -Área de contacto amplia	- Alto costo. - Adición de otros compuestos.	ND
	Nanotubos de carbón -Pared simple -Multi-pared	2-6	- Alta eficiencia	- Adición de HNO ₃ , NaClO y KMnO ₄ . - Alto costo. -Descarga de desechos al medio ambiente.	75-98
	Absorbentes orgánicos - Desechos agrícolas - Productos industriales -Bioabsorbentes	5	- Alta eficiencia - Uso de desechos -Proceso rápido - Bajo costo de absorbentes	- Almacenaje de absorbentes. - Fase de experimentación. -Separación de residuos.	ND
Ósmosis inversa	Membranas	ND	-Alta eficiencia	- Alto consumo de energía. - Restauración de membranas.	47-99

Fuente: Fenglian y Wang, 2011; ND: No disponible

La elección entre un método y otro radica principalmente en tres puntos importantes condiciones fáciles de manejo, bajo costo y eficiencia; además el hecho de que existan distintos métodos está relacionado con el tipo de agua a tratar.

La precipitación química es un método muy utilizado por la industria por su fácil manejo, bajo costo y alta eficiencia. A pesar de esto, el uso de compuestos sulfúricos es un tratamiento con peligros potenciales ya que los iones metálicos en condiciones ácidas y de precipitación con sulfuros pueden dar origen a humos tóxicos (H_2S). Sin embargo, para evitarlos la reacción tendría que llevarse a cabo en un pH neutro o básico lo cual podría modificar la eficiencia; además de que genera precipitados coloidales con algunas dificultades para su separación (Fenglian y Wang, 2011). Muchos autores de distintas partes del mundo, concuerdan con que la eliminación de metales pesados de soluciones acuosas se realiza principalmente mediante la precipitación química, debido a su simplicidad y bajo costo. Este método tiene un valor aproximado de US\$6,420/año con compuesto sulfurosos y de US\$5,550/año para compuestos hidróxido (Gumerman *et al.*, 1979) considerando su operación y manejo (energía, material, mantenimiento, y labor), a una capacidad de 5,000 gal/día, sin tomar en cuenta el precio de la construcción y del establecimiento del equipo. Sin embargo, este método genera grandes volúmenes de lodos de baja densidad, mostrando problemas mayores de eliminación, sin mencionar el requerimiento de capital para su uso (Kongsricharoern *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2011; Ahmaruzzaman, 2011).

El intercambio iónico es otro método que ha sido ampliamente utilizado para la remoción de metales pesados de aguas residuales, sin embargo una limitante para que

sea usado en la eliminación de Cd^{2+} es la inversión tan elevada que se requiere para el equipamiento de éste sistema, el cual asciende a aproximadamente US\$ 12,124,840, a lo que se debe sumar el alto costo operacional que llega a ser de hasta US\$ 764,160 debido a la utilización de productos químicos para la regeneración de las resinas utilizadas en el tratamiento (Gumerman *et al.*, 1979), lo cual además genera contaminación secundaria grave (Fenglian y Wang, 2011; Rao *et al.*, 2011).

Por otra parte, la literatura menciona que al menos en los últimos 15 años los estudios con respecto a la remoción de Cd^{2+} de aguas residuales o contaminadas se han enfocado en la caracterización de adsorbentes de bajo costo, principalmente de procedencia biológica como candidatos potenciales para la eliminación de Cd^{2+} , tales como madera, aserrín, cáscara y médula de coco, cáscara de nuez, almendra, maní entre otros (Rao *et al.*, 2011; Wan y Hanafiah, 2008); en este sentido los mismos estudios conllevan a una falta de información sobre la regeneración, la reutilización y la eliminación segura de este tipo de adsorbentes. Esto nos lleva a la conclusión de que por muy eficiente que sea el método para remover iones de un medio acuoso, sin tomar en cuenta el costo, este no termina por completo el problema de contaminación ya que por lo general solo modifica su estado, además de que lo que se busca es remover los iones pero al mismo tiempo lograr obtenerlos para su reutilización de manera industrial.

Por otro lado los estudios realizados para la remoción de Cd^{2+} revelan que una de las principales problemáticas para este tipo de métodos es la dificultad de remover este metal a concentraciones por debajo de 5 ppm (Butter *et al.*, 1998; Dianati-Tilaki y Shariat, 2004; Rao *et al.*, 2011; Fenglian y Wang, 2011). En los trabajos

antes referidos se menciona que a estas concentraciones tan bajas no es económicamente rentable utilizar metodologías como la precipitación química, intercambio iónico y osmosis inversa (Dianati-Tilaki y Shariat, 2004), los cuales son las metodologías recomendadas por la NOM-127-SSA1-2000. Esto sugiere la búsqueda de métodos que puedan complementar a los ya establecidos, y que además sean más eficientes, baratos, amigables con el ambiente y que permitan recuperar los iones removidos.

La biorremediación es un método alternativo que implica el uso de organismos para degradar o depurar el ambiente de productos tóxicos, donde generalmente se utilizan bacterias, hongos, algas, y plantas; los cuales pueden estar o no vivos, y usarse de manera natural o con modificaciones genéticas. Este método posee ciertas ventajas como lo es el hecho de que al ser un proceso derivado de otros organismos es socialmente mejor aceptado, necesita mucho menos capital que otros procesos, y principalmente es posible una recuperación de los contaminantes removidos en algunos casos (Bhatnagar y Kumari, 2013). A pesar de esto la biorremediación aún se encuentra en desarrollo e involucra el estudio y la caracterización de organismos que sean capaces de resistir y acumular metales pesados.

2.4. *E. gracilis*: Mecanismos de resistencia y acumulación a Cadmio.

El modelo de estudio del presente trabajo es el protista flagelado de vida libre *E. gracilis*, esto se debe principalmente a que especies del género *Euglena* han sido reportados en cuerpos de agua y efluentes con pH's ácidos contaminados por Fe, Cu,

Zn, Pb, Cr, Hg y Cd en un intervalo de concentraciones que oscilan entre 0.01-0.5, 0.05-0.2, 0.2-4, 110-320, 30-80, 3-5 y de 0.5-30 mg/L respectivamente (Hargreaves *et al.*, 1975; Togwell, 1978; Conforti *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2004; Javed *et al.*, 2006; Atici *et al.*, 2008).

Por lo tanto, se ha considerado que *E. gracilis* tiene un alto potencial para ser usada en la biorremediación de metales pesados de aguas residuales o en procesos biotecnológicos en los que se tenga el objetivo de recuperar metales con alto valor comercial (Mendoza-Cózatl, 2000). Además *E. gracilis* posee la ventaja de ser un organismo con una gran plasticidad metabólica, ya que además de ser un organismo fotosintético sobrevive de manera autótrofa sin ninguna fuente adicional de carbono que no sea el CO₂ disuelto en el medio, se han generado cepas de éste protista sin cloroplastos, las cuales crecen en la obscuridad y son completamente heterotróficas. De ésta manera se ha comprobado que *E. gracilis* puede utilizar distintas fuentes de carbono tales como glucosa, glutamato, malato, lactato, etanol, succinato, etc (Buetow, 1989).

Los mecanismos de resistencia a Cd²⁺ que se han observado en plantas, bacterias, levaduras y en protistas como *E. gracilis* son 1) la unión a la membrana externa o pared celular, 2) cambios en el transporte de los iones, 3) la inactivación extra e intracelular y 4) la compartimentalización de complejos entre el Cd²⁺ y moléculas quelantes dentro de ciertos organelos (Mendoza-Cózatl, 2005; Rodríguez-Zavala *et al.*, 2007). Sin embargo para fines de biorremediación los mecanismos que atraen nuestro interés son los que permiten una remoción del medio acuoso.

La exposición de *E. gracilis* a concentraciones entre 50-200 μM de Cd^{2+} durante 5 a 8 días genera un aumento en moléculas con grupos tiol (-SH) como la cisteína (Cys), la gamma-glutamilcisteína ($\gamma\text{-EC}$), el glutatión (GSH) y las fitoquelatinas (FQs) de 3-11, 4, 3-19 y 6-30 veces más respecto a las células control (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; García-García *et al.*, 2012). Estos cambios metabólicos se han asociado a un mecanismo de resistencia a Cd^{2+} , ya que el grupo tiol que poseen estos metabolitos puede reaccionar con el Cd^{2+} . Estas observaciones, han generado estudios más profundos que han demostrado que en *E. gracilis* el Cd^{2+} es inactivado formando complejos de alto peso molecular (HMWC, por sus siglas en inglés) dentro de los cloroplastos, similar a lo que sucede en levaduras y plantas a pesar de que en éstos organismos los HMWC son compartimentados en vacuolas. Los HMWC en *E. gracilis* están formados en un 65% por Cys, $\gamma\text{-EC}$ y GSH y 35% por FQs (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006b), por lo tanto el metabolismo de estas moléculas tioles tiene una contribución importante sobre los mecanismos de resistencia y acumulación de Cd^{2+} .

El grupo tiol de estos metabolitos proviene de la Cys, que es sintetizada a través de la vía de asimilación de azufre (VAA). Esta inicia con el transporte de sulfato (SO_4^{2-}) por transportadores de la membrana celular de baja afinidad con una $K_m\text{SO}_4^{2-} > 100\mu\text{M}$ (LAST, por sus siglas en inglés) y alta afinidad con una $K_m\text{SO}_4^{2-} < 100\mu\text{M}$ (HAST, por sus siglas en inglés), los cuales dependen de energía (ATP); el gradiente de protones generado por las ATP-asas de la membrana plasmática permite un co-transporte electrogénico donde se utilizan 3 protones (H^+) para contrarrestar las dos cargas negativas del SO_4^{2-} y que así éste oxianión logre entrar a la célula. Dentro es reducido a

sulfito (SO_3^{2-}) y luego a sulfuro (S^{2-}); esto mediante la activación del SO_4^{2-} donde la enzima ATP sulfurilasa (ATPS) le transfiere al sulfato un grupo adenosin fosfato (AMP) que proviene de otra molécula de ATP, formando AMP-sulfato (APS) y liberándose pirofosfato (PPi). Después el APS es reducido a SO_3^{2-} por la APS reductasa (APSR) utilizando 2 moléculas de GSH como donador de electrones y así finalmente reducir ese SO_3^{2-} a S^{2-} mediante la sulfito reductasa (SiR). Por último el S^{2-} se condensa con la Oxígeno-acetilserina (OAS) mediante la Oxígeno-acetilserina tiol liasa (OAS TL) para formar Cys (García-García, 2014). A partir de aquí la Cys y un ácido glutámico son tomados por la enzima γ -glutamílcisteína sintetasa (γ -ECS) para formar γ -glutamílcisteína (γ -EC); después una glicina y la γ -EC formarán glutatión (GSH) por medio de la enzima glutatión sintetasa (GS) (García-García, 2014). Las fitoquelatinas (FQs) son proteínas de bajo peso molecular (menor a 10KDa), que difieren a las metalotioneínas (MTs) presentes en animales y plantas las cuales son codificadas mediante un gen y que se clasifican de manera distinta dependiendo del organismo. Las FQs son polipéptidos generados a partir de moléculas de GSH, los cuales son sintetizados por la enzima fitoquelatina sintasa (FQS) en respuesta a la presencia de metales pesados y unen fuertemente a los metales debido al grupo tiol que poseen. En el caso de la formación del complejo Cd-GS cuando están presentes el GSH y Cd^{2+} se ha reportado una K_{eq} (constante de equilibrio) de $5.13 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Vatamaniuk *et al*, 2000); lo cual indica que esa reacción está favorecida.

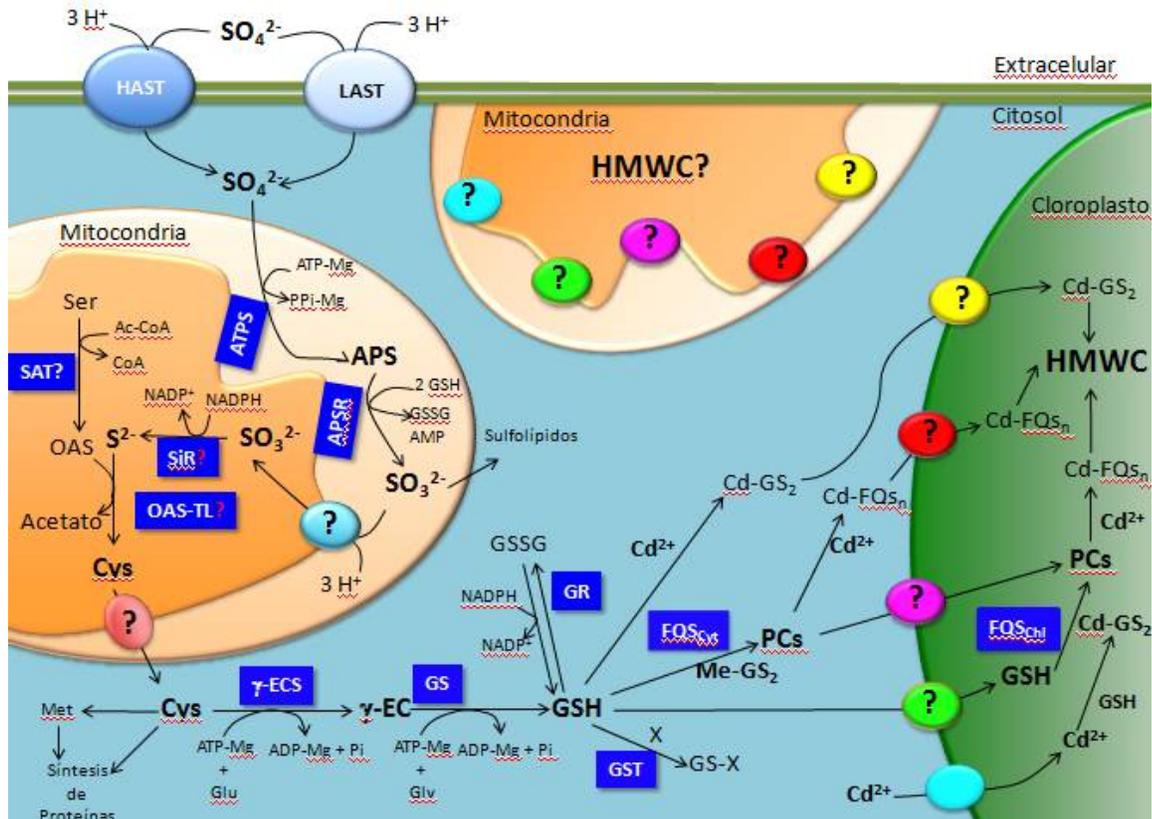


Figura 1. Vía de asimilación de azufre, síntesis de GSH y FQs en *E. gracilis*. Modificado de García-García, 2014.

Con base a estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de *E. gracilis* a nivel metabólico, con el objetivo de modificar los mecanismos que favorezcan la acumulación de metales pesados, entre ellos el Cd^{2+} .

2.5. Estrategias para aumentar la capacidad de acumulación de Cadmio en *E. gracilis*.

El aumento de la capacidad de acumulación de Cd^{2+} es un objetivo que se ha perseguido en organismos con alto potencial para ser aplicados en la biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados. En éste sentido, en la planta *Arabidopsis*

thaliana se ha sobre-expresado a la HA-ATFQS (AtFQS1 con un epítotope de 10aa de la hemaglutinina), logrando aumentar los niveles de FQ₂, FQ₃ y FQ₄ en 4, 7 y 80 veces más en raíces y 2, 5 y 9 veces en hojas, con respecto a los niveles de éstos tioles medidos en plantas no transformadas (wild-type) en exposición a 25 μM Cd²⁺ (Li *et al.*, 2004). Contrario a lo que se esperaba, ésta estrategia generó una hipersensibilidad a Cd²⁺ en las plantas transformadas sin observarse ningún cambio en su capacidad de acumulación (0.6 mg Cd/ g_{peso seco}) con respecto a plantas wild-type. Los autores sugieren que lo anterior fue debido a la depleción de GSH posiblemente por la eficiencia catalítica de esta enzima para sintetizar FQs, lo cual generó un desbalance en el sistema antioxidante de la planta originando una hipersensibilidad, ya que el fenotipo hipersensible se restaura adicionando 1mM de GSH. Debido a esto, en otro trabajo en *A. thaliana* se sobre-expresó simultáneamente a la γ -ECS de *Saccharomyces cerevisiae* y a la FQS de *Allium sativum* (ajo), con el objetivo de mantener una homeostasis entre la concentración de GSH y FQs, los resultados mostraron que las plantas expuestas a 250 μM Cd²⁺ sintetizaban 30% más GSH y FQs_{Totales}, además de que la acumulación de Cd²⁺ aumentaba 15 veces más con respecto a las plantas no transformadas (Jiangbo *et al.*, 2008). Estos antecedentes muestran que mediante el aumento en el flujo de síntesis de fitoquelatinas se puede lograr un aumento en la capacidad de acumulación de cadmio en los organismos, además de que estos fenotipos dependen de la eficiencia catalítica y de las enzimas que se deciden sobre-expresar.

Si bien la modificación genética de plantas ha mostrado avances importantes en el aumento de la capacidad de acumulación de cadmio, se debe considerar que no todos

los organismos de interés biotecnológico son adecuados para seguir éstas estrategias. Éste es el caso del protista *E. gracilis*, ya que además de ser un organismo del cual no se ha secuenciado su genoma, no se han desarrollado vectores de sobre-expresión específicos para éste protista.

Tomando en cuenta éstas limitaciones metodológicas, en nuestro grupo de trabajo se han considerado protocolos basados en la presión de selección metabólica por deficiencia de SO_4^{2-} , ya que los antecedentes de la literatura muestran que bajo éste estrés nutricional es posible modular la actividad de los transportadores de SO_4^{2-} y la γ -glutamilcisteína sintetasa, dos de las enzimas clave en la síntesis de GSH y FQs. En la siguiente sección se detalla dicha información.

