

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

1

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CADMIO EN *Euglena gracilis* HETEROTROFA

788292
292887

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN: BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A :

Q.F.B. CESAR AVILES RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL GONZALEZ MORALES



MEXICO, D.F.,



2001

REGISTRACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS



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.

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

Miembros del Jurado:

Dr. Edgardo Escamilla Marván (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dr. Carlos Cervantes Vega (Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH)

Dr. Rafael Moreno Sánchez (Instituto Nacional de Cardiología)

Dra. Regina Montero Montoya (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Rolando Hernández Muñoz (Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dedicatorias y agradecimientos:

A mis padres, a quienes debo la vida y por quienes he de vivirla dignamente.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez y al Dr. Edmundo Chávez Cossio por permitirme entrar a su laboratorio e introducirme en el apasionante mundo de la Bioquímica.

Muy especialmente a la M.C. Silvia Devars Ramos, quien colaboró en gran parte de la realización de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", por el apoyo y financiamiento para la realización de esta tesis.

A mis grandes amigos, siempre motivo e inspiración: Citlalli Rico, Angelina Hernández, Raúl Cortes y Ariel Graff.

A Alonso, por su ternura e incomparable cariño

A mis amigos e incomparables compañeros de laboratorio: Ricardo Jasso, Marcela Várela, David Mendoza, Francisco Correa, Norma Castro, Jose S. Rodríguez, Karla Carbajal, Martha Ríos, Concepción Bravo, Sara Rodríguez, Oscar Juárez, Gerardo García, Cecilia Zazueta y Adrian Reyes. Gracias por su amistad.

A aquellas personas que me han enseñado a ser mejor cada día, quienes siempre me han ofrecido su invaluable amistad y dar sabios consejos: Noemi Garcia (gracias por todo), Silvia Devars (por su apoyo siempre incondicionable), Raúl Covian, Andrea Hernández y a la Dra. Herminia Loza.

A Oasis, por su formidable e inspiradora obra.

A Dios, por quien todo lo bueno es creado.

CONTENIDO

ABREVIATURAS, 3

RESUMEN, 4

INTRODUCCION

Los metales pesados, 5
Importancia biológica del cadmio, 6
Significado biológico del glutatión, 7
Mecanismos de resistencia a cadmio en bacterias, 7
Mecanismos de resistencia a cadmio en plantas, 8
Mecanismos de resistencia a cadmio en levaduras, 11
Estudios sobre metales pesados en algas, 12
Euglena gracilis, 14

HIPOTESIS, 16

OBJETIVOS, 16

MATERIALES Y METODOS

Condiciones de cultivo, 17
Aislamiento de mitocondrias de *Euglena*, 18
Captación de cadmio, 18
Respiración en mitocondrias de *Euglena*, 18
Determinación del volumen intracelular, 19
Determinación del volumen de agua intramitocondrial, 20
Determinación de intermediarios del ciclo de Krebs, 20
 Determinación de citrato, 20
 Determinación de malato, 22
Medición de la actividad de citrato sintetasa, 23
Determinación de glutatión por método enzimático, 24
Determinación de tioles inducidos por cadmio, 24

RESULTADOS

- Curvas de crecimiento, 26
- Acumulación de cadmio, 28
- Respiración mitocondrial, 29
- Volumen intracelular de agua, 33
- Determinación de citrato, 33
- Actividad de citrato sintetasa, 34
- Determinación de malato, 35
- Determinación de glutatión, 36
- Determinación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas por HPLC en células, 37
- Determinación del volumen intramitocondrial, 39
- Determinación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas por HPLC en mitocondrias, 37

DISCUSION, 43

CONCLUSIONES, 47

PERSPECTIVAS, 48

REFERENCIAS, 49

ABREVIATURAS

AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
AST	Tioles solubles en ácido
BSA	Albúmina de suero bovino
Cis	Cisteína
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
γ -EC	γ -glutamilcisteína
γ -ECS	γ -glutamilcisteína sintetasa
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilen-glicol-bis(β -amino-etil eter) N,N,N',N' - tetraacetico
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado o disulfuro de glutati3n
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Hepes	Acido 4-(2-hidroxi3til)-1-piperazinetanosulfonico
HMW-S-Cd	Complejos de alto peso molecular de uni3n a cadmio
LMH-Cd	Complejos de bajo peso molecular de uni3n a cadmio
MOPS	Acido 3-N-morfolino propanosulfonico
PCS	Fitoquelatina sintetasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDH	Succinato deshidrogenasa
TEA	Trietan3lamina
TMPD	N,N,N',N' -tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
TNB	Acido 5-tio-2-nitrobenzoico
Z	<i>Euglena gracilis</i> cultivada en glutamato + malato
Z-Hg	<i>Euglena gracilis</i> cultivada en glutamato + malato y preexpuesta a Hg ²⁺ 1.5 μ M
ZL	<i>Euglena gracilis</i> cultivada en lactato
ZL-Hg	<i>Euglena gracilis</i> cultivada en lactato y preexpuesta a Hg ²⁺ 1.5 μ M

RESUMEN

La preexposición de *Euglena gracilis* a mercurio (Hg^{2+}) durante varias generaciones selecciona una población con mayor resistencia a cadmio (Cd^{2+}), dicha resistencia es más notoria en células cultivadas con lactato que con glutamato + malato. En la búsqueda de los mecanismos de resistencia a Cd^{2+} en *Euglena*, en este trabajo se analizaron los niveles de glutatión (GSH), cisteína y tioles inducidos por Cd^{2+} o fitoquelatinas (FQ's). Se encontró que la concentración intracelular de GSH en células cultivadas en lactato y preexpuestas a Hg^{2+} se eleva cinco veces por la exposición a Cd^{2+} respecto al control (8 vs. 35 mM GSH). Este valor sumado al contenido de citrato, cisteína y FQ's rebasa la relación de dos ligandos por cada átomo de Cd^{2+} acumulado en la célula entera, estequiometría necesaria para la formación de complejos estables ligando-metal. En las mitocondrias, donde se acumula aproximadamente el 50% del Cd^{2+} celular total, también se observaron aumentos significativos en los contenidos de citrato y GSH, promovidos por la preexposición de las células a Hg^{2+} . Estos resultados sugieren que en la mitocondria existe una compartimentalización activa de fitoquelatinas, la cual puede representar un mecanismo de protección contra los efectos tóxicos del cadmio.

INTRODUCCION

LOS METALES PESADOS

Los metales pesados han adquirido relevancia desde la perspectiva de la ecología puesto que son liberados al medio ambiente donde persisten y son tóxicos para los organismos. Existen 40 elementos químicos clasificados como metales pesados. Muchos de estos elementos son esenciales para el crecimiento celular de procariontes y eucariontes y se requieren en bajas concentraciones (V^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Sn^{2+} , I , F). Sin embargo, algunos de estos metales como son: Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , etc., no son esenciales para el crecimiento celular y son extremadamente tóxicos aún en bajas concentraciones (Trevors, 1986., Martell, 1975).

El término metal pesado se ha usado convencionalmente cuando existen connotaciones acerca de toxicidad. Los metales pesados se definen como aquellos con una densidad específica mayor a 5 g/mL. Una clasificación más actual usando criterios biológicos y químicos los sitúa en tres grupos, de acuerdo con la reactividad preferente con ligandos que contienen oxígeno (O-), nitrógeno (N-), o azufre (S-) en las biomoléculas (Nieboer y Richardson, 1980). Son clase A, los que reaccionan preferentemente con el oxígeno (reactividad $O > N > S$), entre ellos Al^{3+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} y La^{3+} . Son de clase B, los que reaccionan más con el azufre ($S > N > O$), como Cu^+ , Hg^{2+} y Ag^+ ; y los de la clase C; son metales con afinidad intermedia, como son Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} (Esquema1).

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu*	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	Y	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

Esquema 1.- Tabla periódica de los elementos mostrando la disposición de los metales Clase A (Mg, Ca, etc.), Clase B (Hg, Pt, etc.) y los de la Clase C (Cd, Zn, Pb, etc.).

Tomado y modificado de Nieboer y Richardson, 1980. * El Cu puede ubicarse en la clase B o C en función de su valencia.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL CADMIO

El cadmio se encuentra en la naturaleza en bajos niveles (Iverson y Brinckman, 1978) y ocurre principalmente como un componente de la corteza terrestre a una concentración promedio de 0.18 ppm (Babich y Stotzky, 1978). El cadmio puede ingresar al medio ambiente desde varias fuentes antropogénicas como pueden ser derivados de la refinación del zinc, combustión del alquitrán, desechos mineros, procesos de galvanizado, producción de hierro, acero, fertilizantes y pesticidas (Hutton, 1983., Iverson y Brinckman, 1978). El cadmio y sus compuestos son principalmente utilizados para la fabricación de baterías de níquel/cadmio, revestimientos anticorrosivos de metales, pigmentos y estabilizadores de plásticos (Merian, 1991). Puesto que es un metal ampliamente utilizado en la industria y en la minería, el cadmio es un contaminante muy abundante en el ambiente (aire, agua, suelo, alimentos, tabaco, etc.). Por ejemplo, cada cigarrillo contiene de 1-2 µg de cadmio. Una parte de éste es eliminado por la combustión, inhalándose de 0.1-0.2 µg por cigarrillo. El cadmio puede acumularse en altas concentraciones en una gran variedad de organismos marinos (peces y algas) y en algunas plantas. También puede depositarse en las riberas de ríos y costas marinas (Galvão, 1987).

El cadmio interactúa con monómeros de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina en las membranas celulares, dichas interacciones son parte de la base bioquímica que explica sus efectos tóxicos (Vallee y Ulmer, 1972). Los efectos tóxicos del cadmio también se relacionan con la producción de radicales libres y con la activación parcial de la calmodulina como análogo del calcio (Diaz-Barriga, 1991).

El cadmio también es tóxico para las bacterias, algas y hongos; sin embargo, existen algunas cepas que son resistentes a este metal. Se sabe que la resistencia en bacterias involucra una alteración en la captación del metal y no una transformación enzimática (Trevors y col, 1986). Las bases genéticas para la resistencia contra el metal, los mecanismos bioquímicos de captación, toxicidad y tolerancia son áreas de la investigación que no han sido satisfactoriamente exploradas.

El cadmio ingresa a los organismos vivos superiores por ingestión y por inhalación; el cadmio absorbido es transportado por la sangre a diversos órganos, principalmente a riñones e hígado; también atraviesa la barrera placentaria, pero en mucho menor grado que otros metales pesados, tales como mercurio y plomo. Se sabe que en los procesos de absorción y de transporte del cadmio en la sangre en animales, tiene participación importante una proteína de bajo peso molecular, llamada metalotioneína (MT), a la cual se une el cadmio con alta afinidad (Souza y col, 1996). Pequeñas cantidades del complejo metalotioneína-cadmio se secretan continuamente del hígado al torrente sanguíneo para ser transportado a los riñones; aquí es filtrado a través de los glomérulos para que posteriormente sea reabsorbido y almacenado en las células tubulares del riñón. Este órgano excreta del 1 al 2% del cadmio absorbido directamente de las fuentes ambientales (Souza y col, 1996).

SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL GLUTATIÓN

El GSH, péptido compuesto por tres aminoácidos (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina o GSH) está distribuido en todas las células en concentraciones relativamente altas (0.5-10 mM). El GSH parece ser el tiol intracelular más abundante, así como el compuesto γ-glutamil más abundante; por esto, se piensa que la cisteína es almacenada en forma de GSH (Meister, 1975, 1983., Meister y Tate, 1976).

El glutatión es utilizado en la célula para la inactivación de peróxidos, radicales libres, destoxificación de algunos compuestos exógenos y para las reacciones de transferencia de tioles (Douglas 1987). Además de estas funciones también se ha estudiado su papel potencial en la destoxificación de metales pesados.

La forma reducida del glutatión (GSH) representa el mayor compuesto intracelular con grupos sulfhidrilos transferibles y su concentración es mucho mayor que la forma oxidada, es decir el disulfuro de glutatión (GSSG) (Meister y Anderson, 1983).

La exposición a Cd^{2+} (100 μM) en *E. gracilis* incubada bajo fotoperíodos de luz-oscuridad de 12 horas conduce a un incremento en el contenido de tioles solubles en ácido (AST), glutatión (GSH) y cisteína (Cis) en función de la dosis del metal y del tiempo de exposición (Coppellotti, 1989).

La concentración de glutatión encontrada por Coppellotti (1989) fue de aproximadamente 0.2 mM, cuando es referida por gramo de peso fresco y se elevó hasta 1 mM después de la exposición de las células a 45 μM de Cd^{2+} . Este contenido es el mismo que reportaron Shigeoka y col. (1987) para células de *E. gracilis* fotosintéticas, aunque en este caso el volumen de agua en *Euglena* se determinó mediante el uso del hematocrito, método basado en la separación del agua intracelular mediante centrifugación en un tubo graduado.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CADMIO EN BACTERIAS

El cadmio es un metal extremadamente tóxico para la mayoría de los cultivos puros de bacterias y cianobacterias. Perry y Silver (1982) demostraron transporte de Cd^{2+} y Mn^{2+} en vesículas de *Staphylococcus aureus*, el cual ocurre a expensas del sistema de transporte de Mn^{2+} . El Cd^{2+} y Mn^{2+} fueron inhibidores competitivos uno del otro de los sistemas de transporte y mostraron una K_m de 0.2 μM para el Cd^{2+} y de 0.95 μM para el Mn^{2+} .

Laddaga y Silver (1985) reportaron que la captación de $^{109}Cd^{2+}$ en una cepa de *Escherichia coli* K-12 resistente a cadmio se lleva a cabo mediante un transporte activo, con una K_m para el Cd^{2+}

de 2.1 μM y una V_{max} de 0.83 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ peso seco. También se reportó que 20 μM de Zn^{2+} , pero no de Mn^{2+} , actúa como un inhibidor competitivo de la captación de $^{109}\text{Cd}^{2+}$.

Contrario a los mecanismos de resistencia involucrados con la exclusión del metal, una cepa de *Pseudomonas putida* con capacidad de acumular cadmio y unirlo a proteínas fue aislada de sedimentos acuáticos (Higham y col, 1984). El mecanismo de resistencia estuvo también asociado a la presencia de polifosfatos y principalmente a tres proteínas que unen Cd^{2+} , ricas en cisteína y con pesos moleculares de 6700, 6900 y 3600 Da (CdBP_1 , CdBP_2 , CdBP_3 , respectivamente). Higham y col. (1985) reportaron transporte de Cd^{2+} en *Pseudomonas putida*, exhibiendo una resistencia a Cd^{2+} 3 mM. La expresión de estos mecanismos de resistencia sólo ocurre en presencia del metal.

La información genética asociada a los mecanismos de resistencia al Cd^{2+} en bacterias es escasa. Singh y Pandey (1982), estudiando la cianobacteria *Nostoc calcicola* encontraron que las cepas resistentes a Cd^{2+} fueron también resistentes a otros metales: Zn^{2+} y Hg^{2+} , a antibióticos como neomicina y cloranfenicol, pero no a estreptomycin. La resistencia a mercurio en bacterias fecales gram negativas de primates expuestos a amalgamas dentales se ha asociado con la multiresistencia a antibióticos (Wireman y col, 1997).

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CADMIO EN PLANTAS

El principal mecanismo de resistencia en plantas ante un exceso de cadmio es la formación de complejos que unen al cadmio. Cuando el metal entra en contacto con la planta se induce la síntesis de polipéptidos ricos en cisteína, así como de sulfhidrilos lábiles al ácido (Rausser, 1991). La estructura primaria de estos polipéptidos muestra una serie de moléculas de poli(γ -glutamil-cisteinil)glicina o (γ -EC) $_n$ G, donde n tiene un valor de 2-11 (Grill y col. 1985). La fuente del grupo γ -glutamil-cisteína para la síntesis de estos polipéptidos es el glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina).

En algunas familias de plantas como la Fabaceae (leguminosas), el glutatión es parcial o totalmente reemplazado por homoglutatión en el cual, la β -alanina sustituye a la glicina. Los polipéptidos ricos en cisteína pertenecen a la familia III de las metalotioneínas (MT). Debido a que difieren marcadamente de las MTs presentes en mamíferos, en lo que respecta a la composición de aminoácidos, la mayoría de los autores las refieren como fitoquelatinas (FQs), un nombre trivial dado por Grill y col. (1985), puesto que han sido identificadas en muchas especies de plantas.