2.5.1. Aumento de la biosíntesis de Cys y GSH mediante presión de selección con deficiencia de sulfato.

Como se mencionó anteriormente, la fitoquelatina sintasa (FQS) utiliza al GSH como uno de sus sustratos para sintetizar FQs, y además el aumento de su síntesis de FQs es crucial en los mecanismos de resistencia y acumulación de Cd^{2+} . Por lo tanto, un aumento en la síntesis de GSH podría favorecer la biosíntesis de FQs y por ende la capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

En éste sentido, resultados reportados por García-García *et al.*, 2012, muestran que un cultivo de *E. gracilis* deficiente de SO_4^{2-} (cultivada por más de 10 generaciones con 0.06 mM SO_4^{2-}) tiene 16, 1 y 6 veces menos Cys, γ -EC y GSH; sin embargo, al alimentar a éstas células con 10 mM SO_4^{2-} durante 3 hr su capacidad para sintetizar Cys es 3 veces mayor que la determinada en células control (crecidas con 2 mM SO_4^{2-}). La

alta capacidad de sintetizar Cys se asoció a un aumento en la actividad de los transportadores de sulfato de alta (*EgPMST1* por sus siglas en inglés) y baja afinidad (*EgPMST2*) de 9 y 104 veces, respectivamente. Un cálculo teórico basado en los parámetros cinéticos del transporte de SO_4^{2-} (K_m y V_{max} de *EgPMST1* y *EgPMTS2*) y en la ecuación de doble Hill, la cual describió dicho fenómeno de transporte, demostró que las células deficientes de SO_4^{2-} aumentaron 26 veces su capacidad para transportar SO_4^{2-} respecto a las células control (García-García *et al.*, 2012).

Curiosamente, la capacidad de sintetizar GSH no aumentó a pesar de que la actividad de la γ -glutamílcisteína sintetasa (γ -ECS) y glutatión sintetasa (GS) aumentaron 4.5 veces, lo cual sugiere que la regulación cinética tipo feedback que tiene el GSH sobre la γ -ECS sigue regulando la actividad de la enzima (García-García *et al.*, 2012). Respecto a la síntesis de FQs tampoco se observaron cambios; sin embargo esto puede deberse a que la FQS además del GSH, necesita del co-sustrato formado entre un metal pesado como el Cd^{2+} y dos moléculas de GSH (bis-glutationato de metal, Me-GS_2), y en esos experimentos no se adicionó ningún metal.

No obstante, las células de *E. gracilis* deficientes de SO_4^{2-} y su alta capacidad de sintetizar Cys eran atractivas para analizar un fenotipo hiperacumulador de Cd^{2+} , ya que los antecedentes mencionados sugerían que al exponer a las células a Cd^{2+} la concentración de GSH iban a movilizarse hacia la síntesis de FQs, y al tener un alta capacidad de síntesis de Cys, ésta a su vez iba a restablecer la concentración de GSH.

Tomando en cuenta estos antecedentes, en el proyecto de Servicio Social que se realizó previo al presente proyecto de Tesis, se utilizaron células de *E. gracilis*

deficientes de SO_4^{2-} para determinar su capacidad de acumulación de Cd^{2+} . En principio, los resultados mostraron que la IC_{50} por Cd^{2+} de éstas células es de 5 μM , 3 veces menor a la reportada para las células control (García-García *et al.*, 2012). Por otro lado, tomando en cuenta que las células deficientes de SO_4^{2-} tienen concentraciones bajas de Cys, γ -EC y GSH como resultado de la restricción de fuentes de azufre, en el protocolo para determinar la capacidad de acumulación primero se planeó reestablecer los niveles de tioles mediante la adición de 2 y 10 mM de SO_4^{2-} , y posteriormente hacer la exposición a Cd^{2+} . Los resultados que se obtuvieron muestran que en presencia de 2 mM SO_4^{2-} la acumulación de Cd^{2+} fue la misma en células deficientes de SO_4^{2-} y control, mientras que con 10 mM SO_4^{2-} , ésta fue 4 veces menor en las células deficientes de SO_4^{2-} (Cuadro 3).

Cuadro 3. Acumulación en *E. gracilis* control (*EgZn₂₀*) y deficiente de SO_4^{2-} [(-) SO_4^{2-}], en 2 y 10 mM SO_4^{2-} durante 5 días. En cada caso, la concentración de Cd^{2+} que se utilizó corresponde al doble del valor de su IC_{50} .

n = 3	Acumulación de Cd^{2+} nmol/ 10^7 células	
	<i>EgZn₂₀</i> (30 μM Cd^{2+})	(-) SO_4^{2-} (10 μM Cd^{2+})
2 mM	30 \pm 2	15 \pm 6
10 mM	23 \pm 6	6 \pm 2

La capacidad de acumulación también se determinó usando un protocolo de “alta densidad”, el cual consistió en generar cultivos de *E. gracilis* de 1 L, cosechar a las células en condiciones de esterilidad al inicio de la fase estacionaria, y con ellas preparar soluciones celulares entre 20 – 30 $\times 10^7$ células/mL en 10 mL de medio de cultivo. La intención de haber usado éste protocolo de alta densidad fue determinar la capacidad de

acumulación sin el factor crecimiento. Sin embargo, como se puede observar en el Cuadro 4, tampoco se observaron diferencias en la capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

Cuadro 4. Acumulación de Cd^{2+} en células control (EgZn_{20}) y deficientes $[(-)\text{SO}_4^{2-}]$ a distintos tiempos en protocolo de alta densidad.

t, h	Cd^{2+} (μM)					
	50		100		200	
	nmol/ 10^7 células					
	Control	SUI	Control	SUI	Control	SUI
6	1.4 (1)	0 (1)	1.6 (1)	1.1 (1)	2.6 (1)	2.8 (1)
24	5.4 (1)	4.6 (1)	5.9 (1)	7.5 (1)	11 \pm 5	12 \pm 6
48	13 (1)	6 (1)	6.7 (1)	6 (1)	18 \pm 15	18 \pm 12

Estos antecedentes sugieren que el aumento en la actividad de los transportadores de sulfato y de la γ -ECS en las células de *E. gracilis* deficientes de SO_4^{2-} no fue suficiente para obtener un fenotipo hiperacumulador de Cd^{2+} en *E. gracilis*.

Por otro lado, hay información en la literatura que sugiere que el Zn^{2+} tiene un papel importante en los mecanismos de resistencia y acumulación de Cd^{2+} en *E. gracilis*. Dicha información se detalla en la siguiente sección.

2.5.2. Favorecimiento la actividad de la fitoquelatina sintasa (FQS).

Como se mencionó anteriormente la sobre-expresión de la FQS en plantas ha tenido resultados contrastantes sobre la capacidad de acumulación de Cd^{2+} . El objetivo de estos trabajos basados en metodologías de ingeniería genética es aumentar la cantidad de enzima activa en las plantas; sin embargo, esto también se podría lograr favoreciendo la disponibilidad de sustratos con el fin de promover la síntesis de los compuestos quelantes, y así obtener una mayor eficiencia y un aumento en la acumulación de Cadmio.

Estudios *in vitro* de la FQS de *E. gracilis* (EgFQS) muestran que esta enzima es 2.6 veces más activa en presencia de Zn^{2+} con respecto a Cd^{2+} , lo que significa que el bis-glutationato de Zinc ($Zn-GS_2$) es mejor sustrato que el bis-glutationato de Cadmio ($Cd-GS_2$), contrario a lo que sucede con la FQS de otros protistas, algas, levaduras y plantas (García-García *et al.*, 2014). Además, se han realizado estudios de la interacción entre el Cd^{2+} y el Zn^{2+} en *E. gracilis*, donde se observa que $15 \mu M Zn^{2+}$ en el medio de cultivo protege a las células contra los efectos estructurales y de proliferación que conllevan una exposición a Cd^{2+} en comparación con células completamente deficientes en Zn^{2+} (Nakano *et al.*, 1978; Gingrich *et al.*, 1984). Aunado a lo anterior, la importancia del Zn^{2+} durante exposiciones a Cd^{2+} se ha determinado mediante el análisis de la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cd^{2+} , ya que la concentración inhibitoria del 50% de crecimiento para Cd^{2+} ($IC_{50 Cd}$) se ve modificada dependiendo de las concentraciones de Zn^{2+} en el medio de cultivo. De tal forma que en presencia de 20 y 300 $\mu M Zn^{2+}$ la $IC_{50 Cd}$ es 15 y 70 μM , respectivamente (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2006a; García-García *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento no se había intentado usar al Zn^{2+} como parte de una estrategia metabólica para aumentar la capacidad de acumulación de Cd^{2+} en *E. gracilis*.

Tomando en cuenta los antecedentes planteados en el presente trabajo de tesis, se planeó llevar a cabo el pre-acondicionamiento de células de *E. gracilis* a distintas concentraciones de Zn^{2+} , con el objetivo de aumentar las concentraciones intracelulares de éste metal esencial y favorecer la biosíntesis de FQs, de tal forma que se favorezca un fenotipo que aumente la capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

3. HIPÓTESIS

El pre-acondicionamiento con Zn^{2+} proveerá una mayor acumulación de Cd^{2+} mediante un aumento en la síntesis de fitoquelatinas en *Euglena gracilis*.

4. OBJETIVOS

4.1. General:

Determinar la acumulación de Cd^{2+} y el contenido de fitoquelatinas en células de *E. gracilis* pre-acondicionadas con Zn^{2+} .

4.2. Particulares:

- Determinar la susceptibilidad al Zn^{2+} mediante la determinación del crecimiento celular de *E. gracilis* expuesta a distintas concentraciones de Zn^{2+} .
- Optimizar un protocolo de pre-acondicionamiento con Zn^{2+} para aumentar la concentración intracelular de este metal en *E. gracilis*.
- Determinar la concentración de los cationes metálicos totales Mg, Mn, Fe, Co y Cu, la fotosíntesis y la respiración para evaluar los efectos fisiológicos del pre-acondicionamiento con Zn^{2+} en *E. gracilis*.
- Determinar la susceptibilidad a Cd^{2+} (densidad celular en presencia de distintas concentraciones de Cd^{2+}) y capacidad de acumulación de Cd^{2+} en las células de *E. gracilis* pre-acondicionadas con Zn^{2+} .
- Determinar el contenido de Cys, γ -EC, GSH y FQs en *E. gracilis* control y pre-acondicionadas con Zn^{2+} en las condiciones de máxima acumulación de Cd^{2+} para evaluar el metabolismo de las fitoquelatinas.

5. Materiales y Métodos

5.1. Cultivo de *E. gracilis* fotosintética

5.1.1. Células control (*EgZn₂₀*)

La cepa fotosintética de *E. gracilis* Var. *Z* fue cultivada axénicamente en medio *Hutner*, modificado por Schiff *et al.*, 1971. Este medio se compone de Glutamato 34 mM, Malato 15 mM, CaCO₃ 2 mM, (NH₄)₂HPO₄ 1.5 mM, MgSO₄·7H₂O 2 mM, KH₂PO₄ 3 mM, *Minerales Traza A* (ZnSO₄·7H₂O 0.02 mM, MnSO₄·H₂O 0.01 mM, Na₂MoO₄·2H₂O 0.1 mM y CoCl₂·6H₂O 7x10⁻³ mM) y *Minerales Traza B* (CuSO₄·5H₂O 3x10⁻³ mM, H₃BO₃ 0.01 mM). El medio se ajustó a un pH de 3.5 con perlas de KOH y se esterilizó por autoclave 15 minutos a 20 libras de presión; antes de sembrar las células se añadió por cada 100 mL de cultivo 1 mL de vitaminas (Tiamina 3x10⁻³ mM, Cianocobalamina 0.2 µg/L y FeCl₂ 0.02 mM) previamente esterilizadas por filtración.

Las células se mantuvieron por resiembras, las cuales se hicieron antes de llegar a la fase estacionaria de crecimiento, partiendo de un inóculo de 0.2-0.4x10⁶ células/mL dependiendo del experimento. Los cultivos se mantuvieron en una cámara a una temperatura entre 22-25°C, con un fotoperiodo de 12 horas con luz blanca (70 µmol quanta m⁻² s⁻¹) y 12 horas de oscuridad.

Cuando se detectaban signos de contaminación en los cultivos de *E. gracilis* (células precipitadas en el fondo de los matraces, hongos en la superficie de los cultivos, y a nivel microscópico la presencia de bacterias y células de *E. gracilis* redondas e inmóviles) el protocolo que se siguió fue tomar con un asa microbiológica una muestra del cultivo contaminado para inocular una placa de Petri de agar natural. Las cajas se

mantuvieron a 22-25 °C y bajo el mismo fotoperiodo que los cultivos líquidos. Después de 15 días aproximadamente, era posible identificar colonias aisladas de color verde, las cuales se tomaron con palillos de madera estériles para cultivarlas en el medio líquido descrito previamente.

5.1.2. Células pre-acondicionadas con Zinc (*EgZn*)

Para realizar el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} se cultivaron las células por más de 10 generaciones en distintas concentraciones de Zn^{2+} , donde se utilizó una solución calibrada de $ZnCl_2$ y esterilizada por filtración, de la cual se tomaron las alícuotas para obtener las concentraciones necesarias para cada condición de cultivo. La adición del $ZnCl_2$ se llevó a cabo después de las vitaminas y antes de agregar las células. Es importante mencionar que se decidió nombrar a las células pre-acondicionadas con 200, 300, 400, 500 y 1000 $\mu M Zn^{2+}$ como *EgZn*₂₀₀, *EgZn*₃₀₀, *EgZn*₄₀₀, *EgZn*₅₀₀ y *EgZn*₁₀₀₀, respectivamente, y a las células control (cultivadas con 20 $\mu M Zn^{2+}$) como *EgZn*₂₀.

5.1.3. Conteo celular y determinación de viabilidad

Las células se contaron con una cámara de Neubauer, esto se realizó tomando muestras de los cultivos para hacer diluciones en un volumen final de agua de 1 mL con 0.05% de HCl para inmovilizar a las células y así facilitar su conteo. Se tomaron 15 μl de la dilución, se colocaron en el centro de la cámara, se colocó el portaobjetos y se contaron las células dentro de los 5 cuadrantes principales de la cámara (Fig. 1) para hacer un promedio entre ellos. Este valor fue multiplicado por el factor de extrapolación de la cámara (10,000) (el cual fue calculado considerando el volumen de muestra que

hay en cada cuadrante entre la cámara y el cubreobjetos (1×10^{-4} ml)) para determinar la concentración de células por mililitro de cada cultivo.

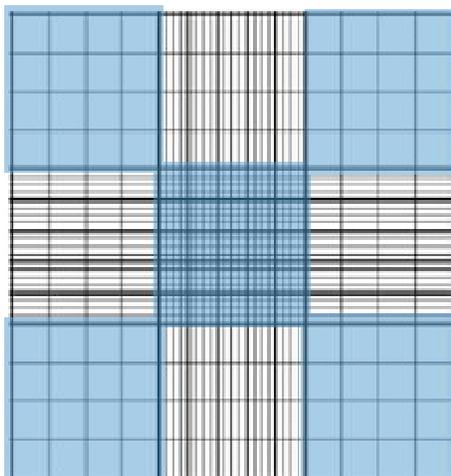


Fig. 1 Cámara de Neubauer; cuadrantes utilizados para la cuantificación celular (azul).

La viabilidad se determinó pre-incubando a las células con azul tripano 0.05% (w/v) durante 2 minutos antes de ser contadas ya que las células muertas después de esta incubación se tiñen de color azul. Por lo tanto se consideran 100 células dentro de los cuadrantes y se determina el porcentaje de la cantidad de células vivas y muertas.

5.2. Exposición al Cadmio

Se tomó un volumen adecuado de los diferentes cultivos experimentales (*EgZn*₂₀, *EgZn*₂₀₀, *EgZn*₃₀₀, *EgZn*₄₀₀, *EgZn*₅₀₀ y *EgZn*₁₀₀₀) para tener un inóculo de 0.4×10^6 células/mL en 50 mL de medio Hutner (SO_4^{2-} 2.01 mM) en presencia de $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$ y suplementado con las concentraciones de Zn^{2+} utilizadas en los pre-acondicionamientos (200, 300, 400, 500 y 1000 μM). La exposición a Cd^{2+} fue a 15, 30, 50, 100, 200, 300 y 500 μM , el cual provenía de una solución calibrada y esterilizada de CdCl_2 300 mM.

Después de los tiempos establecidos, se cosechó a las células por centrifugación (3500 rpm 4°C 5 minutos). Posteriormente el botón celular se lavó con KH_2PO_4 0.1 M suplementado con 5 mM EGTA para eliminar el metal adherido extracelularmente. Al final de los lavados el botón celular se resuspendió en KH_2PO_4 0.1M, las células se contaron en un hemocitómetro y se tomó 1mL de esa suspensión celular para medir el Cd, Zn, Cu, Co, Mn, Fe y Mg intracelular (Sección 5.4), y la síntesis de tioles (Sección 5.5).

5.3. Determinación del consumo y producción de oxígeno.

Cultivos de células control de 50 mL y pre-acondicionadas con Zn^{2+} inoculados con 0.2×10^6 células/mL, fueron cosechados a las 120 h y se lavaron con buffer KME, KCl (120 mM) , MOPS (20 mM) y EGTA (1 mM)) pH 7.2, por centrifugación (3500rpm 4°C por 5 min). El botón celular obtenido fue resuspendido con KME, donde se obtuvo una suspensión de aproximadamente de 10×10^7 células/mL para determinar el consumo y producción de oxígeno.

Las mediciones se hicieron usando un electrodo de O_2 , tipo Clark (Yellow Spring Instruments) y en una cámara (1.7 mL) con agitación, la cual se mantuvo a temperatura constante (25°C) mediante un flujo continuo de agua. El electrodo se calibró utilizando buffer KME pH 7.2 saturado de oxígeno y se adicionó ditionito de sodio (Na_2SO_3) para determinar la cantidad total de oxígeno en la cámara. La solubilidad del oxígeno a la altitud de la Ciudad de México (2240m) se consideró de 420 ngatO/mL. Las mediciones se hicieron dentro de una caja oscura para mantener aisladas a las células de la luz y poder controlar la fotosíntesis con luz de un proyector de diapositivas (1000 μmol

quanta/ m·s). Los cambios en la concentración de oxígeno se acoplaron a un registrador (Kipp & Zonen) que graficó los trazos de respiración y fotosíntesis.

5.4. Determinación de Cd, Zn, Cu, Co, Mn, Fe y Mg totales por EAA.

La cantidad intracelular de los cationes metálicos totales de interés se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Se utilizó un equipo Varian Spectra AA 640 con una mezcla de aire y acetileno a un flujo de 13.5:2 L/min. Se utilizaron lámparas que emiten a una longitud de onda de 228.8, 213.9, 324.8, 240.7, 279.5, 248.3, y 285.2 nm para medir Cd, Zn, Cu, Co, Mn, Fe y Mg total respectivamente.

Las células se obtuvieron como se detalló en el inciso 5.2. Para romper a las células y eliminar residuos orgánicos, se hizo una digestión agregando 3ml de una mezcla ácida (2.5 mL HNO₃/0.5 mL H₂SO₄) por cada mililitro de muestra y utilizando una plancha de calentamiento durante 2 horas, alternando cada 15 minutos con alta intensidad (100-110°C) y 10 minutos con baja intensidad (95-100°C). Por último las muestras se aforaron a 5 mL con H₂O_{mQ}. La concentración de las muestras se obtuvo mediante la interpolación de una curva patrón con un ajuste lineal utilizando distintas concentraciones de Cd (Fig. 3A), Zn (Fig. 3B), Cu (Fig. 3C), Co (Fig. 3D), Mn (Fig. 3E), Fe (Fig. 3F) y Mg (Fig. 3G).