Se ha caracterizado la síntesis de fitoquelatinas en plantas. El glutamato y la cisteína son unidos covalentemente por la γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) dependiente de ATP para formar γ -EC (Esquema 2). En aquellas plantas que producen homoglutatión, la enzima homoglutatión sintetasa dependiente de ATP β -Ala específica utiliza γ -EC y β -Ala para producir γ -Glu-Cis- β -Ala. (Rausser,

1995). La γ -glutamil-cisteína sintetasa (γ -ECS) es la enzima que cataliza el paso limitante para la formación del glutatión (GSH) mediante la formación de γ -glutamil-cisteína. En suspensiones de *Arabidopsis*, el cadmio induce aumentos en la actividad de la γ -ECS, lo cual también correlaciona con incrementos en el contenido de GSH (Esquema 2).

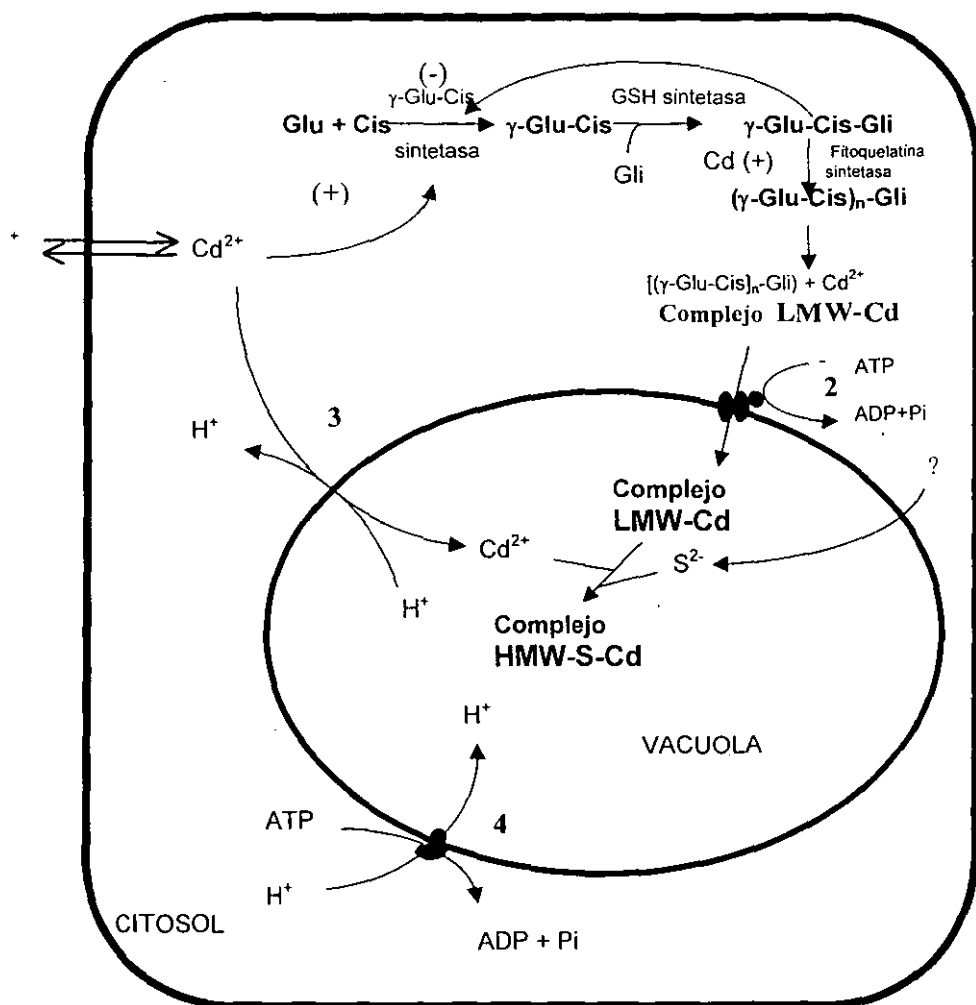
Las evidencias de que las fitoquelatinas se derivan del glutatión son: A) la semejanza estructural entre las fitoquelatinas y el glutatión, B) la aparición de fitoquelatinas con la concomitante desaparición del glutatión, C) reducción o desaparición de la síntesis de fitoquelatinas en mutantes deficientes de fitoquelatina sintetasa (PCS) o γ -ECS, y D) inhibición de la síntesis de fitoquelatinas por butionina sulfoximina, un inhibidor de la γ -ECS (Rauser, 1995).

En suspensiones celulares de *Silene cucubalus* se ha caracterizado una enzima que utiliza glutatión para sintetizar en un principio (γ -Glu-Cis)₂-Gli; después de 15 minutos ocurrió la aparición de (γ -Glu-Cis)₃-Gli y después de 20 minutos el producto fue (γ -Glu-Cis)₄-Gli.

Esta enzima condujo a la transpeptidación del dipéptido γ -Glu-Cis del GSH sobre otra molécula de GSH, formando así (γ -Glu-Cis)₂-Gli, o sobre otra molécula de (γ -Glu-Cis)_n-Gli para formar un oligómero n+1. Esta enzima fue denominada γ -glutamilcisteína dipeptidil transpeptidasa, trivialmente llamada fitoquelatina sintetasa (PCS) (Grill y col, 1989). Esta enzima se purificó a partir de suspensiones de *Silene cucubalus* y fue funcionalmente activa en la forma de tetrámero (M, 95, 000), con una Km para el GSH de 6.5 mM. Una vez que la cantidad de (γ -Glu-Cis)₂-Gli presente es suficiente para secuestrar el cadmio libre con una relación tiol:Cd de 2:1, la catálisis de la PCS se detiene (Grill y col, 1989).

La PCS parece ser una enzima autorregulada puesto que el producto de la reacción quela el metal responsable de su activación. Esta enzima es constitutiva y su formación no parece ser alterada por la exposición de las células a cadmio.

Una vez que los metales pesados son secuestrados, las fitoquelatinas parecen ser degradadas. Por ejemplo, en la planta *Silene vulgaris*, la vida media de los péptidos inducidos por cadmio es de aproximadamente una semana (De Knecht y col, 1995). Posiblemente el metal después se une a otros compuestos como fosfatos, polifosfatos, sulfuros, cloruros, etc. También los ácidos orgánicos pueden servir como ligandos para quelar metales a través de su unión a los grupos amino o carboxilo (Wang y col, 1995). De estas moléculas, la de sulfuro es una de las que más afinidad tiene para unir cadmio y lo mantiene unido por períodos prolongados (Tabla I).



Esquema 2.- Modelo de la síntesis de los complejos de unión a cadmio, localización intracelular, y mecanismos de transporte asociados en levadura. Modelo modificado por Rauser, 1995, tomado de Ortiz y col. 1995 (pasos 3 al 4). 1.- Síntesis de fitoquelatinas a partir de subunidades de γ -glutamilcisteína (Grill y col, 1989), 2.- La actividad de transporte del cassette tipo ATP-binding (Ortiz y col, 1995, Salt y Rauser, 1995), 3.- El intercambiador Cd²⁺/H⁺ (Salt y Wagner, 1993), 4.- La ATPasa de tipo vacuolar.

Ligando	Log $K_{est} [(Cd^{2+} L) / (Cd^{2+}) (L)]$
EDTA	17.4 (0.3 fM)
EGTA	17.5 (8 fM)
Citrato	9.4 (4 pM)
Oxaloacetato	4.2 (0.57 μ M)
Malato	2.9 (5.7 μ M)
Glutamato	4.4 (9.7 μ M)
Lactato	1.5 (9.6 μ M)
Sulfuro (S ²⁻)	6.1 (15 nM)

Tabla 1.- Afinidad de diferentes ligandos totalmente desprotonados por cadmio. Los números en paréntesis indican la concentración del metal libre resultante de la interacción entre 1 mM de ligando (L) con 10 μ M de cadmio, a pH 7.0, 25°C y fuerza iónica de 0.01. Tomado y modificado de Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A CADMIO EN LEVADURAS

La actividad de la fitoquelatina sintetasa (PCS) se detectó inicialmente en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Hayashi y col, 1991). En este organismo el cadmio se transporta hacia la vacuola; el transporte es mediado por una proteína de la familia ABC (HMT1) que es esencial para conferir la tolerancia al cadmio (Ortiz y col, 1992). El transportador puede funcionar ya sea con complejos Cd-FQ o bien con apo-FQs y es homólogo a otra proteína tipo ABC (YCF1) que transporta conjugados glutatión-metal (GSH-Cd) en *Saccharomyces cerevisiae* (Li y col, 1997). Los requerimientos de sustrato, parámetros cinéticos y la estequiometría Cd/glutatión de la captación y el peso molecular del complejo activo del transporte demuestran que YCF1 cataliza selectivamente el transporte del bisglutatiónato de cadmio (Cd•2GSH); esta vía en *S. cerevisiae* contribuye substancialmente con la detoxificación del cadmio. Una vez sintetizadas las fitoquelatinas, se forman complejos de bajo peso molecular (LMW-complexes) pobres en sulfuro, que son transportados más eficientemente por la proteína HMT1 que los complejos de alto peso molecular ricos en sulfuro (HMW-complexes, Esquema 2). El transporte de cadmio libre y de complejos GSH-Cd se ha evaluado en el tonoplasto (membrana que separa la vacuola del citoplasma); sin embargo, dicho transporte no es catalizado por HMT1 (Ortiz y col, 1995). La diferencia de potencial eléctrico que se genera por la ATPasa vacuolar no impulsó el transporte de los complejos (Esquema 2). Las fitoquelatinas sintetizadas en el citosol se combinan con cadmio para formar los complejos de bajo peso molecular

que se mueven a través del tonoplasto por un transportador tipo "cassette" de unión a ATP (Esquema 2).

Una vez que el cadmio es transportado por un antiporte $\text{Cd}^{2+} / \text{H}^+$ al interior de la vacuola de levadura, éste se incorpora junto con el sulfuro a los complejos de bajo peso molecular (LMW) para formar complejos de alto peso molecular (HMW) ricos en sulfuro. Estos últimos son más estables en el medio ácido de la vacuola y tienen mayor capacidad de unir cadmio que los complejos LMW (Rausser, 1995., Esquema 2).

ESTUDIOS SOBRE METALES PESADOS EN ALGAS

La captación y acumulación de metales pesados en algas se ha estudiado desde hace algunos años (Rai y col, 1981), pero los mecanismos específicos no se han explorado satisfactoriamente, especialmente cuando se compara con los datos ya conocidos en bacterias. Una respuesta común de los organismos expuestos a metales pesados es la síntesis de péptidos intracelulares ricos en cisteína, los cuales tienen la capacidad de quelar al metal, disminuyendo sus efectos tóxicos en la célula (Grill y col, 1985).

Hay pocos estudios sobre los mecanismos de resistencia a metales pesados en algas (Grill y col, 1988). Se ha descrito por ejemplo que *Chlamydomonas reinhardtii* es altamente sensible al Cd^{2+} , pues con una concentración tan baja de Cd^{2+} como $1 \mu\text{M}$ se aprecia una inhibición significativa de la fotosíntesis (Overnell, 1975). En contraste, las algas marinas *Dunaliella tertiolecta* y *Phaedactylum tricornutum*, son insensibles a esa concentración y muestran una ligera inhibición de la fotosíntesis a concentraciones de $100 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} (Overnell, 1975).

Bonaly y col, (1978) encontraron que a bajas proporciones de cadmio / zinc (Cd^{2+} 56 mg/L / Zn^{2+} 40 mg/L) en cultivos de *Euglena*, había una lenta velocidad de crecimiento inicial, seguido de una recuperación al cabo de 10 días debido a la adquisición de resistencia celular al cadmio. Después de 16 días de crecimiento, el crecimiento celular fue igual al de los controles. Es probable que los efectos del cadmio sobre *Euglena* sean predominantemente aquellos de los metales pesados, más que como un posible análogo del zinc en la célula. En células depletadas de zinc se permite la entrada del cadmio, pero este no sustituye al elemento ausente (Buetow, 1982).

El mercurio puede ser tolerado por *Euglena* sólo a bajas concentraciones; es decir en el rango de 10^{-7} a 10^{-9} M. Concentraciones 5 a 10 veces mayores conducen a un retraso en el crecimiento, es decir a una fase lag proporcional a la concentración del metal (Simeray y col, 1977); seguida de una fase de crecimiento cercana a la normal, con una densidad celular independiente de la presencia del

mercurio: Estos efectos pueden ser explicados ya sea por la selección de una subpoblación de células resistentes o por la adquisición de resistencia en toda la población.

Se ha demostrado que la cepa Z de *Euglena gracilis* es un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos de tolerancia a metales pesados (Devars y col, 1998). En un trabajo previo, se encontraron diferentes respuestas por la exposición a metales (Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}) bajo diferentes condiciones de cultivo, en las que se variaron parámetros tales como la fuente de carbono en el medio de cultivo, incubación en luz u oscuridad, y la preexposición de las células durante varias generaciones a una concentración de Hg^{2+} de 1.5 μM , la cual no altera significativamente el crecimiento celular (Navarro y col, 1997). En particular, las células cultivadas en la oscuridad en presencia de Cd^{2+} (100 μM), con DL-lactato como fuente de carbono y preexpuestas a Hg^{2+} (ZL- Hg^{2+}), mostraron un aumento del 90% en la acumulación de Cd^{2+} en comparación con las células no preexpuestas al Hg^{2+} (ZL). Aunque las células incubadas en la luz en un medio con glutamato + malato (G+M, Z) acumularon más Cd^{2+} que ZL- Hg^{2+} , Z no presentó diferencias por la preexposición a Hg^{2+} (Z- Hg^{2+}). Estos resultados sugieren diferencias en los mecanismos de resistencia a los metales pesados en *Euglena* dependiendo de la fuente de carbono utilizada para soportar su crecimiento, así como de la preexposición de las células al mercurio.

En células fototróficas de *E. gracilis*, el Cd^{2+} causa pérdida de la movilidad celular (Nakano y col, 1978, DeFilippis y col, 1981). Este efecto ha sido atribuido a alteraciones inducidas por el Cd^{2+} durante el proceso de división celular. En este tipo de células se ha descrito la presencia de iones sulfuro en una proteína inducible por cadmio (Weber y col, 1987). Los iones sulfuro tienen la función de estabilizar los complejos proteína-cadmio haciéndolos más insolubles y estables, lo cual ya ha sido caracterizado en *Schizosaccharomyces pombe* (Ortiz y col, 1995).

Se sabe que el Cd^{2+} y otros metales pesados se unen a las membranas de varias células eucariontes pero el daño mitocondrial parece ser un efecto específico en las algas (Soyer y Prevot, 1981). El cadmio también causa esporulación irregular, desarrollo de microcolonias, hinchamiento mitocondrial, granulación y lisis celular en diversas especies de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Ankistrodesmus* (Silverberg, 1976).

En algas verdes, como *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella pyrenoidosa*, y *Scenedesmus quadricauda*, el Cd^{2+} es capaz de inducir cambios estructurales en la mitocondria, en forma de hinchamiento y vacuolación mitocondrial, según indica el análisis mediante la microscopía electrónica. También se ha observado la presencia de gránulos intramitocondriales prominentes y densos; estas estructuras contienen cadmio según el análisis por dispersión de rayos X (Silverberg, 1976). Puesto que las alteraciones en la estructura mitocondrial son suficientes para deteriorar el metabolismo celular, este organelo debe considerarse como el primer blanco para la citotoxicidad asociada al cadmio en algas.

Aunque el Cd^{2+} es altamente tóxico para las algas, los mecanismos específicos de este daño no son conocidos con exactitud. El cadmio puede expresar su toxicidad indirectamente adhiriéndose a sitios de la pared celular o de la membrana plasmática impidiendo el transporte de nutrientes, o directamente, dirigiéndose a compartimentos subcelulares y reemplazando metales divalentes esenciales en las enzimas (Trevors y col, 1986). Sin embargo, el cadmio debe primero ser absorbido en las superficies celulares antes de ser translocado a sus sitios de acción y ejercer su toxicidad. La regulación de esta secuencia de eventos podría también estar involucrada en los mecanismos de resistencia contra el metal.

Chlorella vulgaris, otra alga unicelular, también tiene la capacidad de sintetizar péptidos con alto contenido de cisteína que pueden unir cadmio. Este microorganismo es capaz de remover aproximadamente el 83% del cadmio presente en el medio (22 μM) y la biorremoción aumentó conforme se aumentó la cantidad de células (Carr y col, 1998). De esta alga se obtuvo también una cepa resistente a 500 μM de cadmio que mostró una IC_{50} de 35 μM , en comparación con la cepa silvestre cuya IC_{50} para el cadmio fue de 3.5 μM (Kaplan y col, 1995); tal cepa resistente se obtuvo después de cultivar a *Chlorella* en concentraciones crecientes de cadmio.

Euglena gracilis

Euglena gracilis es un microorganismo que está entre las especies más abundantes en hábitats dulceacuícolas contaminados por metales pesados (Fernández-Leborans y Novillo, 1996). *Euglena* es un organismo fotoheterotrófico; es decir, presenta actividad fotosintética y también puede crecer en la oscuridad a expensas de la actividad mitocondrial (como un microorganismo heterotrófico). Además de estas características, *Euglena* también tiene la capacidad de fermentar ésteres de cera y de sintetizar paramilo como polisacárido de reserva. *Euglena* tiene la capacidad de crecer en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y energía, como son ácidos orgánicos como glutamato + malato o lactato, o bien en extractos de peptona de levadura, así como también en etanol; crece en un rango de pH de 3.5 a 6.8 con un buen rendimiento celular. Para su crecimiento, *Euglena* requiere de las vitaminas B1 (tiamina) y B12 (cianocobalamina), las cuales son suplementadas en el medio de cultivo. *E. gracilis* es un organismo que se puede usar para varios estudios de laboratorio, usando métodos y condiciones de cultivo controlables y a bajo costo (Kempner, 1982).

El crecimiento de *Euglena gracilis* en diferentes fuentes de carbono, como DL-lactato (L) y glutamato + malato (GM) promueve el predominio de diferentes metabolismos, así como diferentes estructuras mitocondriales. En las células cultivadas en GM se observan mitocondrias con estructura normal, mientras que la presencia de lactato da origen a la aparición de un retículo mitocondrial (Calvayrac, 1970).

La mayor parte de los estudios bioquímicos realizados con *Euglena* se han relacionado con la fotosíntesis y por ello el conocimiento de este organismo se ha enfocado más a sus características autótrofas.

Otra característica de *Euglena* es que lleva a cabo la fosforilación oxidativa en asociación con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la respiración mitocondrial. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos de *E. gracilis*, a diferencia del presente en mitocondrias de mamífero, contiene una α -cetoglutarato descarboxilasa dependiente de pirofosfato de tiamina, que produce succinato semialdehído a partir de α -cetoglutarato, así como dos deshidrogenasas de succinato semialdehído, una dependiente de NAD^+ y otra de NADP^+ , las cuales catalizan la conversión de succinato semialdehído a succinato (Buetow, 1989). Esta ruta para la oxidación del α -cetoglutarato a succinato se ajusta con el hecho de que el succinato-semialdehído actúa como uno de los mejores sustratos respiratorios en mitocondrias de *Euglena* intactas (Tokunaga y col, 1976).

En *Euglena* también se ha reportado la presencia de una piruvato oxidoreductasa distinta a la descrita en mitocondrias de otros organismos. Esta enzima es inhibida por piruvato en aerobiosis y el NADP^+ funciona como aceptor de electrones. Dependiendo de la concentración de oxígeno, esta enzima desempeña un papel regulatorio en el metabolismo energético del organismo (Inui y col, 1984). También se ha descrito que *Euglena* en condiciones de anoxia obtiene energía mediante la fermentación de ésteres de cera (Inui y col, 1982).

La capacidad de *Euglena* de resistir altas concentraciones de metales pesados, su fácil manejo en el laboratorio y la facilidad de manipularla bajo diferentes condiciones de cultivo, hacen de este organismo un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos bioquímicos involucrados en el desarrollo de resistencia a metales pesados.

HIPOTESIS

Al exponer a *Euglena gracilis* a una cantidad tóxica de cadmio, la célula responde con un incremento en la síntesis de compuestos orgánicos con capacidad de quelar al metal y disminuir sus efectos tóxicos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena gracilis* heterotrófa asociados a su acumulación intracelular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar el efecto del cadmio sobre el crecimiento de *Euglena* cultivada con Glutamato + Malato o DL-lactato como fuentes de carbono.
- 2.- Determinar la acumulación de cadmio en células de *Euglena* y en mitocondrias aisladas.
- 3.- Evaluar los efectos del cadmio sobre la respiración mitocondrial.
- 4.- Evaluar el efecto de la preexposición de *Euglena* a Hg^{2+} sobre el crecimiento celular, la acumulación de cadmio y el desarrollo de los mecanismos de resistencia a cadmio.
- 5.- Determinar el contenido de metabolitos que unen Cd^{2+} con alta afinidad, como son: citrato, malato, cisteína, glutatión y sus derivados (fitoquelatinas) en células enteras y en mitocondrias aisladas.

MATERIALES Y METODOS

CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizaron cultivos axénicos de *Euglena gracilis* (cepa Z) mantenidos en la oscuridad durante varios años; la cepa fue reactivada de acuerdo con lo descrito por Moreno-Sánchez y Raya (1987) y Devars y col (1992). Esta cepa de *Euglena gracilis* ha perdido la capacidad de generar cloroplastos a partir de los plástidos presentes. Una vez que se reactivaron las células, estas fueron incubadas en la oscuridad con agitación orbital a 120 rpm y 25°C en un medio organotrófico que contiene glutamato + malato como fuente de carbono (37 y 16 mM, respectivamente), de acuerdo con lo descrito por Schiff y col (1971). Se cultivaron también células de *E. gracilis* en un medio en el cual el glutamato + malato fue sustituido por DL-lactato (36 mM) (cultivo ZL). El pH inicial en ambos medios fue de 3.5 el cual se incrementó a 8.6 cuando las células llegaron a la fase estacionaria de su crecimiento (4-5 días de incubación).

Se obtuvieron células de *E. gracilis* preexpuestas a una baja concentración de HgCl_2 (1.5 μM), concentración que se encuentra por debajo de la IC50, es decir la concentración de Hg^{2+} que se requiere para inhibir el crecimiento al 50%. Las células fueron cultivadas en presencia de HgCl_2 en un medio con glutamato + malato (Z- Hg^{2+}) y también en DL-Lactato (ZL- Hg^{2+}) por aproximadamente 2 meses, tiempo en el que ocurren alrededor de 60 generaciones.

Todos los cultivos se iniciaron con un inóculo de 0.2×10^6 células/mL tomada de un cultivo "stock" que estaba en la fase estacionaria temprana del crecimiento (aproximadamente 90 h). El CdCl_2 (100 μM) y el HgCl_2 (1.5 μM) fueron añadidos a los cultivos a partir de soluciones "stock" estériles (25 y 0.5 mM, respectivamente). La densidad celular se determinó con un hemocitómetro, en alícuotas extraídas de los cultivos, diluidas apropiadamente e inmovilizadas con HCl concentrado (conc. final 0.2% v/v). La viabilidad celular se determinó utilizando azul tripano al 0.04% después de incubar las células por aproximadamente 5 min a temperatura ambiente.

Una vez que los cultivos llegaron a su fase estacionaria temprana, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 1000 x g durante 10 min, el sedimento se lavó una vez y se resuspendió con un medio (medio KME) que contiene KCl 120 mM, MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfónico) y EGTA (ácido etilen-glicol-bis(β -amino-etil eter) N,N,N',N'- tetraacético) 2 mM, pH 7.2. Estas células se almacenaron a -72°C para las determinaciones de cadmio y metabolitos.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE *Euglena*

Las mitocondrias fueron aisladas siguiendo básicamente el protocolo descrito por Moreno-Sánchez y Raya (1987). Una vez cosechadas las células controles y expuestas a cadmio, se tomó una alícuota de 2×10^9 células (5-10 mL), se transfirió a un vaso de precipitados y se aforó a 25 mL con medio de aislamiento (medio SHE) que contiene sacarosa 250 mM, Hepes 10 mM, y EGTA 0.5 mM, pH 7.4. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. La suspensión celular, en presencia de albúmina sérica de bovino, libre de ácidos grasos (BSA), a una concentración final de 0.2% (p/v), se sonicó a intervalos de un minuto tres veces durante 10 segundos a 15-18 μ m de amplitud en un sonicador (Branson Sonifier 450); el diámetro de la punta fue de 1 cm. El homogenado fue diluido con medio SHE y transferido a tubos de 50 mL para ser centrifugado a 1000 x g durante 10 min para separar los organelos liberados de las células rotas por la sonicación. El sobrenadante se centrifugó a 7000 x g durante 10 min y el sedimento resultante fue resuspendido en un volumen mínimo de medio SHE. Esta fracción rica en mitocondrias fue incubada 10 min en presencia de ADP 1 mM y BSA 0.2 %; finalmente se llevó a un volumen de aproximadamente 30 mL con medio SHE y se realizó una última centrifugación a 7000 x g durante 10 min. El sedimento se resuspendió en el menor volumen posible de medio SHE en presencia de BSA al 0.2% (p/v). La concentración de proteína se determinó por el método de Biuret, utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Gornall y col, 1949).

CAPTACION DE CADMIO

Se tomaron alícuotas de 100-200 μ L de células y mitocondrias ($1-2 \times 10^7$ células y 5-8 mg proteína, respectivamente) y fueron digeridas por ebullición (temperatura aprox. 98°C) en 0.5 mL de H₂SO₄ al 99% (v/v) y 2.5 mL de HNO₃ al 70% (v/v) durante dos horas. El contenido de cadmio fue determinado a 228.8 nm con una flama apoyada por óxido nitroso y acetileno a partir de las muestras digeridas y transparentes utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA 640, Varian).

RESPIRACION EN MITOCONDRIAS DE *Euglena*

La velocidad de respiración se midió a 25°C con un electrodo de oxígeno tipo Clark, en un medio saturado con aire, compuesto por KCl 120 mM, MOPS 20 mM, EGTA 1 mM (medio KME), KH₂PO₄ 5 mM y MgCl₂ 1 mM, pH 7.2. La cantidad de mitocondrias en el medio fue de 0.5 a 1 mg proteína por mL. Se determinaron las actividades de L-lactato, succinato y TMPD oxidasas midiendo el consumo de oxígeno estimulado por L-lactato 10 mM, succinato 10 mM y TMPD.

(N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilendiamina) 2 mM + ascorbato 5 mM, respectivamente. La velocidad en el consumo de oxígeno en presencia sólo de sustrato se consideró como la respiración en estado 4 y cuando se agregó ADP al medio y se observó un incremento en la velocidad, ésta se consideró como respiración en estado 3 (Nicholls, 1982).

DETERMINACION DEL VOLUMEN INTRACELULAR

El volumen de agua en *E. gracilis* se determinó de acuerdo con el método descrito por Rottenberg (1979), el cual se basa en la distribución de $^3\text{H-H}_2\text{O}$ e [^3H]-inulina. Una alícuota de células lavadas en medio KME ($2-3 \times 10^7$ células), se incubó con 15 μL de $^3\text{H-H}_2\text{O}$ (110 000 cpm) durante 1 minuto a 25°C. Esta suspensión se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL que contiene en el siguiente orden desde el fondo: 0.3 mL de ácido perclórico al 30%, 0.3 mL de bromododecano ($\delta=1.04$ g/mL), y 0.3 mL de medio KME. Las células incubadas con el $^3\text{H-H}_2\text{O}$ se adicionaron cuidadosamente al tubo y se centrifugó 1 min a $10\ 000 \times g / 4^\circ\text{C}$. De esta forma, las células junto con su contenido, atraviesan la capa de bromododecano, puesto que la molécula de $^3\text{H-H}_2\text{O}$ es permeable a todas las células hasta alcanzar un equilibrio, es posible distinguir entre la cantidad de agua intracelular y la cantidad de agua que permaneció en el exterior. En forma paralela, en otro tubo se tomó otra alícuota de células ($2-3 \times 10^7$ células) y se incubó por 15 seg con 15 μL de [^3H]-inulina (60 000 cpm). La molécula de [^3H]-inulina es impermeable a las membranas permitiendo hacer una cuantificación del espacio extracelular. El volumen de agua interna se determinó por la siguiente ecuación:

$$\frac{[^3\text{H-H}_2\text{O p.p}]}{[^3\text{H-H}_2\text{O SN}]} = \frac{[^3\text{H-I p.p}]}{[^3\text{H-I SN}]} \times \frac{V_1 \times V_2}{\#cels \times 10^7} = \mu\text{L H}_2\text{O} / 10^7 \text{ células}$$

Donde:

$^3\text{H-H}_2\text{O p.p}$: Radioactividad específica en el precipitado (fase del ácido perclórico) a partir de las células incubadas en $^3\text{H-H}_2\text{O}$. (1827)

$^3\text{H-H}_2\text{O SN}$: Radioactividad específica en el sobrenadante (fase de KME) a partir de las células incubadas en $^3\text{H-H}_2\text{O}$. (25757)

$^3\text{H-I p.p}$: Radioactividad específica en el precipitado (fase del ácido perclórico) a partir de las células incubadas en [^3H]-Inulina. (138)

$^3\text{H-I SN}$: Radioactividad específica en el sobrenadante (fase del ácido perclórico) a partir de las células incubadas en [^3H]-Inulina. (14389)

V_1 : Volumen corregido 1; es un factor de corrección de acuerdo con el volumen tomado de HClO_4 y el volumen de células utilizado. (45)

V_2 : Volumen corregido 2; es un segundo factor de corrección determinado en relación con el volumen de KME tomado de esa capa (1.5).

A continuación se muestra un ejemplo para calcular el volumen intracelular a partir de los números entre paréntesis que corresponden a valores de radioactividad de un experimento típico:

$$\frac{[1827]}{25757} \times \frac{[138]}{14389} \times \frac{44.9 \times 1.5}{2 \times 10^7 \text{ cels.}} = 2.06 \mu\text{L} / 10^7 \text{ células}$$

DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA INTRAMITOCONDRIAL

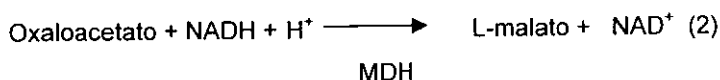
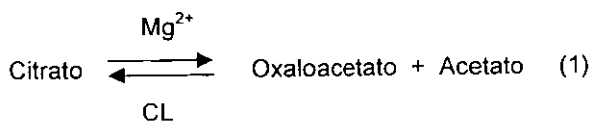
El volumen de agua interno en las mitocondrias de *Euglena gracilis* se midió siguiendo una modificación del método utilizado para la medición del volumen intracelular debido a que es más difícil separar las mitocondrias mediante el uso de un gradiente. En este caso, las mitocondrias (2-3 mg) fueron incubadas a 25°C en presencia de ³H-H₂O e [³H]-inulina en tubos separados durante 1 min y 15 seg respectivamente, en un volumen de 400 μL el cual fue complementado con medio KME. Esta suspensión fue transferida a tubos de 0.4 mL, en los cuales una vez hecha una centrifugación a 10 000 x g durante 1 min a 4°C para separar las mitocondrias del medio, la superficie de contacto entre la proteína mitocondrial y el medio es significativamente reducida. Esto permite determinar la distribución de los isótopos empleados en los espacios extracelular e intramitocondrial, disminuyendo la posibilidad de reflujo de los isótopos. El volumen de agua mitocondrial se determinó empleando la fórmula descrita para el volumen intracelular. En este caso, los sedimentos resultado de la centrifugación (³H-H₂O p.p y [³H]-I p.p), fueron resuspendidos mediante agitación vigorosa en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 2% para poder detectar la distribución del isótopo.

DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DEL CICLO DE KREBS

Citrato: Determinación con Citrato Liasa y Malato Deshidrogenasa

El contenido de citrato en células y mitocondrias de *E. gracilis* a partir de extractos en ácido perclórico se cuantificó en un medio con trietanolamina-HCl (TEA) 0.05 M, MgSO₄ 10 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 5 mM, pH 7.4. Se preparó un estándar de citrato de sodio 10 mM y se diluyó hasta una concentración final de 0.2 mM. La malato deshidrogenasa (5 mg/mL de enzima comercial, actividad específica=1200 U/mg a 25°C), se diluyó 1:5 con agua destilada. La citrato liasa se preparó a 20 mg/mL a partir de la enzima comercial a 0.48 U/mg (actividad específica ≥ 0.25 U/mg en la enzima liofilizada a 25°C con citrato como sustrato) en un amortiguador de TEA 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 6%, ZnCl₂ 0.04%, pH 7.6 (Williamson y Corkey. 1969).