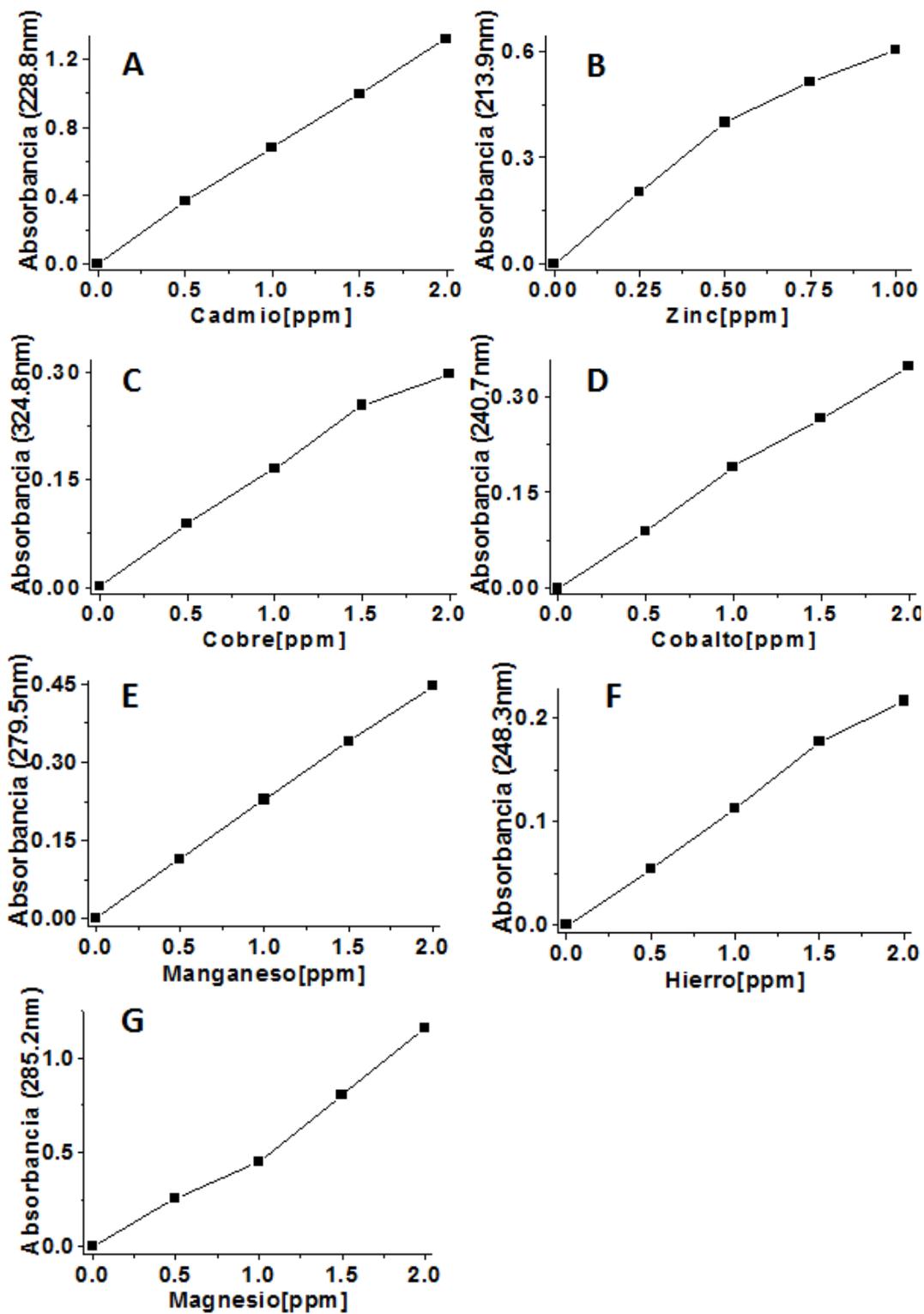


Figura 3. Curva patrón utilizada para la determinación cuantitativa de Cd_{Total} (A), Zn_{Total} (B), Cu_{Total} (C), Co_{Total} (D), Mn_{Total} (E), Fe_{Total} (F) y Mg_{Total} (G).

5.5. Determinación de tioles

Las células fueron cosechadas según el apartado 5.2 con la diferencia de que la alícuota que se tomó para medir tioles (1 mL) se guardó a -70°C en presencia de 5 mM de DTT hasta por 5 días. Una vez descongeladas las muestras se adicionó Tritón X-100 0.1% y PCA 3%, se agitaron vigorosamente 1 minuto y después se centrifugaron a 14000 rpm y 4°C durante 2 min. Se obtuvo el sobrenadante por filtración (0.45 μm de diámetro de poro), y se tomaron 50 μl para medir tioles por HPLC (Mca. Waters 1525-1289).

El sistema HPLC que se utilizó contaba con una columna C-18 Symmetry Waters de tamaño de partícula 3.5 μm . La fase móvil que se utilizó estaba compuesta de ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% en agua, y los tioles se eluyeron con un gradiente lineal acetonitrilo (ACN) 100%. La separación al principio fue con 99% de solución de TFA y 1% ACN, después de 10 min se utilizó un gradiente discontinuo para obtener 80% de la solución de TFA y 20% ACN a un flujo de 1mL/min. Los compuestos con grupos tiol fueron detectados por una reacción colorida con DTNB 0.1 mM en KH_2PO_4 0.1 M pH 8, utilizando una longitud de onda de 412 nm en un espectrofotómetro acoplado al HPLC. Cada uno de los metabolitos fueron identificados mediante el uso de estándares internos.

6. RESULTADOS

6.1. Pre-acondicionamiento con Zinc

6.1.1. Susceptibilidad al Zinc

Con el objeto de establecer los rangos de concentración empleados para que la concentración de Zn^{2+} no fuese demasiado tóxica para la células de *E. gracilis*, se establecieron las concentraciones de zinc en el medio de cultivo tomando como referencia el valor de IC_{50} para Zn^{2+} .

Para determinar la IC_{50} se cultivo a *E. gracilis* control (*EgZn₂₀*) en presencia de distintas concentraciones de Zn^{2+} . Tomando en cuenta las densidades celulares obtenidas al quinto día de crecimiento se construyó la Fig. 4, de la cual se obtuvo un valor de IC_{50} de 1.4 mM.

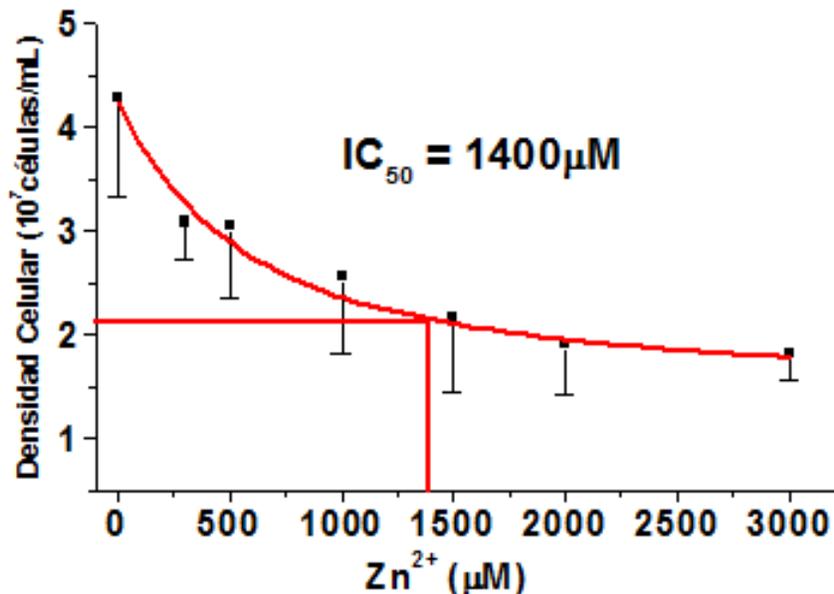


Figura 4. Crecimiento de *EgZn₂₀* en 5 días. La IC_{50} se calculó considerando como 100% la densidad celular de las células cultivadas en $20\mu M Zn^{2+}$ y el 50% de crecimiento se extrapoló al eje de las abscisas utilizando como base una hipérbola. $\pm SD n = 4$

6.1.2. Acumulación de Zinc

Después de cultivar a las células por más de 10 generaciones en su respectiva concentración de pre-acondicionamiento, se determinó la acumulación de Zn^{2+} (Cuadro 5) donde primero se observó que el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} generó un aumento de 21-46 veces en la concentración de Zn^{2+} intracelular. Además este experimento permitió observar que existe un posible mecanismo de homeostasis para regular la entrada de zinc a la célula, ya que a partir de $300 \mu M Zn^{2+}$, la acumulación de este metal alcanza su máxima acumulación aunque la concentración extracelular vaya en aumento.

Cuadro 5. Acumulación de Zn^{2+} al inicio de la fase estacionaria (5^o día) en células $EgZn_{20}$ y pre-acondicionadas a Zn^{2+} ($\pm SD$). Los valores están reportados en unidades de $nmol/10^7$ células.

	<i>EgZn</i> ₂₀ (7)	<i>EgZn</i> ₂₀₀ (4)	<i>EgZn</i> ₃₀₀ (5)	<i>EgZn</i> ₄₀₀ (6)	<i>EgZn</i> ₅₀₀ (4)	<i>EgZn</i> ₁₀₀₀ (3)
Zn_{Total}	7 \pm 3	150 \pm 48	223 \pm 50	260 \pm 95	256 \pm 60	323 \pm 42

6.1.3. Análisis ionómico

Por otro lado, fue muy importante determinar si la presión de selección nutricional con Zn^{2+} en *E. gracilis* podría haber afectado a otros cationes esenciales presentes en el medio de cultivo. Es por esto que se determinó la concentración intracelular de Cu, Co, Mn, Fe y Mg total en las células pre-acondicionadas a Zn^{2+} (Cuadro 6). Esta determinación permitió observar que la concentración de Cu no cambia excepto a concentraciones $<1000 \mu M Zn^{2+}$ donde esta aumenta 1.5 veces. Con respecto al Co, Mn, Fe y Mg se observa que estos disminuyen de un 40 a un 55% en todas las condiciones de pre-acondicionamiento, sin embargo el cambio más importante es en Mg, ya que su

disminución representa 500 nmol/10⁷ células, lo cual podría tener un efecto importante en la síntesis de FQs debido a que la vía de asimilación de azufre y la síntesis de GSH requieren de ATP y Mg para su funcionamiento, sin mencionar todas las funciones celulares que requieren de este catión.

Cuadro 6. Concentración intracelular de Cu, Co, Mn, Fe y Mg total al 5º día de crecimiento en *EgZn*₂₀ y células pre-acondicionadas a Zn²⁺. Los valores están reportados en unidades de nmol/10⁷ células.

	<i>EgZn</i> ₂₀	<i>EgZn</i> ₂₀₀	<i>EgZn</i> ₃₀₀	<i>EgZn</i> ₄₀₀	<i>EgZn</i> ₅₀₀	<i>EgZn</i> ₁₀₀₀
Cu	4±1(4)	4±1(4)	4±1(4)	4±1(4)	4±1(3)	10±2(3)
Co	13±4(4)	7±1(4)	7±1(4)	7±0.3(4)	6±1(3)	7±1(3)
Mn	10±2(4)	6±0.4(4)	6±1(4)	6±1(4)	6±1(3)	8±0.4(3)
Fe	162±30(4)	156±40(4)	149±56(4)	108±21(4)	110±10(3)	131±48(3)
Mg	1243±507(4)	826±171(4)	748±56(4)	796±100(4)	796±83(3)	941±63(3)

±SD (n)

6.1.4. Respiración y Fotosíntesis en células pre-acondicionadas

A partir de lo anterior era esencial determinar si el estatus energético de la célula podía haberse modificado debido a un pre-acondicionamiento a Zn²⁺, por lo que se determinó el consumo y la producción de oxígeno en las diferentes condiciones (Cuadro 7). Los resultados muestran que la respiración no cambia con respecto a la concentración de Zn²⁺, pero si en la fotosíntesis a concentraciones < 500 µM Zn²⁺.

Cuadro 7. Respiración y Fotosíntesis en las células pre-acondicionadas con Zinc.

Células	Consumo de Oxígeno ngAO/min 10⁷ células	Producción de Oxígeno ngAO/min 10⁷ células
<i>EgZn</i>₂₀ (4)	292±58	263±14
<i>EgZn</i>₂₀₀ (3)	242±81	313±110
<i>EgZn</i>₃₀₀ (3)	331±124	316±123
<i>EgZn</i>₄₀₀ (4)	226±23	314±38
<i>EgZn</i>₅₀₀ (3)	254±81	195±92
<i>EgZn</i>₁₀₀₀ (3)	222±100	63±27

±SD (n)

6.1.5. Contenido de Cys, γ -EC, GSH y FQs

Por último se determinó si el aumento de Zn^{2+} intracelular había tenido un efecto directo en la vía de asimilación de azufre y síntesis de FQs, por lo que se cuantificó el contenido de Cys, γ -EC, GSH, FQs_{Totales}, FQ₂, FQ₃ y FQ₄ (FQs canónicas) en las células control y pre-acondicionadas con Zn^{2+} . Sin embargo como se observa en el Cuadro 8, a pesar de que se esperaba que el aumento en la concentración intracelular de Zn^{2+} modificara la síntesis de estos metabolitos quelantes, no hubo diferencias entre las distintas condiciones con respecto a *EgZn*₂₀ excepto en concentraciones > 500 μ M Zn^{2+} donde se observa una disminución del 50% en la síntesis de FQs_{Totales} lo cual se mantiene en la suma total de FQs canónicas.

Cuadro 8. Contenido intracelular de Cys, γ -EC, GSH y FQs en células $EgZn_{20}$ y pre-acondicionadas con Zn^{2+} al inicio de la fase estacionaria (5^o día). Los valores están reportados en unidades de nmol/10⁷ células.

Células	Cys	γ -EC	GSH	PCs _{Total}	FQ ₂	FQ ₃	FQ ₄	FQ ₂₋₄
<i>EgZn</i> ₂₀ (8)	29±3	3±1	13±1	5±0.3	0.1±0.02	0.2±0.04	0.2±0.04	0.4±0.1
<i>EgZn</i> ₂₀₀ (5)	27±3	4±0.4	22±2	6±1	0.1±0.07	0.4±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1
<i>EgZn</i> ₃₀₀ (4)	24±2	4±0.4	19±3	5±1	0.1±0.05	0.1±0.06	0.1±0.05	0.4±0.1
<i>EgZn</i> ₄₀₀ (11)	31±3	5±1	18±2	6±1	0.04±0.01	0.3±0.07	0.2±0.04	0.6±0.1
<i>EgZn</i> ₅₀₀ (3)	20±3	3±0.5	17±3	3±0.6 *	0.04±0.02	0.04±0.01	0.1±0.03	0.2±0.1
<i>EgZn</i> ₁₀₀₀ (3)	33±5	5±0.4	21±3	3±0.4 *	0.02±0.01	0.03±0.01	0.2±0.1	0.3±0.1

± SE (n) * t-test p>0.05

Además este análisis detallado de la composición de las FQs_{Totales} permitió determinar que únicamente el 8-10%, de estas corresponde a FQs canónicas (FQ₂, FQ₃ y FQ₄), por lo que se sugiere que el otro 90% podría estar conformado por polímeros de GSH no canónicos como homo-fitoquelatinas (homo-FQs), iso-fitoquelatinas (iso-FQs) e hidroximetil-fitoquelatinas (hidroximetil-FQs).

6.2. Capacidad de acumulación de Cadmio

6.2.1. Susceptibilidad a Cadmio en células *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀*

Posteriormente se evaluó el efecto del pre-acondicionamiento con Zn^{2+} en la susceptibilidad a Cd^{2+} , por lo que se determinó una IC_{50} por Cd^{2+} . Se utilizaron células *EgZn₄₀₀*, ya que en esta condición la concentración de Zn^{2+} intracelular llega a su máxima capacidad después del pre-acondicionamiento, sin modificar la respiración y la fotosíntesis con respecto a las células control.

Sorprendentemente, a pesar de que se esperaba que el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} tuviera un efecto protector ante un estrés por Cd^{2+} , las células *EgZn₄₀₀* fueron más susceptibles a Cd^{2+} cuando estas fueron expuestas en $20 \mu M Zn^{2+}$, ya que la IC_{50Cd} resultó ser 3 veces menor (Fig. 5A) a la reportada para las células control *EgZn₂₀* de $15 \mu M Cd^{2+}$ (García-García *et al.*, 2012). Sin embargo el efecto protector del Zn^{2+} , sí se observó cuando el experimento se realizaba en presencia de su misma concentración de pre-acondicionamiento ($400 \mu M Zn^{2+}$) donde la IC_{50Cd} fue 4 veces mayor (Fig. 5B).

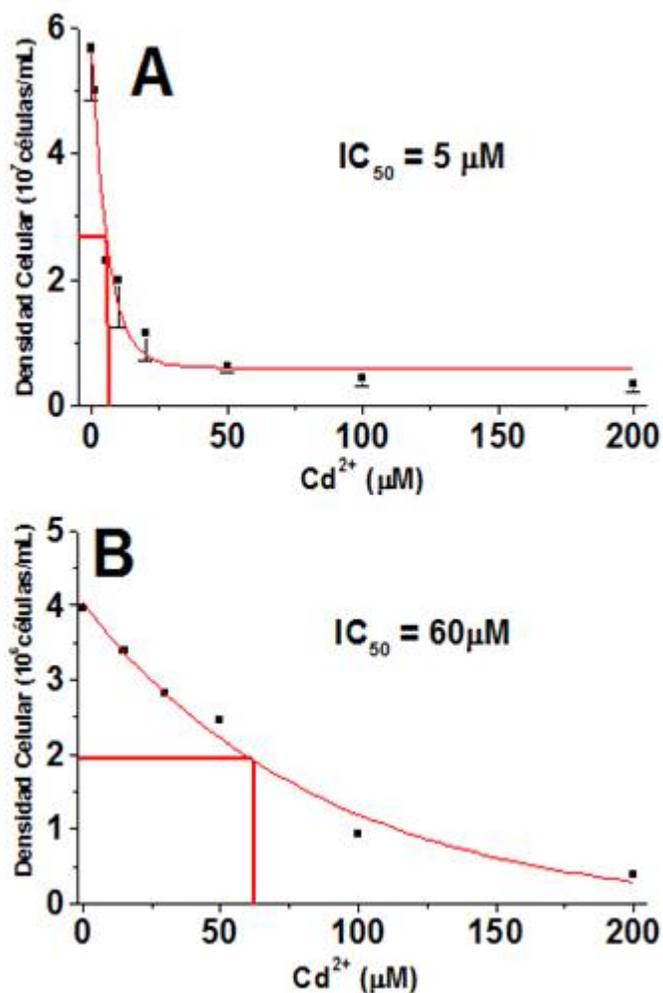


Figura 4. Crecimiento celular de *EgZn*₄₀₀ al 5to día, al ser expuestas a distintas concentraciones de Cadmio en presencia de 20 (A) y 400 (B) μM Zn²⁺ en el medio de cultivo.