La citrato liasa (CL) cataliza la ruptura del citrato a oxaloacetato y acetato de acuerdo con la siguiente reacción (1):



La constante de equilibrio de la reacción de la CL es 1.56 M a favor de la síntesis de citrato. Esta reacción está acoplada a la malato deshidrogenasa (MDH) (2) para la remoción cuantitativa del oxaloacetato. La concomitante disminución en la fluorescencia del NADH puede ser monitoreada en un fluorómetro a 340 nm o ser medida espectrofotométricamente por el cambio en la densidad óptica a 340 nm (Figura 1).

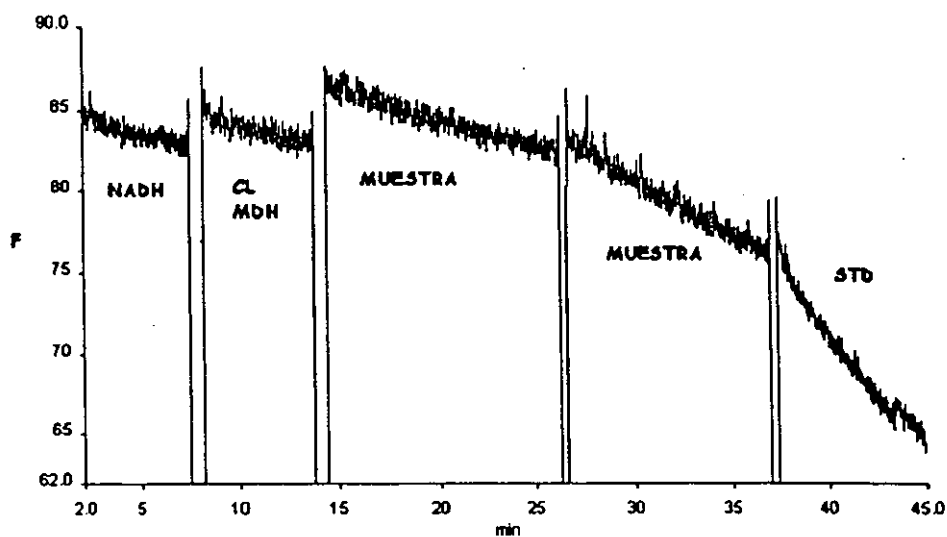


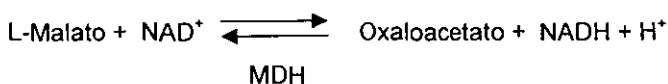
Figura 1.- Trazo del fluorómetro representativo de una medición de citrato. La señal se obtuvo mediante la adición de NADH al medio de incubación (340 nm), después se adicionaron las enzimas citrato liasa (CL) y malato deshidrogenasa (MDH). Cuando se adicionó la muestra (10-20 μL) se obtuvo una disminución de la fluorescencia y este cambio se cuantificó mediante la adición de una cantidad conocida de citrato (estándar).

El ensayo se realizó mediante la adición del 10 μL de CL en 2 mL del medio de incubación que contiene también 5 μL de MDH y 10 μL de NADH 2 mg/mL (aproximadamente 2.25 mM); se dejó un intervalo de 1-2 minutos para calibrar la señal, después se adicionó 10 μL del estándar de citrato 0.2 mM (la concentración real del estándar de citrato fue de aproximadamente 0.18 mM). Después de que el citrato ha sido transformado se debe alcanzar una nueva línea basal; cuando se agrega por segunda vez la misma cantidad de sustrato se debe obtener el mismo cambio de fluorescencia (Figura I). Los cambios en la fluorescencia del NADH fueron cuantificados realizando una curva de concentración en un espectrofotómetro a 340 nm; una vez conocida la concentración del "stock" de NADH se puede determinar el contenido de citrato tomando en cuenta que la desaparición de una molécula de NADH equivale a la ruptura de una molécula de citrato.

MALATO: Determinación con Malato Deshidrogenasa

El contenido de malato se determinó en un medio que contiene hidrato de hidrazina 0.4 M, glicina 0.5 M, pH 9.5. Se preparó un estándar de malato 0.2 mM, pH 6.5. Para el ensayo se usaron 10 μL (60 U) de malato deshidrogenasa comercial (5 mg/mL, actividad específica = 1200 U/mg a 25°C con oxaloacetato como sustrato) y 10 μL de NAD⁺ 120 mM (1.2 μmoles) en 2 mL del medio de incubación (Williamson y Corkey, 1969).

La malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del L-malato a oxaloacetato en presencia de NAD⁺ de acuerdo con la siguiente reacción:



El equilibrio de la reacción está desplazado en gran medida a la izquierda bajo condiciones termodinámicas estándar, pero puede favorecerse la formación de NADH mediante la remoción de los productos de la reacción. Un medio alcalino es usado para disminuir la concentración de H⁺ y el oxaloacetato es atrapado como un derivado de hidrazona. El concomitante incremento en la fluorescencia del NADH puede ser monitoreado en un fluorómetro a 340 nm de excitación y 460 nm de emisión. El ensayo se inicia con la adición de la MDH, se deja un intervalo de 1-2 minutos para obtener una línea basal y se adiciona 10 μL del estándar de malato o de 20-100 μL de la muestra con lo cual se detecta un aumento en la fluorescencia (Figura II). La concentración de malato en las muestras se determina a partir de una curva de concentración de NADH siguiendo el mismo procedimiento empleado para la determinación de citrato.

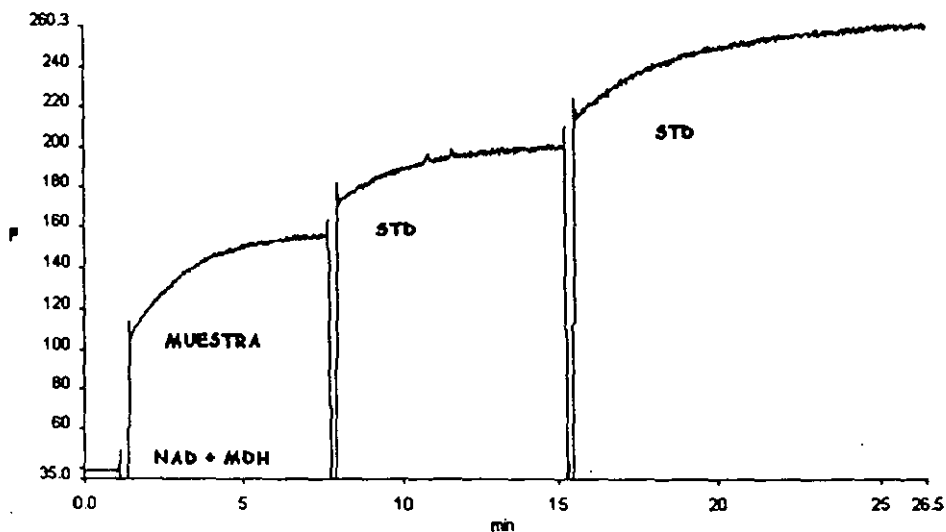


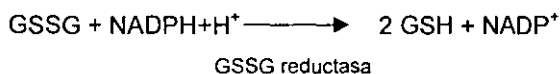
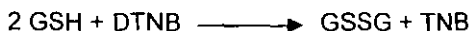
Figura II.- Trazo del fluorómetro representativo de una medición de malato. Inicialmente se adicionó al medio de incubación la enzima malato deshidrogenasa (MDH) y NAD. Al agregar la muestra se obtuvo un incremento de la fluorescencia debida a la aparición de NADH. El contenido de malato en esas muestras (10-20 μ L) se calculó a partir del cambio de fluorescencia promovido por una cantidad conocida de malato.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE CITRATO SINTETASA

La actividad de esta enzima fue monitoreada por la aparición del grupo -SH de la coenzima A (CoASH) liberada (Srere, 1969). El método se basa en la medición del grupo -SH de la CoASH mediante el uso del reactivo de Ellman [ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico), DTNB] que reacciona con grupos tioles. La reacción puede seguirse a 412 nm donde el TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) absorbe fuertemente ($\epsilon = 13,600 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El rango de pH para la medición es de 7.4-9.0. La cubeta para el ensayo contiene DTNB 0.1 mM, acetilCoA 0.3 mM, oxaloacetato 0.5 mM disuelto en Tris-HCl 0.1 M y Tritón X-100 0.01% (p/v); esta solución se preparó fresca para cada experimento. La actividad de la enzima se midió en mitocondrias aisladas frescas (30-50 μ g) y la reacción se inició mediante la adición de oxaloacetato.

DETERMINACION DE GLUTATION POR METODO ENZIMATICO

Esta medición se realizó mediante un ensayo de reciclaje para el glutatión total (GSH + GSSG, en equivalentes de GSH). En esta técnica, el GSH es oxidado por DTNB para generar GSSG + TNB. El GSSG es reducido a GSH por acción de la glutatión reductasa y NADPH. La velocidad de formación de TNB fue monitoreada espectrofotométricamente a 412 nm y es proporcional a la suma de GSH y GSSG presentes (Anderson, 1985).



El medio consiste de Na_2HPO_4 143 mM y $\text{Na}_4\text{-EDTA}$ 6.3 mM, pH 7.5. El NADPH se adicionó fresco al medio antes mencionado (0.248 mg/mL). A 700 μL de medio se adicionaron 100 μL de DTNB 6.3 mM y 200 μL de agua destilada menos el volumen del estándar utilizado (10 μL de un estándar de GSH 100 μM equivalente a 1 nmol de GSH), menos el volumen de muestra extraída en ácido perclórico y posteriormente neutralizada a pH 7.5.

DETERMINACION DE CISTEINA, GLUTATION Y TIOLES INDUCIDOS POR CADMIO

Los compuestos que contienen grupos -SH, como son cisteína, glutatión y tioles orgánicos inespecíficos inducidos por el cadmio, fueron determinados a partir de extractos en ácido perclórico. Se tomó una alícuota de células y/o mitocondrias ($1-2 \times 10^7$ células y/o 5-8 mg proteína, respectivamente), se añadió HClO_4 a una concentración final del 3% en 2 mL aforados con el medio KME y se agitó vigorosamente en un vórtex durante 45 seg. Esta suspensión se centrifugó a 1000 x g durante 5 min y se tomó una alícuota del sobrenadante ácido para las determinaciones pertinentes.

Estas muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa, utilizando una derivatización post-columna de acuerdo con el método de Grill y col (1987). Los compuestos con grupos -SH fueron separados en una columna analítica Waters C-18 Spherisorb S5 ODS2 de 4.6 mm x 150 mm (Waters PSS 831913). Previo a la inyección de las muestras, la columna fue equilibrada en H_3PO_4 0.05% (v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} . Se inyectó una alícuota de 50 μL del extracto ácido y se analizó en un gradiente lineal de 1-20% de acetonitrilo en H_3PO_4 0.05% (v/v) durante 50 min. Los compuestos con grupos -SH fueron

detectados por derivatización post-columna con el reactivo de Ellman, 0.1 mM de DTNB a 412 nm mediante el uso de un detector de absorbancia Waters 2487. La presión total a la que se realizó la cromatografía fue de aproximadamente 3600 PSI. Los picos obtenidos fueron integrados manualmente utilizando el programa de computación Reporter (2) provisto por Waters.

RESULTADOS

CURVAS DE CRECIMIENTO

En los cultivos con lactato (L, ZL) como fuente de carbono, la densidad fue de $4 \pm 0.65 \times 10^6$ células/mL a las 96 horas de cultivo (Figura 1C). Este crecimiento se inhibió un 11% por la preexposición de las células a HgCl_2 1.5 μM ($3.5 \pm 0.3 \times 10^6$ células/mL, ZL-Hg, Figura 1 D). Los cultivos con glutamato + malato (G+M, Z) alcanzaron una densidad de $6 \pm 0.8 \times 10^6$ células/mL aproximadamente a las 96 horas el desarrollo. Las células presentaron un tiempo de duplicación o generacional de aproximadamente 12 horas durante la fase exponencial del crecimiento; todos los cultivos fueron iniciados con un inoculo de 0.2×10^6 células, por lo tanto, bajo esta condición las células crecieron por 5 generaciones (Figura 1 A). Cuando las células fueron preexpuestas a 1.5 μM de HgCl_2 durante al menos 60 generaciones (Z-Hg), la densidad alcanzada fue de $5.1 \pm 0.7 \times 10^6$ células/mL, aproximadamente 15% menor con respecto a Z, aunque no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (Figura 1 B). La viabilidad celular determinada con azul de tripano en todos estos casos osciló entre el 96 y 98%.

Glutamato y malato se usan frecuentemente en conjunto como fuente de carbono en un medio ácido, aunque el glutamato por sí solo puede soportar el crecimiento de *Euglena*. Al parecer estos sustratos son utilizados rápidamente durante la fase exponencial del crecimiento (0-96 h, Figura 1 A y 1 B) como fuente de carbono, nitrógeno y energía. Se ha determinado que en la fase logarítmica las células muestran un volumen celular constante (Buetow, 1989).

En *Euglena* se ha encontrado una glutamato deshidrogenasa NADP-específica (Tokunaga y col, 1979), que a diferencia de lo encontrado en otros organismos, en los cuales es una enzima marcadora de mitocondria, en *Euglena* es una enzima localizada únicamente en el citoplasma. El significado de la localización de esta enzima en *Euglena* no se ha dilucidado.

El crecimiento en lactato mostró el mismo tiempo de duplicación que en G+M, a pesar de que la fase logarítmica en este caso fue más corta y alcanzaron una densidad final menor. *Euglena* presenta una lactato deshidrogenasa mitocondrial que provee de electrones en forma directa a la cadena respiratoria (Moreno-Sánchez y col, 2000). Se ha propuesto que la oxidación de lactato en la mitocondria de *Euglena* puede ocurrir a través de la vía clásica (citocromos bc₁ y aa₃), o a través de una ruta alterna por lo que esta enzima tiene un papel importante en la oxidación de lactato, aún cuando existan condiciones de estrés.

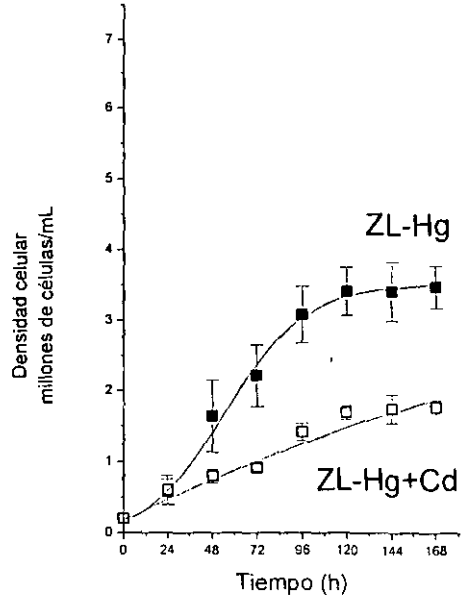
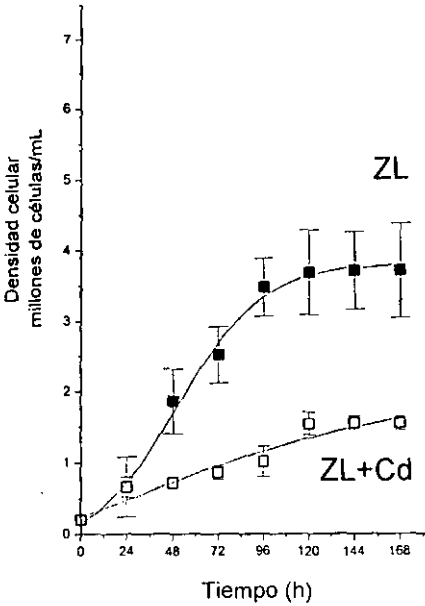
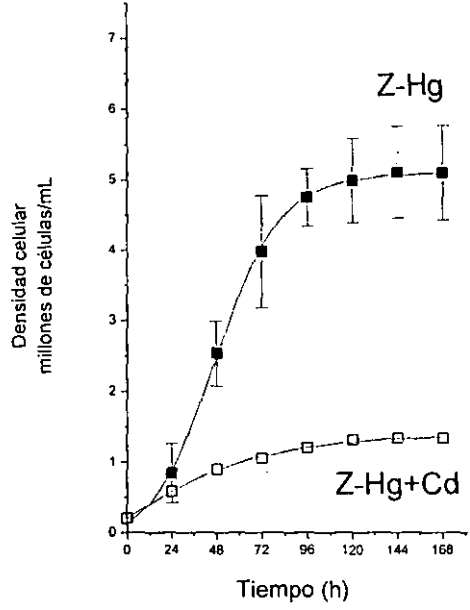
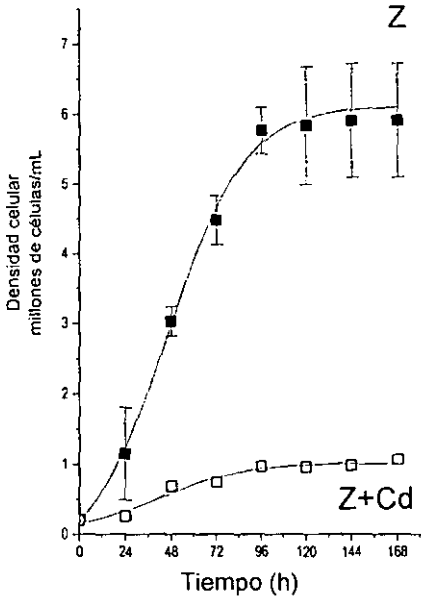


Figura 1.- Curvas de crecimiento de *Euglena gracilis* con y sin preexposición a Hg^{2+} 1.5 μM , en ausencia y presencia de Cd^{2+} 100 μM . Los puntos representan la media \pm desviación estándar (n=5).