6.2.2. Acumulación de Cadmio en *EgZn*₂₀ y *EgZn*₄₀₀

Para determinar la capacidad de acumulación de Cd²⁺, todas las condiciones fueron expuestas durante 5 días con su respectiva concentración de pre-acondicionamiento con Zn²⁺ (200, 300, 400, 500 y 1000) a 200 μM Cd²⁺, con la finalidad de observar el comportamiento de ambos metales en la célula y su efecto en la acumulación de cada uno a partir solo de un pre-acondicionamiento con Zn²⁺. Por otro

lado es importante mencionar que se eligió la concentración de 200 μM Cd^{2+} con la finalidad de comparar los resultados con la máxima acumulación reportada para *E. gracilis* y otras pre-adaptaciones que de igual forma tenían la finalidad de incrementar la capacidad de acumulación de Cd^{2+} (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

Los resultados de acumulación de Cd^{2+} y Zn^{2+} después de 5 días se muestran en el Cuadro 9, donde se observa que la acumulación de Cd^{2+} es igual e incluso 60% menor en las células pre-acondicionadas con Zn^{2+} con respecto a las células control. Además los resultados muestran que la acumulación de Zn^{2+} se mantiene constante a partir de 400 μM Zn^{2+} y 30-70% mayor a la de Cd^{2+} en concentraciones < 500 μM Zn^{2+} .

Cuadro 9. Acumulación de Cd y Zn en células control y pre-acondicionadas con Zn^{2+} expuestas durante 5 días a 200 μM Cd^{2+} en su misma concentración de pre-acondicionamiento con Zn^{2+} .

Células	[Zn^{2+}] μM	ACUMULACIÓN $\text{nmol}/10^7$ células	
		Cd^{2+}	Zn^{2+}
<i>EgZn</i>₂₀ (11)	20	183±50	9±1
<i>EgZn</i>₃₀₀ (2)	300	86	83
<i>EgZn</i>₄₀₀ (1)	400	209	286±60
<i>EgZn</i>₅₀₀ (1)	500	153	228
<i>EgZn</i>₁₀₀₀ (1)	1000	67	214

± SD (n)

A partir de los resultados anteriores, se consideró realizar el mismo experimento pero utilizando 20 μM Zn^{2+} como concentración en el medio de cultivo al momento de exponer a las células al Cd^{2+} . Esto debido a que posiblemente existe una competencia entre el Zn^{2+} y el Cd^{2+} por entrar a la célula, lo cual no permite que sea evidente un aumento en la acumulación de Cd^{2+} por un pre-acondicionamiento con Zn^{2+} . En el Cuadro 10 se muestra que en efecto solo el pre-acondicionamiento y no la exposición conjunta genera un aumento de hasta el 60% en la acumulación de Cd^{2+} en las células pre-acondicionadas a 400 μM Zn^{2+} (*EgZn₄₀₀*). Además los resultados muestran que la acumulación de Zn^{2+} disminuye 17-30% con respecto a la condición en que las células que son expuestas al Cd^{2+} en su misma concentración de pre-acondicionamiento.

Cuadro 10. Acumulación de Cd^{2+} en células control y pre-acondicionadas a Zn^{2+} expuestas durante 5 días a 200 μM Cd^{2+} en presencia de 20 μM Zn^{2+} .

Células	[Zn^{2+}] μM	ACUMULACIÓN nmol/ 10^7 células	
		Cd^{2+}	Zn^{2+}
<i>EgZn₂₀</i> (11)	20	183 \pm 50	9 \pm 1
<i>EgZn₃₀₀</i> (2)	20	313	69
<i>EgZn₄₀₀</i> (8)	20	371 \pm 7	189 \pm 58
<i>EgZn₅₀₀</i> (1)	20	260	97
<i>EgZn₁₀₀₀</i> (1)	20	279	96

\pm SD (n)

Sin embargo para hacer una comparación con otros trabajos que tenían de igual forma el propósito de incrementar la capacidad de acumulación de Cd^{2+} (Devars *et al.*, 1998; Avilés *et al.*, 2003), se determinó la acumulación de Cd^{2+} después de 8 días de exposición (Fig. 6). Se observó que todos los pre-acondicionamientos aumentan la acumulación de Cd^{2+} en presencia de $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$, aunque en las células pre-acondicionadas con $400 \mu\text{M Zn}^{2+}$ (EgZn_{400}) fue donde se observó el mayor aumento con 80% más Cd^{2+} con respecto a EgZn_{20} .

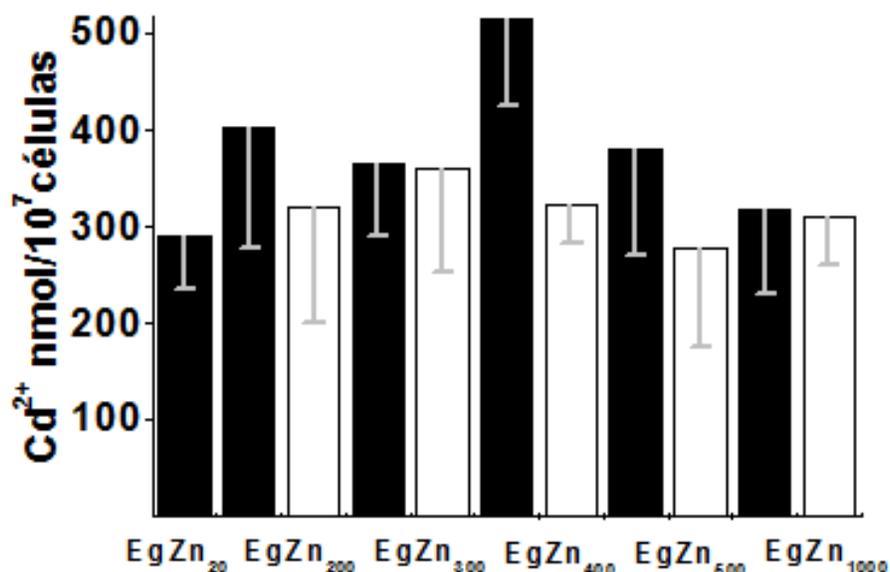


Figura 6. Acumulación de Cd^{2+} en células control (EgZn_{20}) y pre-acondicionadas con Zn^{2+} expuestas durante 8 días a $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$, en $20 \mu\text{M Zn}^{2+}$ (barras negras) y en su concentración de pre-acondicionamiento a Zn^{2+} (barras blancas). \pm SD n = 3 - 8

Es importante mencionar que como control experimental se determinó la acumulación de Zn^{2+} (Fig. 6), para observar si la modulación de la concentración intracelular de zinc se mantenía con respecto a la concentración de zinc en la que son

expuestas las células, debido al fenómeno de competencia que posiblemente existe entre estos iones para entrar a la célula.

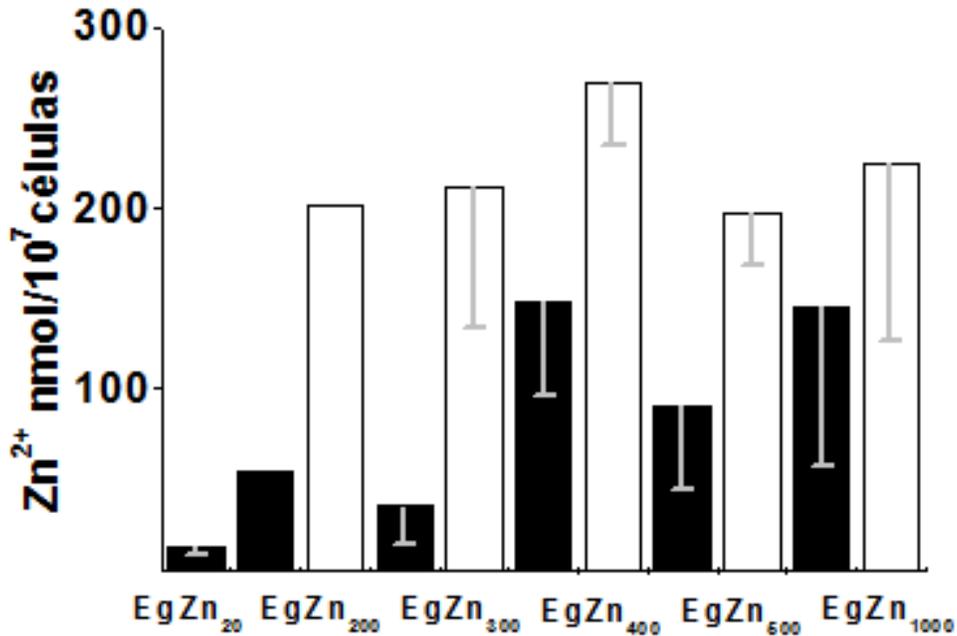


Figura 6. Acumulación de Zn²⁺ en células control y pre-acondionadas a zinc expuestas durante 8 días a 200 μM Cd²⁺, en 20 μM Zn²⁺ (barras negras) y en su concentración de pre-acondicionamiento a zinc (barras blancas). ±SD n = 2-6.

A partir de los resultados anteriores, se utilizó a las células *EgZn*₄₀₀ para explicar el fenómeno observado con respecto al aumento en la acumulación de Cd²⁺. Es por esto que, con la finalidad de observar de que manera se internalizaba el Cd²⁺, se realizó un curso temporal de acumulación en células *EgZn*₂₀ y *EgZn*₄₀₀, expuestas a 200 μM Cd²⁺ en 20 μM Zn²⁺ durante 8 días.

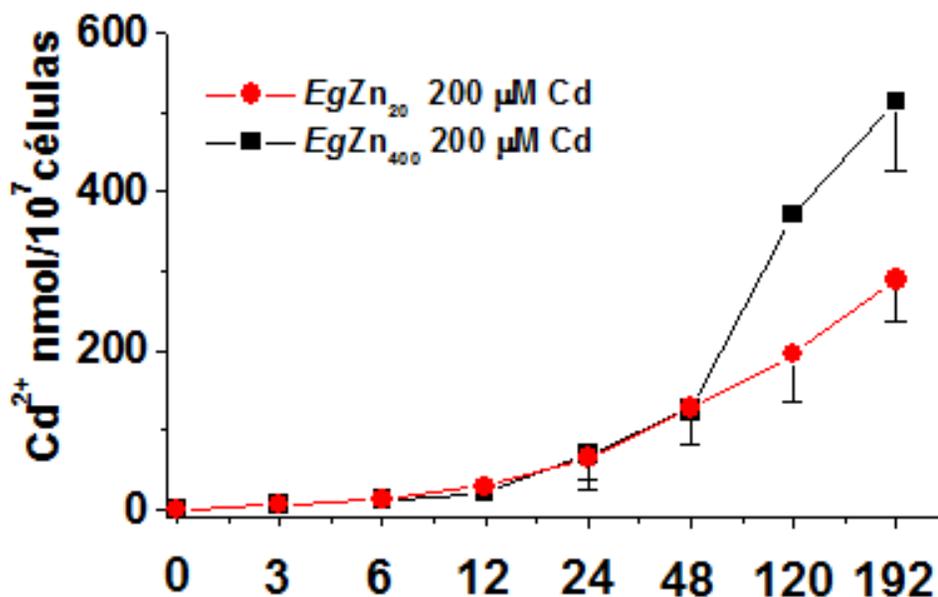


Figura 8. Curso temporal de acumulación de cadmio durante 8 días en células *EgZn*₂₀ y *EgZn*₄₀₀ expuestas a 200 μM Cd²⁺. ±SD n = 2-8.

Los resultados muestran que a tiempos cortos no hay diferencias en la acumulación de Cd²⁺ entre ambas células, sin embargo se observa que a partir de 48 horas las células *EgZn*₄₀₀ tienen un aumento del 50% en la acumulación que ya no es alcanzado por las células controla través del tiempo. Además, aunque no se muestra en la figura anterior estos experimentos se llevaron a cabo hasta 360 horas, lo cual mostró que las células *EgZn*₄₀₀ ya no acumulan más Cd²⁺ después de 192 horas.

Por último se determinó la capacidad de acumulación de Cd²⁺ a distintas concentraciones (Fig. 9). Los resultados indican que a bajas concentraciones de Cd²⁺ (15-100 μM Cd²⁺) no hay diferencias en la acumulación entre células control y *EgZn*₄₀₀. Por otro lado, a pesar de que el aumento del 80% en las células *EgZn*₄₀₀ en 200 μM Cd²⁺ se mantiene, a concentraciones mayores (300- 500 μM Cd²⁺) sería necesario realizar

más repeticiones para observar si el aumento que se observa es estadísticamente significativo.

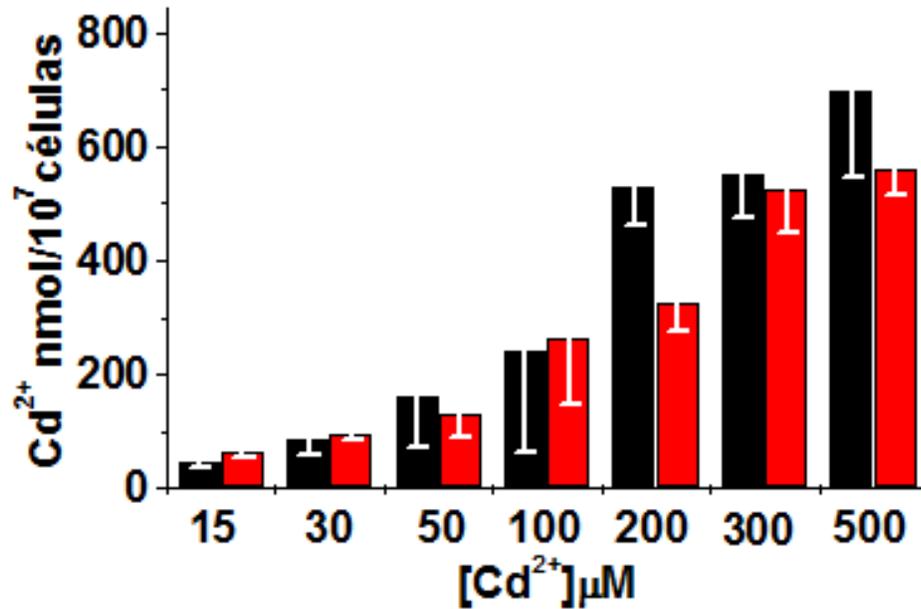


Figura 9. Capacidad de acumulación de Cd²⁺ a distintas concentraciones durante 8 días, en las células *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀*. ±SD n = 4

6.2.3. Efecto del Cadmio en el estatus iónico de la célula

Por otro lado se hizo un análisis iónico de las células control y pre-acondicionadas a 400 μM Zn²⁺, para observar como se había modificado la concentración intracelular de Cu, Co, Mn, Fe y Mg debido al aumento en la concentración intracelular de Cd²⁺. Los resultados indican que el Cu y el Fe (Fig. 10A y 10B) aumentan de 3 a 5 veces tanto en las células *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* expuestas a 200 μM Cd²⁺ con respecto a su condición sin Cd²⁺. Sin embargo son necesarias más cuantificaciones para determinar si este aumento es menor en las células *EgZn₄₀₀* expuestas a Cd²⁺, ya que esto le proporcionaría una ventaja debido a que el aumento

intracelular de estos iones podría estar favoreciendo la reacción de Fenton y con esto el estrés oxidante, ya que esta reacción produce radicales hidroxilo altamente reactivos. Por otra parte en general la concentración de Co y Mn (Fig. 10C y 10D) disminuye 30-50% en *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* cuando son expuestas a Cd^{2+} .

A pesar de esto el dato más relevante es la disminución de 60% en Mg en las células *EgZn₂₀* expuestas a cadmio con respecto a su condición sin Cd^{2+} , mientras que se observa que las células *EgZn₄₀₀* recuperan su concentración intracelular de Mg a los mismos niveles que las células *EgZn₂₀* no expuestas a Cd^{2+} . Estos resultados sugieren que la recuperación de la concentración intracelular de Mg en las células *EgZn₄₀₀* expuestas a Cd^{2+} pudo haber favorecido la síntesis de FQs en condiciones de exposición a Cd^{2+} , ya que como se mencionó anteriormente es necesario el complejo ATP-Mg para la vía de asimilación de azufre y síntesis de GSH.

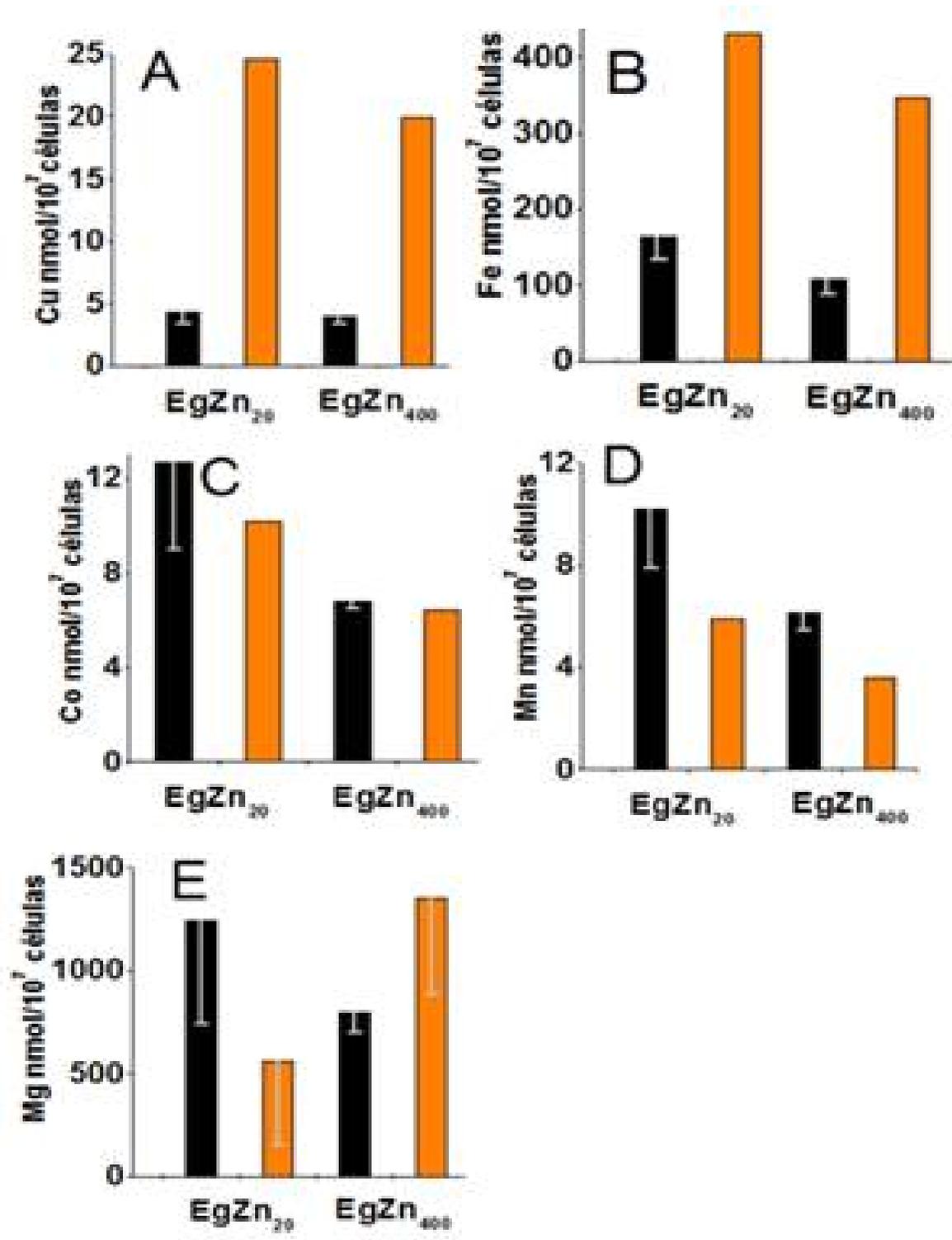


Figura 10. Concentración intracelular de Cu(A), Fe(B), Co(C), Mn(D) y Mg(E) en células control y *EgZn*₄₀₀ sin Cd²⁺ (barras negras) y expuestas a 200 μM Cd²⁺ durante 8 días(barras naranja).

6.2.4. Contenido de tioles en *EgZn*₂₀ y *EgZn*₄₀₀

Por último había que dar una explicación al fenómeno de aumento en la capacidad de acumulación de Cd²⁺. Nuestra hipótesis planteaba una posible correlación entre la síntesis de FQs y el aumento en la acumulación de Cd²⁺ mediante un aumento en la concentración intracelular de zinc, por lo que en principio se utilizaron extractos celulares de *EgZn*₄₀₀ expuesta en 20 μM Zn²⁺ a 200μM de Cd²⁺ durante 8 días para revelar por HPLC la presencia de FQs con el uso de estándares internos (Fig. 11).

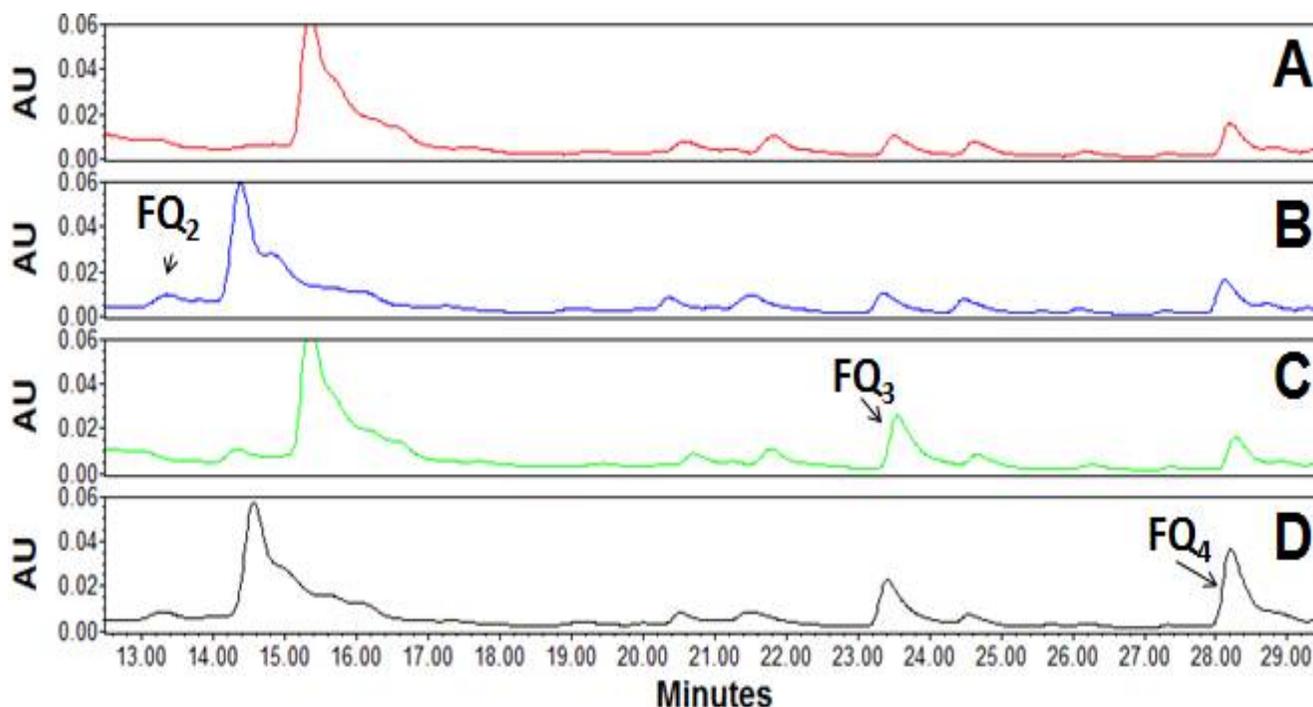


Figura 11. Cromatogramas de determinación de tioles totales en extractos de *EgZn*₄₀₀, con ampliación en la zona de las FQs, incluyendo la adición de estándares de FQ₂, FQ₃ y FQ₄ sucesivamente en el mismo extracto. A) Control; B) Adición de FQ₂; C) FQ₃ y D) FQ₄.

La obtención de estos cromatogramas nos permitió determinar que la región que normalmente se considera la zona de las FQs en nuestro grupo de trabajo y que se cuantifica como FQs_{Totales}, sí corresponde a la presencia de FQ₂, FQ₃ y FQ₄. A pesar de

esto existen metabolitos revelados en esta zona de los cuales se desconoce su identidad, sin embargo en parte se logró determinar la presencia de hidroximetil-FQ₂ (Fig.12), homo-FQ₂ (Fig. 13) e iso-FQ₂ (Fig. 14).

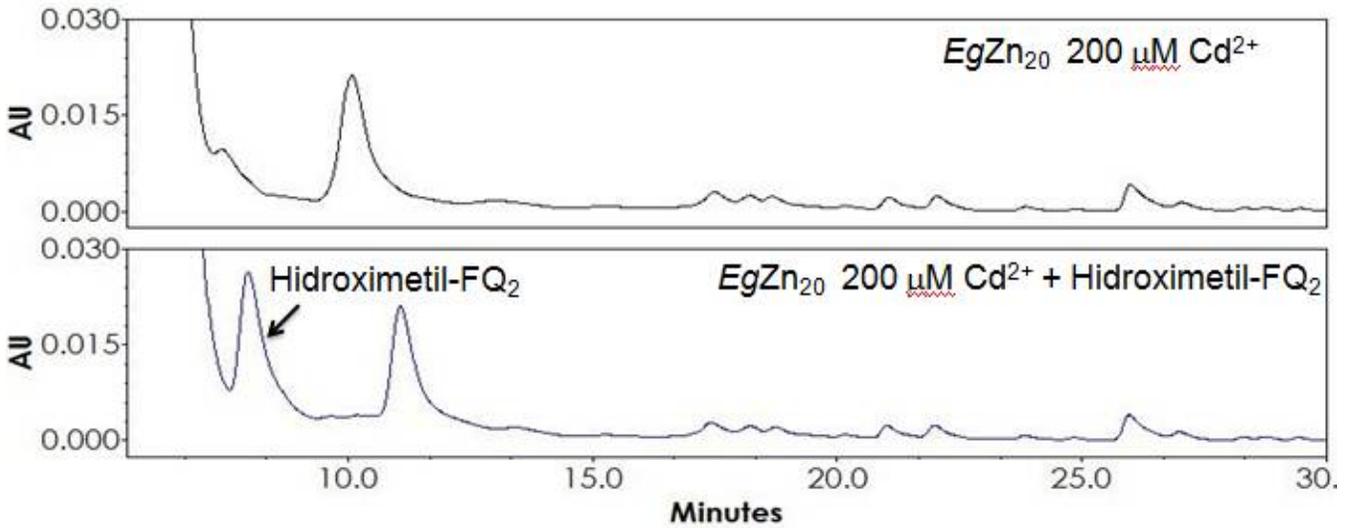


Figura 12. Ampliación de la zona de las FQs de los cromatogramas de determinación de tioles de extractos de *EgZn₂₀* expuesta a 200 μM Cd^{2+} durante 8 días. Identificación de hidroximetil-FQ₂ con el uso de un estándar interno.

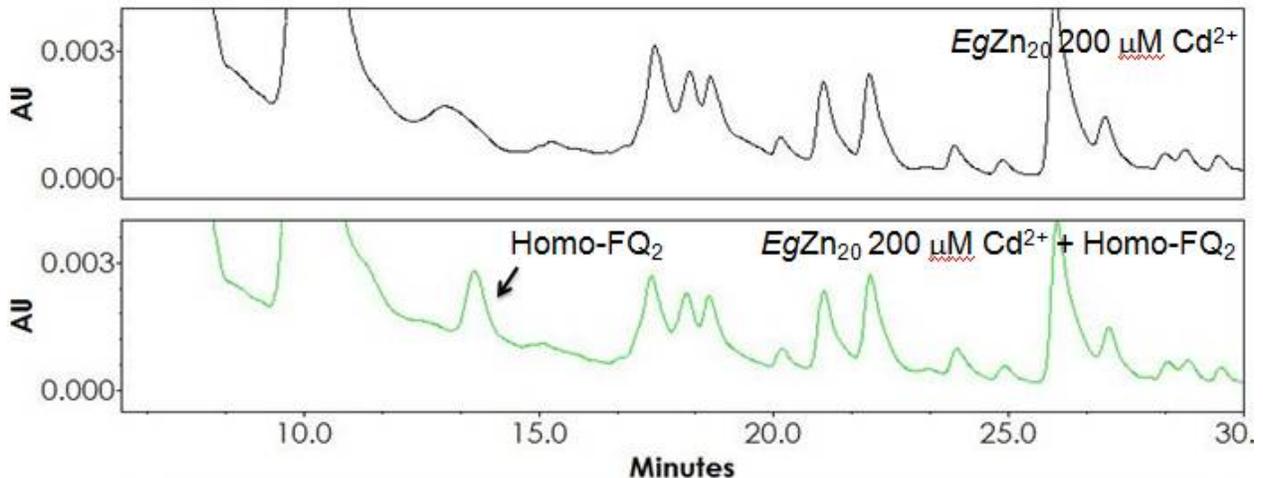


Figura 13. Ampliación de la zona de las FQs de los cromatogramas de determinación de tioles de extractos de *EgZn₂₀* expuesta a 200 μM Cd^{2+} durante 8 días. Identificación de homo-FQ₂ con el uso de un estándar interno.

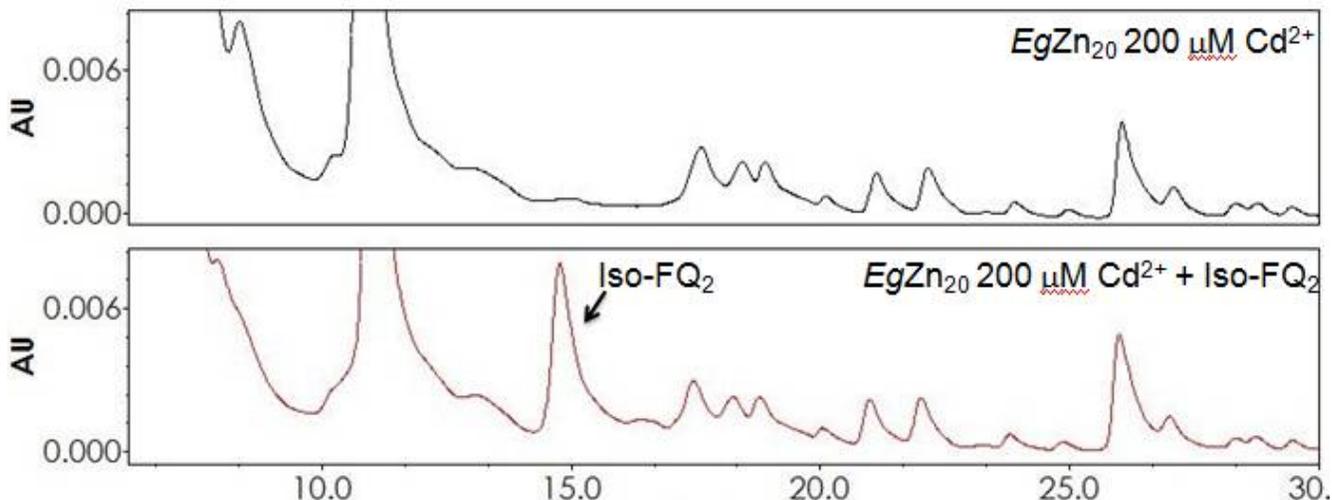


Figura 14. Ampliación de la zona de las FQs de los cromatogramas de determinación de tioles de extractos de *EgZn₂₀* expuesta a 200 μM Cd^{2+} durante 8 días. Identificación de iso-FQ₂ con el uso de un estándar interno.

Por otra parte se hizo la cuantificación de síntesis de tioles para poder correlacionar el incremento en la capacidad de acumulación de Cd^{2+} de las células *EgZn₄₀₀* con respecto al control, por lo que se realizó un curso temporal de síntesis de Cys, $\gamma\text{-EC}$, GSH y FQs_{Totales} (Fig. 15) con la finalidad de observar si el precondicionamiento con Zn^{2+} realmente había tenido una repercusión en las vías que involucran la síntesis de FQs. Se observó que al menos en cuanto a la síntesis de Cys, $\gamma\text{-EC}$ y GSH no hay diferencias a lo largo de 8 días entre *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀*. Con respecto a la síntesis de FQs_{Totales}, en *EgZn₄₀₀* se observa que a partir de las 48 horas hay un aumento en la síntesis de estos polímeros que concuerda con el aumento en el curso temporal de acumulación al 2° día donde las células *EgZn₄₀₀* lograron acumular casi el doble que las células control.

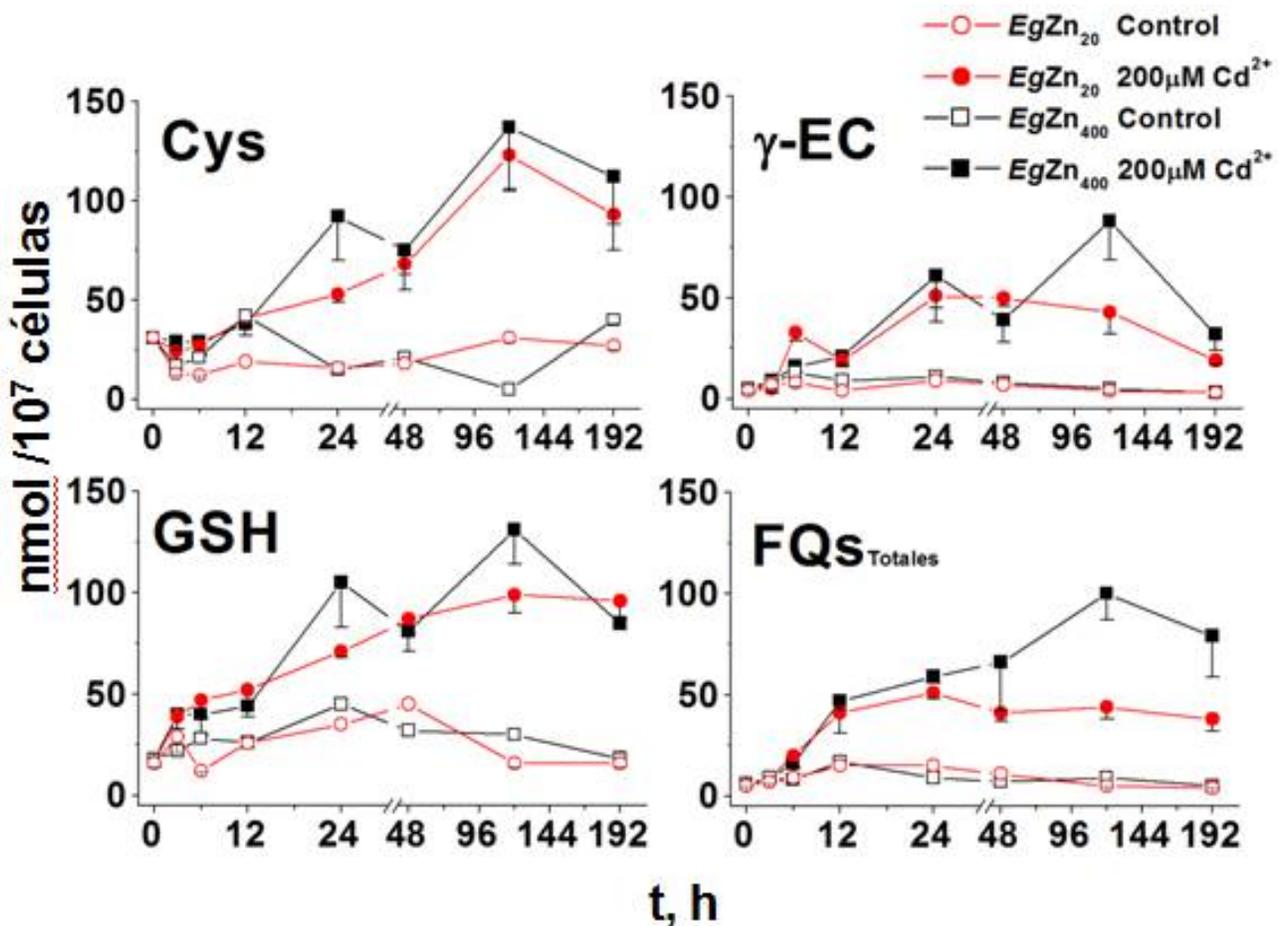


Figura 14. Síntesis de Cys, γ -EC, GSH y FQs durante 8 días en células control *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* expuestas a 200 μ M Cd²⁺ en 20 μ M Zn²⁺.