En cultivos iniciados en presencia de CdCl_2 100 μM , el crecimiento celular se inhibió significativamente en todos los casos. En el cultivo Z + Cd (G+M) el cadmio inhibió el crecimiento en un 82% con respecto al control (1.06 ± 0.08 vs. $6 \pm 0.8 \times 10^6$ células/mL, Figura 1 A). Cuando las células fueron preexpuestas a HgCl_2 , la inhibición del crecimiento por efecto del cadmio fue ligeramente menor del 70% (1.3 ± 0.1 en Z-Hg + Cd vs. 5.1 ± 0.7 en Z-Hg, Figura 1 B). En ZL + Cd el crecimiento fue de $1.55 \pm 0.1 \times 10^6$ células/mL (Figura 1C), la inhibición del crecimiento fue del 60%. ZL-Hg + Cd fue la condición en la que el cadmio resultó menos tóxico, ya que el crecimiento se inhibió sólo un 50% (1.8 ± 0.1 vs. $3.5 \pm 0.3 \times 10^6$ células/mL, Figura 1 D). Con respecto a las células cultivadas en G+M, la viabilidad celular en Z + Cd y Z-Hg + Cd, fue del 78 y 80% respectivamente. Con respecto a los cultivos con lactato como fuente de carbono, la viabilidad celular fue de 88% en ZL + Cd y 92% en ZL-Hg + Cd.

ACUMULACIÓN DE CADMIO EN CELULAS Y MITOCONDRIAS

Se determinó también el contenido de cadmio en *Euglena* en las condiciones descritas en la Fig 1. La remoción del metal del medio fue de aproximadamente un 10%. En el cultivo Z + Cd, se obtuvo una acumulación de 122 ± 12 nmoles Cd/ 10^7 células (Tabla 1). Cuando las células fueron preexpuestas a mercurio y cultivadas con Cd^{2+} 100 μM (Z-Hg + Cd), ocurrió una disminución en la acumulación del metal. En este caso, el mercurio no induce algún mecanismo que le permita a la célula ser más resistente al cadmio y acumularlo en mayor proporción.

Tabla 1.- Acumulación de Cd^{2+} en células y mitocondrias de *Euglena gracilis*.

Cultivo	Células (nmoles/ 10^7 cels)	Células (mM)	Mitocondrias (nmoles/mg prot)	Mitocondrias (mM)
Z	122 ± 12	19 ± 2	82 ± 6	117 ± 9
Z•Hg ²⁺	93 ± 5	14 ± 1	73 ± 5	81 ± 6
ZL	105 ± 3^a	24 ± 1	90 ± 2^b	112 ± 3
ZL•Hg ²⁺	160 ± 10^a	33 ± 2	124 ± 3^b	155 ± 4

Los valores fueron determinados en células completas lavadas con EGTA 2 mM, o bien en mitocondrias aisladas a partir de cultivos con 100 μM de CdCl_2 . Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=3). a, b= $P < 0.05$ (ZL vs. ZL•Hg²⁺). La concentración de Cd se calculó a partir del volumen intracelular e intramitochondrial (tablas 2 y 7, respectivamente)

En las células cultivadas con lactato y expuestas a cadmio (ZL + Cd), la acumulación fue del mismo orden que en los cultivos con G+M (Tabla 1); sin embargo, en las células preexpuestas a mercurio (ZL-Hg + Cd), la acumulación del metal se incrementó significativamente con respecto a lo

determinado en el cultivo ZL + Cd. Este aumento en el contenido de cadmio expresado en nmoles/10⁷ células, también se reflejó en una mayor concentración intracelular (Tabla 1).

De acuerdo con estudios previos en algas verdes, los principales efectos del cadmio se presentan en mitocondrias y cloroplastos (Silverberg, 1976., Nagel y col. 1996). Dado que los cultivos de *E. gracilis* son heterotróficos y los cloroplastos están ausentes, un punto importante fue determinar si el cadmio puede estar compartimentalizado en la mitocondria y por ello, parámetros como la respiración se encuentren afectados. Un primer paso fue determinar la acumulación del cadmio en las mitocondrias.

No hubo cambios notorios en la acumulación del metal en ese organelo por la preexposición de las células a mercurio y cultivadas en glutamato + malato cuando los valores se expresan en acumulación de Cd por mg de proteína (Tabla 1), pero cuando este valor se calculo a partir del volumen intranmitocondrial (tabla 7), se observaron cambios apreciables en dicha acumulación (tabla 1). Con lactato se observó también un incremento significativo en la acumulación del metal en mitocondrias aisladas de células preexpuestas a mercurio (Tabla 1). El contenido de cadmio en la fracción mitocondrial representa aproximadamente el 50% del cadmio total en la célula. Este valor fue estimado tomando en cuenta la actividad de TMPD oxidasa recuperada en las mitocondrias aisladas a partir del homogenado celular, así como el contenido de cadmio en dicho homogenado y el contenido de cadmio en las mitocondrias aisladas.

RESPIRACION MITOCONDRIAL

La función más importante de la mitocondria es la oxidación de sustratos endógenos y el aporte de ATP a la célula. Con el objetivo de evaluar los efectos del cadmio *in vitro* sobre la actividad respiratoria, se aislaron mitocondrias de *Euglena* a partir de cada una de las condiciones mencionadas y se midió el efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre algunos parámetros bioenergéticos como son el control respiratorio y la relación ADP/O (Figuras 2 y 3), los cuales nos permiten determinar el estado de acoplamiento entre la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa. El control respiratorio se estima a partir de la adición de ADP limitante al medio de respiración, el ADP estimula el consumo de oxígeno (Estado 3 de la respiración). El mayor consumo de oxígeno en esta condición se debe a la fosforilación del ADP y a un incremento en la oxidación del sustrato. El ADP/O es un parámetro que indica la estequiometría y el grado de acoplamiento de la mitocondria para que se realice la síntesis de ATP a partir de un sustrato específico. Este valor se determinó del consumo extra de oxígeno y la cantidad de ADP añadido al medio.

El control respiratorio en mitocondrias de la cepa Z (Figura 2A), no se afectó significativamente con Cd²⁺ 1 µM o 10 µM. Con cadmio 100 µM el control respiratorio desapareció

cuando el sustrato fue succinato, con lactato el control respiratorio fue de 1.4 y de 1.2 con TMPD. El control respiratorio desaparece por completo cuando se exponen las mitocondrias a Cd^{2+} 1 mM *in vitro* (Figura 2A).

En mitocondrias aisladas del cultivo Z-Hg se obtuvo un comportamiento similar, la respiración fue más sensible al cadmio cuando se utilizó succinato como sustrato oxidable (Figura 2B). Utilizando lactato y TMPD fue todavía posible determinar un control respiratorio en presencia de Cd 100 μ M.

En mitocondrias aisladas de células cultivadas en lactato (ZL) se determinó la misma velocidad de respiración en estado 3 comparada con Z (282 ± 56 en Z vs. 280 ± 56 ngAtomO/min/mg en ZL), utilizando lactato como sustrato. Las mitocondrias ZL son menos susceptibles al cadmio *in vitro*. En presencia de cadmio 1 mM, aunque el control respiratorio fue abatido en un 75%, no desapareció, es decir que hubo transición entre el estado 3 y el 4. En mitocondrias Z y Z-Hg no se presentó esta transición (Figura 2B). Esta misma tendencia se obtuvo en mitocondrias de ZL-Hg (Figura 2D). En todos los casos la respiración en presencia de succinato fue la más susceptible a ser inhibida por cadmio *in vitro*.

El cociente ADP/O determinado en presencia de lactato fue de 1.06 ± 0.09 , para succinato fue de 1.3 ± 0.1 y para TMPD 1 ± 0.01 en mitocondrias Z (Figura 3A). En general para los diferentes tipos de mitocondrias se obtuvieron valores semejantes de este parámetro cuando no fueron expuestas a cadmio. La relación ADP/O se mantuvo alrededor de 1 en mitocondrias Z cuando se adicionó cadmio 100 μ M al medio. Este parámetro desapareció cuando se midió la respiración en presencia de cadmio 1 mM; la respiración soportada por succinato y TMPD fue más sensible que con lactato a cadmio (Figura 3A). En mitocondrias Z-Hg respirando TMPD y expuestas a 100 μ M de cadmio *in vitro* todavía fue posible determinar el cociente ADP/O (Figura 3B).

Fue sorprendente encontrar que en las mitocondrias ZL y ZL-Hg (Figuras 3C y 3D) la relación ADP/O utilizando lactato como sustrato se mantuvo alrededor de 1, aun cuando estas fueron expuestas a cadmio 1 mM. En presencia de TMPD también se observó una menor inhibición de la respiración y por lo tanto todavía fue posible calcular el cociente ADP/O, específicamente en la condición ZL-Hg (Figura 3D).

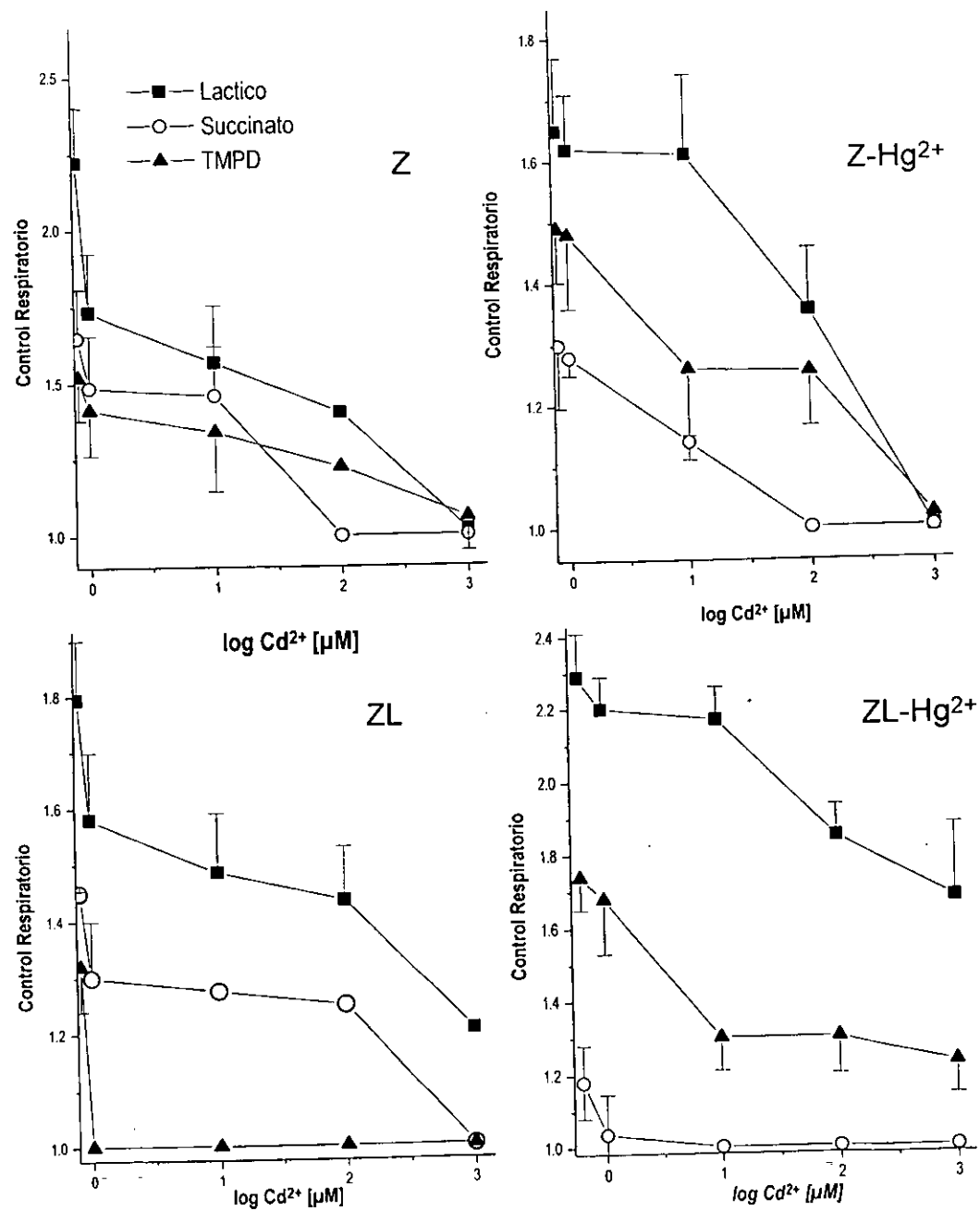


Figura 2.- Control respiratorio en presencia de diferentes sustratos de mitocondrias aisladas de células Z, Z-Hg²⁺, ZL y ZL-Hg²⁺ de *Euglena gracilis*. Los puntos representan la media ± desviación estándar (n=3).

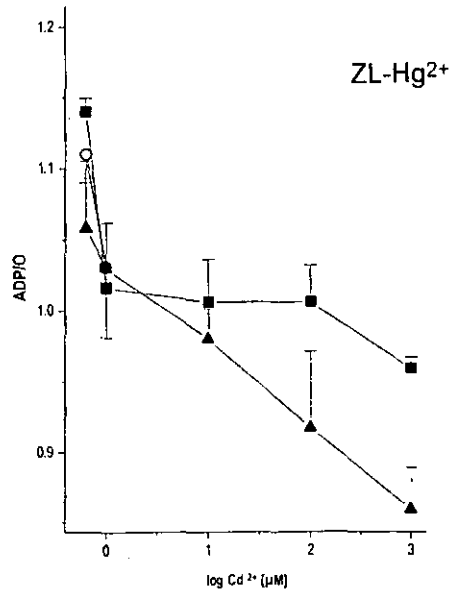
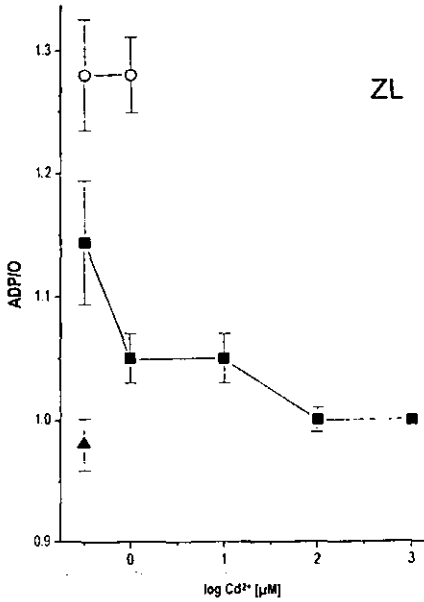
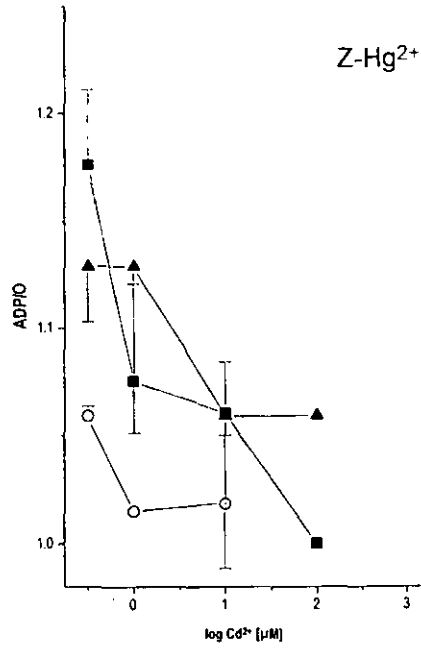
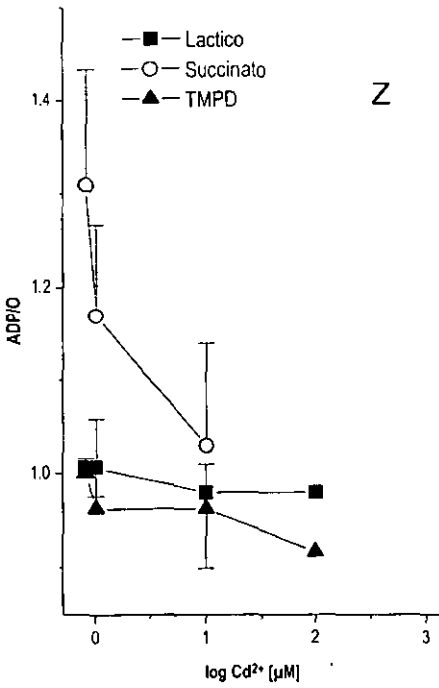


Figura 3.- Relación ADP/O en mitocondrias aisladas de células Z, Z-Hg²⁺, ZL y ZL-Hg²⁺ de *Euglena gracilis* en presencia de diferentes sustratos. Los puntos representan la media \pm desviación estándar (n=3).

DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN INTRACELULAR DE AGUA

Para determinar si los cambios en el contenido de metabolitos correlacionan con un cambio en la concentración intracelular, se determinó el volumen intracelular de agua en cada condición (Tabla 2). Cuando las células de *E. gracilis* expuestas a cadmio fueron observadas al microscopio es evidente que presentan un mayor tamaño con respecto a las células control. De acuerdo con nuestras determinaciones no existen diferencias significativas en el volumen intracelular de *Euglena* cuando se cultivó con diferente fuente de carbono en ausencia de cadmio (Tabla 2). El volumen intracelular de células cultivadas en presencia de cadmio 100 μM se incrementó aproximadamente 2.5 veces (Tabla 2).

Tabla 2.- Volumen intracelular de células de *Euglena gracilis* en cultivos control (-Cd) y expuestos a Cd (100 μM).

Cultivo	- Cd ²⁺ ($\mu\text{L}/10^7$ células)	+ Cd ²⁺ ($\mu\text{L}/10^7$ células)
Z	2.4 \pm 0.4	6.3 \pm 1.7
Z•Hg	2.6 \pm 1.6	6.8 \pm 0.3
ZL	1.8 \pm 0.3	4.4 \pm 0.4
ZL•Hg	2 \pm 0.8	4.9 \pm 1.4

Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=3).

DETERMINACIÓN DE CITRATO

Una vez conocido el volumen intracelular fue posible establecer con mayor exactitud los cambios en la concentración de metabolitos. Se determinó el contenido de citrato en células y mitocondrias de *Euglena* en cada condición. En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos, que como se esperaba, cambiaron de acuerdo con volumen intracelular.

El contenido de citrato tanto en células cultivadas en G+M, como en lactato, en ausencia de cadmio, fue el mismo, mientras que la preexposición de las células a mercurio no modificó significativamente el contenido de este metabolito (Tabla 3). Aunque pueden observarse cambios en el contenido de citrato en las células cultivadas en G+M cuando estos valores se expresan en nmoles/ 10^7 células, la concentración intracelular no se modificó (Tabla 3). El contenido de citrato en los cultivos en lactato aumentó cuando las células fueron expuestas a cadmio.

Se observaron cambios importantes en el contenido de citrato en mitocondrias aisladas de cultivos expuestos a cadmio. El contenido de este metabolito se incrementó al doble en mitocondrias aisladas del cultivo Z+Cd. Esta tendencia se mantuvo en mitocondrias Z-Hg+Cd con respecto a Z-Hg (Tabla 3). Los cambios fueron más notorios en mitocondrias aisladas de cultivos en lactato. El contenido de citrato en mitocondrias ZL y ZL-Hg aumentó 4-5 veces cuando las células fueron expuestas a cadmio (Tabla 3).

Tabla 3 .- Contenido de citrato en células y mitocondrias de *Euglena gracilis*.

	Cultivo	- Cd ²⁺	+ Cd ²⁺
Células (nmoles/10 ⁷ células)	Z	11 ± 5	35 (2)
	Z•Hg ²⁺	14 ± 1	35 (2)
	ZL	10 (2)	51 (2)
	ZL•Hg ²⁺	9 (2)	39 (2)
Células (mM)	Z	5 ± 2	6 (2)
	Z•Hg ²⁺	5 ± 0.4	5 (2)
	ZL	6 (2)	12 (2)
	ZL•Hg ²⁺	5 (2)	8 (2)
Mitocondrias (nmoles/mg proteína)	Z	23 (2)	41 (2)
	Z•Hg ²⁺	16 (2)	41 ± 4
	ZL	10 ± 2	38 ± 14
	ZL•Hg ²⁺	10 (2)	50 ± 22

Los datos representan la media ± desviación estándar (n).

ACTIVIDAD DE LA CITRATO SINTETASA

Se determinó la actividad de la citrato sintetasa en mitocondrias aisladas de cultivos control y expuestos a cadmio (Tabla 4), para establecer si las variaciones en el citrato se debían a un incremento en la actividad de la enzima que lo sintetiza.

Se encontró que la actividad de esta enzima fue mayor en mitocondrias de cultivos en G+M, la cual aumentó cuando las células fueron expuestas a cadmio. La actividad de la enzima no cambió en el caso de mitocondrias aisladas del cultivo Z-Hg de *Euglena* con y sin cadmio. Aunque la actividad de la citrato sintetasa fue menor en las mitocondrias aisladas a partir de cultivos en lactato, hubo un incremento significativo en la actividad de esta enzima en las mitocondrias ZL-Hg (Tabla 4).

Tabla 4.- Actividad de citrato sintetasa en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis* a partir de cultivos control y expuestos a Cd^{2+} 100 μ M.

Cultivo	- Cd^{2+} (nmoles/min/mg)	+ Cd^{2+} (nmoles/min/mg)
Z	130 \pm 56	280 \pm 95
Z•Hg	147 \pm 31	160 \pm 42
ZL	14 \pm 6	21 \pm 9
ZL•Hg	36 \pm 8 ^a	60 \pm 7 ^a

Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=3). ^aP<0.05.

DETERMINACIÓN DE MALATO

Puesto que el malato representa un ligando potencial del cadmio en la célula, se determinó también su contenido en células y mitocondrias de *Euglena*. El malato aumentó notablemente en células enteras de los cultivos en G+M, mientras que en cultivos con lactato el cadmio no indujo aumentos en el contenido de malato. El contenido de malato en las mitocondrias aisladas en cada condición no tuvo cambios importantes por la exposición de las células a cadmio (Tabla 5). Es poco probable que los incrementos en el contenido de malato se deban a un mecanismo de resistencia inducido por el cadmio. Este sustrato está presente en el medio de cultivo y por ello no podemos determinar con exactitud si el cadmio indujo su síntesis o si sólo fue tomado del medio para quelar al metal en exceso.

Tabla 5.- Contenido de malato en células y mitocondrias de *Euglena gracilis*.

	Cultivo	- Cd²⁺	+ Cd²⁺
Células (nmoles/10 ⁷ células)	Z	3.4 ± 0.7	252 ± 107
	Z•Hg ²⁺	6 ± 2	467 ± 110
	ZL	0.8 ± 0.6	1.2 ± 0.5
	ZL•Hg ²⁺	1.5 ± 0.4	11 ± 9
Células (mM)	Z	1.4 ± 0.3	40 ± 17
	Z•Hg ²⁺	2.3 ± 0.8	69 ± 16
	ZL	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.1
	ZL•Hg ²⁺	0.8 ± 0.2	2.3 ± 1.9
Mitocondrias (nmoles/mg proteína)	Z	2.9 ± 1.7	1.1 ± 0.4
	Z•Hg ²⁺	3 ± 0.8	1.2 ± 1
	ZL	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.1
	ZL•Hg ²⁺	1.2 ± 0.3	0.17 ± 0.04

Los datos representan la media ± desviación estándar (n=3).

DETERMINACIÓN DE GLUTATION

Uno de los mecanismos de resistencia contra cadmio comúnmente encontrados en diversos organismos está relacionado con el metabolismo del glutatión. Se realizó la determinación de este tripéptido mediante un método enzimático en células y mitocondrias de cultivos control y expuestos a cadmio 100 µM. Cuando los resultados son expresados en nmoles/10⁷ células se pueden apreciar cambios importantes en el contenido de este compuesto en todas las condiciones. Sin embargo, cuando se calculó la concentración intracelular del glutatión no hubo tales cambios.

Tabla 6.- Contenido de glutatión en células y mitocondrias de *Euglena gracilis* determinado mediante el método enzimático (Anderson, M. 1985).

	Cultivo	- Cd ²⁺	+ Cd ²⁺
Células (nmoles/10 ⁷ células)	Z	*26 ± 6	86 ± 25
	Z•Hg ²⁺	*23 ± 3	65 ± 7
	ZL	*6 ± 1	54 ± 11
	ZL•Hg ²⁺	*30 ± 6	63 ± 12
Células (mM)	Z	11 ± 3	14 ± 4
	Z•Hg ²⁺	9 ± 1	10 ± 1
	ZL	*3 ± 0.5	12 ± 2.5
	ZL•Hg ²⁺	15 ± 3	13 ± 2
Mitocondrias (nmoles/mg proteína)	Z	*1.8 ± 0.5	13.4 ± 0.9
	Z•Hg ²⁺	*1.06 ± 0.3	7.5 ± 1.1
	ZL	*1.56 ± 0.4	3.65 ± 0.24
	ZL•Hg ²⁺	*2.04 ± 1.05	33.6 ± 9.3

Los datos representan la media ± desviación estándar (n=3). -Cd²⁺ vs. +Cd²⁺ (*)=(p< 0.05).

DETERMINACION DE CISTEINA, GLUTATION Y FITOQUELATINAS POR HPLC

La determinación de tioles por HPLC resultó ser un método muy eficiente para la identificación de glutatión, cisteína y de otros tioles inducidos por el cadmio. Con este método se obtuvieron valores semejantes de GSH a los encontrados por el método enzimático en lo que respecta a muestras que no fueron tratadas con cadmio. La concentración intracelular de GSH aumenta 4 veces en células cultivadas en G+M expuestas a cadmio 100 µM. Se observaron aumentos de la misma magnitud en células de Z-Hg expuestas a cadmio (Tabla 7).

Tabla 7.- Determinación por HPLC de Glutati3n, Cisteina y Tioles (-SH) Inducidos por Cd²⁺ en c3lulas de *Euglena gracilis*.

	Cultivo	- Cd ²⁺ (nmoles/10 ⁷ cels)	- Cd ²⁺ (mM)	+ Cd ²⁺ (nmoles/10 ⁷ cels)	+ Cd ²⁺ (mM)
GLUTATI- ON	Z	18 ± 5 (6)	8 ± 2	221 ± 61 (6)	35 ± 10
	Z • Hg ²⁺	19 ± 6 (4)	7 ± 2	226 ± 58 (5)	33 ± 9
	ZL	27 ± 4 (3)	15 ± 2	296 ± 98 (3)	67 ± 22
	ZL • Hg ²⁺	27 ± 10 (3)	14 ± 5	371 ± 94 (4)	75 ± 19
CISTEINA	Z	35 ± 15 (6)	15 ± 6	344 ± 64 (6)	55 ± 10
	Z • Hg ²⁺	35 ± 17 (4)	13 ± 6	350 ± 74 (4)	52 ± 11
	ZL	16 ± 9 (4)	9 ± 5	275 ± 30 (4)	63 ± 7
	ZL • Hg ²⁺	24 ± 13 (3)	12 ± 7	317 ± 56 (5)	65 ± 11
-SH inducidos por Cd²⁺	Z	0	0	232 ± 32 (5)	37 ± 5
	Z • Hg ²⁺	0	0	241 ± 31 (4)	35 ± 5
	ZL	0	0	187 ± 50 (3)	43 ± 11
	ZL • Hg ²⁺	0	0	149 ± 27 (3)	30 ± 6

Los datos representan la media ± desviaci3n est3ndar (n). La sumatoria de tioles (-SH) (mM) en c3lulas tratadas con cadmio fue: Z=127., Z-Hg= 120., ZL= 173 mM y ZL-Hg= 170 mM.

La concentraci3n intracelular de GSH fue mayor en c3lulas cultivadas en lactato (Tabla 7). Los valores de cisteina encontrados fueron del mismo orden que los del GSH. La concentraci3n de esta mol3cula se increment3 significativamente en todas las condiciones como respuesta de las c3lulas ante la exposici3n al cadmio, aunque no hubo diferencias cuando las c3lulas fueron cultivadas en diferente fuente de carbono y tampoco por la preexposici3n de las c3lulas a mercurio (Tabla 7).

La concentraci3n de cisteina en las c3lulas control se mantuvo alrededor de 13 mM y se elev3 casi 4 veces, es decir alcanza una concentraci3n de aproximadamente 58 mM, tomando un promedio de todas las condiciones, ya que no hay diferencias significativas entre ellas (Tabla 7).

En células control fue posible identificar principalmente dos compuestos en la cromatografía (HPLC): uno correspondiente a la cisteína con un tiempo de retención de 2.58 min y otro correspondiente al GSH con un tiempo de retención de 4.3 min. En extractos de células expuestas a cadmio se detectaron adicionalmente otros compuestos que aún no han sido identificados con los estándares correspondientes, pero que de acuerdo con la literatura representan compuestos que contienen tioles inducidos específicamente por cadmio, y que han sido identificados como fitoquelatinas (Figura 4).

En extractos de mitocondrias aisladas de células expuestas a cadmio se determinaron cambios muy importantes en el contenido de glutatión, cisteína y tioles inducidos por cadmio (Figura 5). Para calcular la concentración de estos metabolitos en este compartimento subcelular, se determinó también el volumen intramitocondrial (Tabla 7). Los datos de estas determinaciones indican que el volumen intramitocondrial en *Euglena* no expuesta a cadmio oscila alrededor de 0.5 $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína, mientras que en mitocondrias de células expuestas a cadmio, este valor se mantuvo alrededor de 0.8 $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína. El volumen de las mitocondrias expuestas a cadmio se elevó, aunque esto no fue un cambio drástico. No se presentaron diferencias en cuanto al volumen intramitocondrial por cultivar a las células con diferente fuente de carbono.

Tabla 7.- Determinación del volumen de agua en mitocondrias aisladas de células de *Euglena*.

CULTIVO	Volumen Intramitocondrial ($\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína)	
	-Cd ²⁺	+Cd ²⁺
Z	0.6	0.7
Z • Hg ²⁺	0.5	0.9
ZL	0.5	0.8
ZL • Hg ²⁺	0.6	0.8

Los datos representan el promedio de 2 repeticiones, el error experimental entre cada repetición fue menor del 10%.

La concentración de GSH en mitocondrias aisladas de células cultivadas en glutamato + malato osciló alrededor de 4 mM, mientras que para mitocondrias provenientes del cultivo ZL este valor fue alrededor de 2 mM. El cambio más importante en GSH fue en el caso de mitocondrias del cultivo ZL-Hg, donde la concentración de este péptido se elevó 16 veces con respecto a las mitocondrias control (Tabla 8).

Tabla 8.- Determinación por HPLC de Glutación, Cisteína y Tioles (-SH) Inducidos por Cd²⁺ en mitocondrias de *Euglena gracilis* (n=2).

	Cultivo	- Cd ²⁺ nmoles/mg prot.	- Cd ²⁺ mM	+ Cd ²⁺ nmoles/mg prot.	+ Cd ²⁺ mM
GLUTATI- ON	Z	2	3.3	6	9
	Z • Hg ²⁺	2	4	18	20
	ZL	1	2	5	6
	ZL • Hg ²⁺	1	1.7	22	27.5
CISTEINA	Z	7.5	12.5	14	20
	Z • Hg ²⁺	8	16	12	20
	ZL	10	20	17	21
	ZL • Hg ²⁺	7	12	18	22
-SH inducidos por Cd²⁺	Z	0	0	65	93
	Z • Hg ²⁺	0	0	55	61
	ZL	0	0	48	60
	ZL • Hg ²⁺	0	0	28	35

El contenido de cisteína en estas condiciones no se modificó significativamente en ninguna de las condiciones una vez que se calculó la concentración intramitocondrial de este aminoácido. También se analizó la presencia de tioles inducidos por cadmio en los extractos de mitocondrias aisladas (Tabla 8). Se obtuvieron aumentos considerables de estos tioles, aunque en este caso tampoco hubo diferencias entre las condiciones estudiadas. Estos datos indican que la presencia de fitoquelatinas en la mitocondria de *Euglena* tiene un papel importante en la resistencia contra el cadmio. La presencia de péptidos que contienen grupos tioles y de otros compuestos con afinidad para atrapar cadmio en este compartimento puede ser de suma importancia para la supervivencia de la célula, ya que es aquí donde se obtiene la energía necesaria para que la célula continúe con sus funciones normales, como es la duplicación.