Además como un análisis más detallado se hizo un curso temporal de síntesis de FQ₂, FQ₃ y FQ₄ en *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* durante 8 días (Fig.15). Los resultados indican que cuando las células no son expuestas a Cd²⁺ sus niveles de FQs son bajos, excepto por la síntesis de FQ₃ que incrementa entre 6-48 horas en ambas células, sin embargo esto puede atribuirse a otras funciones celulares. Por otro lado, cuando ambas células fueron expuestas a 200 μ M Cd²⁺ las concentraciones de FQ₂, FQ₃ y FQ₄ aumentan, a pesar de esto el patrón es distinto en ambas células ya que las células *EgZn₂₀* después de 12 horas tienen su máxima capacidad de síntesis de los 3 polímeros, y que además ya no

sufren grandes cambios a través del tiempo. Mientras tanto en las células *EgZn₄₀₀* desde las 3 horas aumentan los niveles de FQ₂ hasta 12 veces con respecto a *EgZn₂₀* e incluso generando un efecto cruzado ya que cuando las concentraciones de FQ₂ disminuyen las de FQ₃ aumentan, dando la impresión de una mejor eficiencia para sintetizar estas FQs canónicas.

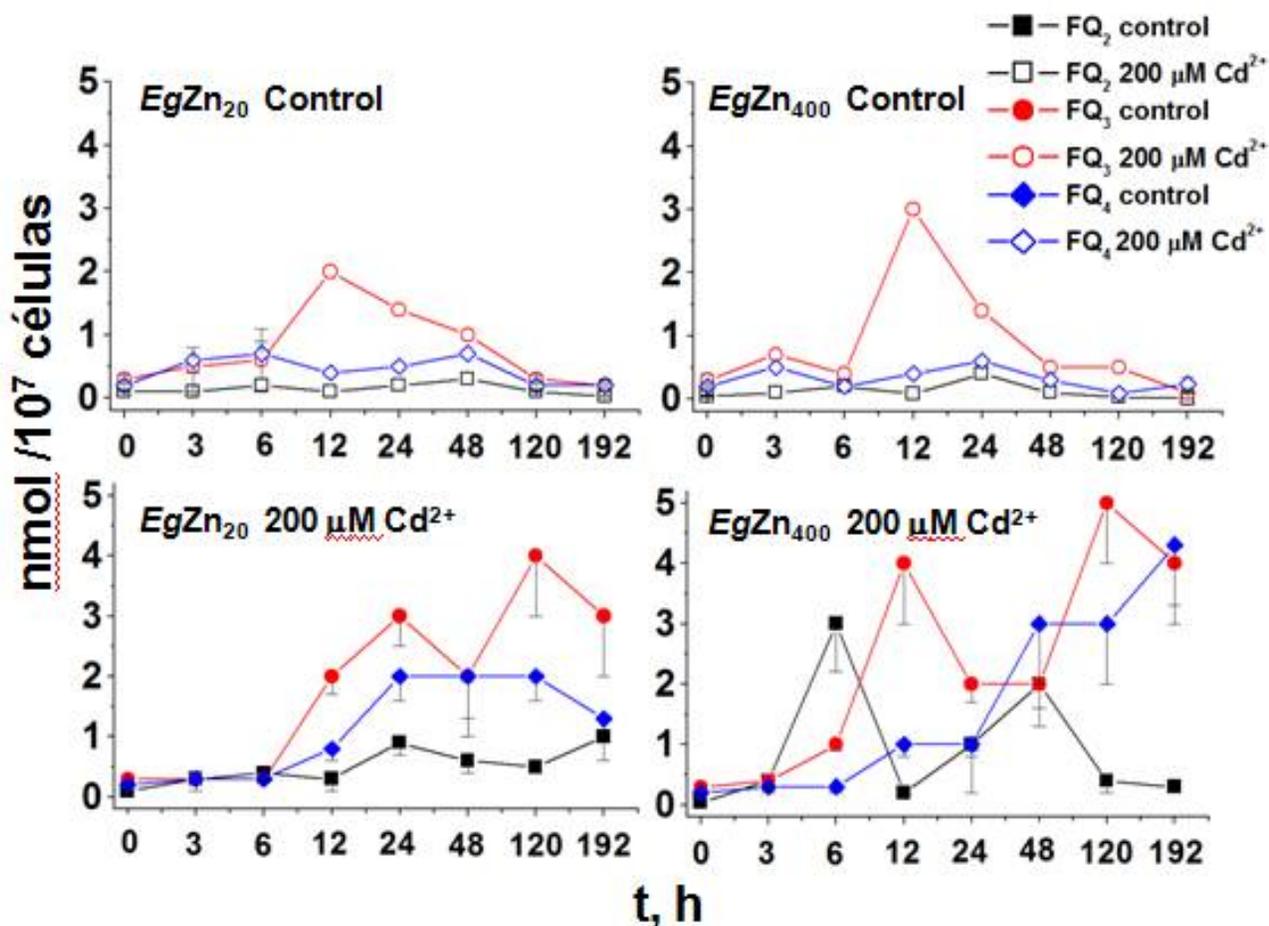


Figura 15. Curso temporal de síntesis de FQ₂, FQ₃ y FQ₄ durante 8 días. (A) *EgZn₂₀* y (B) *EgZn₄₀₀* sin Cd²⁺; (C) *EgZn₂₀* y (D) *EgZn₄₀₀* expuestas a 200 μM Cd²⁺.

No obstante, era necesario determinar si ésta síntesis era suficiente para inactivar a todo el Cd²⁺ que había sido acumulado por ambas células. En el Cuadro 11,

se muestra las concentraciones de FQs que fueron sintetizadas por *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* después de 8 días de ser expuestas a 200 $\mu\text{M Cd}^{2+}$. En la primera columna se observa el aumento al doble en la síntesis de FQs_{Totales} en las células *EgZn₄₀₀* con respecto a *EgZn₂₀*, en cuanto a la síntesis de FQ₂ es clara una disminución de 3 veces, mientras que la FQ₃ no presenta cambios, sin embargo para la FQ₄ aumenta 2 veces su concentración, por lo que el aumento al doble en la sumatoria de FQs canónicas (FQ₂, FQ₃ y FQ₄) es consistente con el aumento en FQs_{Totales}. Sin embargo es importante señalar que como se mencionó anteriormente (Sección 7.1.5) la síntesis de FQs canónicas sigue representando solo el 10-15% de las FQs_{Totales} sintetizadas, por lo que sería importante determinar la composición, síntesis y contribución de otros polímeros de GSH no canónicos en *E. gracilis*.

Por otro lado, las dos últimas columnas del Cuadro 11 muestran un cálculo de la concentración de FQs_{Totales} y la concentración de tioles_{Totales} (Cys, γ -EC, GSH y FQs_{Totales}) entre la concentración de Cd acumulado por cada una de las células, donde se esperaba obtener un valor de 4, debido a que el ion Cd^{2+} es capaz de formar 4 enlaces coordinados por lo que tendría que estar unido a 4 grupos tiol para estar completamente inactivado. A pesar de esto, los cálculos muestran que ni considerando la concentración de tioles_{Totales} es posible alcanzar este valor, por lo que se concluye que aunque la síntesis de FQs aumenta mediante un pre-acondicionamiento a Zn^{2+} , esta no es suficiente para inactivar a todo el Cd^{2+} que es acumulado por *E. gracilis* cuando es expuesta a 200 $\mu\text{M Cd}^{2+}$, por lo que sería importante determinar la contribución de otros mecanismos como la síntesis de sulfuro (S^{2-}), de moléculas carboxílicas (malato, citrato,

oxalato, succinato) y los polifosfatos que también pueden ser utilizados como metabolitos quelantes en la célula.

Cuadro 11. Síntesis de PCs en *EgZn₂₀* y *EgZn₄₀₀* expuestas a 200 μM Cd^{2+} durante 8 días, y su participación en la inactivación del Cd^{2+} . Los valores están reportados en unidades de $\text{nmol}/10^7$ células.

Células	FQs Totales	FQ ₂	FQ ₃	FQ ₄	FQ ₂₋₄	FQs _{Totales} / Cd^{2+}	tioles _{Totales} / Cd^{2+}
EgZn₂₀ (8)	38±6	1±0.4	3±1	2±0.3	5±1	0.13	0.85
EgZn₄₀₀ (4)	79±20	0.3±0.1	4±1	4±1	9±1	0.15	0.6

7. DISCUSIÓN

Distintos grupos de trabajo se han enfocado en la generación de organismos hiperacumuladores de Cd^{2+} y otros metales pesados con el objeto de implementar a la biorremediación como un método más eficiente, limpio y barato para remover o recuperar los metales pesados del medio circundante. La estrategia que se ha utilizado en plantas para generar fenotipos hiperacumuladores es la modificación genética de enzimas clave de vías metabólicas relacionadas con los mecanismos de acumulación de metales (Macek *et al.*, 2007; Jiangbo *et al.*, 2008; Fulekar *et al.*, 2009). Por ejemplo, en las plantas *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2003a; Lee *et al.*, 2003b; Li *et al.*, 2004; Jiangbo *et al.*, 2008), *Brassica juncea* (Liang *et al.*, 1999a; Liang *et al.*, 1999b; Ksenija y Schuyler, 2007) y *Nicotiana tabacum* (Pomponi *et al.*, 2006; Wojas *et al.*, 2008) se han sobre-

expresado las enzimas γ -ECS, GS y FQS con el objetivo de aumentar la acumulación de Cd^{2+} y As, lo cual ha dado como resultado fenotipos contrastantes. En este sentido, algunos autores sugieren (Jiangbo *et al.*, 2008; Wojas *et al.*, 2008) que el éxito de estos procedimientos depende de que se preserve la homeostasis entre el GSH y las FQs para mantener el balance en el estado antioxidante de la planta.

Sería atractivo utilizar la estrategia de ingeniería genética en otros organismos con mecanismos de quelación de metales similares a los de las plantas, con mayores velocidades de crecimiento, de producción de biomasa y diferentes capacidades de utilización de fuentes de carbono; sin embargo, no en todos los casos es posible.

Tal es el caso de *E. gracilis*, el cual es un modelo con potencial para ser aplicado en la biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados pero que no ha podido ser modificada genéticamente porque hasta el momento no existen vectores de sobre-expresión para este organismo, lo que en parte también es debido a que su genoma no ha sido secuenciado. Por esta razón se ha optado por utilizar estrategias de presión de selección metabólica para incrementar su capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

Durante el Servicio Social se trabajó con las células de *E. gracilis* cultivadas en deficiencia de SO_4^{2-} (Sección 2.5.1), las cuales se consideraron atractivas para evaluar un posible aumento en la acumulación de Cd^{2+} principalmente por su alta capacidad para sintetizar Cys. Esta característica metabólica estaba soportada por aumento de 4.5 veces en la actividad de los transportadores de sulfato y de la γ -ECS con respecto a las células control. El aumento de la actividad de la γ -ECS llamó poderosamente nuestra atención puesto que Liang-Zhu *et al.*, en 1999b reportó que la sobre-expresión del gen

de la γ -ECS de *Escherichia coli* en la planta de la mostaza (*B. juncea*) generó un incremento en la acumulación de Cd^{2+} de 40-90%, lo cual correlacionó con un aumento en la síntesis de γ -EC, GSH, FQ₂, FQ₃ y FQ₄ en 1.6, 2.5, 1.3, 1 y 2 veces, respectivamente, con respecto a las plantas no transformadas.

Sin embargo, las células de *E. gracilis* deficientes de sulfato no acumularon más Cd^{2+} . Para tratar de entender este fenómeno se consideró que el fenotipo de alta actividad de los transportadores de sulfato y la γ -ECS pudo haber revertido, ya que la exposición a Cd^{2+} se hizo en presencia de 2 mM SO_4^{2-} (condición de cultivo para que la célula tuviera suficiente sustrato para resistir la exposición a Cd^{2+}). Otra razón pudo haber sido una depleción de las pozas de ATP debido al alto transporte de sulfato y actividad de γ -ECS, lo cual además pudo haber limitado de energía otros procesos celulares. El aumento de la γ -ECS también pudo haber tenido implicaciones negativas sobre el balance antioxidante, fenómeno que ya ha sido descrito en el cloroplasto de la planta de tabaco (*N. tabacum*) donde la sobre-expresión del gen de la γ -ECS incrementa 3 veces los niveles de GSH (Creissen *et al.*, 1999) generando un desbalance entre glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). A pesar de esto, otros estudios con árboles del género *Populus* revelan que la sobre-expresión de la γ -ECS, y no la GS, puede incrementar los niveles de GSH sin afectar el estado redox de este metabolito (Noctor *et al.*, 1998; Herschbach *et al.*, 1998).

Debido a los resultados obtenidos en el Servicio Social, en la presente tesis se planeó una estrategia para aumentar la actividad de la FQS (enzima consumidora de GSH).

Tomando en cuenta que la síntesis de FQs es necesaria para generar una resistencia a Cd^{2+} (Howden *et al.*, 1995), es natural pensar que la sobre-expresión de su síntesis podría además incrementar la acumulación de Cd^{2+} . Por ejemplo la planta de tabaco *N. tabacum* (Pomponi *et al.*, 2006; Wojas *et al.*, 2008), la bacteria simbiote de plantas *Mesorhizobium sp* (Sriprang *et al.*, 2003) y la planta de mostaza *B. juncea* (Knesija y Shuyler, 2007) indican que la sobre-expresión genética de la FQS de *A. thaliana* (*AtFQS1*) incrementa la tolerancia y/o la acumulación de Cd^{2+} .

Al no poder manipular genéticamente a *E. gracilis*, se buscó favorecer la actividad enzimática de la FQS mediante un aumento del Zn^{2+} intracelular, principalmente debido a: 1) que la FQS recombinante de *E. gracilis* (*EgFQS*) muestra su máxima actividad en presencia de éste metal (García-García *et al.*, 2014); y 2) porque la susceptibilidad de *E. gracilis* a Cd^{2+} depende de la concentración de Zn^{2+} en el medio de cultivo (García-García *et al.*, 2012). Aunado a esto, existen antecedentes en otros organismos como el alga marina *Dunaliella tertiolecta*, que indican que su pre-tratamiento con $200 \mu\text{M}$ Zn^{2+} durante al menos 12 horas induce un aumento de hasta 140 veces en la síntesis de FQs (FQ_2 , FQ_3 y FQ_4) con respecto a las células control (Hirata *et al.*, 2001). En un estudio posterior se determinó que el pre-tratamiento con Zn^{2+} en *D. tertiolecta* le confirió una mayor resistencia a Hg^{2+} , As^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e incluso a peróxido de hidrógeno respecto a células que no recibieron tratamiento con Zn^{2+} (Tsuji *et al.*, 2002).

Los resultados del presente trabajo muestran que el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} incrementa la concentración intracelular de éste metal hasta un límite cercano a los $300 \text{ nmol}/10^7 \text{ cél}$ (Cuadro 5), lo cual sugiere un mecanismo de homeostasis que protege

a la célula de acumular más Zn^{2+} del que puede soportar. Existen transportadores muy comunes en plantas que se asocian con la regulación de la acumulación de metales tanto esenciales como no-esenciales, tal es el caso del transportador tipo ATP-asa HMA4 (Heavy Metal ATPase por sus siglas en inglés) que puede transportar Zn, Cu o Fe, y que incrementan su expresión o la reprime en organismos con alta tolerancia y acumulación de metales pesados para que la célula no sufra daños. Por ejemplo se ha visto que la planta indicadora de zonas contaminadas, *Populus spp.* es capaz de mantener la concentración intracelular de Zn^{2+} hasta cierto nivel por un mecanismo de homeostasis regulado por la expresión de genes de transporte *HMA4* (Adams *et al.*, 2011). En *E. gracilis* no se han descrito este tipo de transportadores pero no se descarta su existencia para regular los niveles de metales en la célula.

Sin embargo, el aumento de Zn^{2+} también modificó la concentración intracelular de otros iones. La disminución de Mg (Cuadro 6) es importante ya que se ha reportado que la deficiencia de este catión en *E. gracilis* puede disminuir la tasa de crecimiento, clorofila, paramilo, mitocondrias e incluso modificar la morfología y la composición de los carbohidratos de su biopelícula periplásmica; no obstante, la principal importancia del Mg radica en que es necesario para la catálisis de todas las enzimas que requieren de ATP (Scholten-Beck, 1996).

Con respecto a la baja acumulación de Cd^{2+} cuando el experimento se llevó a cabo en presencia de altas concentraciones de Zn^{2+} ($> 300 \mu M Zn^{2+}$, Cuadros 9 y 10), una posible explicación es que el Cd^{2+} y el Zn^{2+} al ser dos iones muy similares podrían competir por la entrada a la célula. Si bien esto no se ha demostrado a nivel de

membrana plasmática, si se sabe que los transportadores de cloroplasto (así como en plantas y levaduras) toman a ambos cationes divalentes (Williams *et al.*, 2000; Brzoská *et al.*, 2007, Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

Sin embargo, fue posible demostrar que el pre-acondicionamiento de *E. gracilis* con 400 μM Zn^{2+} aumenta 80% la capacidad de acumulación de Cd^{2+} cuando las células son expuestas a 200 μM Cd^{2+} . Estos niveles de acumulación son mayores a los observados en plantas como *Potentilla griffithii* (Rong-Liang *et al.*, 2011) y *Gyanura pseudochina* (Panitlertumpai *et al.*, 2013) en donde se le atribuye al Zn^{2+} un aumento de la acumulación de Cd^{2+} del 50% respecto a las plantas control.

Por otro lado, la cuantificación de Cys, γ -EC, GSH y FQs (Cuadro 8) en *E. gracilis* pre-acondicionada con Zn^{2+} muestra que el Zn^{2+} por sí mismo no induce la síntesis de FQs en la célula como sucede *in vitro* con la FQS recombinante. Anteriormente ya se había reportado que una exposición aguda de *E. gracilis* a 50 y 300 μM Zn^{2+} no induce la síntesis de FQs, lo cual correlaciona con que sólo el 15% de este metal esencial se compartimenta en los cloroplastos; contrario al caso del Cd^{2+} , el cual es un buen inductor de la síntesis de FQs y se compartimenta en los cloroplastos hasta en un 65% (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2005; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2004).

En el alga marina *Dunalliella tertiolecta* el Zn^{2+} aumenta en un 80% la biosíntesis de FQs (Hirata *et al.*, 2001) y los autores proponen que es debido a que la FQS de *D. tertiolecta* es más activa en presencia de bis-glutationato de Zn^{2+} que con bis-glutationato de Cd^{2+} ; sin embargo, ese grupo de trabajo aún no ha caracterizado la FQS recombinante de *D. tertiolecta*.