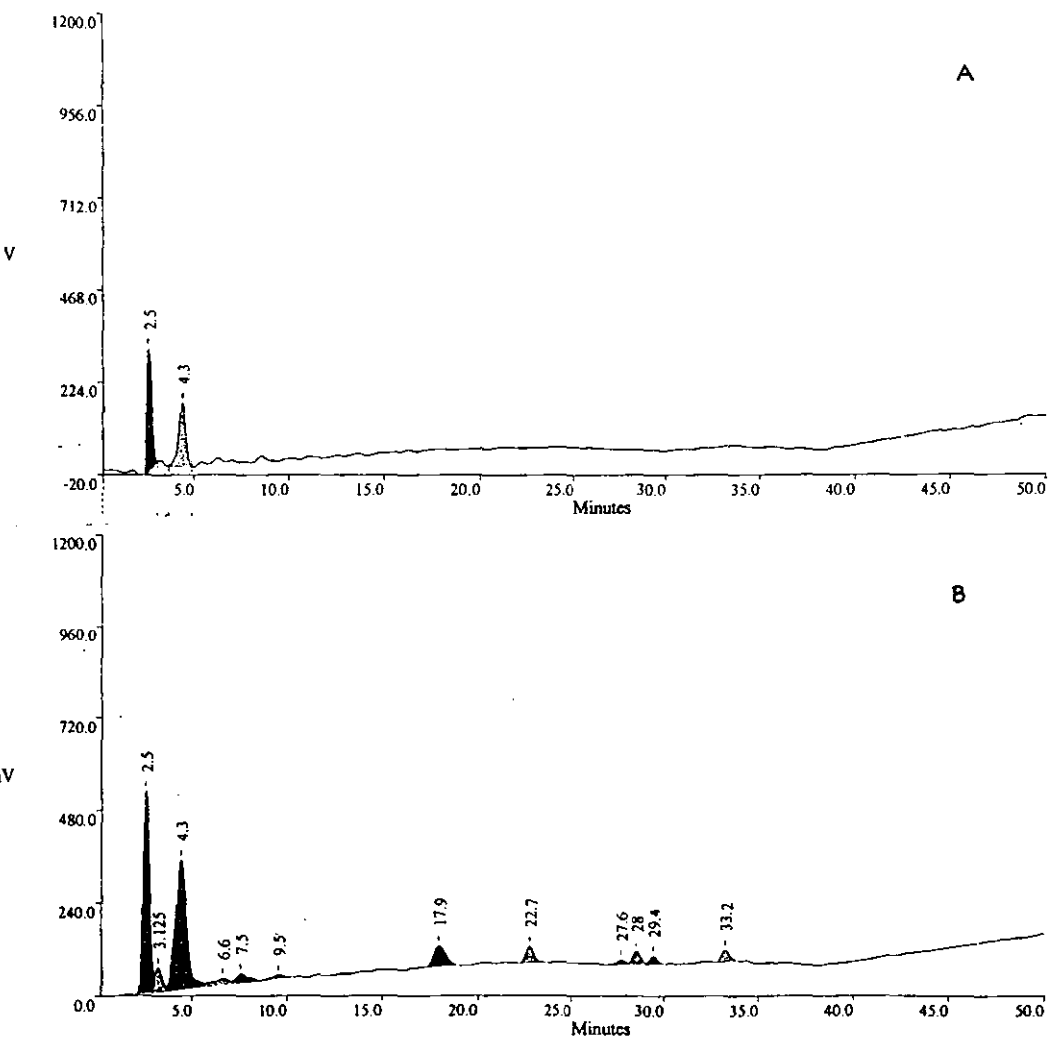


Figura 4.- Cromatogramas de HPLC obtenidos a partir de extractos ácidos de 1.5×10^7 células de *E. gracilis* control (A) y de 1.5×10^7 células expuestas a cadmio $100 \mu\text{M}$ (B). Los picos con un tiempo de retención (TR) de 2.5 minutos corresponden a cisteína y de 4.3 minutos para glutatión. Los picos obtenidos después de estos dos compuestos corresponden a tioles inducidos por cadmio.

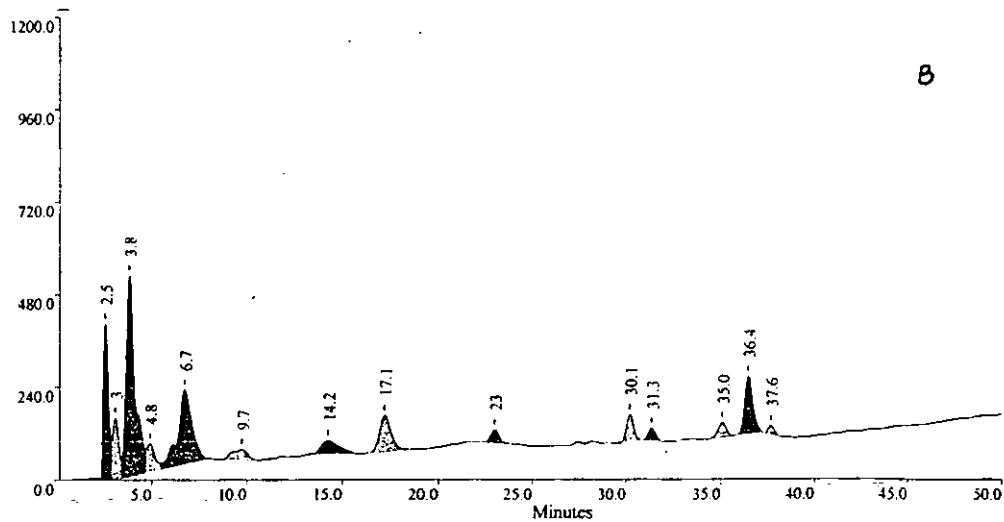
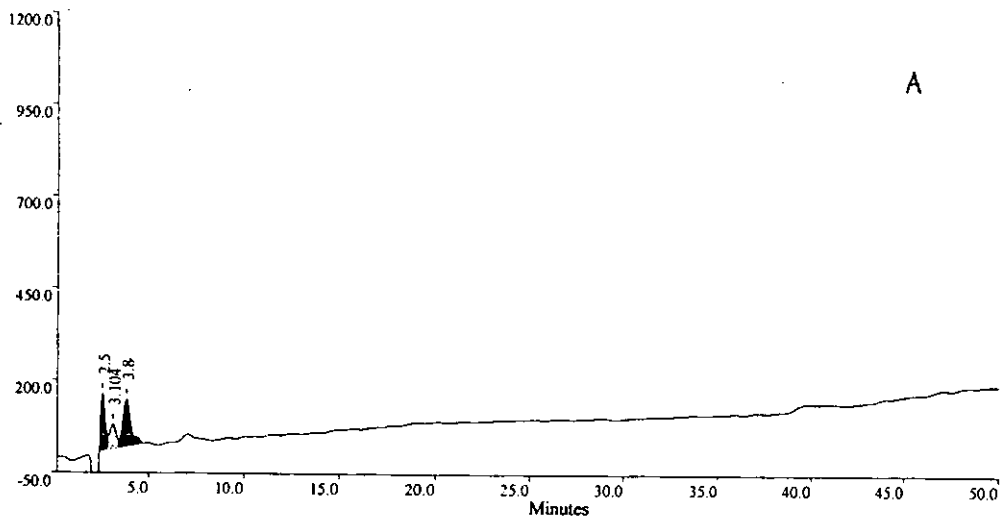


Figura 5.- Cromatogramas de HPLC, obtenidos a partir de extractos ácidos de 8 mg de mitocondrias aisladas de células de *E. gracilis* control (A) y de células expuestas a cadmio (B).

DISCUSION

Los efectos tóxicos del cadmio se relacionan con su unión o bloqueo de los grupos -SH (tioles) esenciales en las células; se conoce, por ejemplo, que el cadmio usurpa los sistemas de transporte de iones esenciales como Zn^{2+} y Ca^{2+} con los cuales compete y puede potencialmente desplazar. Los efectos citotóxicos del cadmio también se relacionan con su unión al DNA (Bonaly y col, 1980). En este último trabajo los autores obtuvieron una cepa fotosintética de *Euglena gracilis* resistente a cadmio 500 μM ; dicha resistencia se reflejó por la aparición de una segunda fase exponencial de crecimiento que permitió a las células resistentes alcanzar la densidad celular del cultivo control, esto ocurrió aproximadamente 15 días después de haber iniciado el cultivo en un medio con lactato. A pesar de que el cadmio detuvo temporalmente la síntesis de DNA, las células adquirieron un mecanismo de resistencia al cadmio que les permitió continuar la síntesis del DNA y por lo tanto su duplicación. En nuestras condiciones, los cultivos de *Euglena* expuestos a cadmio alcanzaron una fase estacionaria después de las 96 horas de incubación. Como la densidad celular solo se midió hasta las 120 horas de incubación, es posible que las células alcancen una segunda fase exponencial después de este período de tiempo y puedan recuperar un crecimiento cercano al de las células control. Este resultado es concebible porque a pesar de que las células acumularon cadmio, la duplicación celular no se detiene y mientras ésta continúe, el cadmio en las células se va también diluyendo en las siguientes generaciones hasta llegar a una concentración no tóxica.

Se ha encontrado que el crecimiento de *Euglena gracilis* se inhibe completamente a una concentración de 5 mM de Cd^{2+} , pero una concentración de cadmio equivalente a 1 μM no tuvo efectos apreciables sobre la fisiología de *Euglena* (Bonaly y col, 1978).

En el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, se encontró que aproximadamente el 50% del cadmio es internalizado en los cloroplastos (Nagel y col, 1996). De acuerdo con nuestros resultados, aproximadamente el 50% del metal total se localiza en la mitocondria, lo cual representa una cantidad considerable del cadmio en la célula, es muy probable que las funciones de este organelo se encuentren alteradas y que por lo tanto este compartimento pueda ser crítico para el desarrollo de los mecanismos de resistencia contra el cadmio, o bien que en la mitocondria se compartimentalicen metabolitos con capacidad de disminuir los efectos tóxicos del cadmio, disminuyendo la concentración del metal libre.

Se ha descrito que el cadmio afecta considerablemente la respiración mitocondrial y que a su vez ocasiona hinchamiento mitocondrial. Los efectos del cadmio son en general debidos a su interacción con los grupos tioles de las proteínas mitocondriales.

Se ha encontrado que la succinato deshidrogenasa (SDH) es altamente sensible a reactivos que modifican grupos tioles (Hopkins y Morgan, 1983) y con base en esto se ha aportado evidencia de

la presencia de grupos sulfhidrilos altamente reactivos en el sitio activo de esta enzima (Jay y col, 1991). En experimentos en los que se estudió el efecto del cadmio sobre el transporte de calcio en la mitocondria, se encontró que la SDH fue particularmente sensible a la acción de este metal (Chávez y col, 1985). Puesto que el cadmio es un catión altamente reactivo con tioles (Vallee y Ulmer, 1972), estos hallazgos son consistentes con el hecho de que los grupos tioles tienen un papel importante en la SDH. En nuestros resultados se encontró una marcada inhibición de la respiración mitocondrial en presencia de succinato como sustrato oxidable (Figura 2); estos resultados sugieren que la unión del metal sucede en un sitio esencial para la catálisis de la enzima y por lo tanto el cadmio induce una pérdida de la actividad.

Evidentemente el cadmio puede unirse a otras enzimas de la cadena respiratoria y causar inhibición en esas actividades; aunque se conoce que el cadmio se une a varios aminoácidos en las proteínas, las constantes de estabilidad indican que la presencia de grupos -SH en los ligandos permiten la formación de complejos con mayor estabilidad, especialmente cuando los grupos -SH se encuentran desprotonados (Vallee y Ulmer, 1972). Las concentraciones de cadmio que se utilizaron en este trabajo son de 2 a 3 órdenes de magnitud mayores a las que se requieren para inhibir el crecimiento en una gran variedad de organismos.

Encontramos que las mitocondrias aisladas de células de *Euglena* cultivadas en lactato muestran una menor sensibilidad al cadmio cuando usan lactato como sustrato durante el ensayo (Figuras 2C, 2D, 3C y 3D). Probablemente las enzimas involucradas en la oxidación del lactato no son afectadas por el cadmio en igual proporción que la SDH, probablemente en esta vía los grupos tioles no tengan un papel clave en la catálisis. El lactato en el medio de cultivo puede ser oxidado en las mitocondrias, alimentando directamente la cadena respiratoria. Por tanto, cuando se utiliza lactato puede ocurrir una mayor producción de radicales libres debido a que este sustrato se oxida directamente en la mitocondria, no así en las mitocondrias obtenidas de cultivos con G+M, donde el glutamato en particular, es oxidado en el citoplasma de *Euglena* y la actividad de las enzimas respiratorias pudiera ser menor. Suponiendo que existe una producción más acelerada de radicales libres en ZL y ZL-Hg, en estas condiciones deben estar aumentados los mecanismos de defensa contra oxidantes; uno de ellos es la producción de glutatión. Cuando las mitocondrias son expuestas a cadmio, el glutatión puede contribuir a amortiguar la acción del metal mediante la formación de complejos GSH-Cd y posiblemente por ello la respiración mitocondrial no se ve afectada como sucede en mitocondrias de Z y Z-Hg.

Nuestros datos sugieren que los mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena* pueden variar dependiendo de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo y que en particular las mitocondrias tienen un papel crítico durante el funcionamiento de dichos mecanismos de resistencia. Lo anterior se sustenta por el hecho de que en los cultivos de *Euglena* expuestos a cadmio, el 50% del metal es internalizado en la mitocondria, siendo que este organelo representa del 16-18% del volumen celular total (Buetow, 1989) y a pesar de esta condición las células pueden continuar su duplicación.

Chávez y col. (1985) han descrito que el Hg^{2+} y el Cd^{2+} inducen hinchamiento mitocondrial, colapso del potencial de membrana y la salida de calcio. El cadmio como ion tiene analogía con el calcio, ambos tienen un radio iónico de 0.97, por lo que es posible que la entrada del cadmio a la célula y a la mitocondria pueda ser a través de los sistemas de transporte de calcio. Se ha descrito que el manganeso, cuyo radio iónico es 0.8, es un inhibidor competitivo de la captación de cadmio y se plantea que tal vez ambos cationes compartan el mismo sistema de transporte. El radio iónico del cadmio también es muy semejante a los de Na^+ y Cu^+ (0.95 y 0.96, respectivamente) y no se descarta que también pueda usurpar los sistemas de transporte de estos iones para internalizarse a la célula. De igual forma, el cadmio podría utilizar el sistema de transporte de entrada a la célula del Zn^{2+} (radio iónico=0.74).

Existen similitudes químicas entre el zinc y el cadmio, puesto que ambos unen grupos tioles de las proteínas, así como a fosfatos, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Vallee y Ulmer, 1972); además, el cadmio puede competir y reemplazar al zinc en algunas enzimas. Falchuk y col (1975) han descrito que los efectos del cadmio y zinc a nivel celular y bioquímico sobre la morfología y la división celular de *Euglena* son los mismos. Este caso es un ejemplo de antagonismo competitivo entre dos metales, el análogo (cadmio) reemplaza al metal biológicamente esencial (zinc) e interactúa o es incorporado a enzimas y proteínas específicas cuya función en la célula es esencial. Por estos antecedentes no es sorprendente encontrar que las células de *Euglena* permitan la entrada inespecífica del cadmio, lo cual probablemente ocasiona un desequilibrio sobre la entrada de otros iones a la célula.

La unión a la pared celular, disminución en la permeabilidad de la membrana plasmática o pared celular a los metales pesados, almacenamiento en vacuolas y organelos, expulsión activa, quelación por metalotioneínas y fitoquelatinas u otros compuestos como malato, citrato, polifosfatos, sulfuro, etc., son los mecanismos de tolerancia a metales que se han descrito en diversos organismos (Reed y Gadd, 1989., De Filippis y Pallaghy, 1994).

Para determinar si estos compuestos están relacionados con mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena*, se realizó la determinación de citrato y de malato tanto en células enteras como en mitocondrias aisladas de cada condición. El cadmio tiene alta afinidad hacia grupos carboxilos, por ejemplo el log de la K_{est} para citrato es de 9.44, para el glutamato es de 4.42, para malato de 2.87 y para el EGTA es de 17.5 (Tabla I, Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999).