No obstante, *E. gracilis* pre-acondicionada a Zn^{2+} y expuesta a Cd^{2+} sintetizó más FQs que las células control. Una explicación a estos resultados puede atribuirse a que el estrés oxidativo generado por el Cd^{2+} es otro componente necesario para la síntesis de FQs. Para comprobar esta hipótesis, sería importante cuantificar las especies reactivas de oxígeno en las células *EgZn₄₀₀* expuestas a 200 μM Cd^{2+} así como la actividad de la FQS.

Por otro lado, en *E. gracilis* el Zn^{2+} y el Cd^{2+} también podrían estar regulando la expresión de metalotioneínas; lo cual, si bien no ha sido demostrado tampoco se puede descartar debido a los antecedentes que existen en la literatura para otros modelos biológicos. Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (>10KDa), con un alto contenido de Cys en su estructura y que son inducidas por los metales pesados con el fin de quelar a los metales y proteger a la célula (Kang, 1999). Por ejemplo, en un modelo de rata se observó que la hepatotoxicidad inducida por el Cd^{2+} puede ser prevenida mediante la administración de 30-60 mg/L de Zn^{2+} durante varios meses debido al aumento en la concentración de MTs de la clase I (Rogalska *et al.*, 2011). Sin embargo, además de la inducción de MT-I, el pre-acondicionamiento a Zn^{2+} generó una protección debido a que disminuyó la acumulación de Cd^{2+} en hígado. Caso contrario ocurre cuando el Zn^{2+} y Cd^{2+} se administran de forma simultánea a la rata, ya que bajo éste tratamiento se ha reportado un incremento de la acumulación de Cd^{2+} tanto en hígado como en riñón (Heni *et al.*, 2008). Por otro lado, la inducción de MTs debida al Zn^{2+} también disminuye el estrés oxidativo generado por radicales libres de oxígeno en

corazón de ratas, lo cual se ha demostrado en modelos de diabetes tipo 1 (Wang *et al.*, 2006).

No se descarta la posibilidad de que el Zn^{2+} pudiera estar desencadenando otro tipo de respuestas metabólicas en *E. gracilis* expuesta a Cd^{2+} que soporten el aumento en la capacidad de acumulación a Cd^{2+} ; lo cual se puede vislumbrar debido a el Zn^{2+} es el segundo micronutriente mas importante para la célula (detrás del Fe) (Sigel *et al.*, 2006). Una de las principales funciones del Zn^{2+} es estabilizar estructuras terciarias como es el caso de los dedos de Zn^{2+} , las cuales son proteínas que pueden unirse a regiones promotoras del DNA de células eucariontes controlando así la expresión de ciertos genes, por lo tanto, este metal esencial tiene una gran influencia en la transcripción y en la síntesis de proteínas (Rodríguez-Castillo *et al.*, 2005).

En la Figura 17 se presenta un esquema que se construyó para visualizar los efectos que el Zn^{2+} pudo haber desencadenado en *E. gracilis* para contribuir al aumento en la capacidad de acumulación de Cd^{2+} .

En principio habría que mencionar los efectos benéficos del Zn^{2+} en el sistema antioxidante de la célula. En el caso de la planta de trigo *Triticum aestivum*, su aclimatización con 15 μM Zn^{2+} durante 6 días incrementa la actividad de distintas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) en 1.4 y 1.5 veces más respecto a las plantas que no fueron pre-tratadas con Zn^{2+} , repercutiendo en una mayor resistencia ante una exposición a Cd^{2+} (Dan-Dan y Mei-Zhou, 2012). Esto además se atribuyó a un aumento en la tasa de expulsión y una disminución en la tasa

de transporte de Cd^{2+} , lo que eventualmente resultó en una disminución del 30% en la acumulación de Cd^{2+} en esta planta.

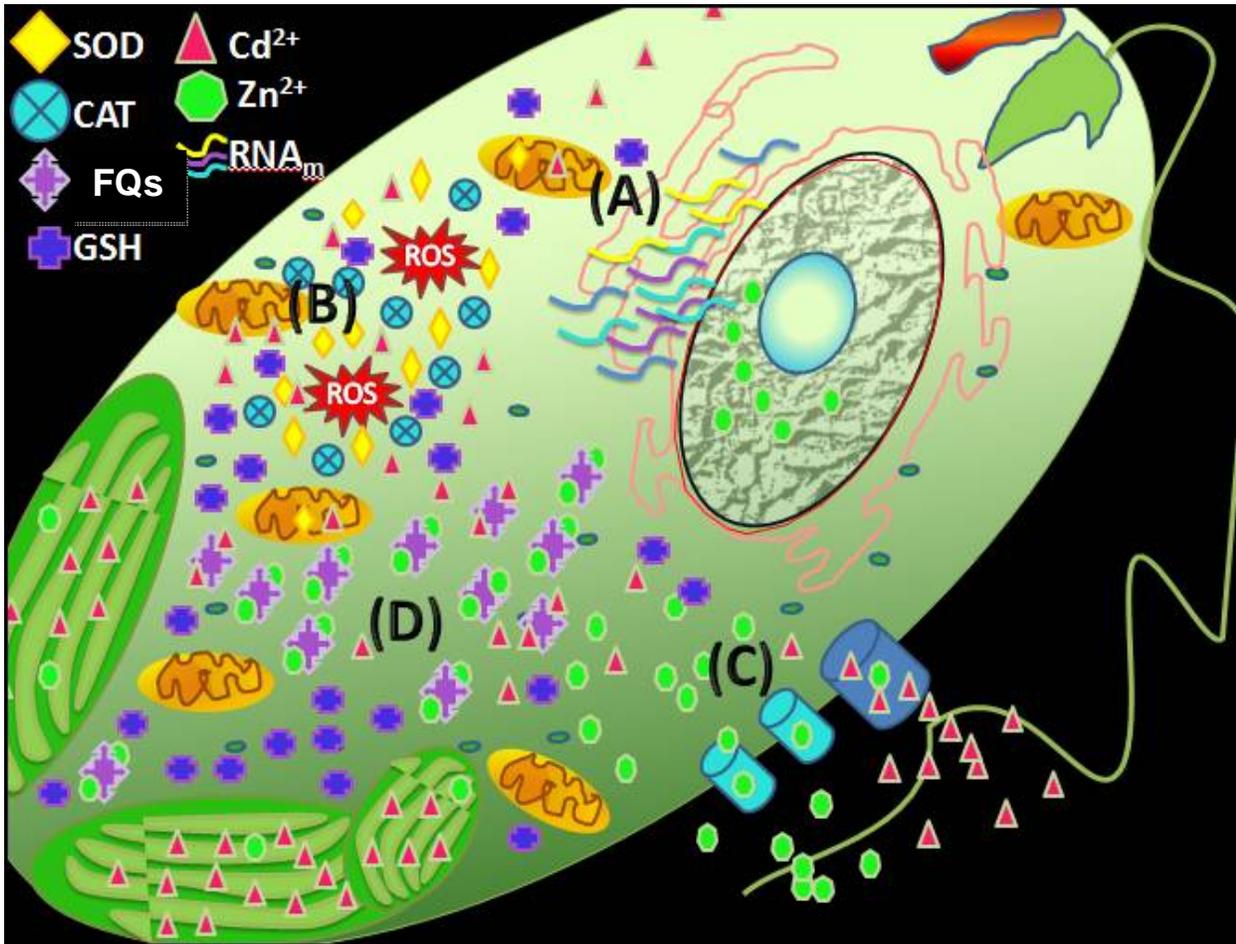


Figura 17. Mecanismos por los cuales el Zn^{2+} protege o aumenta la acumulación de Cd^{2+} : (A) Aumento en la expresión genética de proteínas involucradas contra el estrés oxidativo, el transporte, quelación y compartamentalización de metales pesados; (B) Síntesis de enzimas y péptidos antioxidantes; (C) Aumento de transportadores iónicos; y (D) Estimulación de la síntesis de metabolitos quelantes (FQs).

En este sentido, la síntesis de GSH es una de las principales defensas ante el estrés oxidativo en la célula, y su biosíntesis también está influenciada por el Zn^{2+} . Al GSH se le atribuyen distintas funciones fisiológicas como reservorio de sulfuro, regulador de la expresión genética, sustrato de la enzima glutatión S-transferasa (que une al GSH

con xenobióticos) y, como ya se había mencionado anteriormente, como precursor de la síntesis de FQs (Noctor *et al.*, 1998). Los niveles de GSH en el hígado de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* incrementan en un 45-60% al ser expuesta durante 14 días a 2 o 15 mM de Zn^{2+} respectivamente, a pesar de que no hay un aumento significativo en la acumulación de este metal. Sin embargo, una exposición mixta con 15 o 100 μM Cd^{2+} aumenta la acumulación de Cd^{2+} en un 50% en comparación de cuando el Cd^{2+} es añadido individualmente (Lange *et al.*, 2002). Otro ejemplo es el alga *Chara australis* (Clabeaux *et al.*, 2013), su pre-exposición a 20 μM Zn^{2+} durante 160 días incrementa los niveles de GSH 2.7 veces más con respecto a las algas no expuestas, mientras que de igual forma su exposición a Zn^{2+} y Cd^{2+} simultáneamente incrementa la acumulación de Cd^{2+} con respecto a exposiciones individuales.

Como ya se había mencionado anteriormente, el Zn^{2+} también puede regular la expresión de transportadores celulares que regulan la homeostasis de metales en la célula. En éste sentido, un estudio realizado en Bangladesh reveló que el alto contenido de Cd^{2+} en el arroz y la deficiencia de Zn^{2+} y Fe^{2+} favorecen la acumulación de Cd^{2+} en mujeres embarazadas (Kippler *et al.*, 2007), lo cual se atribuye al papel del Zn^{2+} en la regulación genética de los transportadores celulares de Fe^{2+} (*DMT1* y *FNP1*). Yamaji *et al.* (en 2001), determinó que el Zn^{2+} es capaz de incrementar los niveles de RNA-m y de proteína de los transportadores *DMT1* en células Caco-2; a lo cual habría que añadir que se ha reportado que los transportadores *DMT1* también pueden transportar Cd^{2+} (Fujishiro *et al.*, 2012). Estos antecedentes de la literatura sugieren fuertemente el estudio de transportadores de cationes esenciales tipo *DMT1* en *E.*

gracilis para complementar el estudio del fenómeno del aumento de la acumulación de Cd^{2+} debida a una exposición crónica con Zn^{2+} .

Finalmente, en este estudio se demuestra que el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} desencadenó una mayor capacidad de acumulación de Cd^{2+} (80%) respecto a lo que se había logrado en trabajos anteriores usando pre-acondicionamientos con $1.5\mu\text{M}$ Hg (Devars y Moreno-Sánchez, 1998 y Avilés *et al.*, 2003). En éstos antecedentes en donde se usó el pre-acondicionamiento con Hg^{2+} el aumento en la acumulación de Cd^{2+} fue menor al 50% cuando las células se expusieron a 100 y 500 μM Cd^{2+} por 5-6 días (Cuadro. 12). Además, los niveles de Cd^{2+} alcanzados después del preacondicionamiento con Zn^{2+} (13.4 mg $\text{Cd}^{2+}/\text{g}_{\text{peso seco}}$) rebasa los 10.6 mg $\text{Cd}^{2+}/\text{g}_{\text{peso seco}}$ que acumula *Thlaspi caurulescens* en raíces expuestas a 300 μM Cd^{2+} (Nedelkoska y Doran, 2000). Por lo tanto, los resultados de la presente tesis sugieren que el pre-acondicionamiento con Zn^{2+} en *E. gracilis* puede ser una estrategia más eficiente y amigable con el medio para generar cepas con mayor capacidad para acumular Cd^{2+} mediante presión de selección nutricional.

Cuadro 12. Comparación de la capacidad de acumulación de Cd^{2+} en pre-acondicionamientos de *E. gracilis*.

<i>E. gracilis</i>	Pre-acondicionamiento	Aumento en acumulación (%)	Acumulación (mg $\text{Cd}^{2+}/\text{g}_{\text{dw}}$)
Fotosintética	Hg^{2+}	35	3.5
Heterotrófica		40	9.2
Fotosintética	Zn^{2+}	78	13.4

* Devars *et al.*, 1998; Avilés *et al.*, 2003.

8. CONCLUSIONES

- El pre-acondicionamiento de *E. gracilis* con Zn^{2+} incrementa su concentración intracelular pero modifica principalmente la de Mg^{2+} .
- El aumento intracelular de Zn^{2+} en *E. gracilis* ($> 250 \text{ nmol}/10^7 \text{ células}$) no afecta la respiración pero si la fotosíntesis.
- El pre-acondicionamiento de *E. gracilis* con Zn^{2+} generó un aumento en su capacidad de acumulación de Cd^{2+} , lo cual está correlacionado con un aumento en la síntesis de FQ_{Totales} .
- Las FQs canónicas únicamente representan el 15% de las FQ_{Totales} que se sintetizan ante una exposición a Cd^{2+} , y dentro del 85% restante se encuentran la hidroximetil- FQ_2 , la homo- FQ_2 e iso- FQ_2 .
- La cantidad biosintetizada de FQs en *E. gracilis* expuesta a Cd^{2+} no es suficiente para inactivar completamente al Cd^{2+} acumulado; por lo tanto, la contribución de otras moléculas intracelulares quelantes de metales pesados (ácidos dicarboxílicos y poli-fosfatos) debe ser caracterizada.

9. PERSPECTIVAS

- Medir la actividad de la γ -ECS y FQS en extractos de *EgZn₄₀₀*, para determinar si el pre-acondicionamiento a Zn^{2+} tuvo un efecto en las enzimas más importantes para el flujo de la vía de síntesis de FQs.
- Evaluar semi-cuantitativamente la compartimentación de Cd^{2+} en cloroplastos y mitocondrias de *EgZn₄₀₀* por microscopía de tipo HAADF-STEM y STEM-EDX.
- Realizar un análisis transcripcional del pre-acondicionamiento a Zn^{2+} mediante EST's de *E. gracilis* alineados con genes relacionados con la vía de asimilación de azufre, síntesis de GSH y el metabolismo de las FQs en células *EgZn₄₀₀* y *EgZn₂₀* con o sin Cd^{2+} .
- Determinar el mecanismo de síntesis y el metabolismo de los polímeros de GSH no canónicos en *E. gracilis*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams J. P.; Adeli A.; Hsu C.; Harkess R.; Page G.; de Pamphilis C. W.; Schultz E. y Yuceer C. (2011). Poplar maintains zinc homeostasis with heavy metal genes *HMA4* and *PCS1*. *Journal of Experimental Botany*; 62: 3737- 3752.
2. Ahmaruzzaman M. (2011). Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. *Advances in Colloid and Interface Science*; 166: 36-59.
3. Ahmed H. y Donat-Häder P. (2010). Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environmental and Experimental Botany*; 69: 68-75.
4. Arao T.; Ishikawa S. y Murakam I. M. (2010). Heavy metal contamination of agricultural soil and counter measures in Japan. *Paddy and Water Environment*, 8(3): 247-257
5. Atici T.; Ahiska S.; Altindag A. y Aydin D. (2008). Ecological effects of some heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cr) pollution of phytoplanktonic algae and zooplanktonic organisms in Sariyar Dam Reservoir in Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 7: 1972-1977.
6. Atkins P. y Jones L. (1999). Chemistry: Molecules, Matter and Change. W. H. Freeman and Company. New York, EU. ISBN 84-282-1131-0.

7. Avilés C.; Loza-Tavera H.; Terry N. y Moreno-Sánchez R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*. 180:1- 10.
8. Barbee Jr. J.Y. y Prince T.S. (1999). Acute respiratory distress syndrome in a welder exposed to metal fumes. *Southern Medical Journal*; 92: 510–2
9. Bhatnagar S. y Kumari R. (2013). Bioremediation: A Sustainable Tool for Environmental Management- A Review. *Annual Review & Research in Biology*; 3(4): 974-993.
10. Butter T. J.; Evison L. M.; Hancock I. C.; Holland F. S.; Matis K. A.; Philipson A.; Sheikh A. I. y Zouboulis A. I. (1998). The removal and recovery of cadmium from dilute aqueous solutions by biosorption and electrolysis at laboratory scale. *Water Research*; 32: 400-406.
11. Buetow D. E. (1989). The biology of *Euglena*. Buetow DE ed, vol IV Academic Press, Inc. 528pp. ISBN 012-139904-4.
12. Cervantes C.; Campos-García J.; Devars S.; Gutiérrez-Corona F.; Loza-Tavera H.; Torres-Guzman J.C. y Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 335-347.
13. Chao Su; LiQin Jiang y WeJun Zhang (2014). A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques. *Environmental Skeptics and Critics*. 3(2): 24-38
14. Clabeaux B.; Navarro A. D.; Aga D. S. y Bisson M. A. (2013). Combined effects of cadmium and zinc on growth, tolerance, and metal accumulation in *Chara australis*

and enhanced phytoextraction using EDTA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 98: 236-243.

15. Cobb Allan (2008). Special characteristics of Cadmium on: Cadmium. Marshall Cavendish, New York. 32pp ISBN 978-0-7614-2686-8.
16. Conforti V.; Alberghinia J. y González E. (1995). Structural changes and dynamics of the phytoplankton along a highly polluted lowland river of Argentina. *Journal of Aquatic Ecosystem and Health*; 4: 59-75.
17. Cotton F. A. y Wilkinson G. (1999). Química de los elementos representativos; Zinc, Cadmio y Mercurio. En: Química Inorgánica Avanzada (versión española). Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores. México, DF. 715-740pp ISBN 968-18-1795-8.
18. Creissen G.; Firmin J.; Fryer M.; Kular B.; Leyland N.; Reynolds H.; Pastori G.; Wellburn F.; Baker N.; Wellburn A. y Mullineaux P. (1999). Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in the Chloroplasts of Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes Increased Oxidative Stress. *The Plant Cell*; 11: 1277-1291.
19. Dan-Dan L. y Mei-Zhou D. (2012). Acclimation of wheat to low-level cadmium or zinc generates its resistance to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 79: 264-271.
20. Danilov R. A. y Ekelund N. G. (2000). Responses of photosynthetic efficiency, cell shape and motility in *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) to short-term exposure to heavy metals and pentachlorophenol. *Water, Air and Soil Pollution*. 132: 61-73.

21. De Filippis L.F.; Hampp R. y Ziegler H. (1981). The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. *Archives of Microbiology*. 128: 407-411.
22. Devars S.; Hernández R. y Moreno-Sánchez R. (1998). Enhanced Heavy Metal Tolerance in Two Strains of Photosynthetic *Euglena gracilis* by Preexposure to Mercury or Cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34: 128-135.
23. Devars S.; Avilés C.; Cervantes C. y Moreno-Sánchez R. (2000). Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*. 174: 175-180.
24. Devars S.; Rodríguez-Zavala J.S. y Moreno-Sánchez R. (2011). Enhanced Tolerance to Mercury in a Streptomycin-Resistant Strain of *Euglena gracilis*. *Water, Air & Soil Pollution*. 216: 51-57.
25. Dianati-Tilaki R. A. y Shariat M. (2004). Study on removal of Cadmium from water by adsorption on GAC, BAC and Biofilter. *Research Basins and Hydrological Planning*; 125-129.
26. Fenglian Fu y Wang Qi (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Environmental Management*, 92: 407- 418.
27. Fujishiro H.; Yano Y.; Takada Y.; Tanihara M. y Himeno S. (2012). Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*; 4: 700-708.

28. Fulekar M. H.; Singh A. y Anwasha M. B. (2009). Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *African Journal of Biotechnology*; 8: 529-535.
29. García-García J.D.; Rodríguez-Zavala J.S.; Jasso-Chávez R.; Mendoza-Cózatl D. y Moreno-Sánchez R. (2009). Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Archives of Microbiology*; 191: 431-440.
30. García-García J.D.; Olin-Sandoval V.; Saavedra E.; Girard L.; Hernández G. y Moreno-Sánchez R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1820: 1567-1575.
31. García-García J.D.; Girard L.; Hernández G.; Saavedra E.; Pardo J.P.; Rodríguez-Zavala J.S.; Encalada R.; Reyes-Prieto A.; Mendoza Cózatl D.G. y Moreno-Sánchez R. (2014). Zn-bis-glutathionate is the best co-substrate of the monomeric phytochelatin synthase from the photosynthetic heavy metal hyperaccumulator *Euglena gracilis*. *Metallomics: integrated biometal science*.6.604-16, DOI:10.139/c3mt00313b.
32. García-García J.D. (2014). Contribución de la vía de asimilación de azufre y de la síntesis de fitoquelatinas a la resistencia de Cd²⁺ en *Euglena gracilis*. (Tesis Doctoral) Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
33. Gajdosava J. y Reichrtova E. (1996). Different growth response of *Euglena gracilis* to Hg, Cd, Cr and Ni compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 354: 641-2.

34. Gingrich D. J.; Petering D. H. y Shaw III F. (1984). Zinc and Cadmium Metabolism in *Euglena gracilis*: Metal Distribution in Normal and Zinc-Deficient Cells. *Marine Environmental Research*; 14: 89-102.
35. Godínez-Campos O.; López-Ortega M. y Cuervo-González R. (2013). Bioacumulación de Cadmio en *Neritina reclinata* de acuerdo a la NOM-029-SSA1-1996, en el Sistema Lagunar Tampamachoco, Veracruz, México. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*; 1: 39-51.
36. Gumerman R. C.; Culp R. L.; Hansen S. P. (1979). Estimating Water Treatment Costs. Vol. 2 Cost Curves Applicable to 1 to 200mgd Treatment Plants. US Environmental Protection Agency.
37. Jiangbo G.; Xiaojing D.; Wenzhong X. y Ma M. (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*; 72: 1020-1026.
38. Harada E.; Yamaguchi Y.; Koizumi N. y Sano H. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*. 159:445- 448
39. Hargreaves J.W.; Lloyd E.J.H. y Wittcn B.A. (1975). Chemistry and vegetation in highly in acid streams. *Freshwater Biology*; 5: 563-576.
40. Herschbach C.; Jouanin L. y Rennenberg H. (1998). Overexpression of g-Glutamylcysteine Synthetase, but not of Glutathione Synthetase, Elevates Glutathione Allocation in the Phloem of Transgenic Poplar Trees. *Plant Cell Physiology*; 39: 447-451.

41. Heni E.J.; Messaoudi I.; Hamouda F. y Abdelhamid K. (2008). Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd .*Food and Chemical Toxicology*; 46: 3522-3527.
42. Hirata K.; Tsujimoto Y.; Namba T.; Ohta T.; Hirayanagi N.; Miyasaka H.; Zenk M. y Miyamoto K. (2001). Strong Induction of Phytochelatin Synthesis by Zinc in Marine Green Alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 92: 24-29.
43. Howden R.; Goldsbrough P.B.; Andersen C.R. y Cobbett C.S. (1995). Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology*; 136: 3276-3283.
44. IARC (1993) Summaries & evaluations: Cadmium and cadmium compounds (Group 1) Lyon, International Agency for Research on Cancer, p. 119 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 58; (<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol58/mono58-2.html>))
45. Järup L.; Roggenfelt A.; Elinder C.G.; Nogawa K. y Kjellström T. (1983). Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*; 9: 327–31
46. Järup L.; Berglund M.; Elinder CG.; Nordberg G. y Vahter M. (1998). Health effects of cadmium exposure a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work Environmental and Health*; 24 :1–51
47. Järup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167-182

48. Jasso-Chávez R.; Pacheco-Rosales A.; Lira-Silva E.; Gallardo-Pérez J.C.; García N. y Moreno-Sánchez R. (2010). Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquatic Toxicology*; 100: 329-338.
49. Javed M. (2006). Studies on Metal Contamination Levels in Plankton and their role as Biological Indicator of Water Pollution in the River Ravi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9: 313-317.
50. Jiangbo G.; Xiaojing D.; Wenzhong X. y Mi M. (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*; 72: 1020-1026.
51. Kang Y.J. (1999). The antioxidante function of metallothionein in heart. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 222: 263-273.
52. Kippler M.; Ekström E.C.; Lönnnerdal B.; Goessler W.; A°kesson A.; El Arifeen S.; Persson L. y Vahter M. (2007). Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 222: 221-226.
53. Kongsricharoern N. y Polsprasert C. (1995). Electrochemical precipitation of chromium from a electroplating wastewater. *Water Science Technologies*; 31: 109-117.
54. Ksenija G. y Schuyler S.K. (2007). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*; 225: 1277-1285.

55. Lange A.; Ausseil O. y Segner H. (2002). Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology; Part C* 131: 231-243.
56. Lango-Reynoso F.; Landeros-Sánchez C. y Castañeda-Chávez M. R. (2010). Bioaccumulation of Cadmium, Lead and Arsenic in *Crassostrea virginica* from Tamiahua Lagoon System. Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*; 26: 201-210.
57. Lee S.; Petros D.; Moon J.S.; Tae-Seok K.; Goldsbrough P.B. y Korban S. (2003a). Higher levels of ectopic expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase do not lead to increased cadmium tolerance and accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*; 41: 903-910.
58. Lee S.; Moon J.S.; Tae-Seok K.; Petros D.; Goldsbrough P.B. and Korban S. (2003b). Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiology*; 131: 656-663.
59. Li Y.; Dhanker O.; Carreira L.; Lee D.; Chen A.; Shroeder J.; Balish R. y Meagher R. (2004). Overexpression of Phytochelatin Synthase in *Arabidopsis* Leads to Enhanced Arsenic Tolerance and Cadmium Hypersensitivity. *Plant and Cell Physiology*; 45: 1787-1797.
60. Liang-Zhu Y.; Pilon-Smits A.H.; Jouanin L. y Terry N. (1999a). Overexpression of Glutathione Synthase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *American Society of Plant Physiologists*; 119: 73-79.

61. Liang-Zhu Y.; Pilon-Smits E.; Tarun A.; Weber S.; Jouanin L. y Terry N. (1999b). Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing γ -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiology*; 121: 1169-1177.
62. Lira-Silva E.; Ramírez-Lima I.S.; Olín-Sandoval V.; García-García J.D.; García-Contreras R.; Moreno-Sánchez R. y Jasso-Chávez R. (2011). Removal, accumulation and resistance to chromium in heterotrophic *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*; 193: 216-224.
63. Macek T.; Kotrba P.; Svatos A.; Novakova M.; Demnerova K.; Mackova M. (2007). Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Cell Press: Trends in Biotechnology*. 26: 146-152.
64. Mancilla-Villa O.; Ortega-Escobar H.; Ramírez- Ayala C.; Uscanga-Mortera E.; Ramos-Bello R.; Reyes-Ortizoga A. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*; 28: 39-48
65. Mendez-García T.; Rodríguez-Domínguez L.; Palacios- Mayorga S. (2000). Impact of irrigation with polluted water by the presence of heavy metal on soils. *Terra Latinoamericana*; 18: 277-288.
66. Mendoza-Cózatl, D.G. (2000). Distribución intracelular del cadmio en *Euglena gracilis* cultivada en condiciones fotoheterotróficas. (Tesis de licenciatura) Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Escuela Nacional de Estudios Profesionales Campus Iztacala, UNAM.

67. Mendoza-Cózatl D.G.; Devars S.; Loza-Tavera H.; Moreno-Sánchez R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum*; 115: 276-283.
68. Mendoza-Cózatl D.G. y Moreno-Sánchez R. (2004). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1706: 88-97.
69. Mendoza-Cózatl D.G. (2005). Mecanismos de Resistencia a Cadmio mediado por tioles en *Euglena gracilis* (Tesis doctoral) Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
70. Mendoza-Cózatl D.G.; Loza-Tavera H.; Hernández-Navarro A.; Moreno-Sánchez R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*; 29: 653-671.
71. Mendoza-Cózatl D.G.; Rangel-González E. y Moreno-Sánchez R. (2006a). Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ Uptake and Accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; 51: 521-528.
72. Mendoza-Cózatl D.G.; Rodríguez-Zavala J.S.; Rodríguez-Enríquez S.; Mendoza-Hernandez G.; Briones-Gallardo R. y Moreno-Sánchez R. (2006b). Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complexes of *Euglena gracilis*. *The FEBS Journal*; 273:5703-5713.
73. Moreno-Sánchez R. y Devars S. (1999). Abundancia de los metales pesados. En: Contaminación Ambiental por Metales Pesados. AGT Editor, México. 157pp.

ISBN 968-463-093-X

74. Morton-Bermea O.; Hernández-Álvarez E.; González-Hernández G.; Romero F.; Lozano R.; Beramendi-Orosco L.E. (2008). Assesment of heavy metal pollution in urban topsoils form the metropolitan area of Mexico City. *Journal of Geochemical Exploration*.101:218-224.
75. Nakano Y.; Okamoto K.; Toda S.; Fuwa K. (1978). Toxic Effects of Cadmium on *Euglena gracilis* Grown in Zinc Deficient and Zinc Sufficient Media. *Agricultural and Biological Chemistry*. 42: 901-907.
76. Navarro L.; Torres-Márquez M.E.; González-Moreno S.; Devars S.; Hernández R.; Moreno- Sánchez R. (1997). Comparision of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 116C: 265-272.
77. Nedelkoska T.V. y Doran P.M. (2000). Hyperaccumulation of Cadmium by Hairy Roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*; 67: 1277-1285.
78. Nieboer E. y Richardson D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*. (Ser. B) 1:3-26.
79. Noctor G.; M-Arisi A.C.; Jouanin L.; J-Kunert K.; Rennenberg H.; H-Foyer C. (1998) Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*; 49: 623-647.
80. Osuna-Martínez C.; Páez-Osuna F.; Alonso-Rodríguez R. (2011). Cadmium, Copper, Lead and Zinc in Cultured Oysters under two constrasting climatic conditions in

coastal lagoons from SE Gulf of California, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*; 87: 272-275.

81. Panitlertumpai N.; Nakbanpote W.; Sangdee A.; Thumanu K.; Nakai I.; Hokura A. (2013). Zinc and/or cadmium accumulation in *Gynura pseudochina* (L.) DC. studied *in vitro* and the effect on crude protein. *Journal of Molecular Structure*; 1036: 279-291.
82. Pérez-Olvera M.A.; García-Mateos R.; Vázquez-Alarcón A.; Colinas-León T.; Pérez-Grajales M.; Navarro-Garza H. (2006). Concentration of Pb, Cd, Ni and Zn in Polluted Soils and their Transference to Broccoli Heads. *Terra Latinoamericana*. 26: 215-225.
83. Pomponi M.; Censi V.; Di Girolamo V.; De Paolis A.; Sanità di Toppi L.; Aromolo R.; Costantino P. y Cardarelli M. (2006). Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. 223: 180-190.
84. Quintero-Alvarez J. M.; Soto-Jiménez F.; Amezcua F.; Voltolina D.; Frías-Espericueta G. (2012). Cadmium y Lead Concentrations in the Fish Tissues of a Coastal Lagoon System of the SE Gulf of California. *Bull Environ Contam Toxicol*;
85. Rao K.S.; Mohapatra M.; Anand S.; Venkateswarlu P. (2011). Review on cadmium removal from aqueous solutions. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2: 81-103.
86. Rocchetta I.; Ruiz L.B.; Magaz G.; Conforti V. (2003). Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. *Bull Environ Contam Toxicol*; 70: 1045:1051.

87. Rong-Liang Q.; Palaniswamy T.; Peng-Jie H.; Palaninaicker S.; Rong-Rong Y. y Ye-Tao T. (2011). Interaction of cadmium and zinc on accumulation and sub-cellular distribution in leaves of hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *Journal of Hazardous Materials*; 186: 1425-1430.
88. Rodríguez-Castillo F.; Roldán-Ruiz M.D.; Blasco-Plá R.; Huertas-Romera M.J.; Caballero-Domínguez F.J.; Moreno-Vivián C.; Luque-Romero M. (2005). Ciclos Biogeoquímicos III en: *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tébar, Madrid. 614 pp ISBN:978-84-7360-211-2
89. Rodríguez-Zavala J.S.; García-García J.D.; Ortíz-Cruz M.A.; Moreno-Sánchez R. (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subs Environ Eng* 42:1365–1378
90. Rogalska J.; Pilat- Marcinkiewicz B.; Brzóska M. (2011). Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: A study in a rat. *Chemico-Biological Interactions*; 193: 191-203.
91. Ruíz B.L.; Rocchetta I.; Ferreira dos Santos; Conforti V. (2004). Isolation, culture and characterization of a new strain of *Euglena gracilis*. *Phycological Research*: 52: 168-173.
92. Satarug S.; Kikuchi M.; Wisedpanichkij R.; Li B.; Takeda K.; Na-Bangchang K.R.; Moore M.; Hirayama K.; Shibahara S. (2008). Prevention of cadmium accumulation in retinal pigment epithelium with manganese and zinc. *Experimental Eye Research*; 87: 587-593.

93. Schiff J.A.; Lyman H.; Russell G.K. (1971). Isolation of mutants from *E. gracilis*. *Meth. Enzymol.*, 23:143-162.
94. Scholten-Beck G. (1996). Magnesium starved cells of *Euglena gracilis*- a Possible Model System for Studying Mg^{2+} Influx?. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*; 51:165-173.
95. Seidal K.; Jorgensen N.; Elinder C.G.; Sjogren B.; Vahter M. (1993). Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health*; 19: 429–31
96. SEMARNAT, 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. Límites Máximos Permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Aclaración Diario Oficial de la Federación 30 abril de 1997.
97. Sigel A.; Sigel H. y Sigel R.K. (2006). The Bioinorganic Chemistry of Cadmium in the Context of Its Toxicity on: Cadmium from toxicity to essentiality. Switzerland, Basel. ISSN 1868-0402
98. Sriprang R.; Hayashi M.; Ono H.; Takagi M.; Hirata K. y Murooka Y. (2003). Enhanced Accumulation of Cd^{2+} by a *Mesorhizobium sp.* Transformed with a Gene from *Arabidopsis thaliana* Coding for Phytochelatin Synthase; 60: 1791-1796.
99. SSA, 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (Modificación). Diario Oficial de la Federación 20 de junio de 2000.
100. SSA, 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados.

Especificaciones sanitarias y métodos de prueba (2da Sección). Diario Oficial de la Federación 10 de Febrero de 2011.

101. Togwell A. Jackson (1978). The biogeochemistry of heavy metals in polluted lakes and streams at Flin Flon, Canada, and a proposed method for limiting heavy-metal pollution of natural waters. *Environmental Geology*. 2: 173-189.
102. Tsuji N.; Hirayanagi N.; Okada M.; Miyasaka H.; Hirata K.; H-Zenk M. y Miyamoto K. (2002). Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 293: 653-659.
103. Vatamaniuk O.K.; Mari S.; Yu-Ping L. y Rea A.P. (2000). Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*; 275(40): 31451-31459.
104. Vázquez- Alarcón A.; Justin-Cajuste L.; Siebe-Grabach C.; Alcántar-González G.; de la Isla del Bauer M.L. (2001). Cadmium, Nickel and Lead concentrations in wastewater, soil and crops in the Mezquital Valley, Hidalgo, Mexico. *Agrociencia*; 35: 267-274.
105. Vázquez- Alarcón A.; Cajuste L.; Carillo-González R.; Zamudio-González B.; Álvarez-Sánchez E.; Castellanos-Ramos J.Z. (2005). Límites permisibles de acumulación de Cadmio, Níquel y Plomo en suelos del Valle del Mezquital, Hidalgo. *Terra Latinoamericana*; 23:447-455.

106. Vromman V.; Saegerman C.; Pussemier L.; Huyghebaert A.; De Temmerman L.; Pizzolon J.C. y Waegeneers N. (2007). Cadmium in the food chain near non-ferrous metal production sites. *Food Additives and Contaminants*. 25: 293-301.
107. Wang J.; Song Y.; Elsherif L.; Song Z.; Zhou G.; Prabhu S.; Saari J.T.; Cai L. (2006). Cardiac Metallothionein Induction Plays the Major Role in the Prevention of Diabetic Cardiomyopathy by Zinc Supplementation. *Circulation; Journal of the American Heart Association*; 113: 544-554.
108. Wan Ngah W.S. y Hanafiah M.A. (2008). Removal of heavy metals ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresource Technology*; 99:3935-3948.
109. WHO. *Cadmium*. Environmental Health Criteria, vol. 134. Geneva: World Health Organization, 1992.
110. WHO. *Exposure to Cadmium. A Major Public Health Concern*. Geneva: World Health Organization, 2010.
111. Williams L.E.; Dittman J.K.; Hall J.L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta*; 1465: 104-126.
112. Wojas S.; Clemens S.; Hennig J.; Sklodowska A.; Kopera E.; Schat H.; Bal W. y Antosiewicz D.M. (2008). Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *ATPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*; 59(8): 2205-2219.

113. Yamaji S.; Tennant J.; Tandy S.; Williams M.; Singh Srai S.K.; Sharp P. (2001). Zinc regulates the function and expression of the iron transporters DMT1 and IREG1 in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters*; 507: 137-141.
114. Zhang W.J.; Jiang F.B.; Ou J.F. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2): 125-144.
115. www.iupac.org
116. <http://www.inchem.org>