Los cultivos con lactato mostraron cambios más notorios en el contenido de citrato tanto en células como en mitocondrias (Tabla 3). Esta fuente de carbono y energía es oxidada en las mitocondrias de *Euglena* y por ello el lactato puede representar una fuente directa para la síntesis del malato mediante el ciclo de Krebs. En los cultivos con G+M, el malato puede también servir como precursor para la síntesis del citrato en el ciclo de Krebs, pero la mayor fuente de carbono y energía

proviene principalmente del glutamato cuyos esqueletos de carbono necesarios para la mitocondria son procesados en el citosol de *Euglena*.

Parte de los cambios en el contenido de citrato en las mitocondrias de *Euglena* pueden deberse a un incremento en la actividad de la enzima que lo sintetiza (citrato sintetasa), o bien a una inhibición en la actividad de las enzimas que metabolizan al citrato (aconitasa). Se ha reportado por ejemplo que la citrato sintetasa de rata es activada significativamente por cadmio en varios tejidos cuando este metal es inhalado. Otras enzimas afectadas por el cadmio bajo esta condición fueron la succinato deshidrogenasa y la citocromo c oxidasa (Prasada Rao y Gardner, 1986).

Nuestros datos indican que el principal mecanismo de resistencia a cadmio en *Euglena* es la inducción de compuestos con grupos tioles, como cisteína, glutatión y fitoquelatinas. Sin embargo, a nivel de célula entera, no ocurren cambios aparentes en la concentración de esos grupos como resultado de haber cultivado a las células en diferente fuente de carbono o por efecto de la preexposición a mercurio. La relación de tioles/Cd, junto con la de citrato/Cd, en todas las condiciones es mayor a 1, es decir que en todos los casos la concentración de estos compuestos es suficiente para quelar al metal en exceso.

Los cambios más importantes a nivel de mitocondria se presentaron en ZL-Hg; donde los niveles de GSH se incrementaron 17 veces por exposición de las células a cadmio con respecto al nivel de GSH determinado en las mitocondrias control. Estos cambios explican en parte la mayor resistencia encontrada en esta condición cuando se determinó el efecto del cadmio sobre la respiración; es probable que cuando el cadmio entra a la célula en estas mitocondrias el mercurio haya inducido algún mecanismo que en esta condición le permitió a la célula responder con mayor eficiencia ante los efectos tóxicos de un segundo metal.

Existen escasos reportes acerca del papel de la mitocondria en los mecanismos de resistencia a cadmio. En *Brassica juncea*, una planta acumuladora de metales pesados, se ha encontrado evidencia de la inducción por cadmio de una isoforma mitocondrial de la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (Schäfer y col, 1998).

En la mitocondria, el GSH es crítico para el mantenimiento de la función celular y mitocondrial. Se ha demostrado que varios tipos de daños químicos están asociados con la depleción u oxidación del GSH mitocondrial más que del GSH citosólico (Meister, 1995). En la mitocondria se ha determinado que el transporte de GSH ocurre a través de un intercambio electroneutro con ácidos dicarboxílicos como malato y succinato (McKernan y col, 1991). Independientemente de la preexposición de las células a mercurio, o de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de *Euglena*, el principal mecanismo que condujo a la destoxificación del cadmio fue la síntesis de compuestos con grupos tioles y la compartimentalización de éstos en la mitocondria.

CONCLUSIONES

Euglena gracilis demostró ser un organismo capaz de desarrollar mecanismos de resistencia contra cadmio cuando las células fueron expuestas al metal. El cadmio inhibió considerablemente el crecimiento de esta alga, pero en el caso del cultivo ZL-Hg, el crecimiento fue menos afectado en comparación con las otras tres condiciones ensayadas. A la dosis de cadmio utilizada (100 μM), la duplicación celular se vio afectada; sin embargo ésta no cesó por completo, lo cual nos sugiere la aparición de mecanismos de resistencia contra este metal.

La remoción de cadmio del medio por *Euglena* fue de aproximadamente el 10%, la reexposición de las células con mercurio en un medio con lactato (ZL-Hg) condujo a una mayor capacidad de acumulación de cadmio. Aproximadamente el 50% del cadmio acumulado en la célula se compartamentalizó en las mitocondrias. Esta acumulación de cadmio correlacionó con un aumento en el volumen intracelular.

En mitocondrias aisladas, el cadmio inhibió considerablemente la respiración soportada por succinato. Este dato apoya los hallazgos ya reportados acerca del bloqueo de los grupos tioles en la SDH que son esenciales para la oxidación de este sustrato respiratorio. La respiración soportada por lactato y por TMPD fue menos sensible a los efectos del cadmio.

Aunque la actividad de la citrato sintetasa fue estimulada por cadmio, el incremento en el contenido de citrato no es suficiente para explicarse como el principal mecanismo de resistencia a cadmio.

El incremento en el contenido de GSH y de tioles inducidos por cadmio (fitoquelatinas) probablemente representa el principal mecanismo de resistencia contra el cadmio a nivel de la célula entera. El GSH fue uno de los compuestos que más se elevaron en respuesta a la intoxicación por cadmio a nivel de mitocondria.

La condición ZL-Hg fue en la que el cadmio inhibió en menor medida el crecimiento celular, en la que se determinó una mayor acumulación tanto en la célula completa como en las mitocondrias, y donde se presentaron los cambios más importantes en el contenido de GSH y citrato mitocondriales. Estos cambios en la mitocondria son los que probablemente condujeron a una mayor resistencia, la cual en parte se debe a la selección de una población de células con mayor resistencia a los metales pesados y en particular al tipo de metabolismo que la célula lleva a cabo al tener al lactato como fuente de carbono.

PERSPECTIVAS

La inducción por cadmio de la síntesis de compuestos con grupos tioles representa el principal mecanismo de resistencia al cadmio en los cultivos de *Euglena gracilis*. En este trabajo sólo se determinó el contenido de estos compuestos en células completas y en mitocondrias aisladas. Un aspecto importante en la dilucidación completa de este mecanismo de resistencia contra el cadmio es lograr la caracterización de las enzimas involucradas en la síntesis de fitoquelatinas, el estadio del transporte y del destino de sus productos en la célula, así como identificar el tipo de complejos en los que finalmente se acumula el cadmio en forma estable y el destino final, o la compartimentalización de estos.

Como ya se sabe, en *Schizosaccharomyces pombe*, el cadmio se almacena en forma de complejos de alto peso molecular (HMW complexes, Esquema 2), que presentan mayor afinidad por cadmio al mantenerlo unido mediante cuatro enlaces de coordinación en los que participa como ligando estabilizador el S^{2-} . Incrementos en la concentración de S^{2-} en *Euglena* expuesta a cadmio apoyarían el hecho de que en este organismo se lleva también a cabo la síntesis de fitoquelatinas y la formación de complejos con mayor capacidad de quelar al metal.

Euglena gracilis es un organismo resistente al cadmio. Aunque en el presente trabajo sólo se exploraron los mecanismos bioquímicos involucrados en la acumulación de cadmio y en la forma en la cual se mantienen secuestrados en la célula, estos estudios son básicos si se pretende utilizar a este organismo con fines de biorremediación de aguas contaminadas por cadmio. Un punto importante para continuar esta investigación es realizar la caracterización bioquímica y molecular de las principales enzimas involucradas en la resistencia. Estos datos nos ayudarían a determinar cuales compuestos y/o enzimas que intervienen en la regulación de esta secuencia de eventos. Con base en esta información, *Euglena* se podría manipular a nivel genético con el fin de obtener una cepa con mayor capacidad biotecnológica de remover cadmio.

REFERENCIAS

- Anderson, M. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 113: 548-551.
- Babich, H., Stotzky, G. (1978). Efectos of cadmium on the biota: Influence of environmental factors. *Adv. Appl. Microbiol.* 23: 55-117.
- Bonaly, J., Bariaud, A., Delcourt, A., Mestre, J. C. (1978). Les effets des ions Cd^{2+} sur les cellules d'*Euglena gracilis*: Cytotoxicité et acquisition d'une résistance.- C.R. Acad. Sci. (Paris) D 287: 463-466. En: Bonaly y col, 1980.
- Bonaly, J., Bariaud, A., Duret, S., Mestre, J. C. (1980). Cadmium citotoxicity and variation in nuclear content of DNA in *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 49: 286-290.
- Buetow, D. E. (1982). The biology of *Euglena*. Volume III. Academic Press.
- Buetow, D. E. (1989). The biology of *Euglena*. Volume IV. Academic Press.
- Calvayrac, R. Relation entre les substrats, la respiration et la structure mitochondriale chez *Euglena gracilis* (Z). *Arch. Mikrobiol.* 73: 308-314; 1970
- Carr, H. P., Cariño, F. A., Yang, M. S., Wong, M. H. (1998). Characterization of the cadmium-binding capacity of *Chlorella vulgaris*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 433-440.
- Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R. (1999). Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos. A.G.T. Ediciones. Cap 2, p. 12.
- Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., Jay, D. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 493-497.
- Coppellotti, O. (1989). Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C: 35-40.
- De Fillipis, L. F., Pallaghy, C. K. (1994). Heavy metals: Sources and biological effects. En: Rai, L. C., Gaur, J. P., Soeder, C. J. Eds. *Advances in limnology series: Algae and water pollution*. Cap 2, p. 31-77. E. Schweizerbart'sche Press, Stuttgart.
- De Knecht, J. A., Van Baren, N., Ten Bookum, M. W., Wong Fong Sang, H. W., Koevoets, P. L. M., Schat, H., Verkleij, J. A. C. (1995). Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant. Sci.* 106: 9-18.
- DeFilippis, L. F., Hampp, R., Zeigler, H. (1981). The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena* growth and pigments. *Z. Pflanzenphysiol.* 101: 37-47.
- Devars, S., Torres-Marquez, E., Gonzalez-Halphen, D., Uribe, A., Sánchez-Moreno, R. (1992). Cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. *Plant. Sci.* 82: 37-46.
- Diaz-Barriga, F. (1991). En: Cervantes y Moreno-Sánchez (1999).
- Falchuk, K. H., Fawcett, D. W., Vallee, B. E. (1975). Competitive antagonism of cadmium and zinc in the morphology and cell division of *Euglena gracilis*. *J. Submicr. Cytol.* 1: 139-152.

- Galvão, A. C. L., Corey G. 1987. Cadmio, serie vigilancia No. 4. Centro panamericano de ecología humana y salud. p 1-5.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 77: 751-766.
- Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 439-443.
- Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H. (1985). Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science.* 230: 674-676.
- Grill, E., Winnacker, E-L., Zenk, M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific χ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthetase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6838-6842.
- Highman, D. P., Sadler, P. J. Schawen, M. D. (1984). Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science.* 225: 1043-1046.
- Highman, D. P., Sadler, P. J. Schawen, M. D. (1985). Cadmium resistance in *Pseudomonas putida*: growth and uptake of cadmium. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2539-2544.
- Hopkins, F. G., Morgan, E. J. (1938). *Biochem. J.* 32: 1829-1848. En: Jay, D. y col. (1991).
- Hutton, M. (1983). Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7: 9-24.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1982). En: Inui y col. 1984.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1984). Occurrence of oxygen-sensitive, NADP⁺ - dependent pyruvate dehydrogenase in mitochondria of *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 96: 931-934.
- Iverson, W. P., Brinckman, F. E. (1978). En: Trevors y col. 1986.
- Jay, D., Zamorano, R., Muñoz, E., Gleason, R., Boldu, J-L. (1991). Study of the interaction of cadmium with membrane-bound succinate dehydrogenase. *J. Bionerg. Biomemb.* 23 (2): 381-389.
- Kaplan, D., heimer, Y. M., Abelovich. A., Goldsborg, P. B. (1995). Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella sp.* *Plant Science.* 109: 129-137.
- Kempner, E. S. Stimulation and inhibition of metabolism and growth of *Euglena gracilis*. En: Buetow, D. E. *The biology of Euglena (Volume III)*. New York: Academic Press; 1982: 197-252.
- Laddaga, R. A., Silver, S. (1985). Cadmium uptake in *Escherichia coli*. K-12. *J. Bacteriol.* 162: 1100-1105.
- Li, Z.-S, Lu, Y.-P., Zhen, R.-G., Szczycka, M. Thiele, D. J., Rea, P.A. (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 42-47.
- Martell, A E. 1975. The influence of natural and synthetic ligands on the transport and function of metal ions in the environment. *Pure. Appl. Chem.* 44: 81-113.
- McKernan, T. B. Woods, E. B., Lash, L. H. (1991). En: Meister, A. 1995.

- May, M. J., Vernoux, T., Sánchez-Fernández, R., Montagu, M. V., Inzé, D. (1998). Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. Proc. Natl. Acad. sci. USA. 95: 12049-12054.
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. Meth. Enzymol. 251: 3-31.
- Merian, E. (1991). Metals and their compounds in the environment: Occurrence analysis and biological relevance. VCH Verlagsgesellschaft mbH Editors. Cap. II.6, p. 804.
- Moreno-Sánchez, R., Raya, J.C. (1987). Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. Plant Sci. 48: 151-157.
- Nagel, K., Adelmeir, U., Voigt, J. (1996). Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Plant Physiol. 149: 86-90.
- Nakano, Y., Okamoto, K., Toda, S., Fuwa, K. (1978). Toxic efectos of cadmium on *Euglena gracilis* grown in zinc deficient and zinc sufficient media. Agric. Biol. Chem. 42: 901-907.
- Navarro, L., Torres-Marqu ez, M.E., González-Moreno, S., Devars, S., Hernández R., Moreno-Sánchez, R. Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic Cells. Comp. Biochem. Physiol. 116C:265-272; 1997.
- Nieboer E., 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 (Series B). 1: 3-26.
- Nicholls, D. G. (1982). Bioenergetics. An introduction to the chemiosmotic theory. Academic press, London.
- Ortiz, D. F., Kreppel, L., Speiser, D. M., Scheel, G., McDonald, G., Ow, D. W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. EMBO J. 11: 3491-3499.
- Ortiz, D. F., Ruscitti, R., McCue, K. F., Ow, D. W. (1995). Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. J. Biol. Chem. 270: 4721-4728.
- Overnell, J. (1975). The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater algae. Pestic. Biochem. Physiol. 5: 19-26.
- Perry, D., Silver, S. (1982). Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. J. Bacteriol. 150: 973-976.
- Prasada Rao, P. V. V., Gardner, D. E. (1986). Effects of cadmium inhalation on mitochondrial enzymes in Rat Tissues. J. Toxicol. Environm. Health. 17: 191-199.
- Rai, L. C., Gauer, J. P., Kumar, H. D. (1981). Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 56: 99-151.
- Rauser, W, E. (1991). Phytochelatins. Annu. Rev. Biochem. 59:61-86.
- Rauser, W, E. (1995). Phytochelatins and related peptides. Plant Physiol. 109: 1141-1149.
- Reed, R. H., Gadd, G. M. (1989). Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects, Shaw, A. J. Ed. CRC Press, Boca Raton, Florida. Capitulo 8; p. 105-118.

- Rottenberg, H. (1979). The measurement of membrane potential and ΔpH in cells, organelles and vesicles. *Meth. Enzymol.* LV: 547-569.
- Schäfer, H. J., Haag-Kerwer, A., Rausch, T. (1998). cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: Evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Molecular Biology.* 37: 87-97.
- Schiff, J. A., Lyman, H., Russel, G. (1971). Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Meth. Enzymol.* 23: 143-162.
- Silverberg, B. A. Cadmium-induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae. *Phycologia.* 15 (2): 155-159; 1976.
- Singh, S. P., Pandey, A. K. (1982). (1982). Cadmium-mediated resistance to metals and antibiotics in a cyanobacterium. *Mol. Gen. Genetic.* 187: 240-243.
- Sissoef, J., Grisvard, J., Guille, E. (1976). Studies on metal ions. DNA interactions = specific behaviour of reiteratives DNA sequences. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 31: 165-199.
- Souza, V., Bucio, O., y Col. 1996. El cadmio: mecanismos básicos de toxicidad. *Ciencia y desarrollo.* Enero/febrero de 1996, p. 39-43.
- Soyer, m. O., Prevot, P. (1981). Ultrastructural damage by cadmium in a marine dinoflagellate. *J. Protozool.* 28: 308-313.
- Srere, P. A. (1970). Control of citrate synthase activity. *Adv. Enzyme Regul.* 9: 221-33.
- Tokunaga, M., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1976). *Biochem. Biophys. Acta.* 429: 55-62.
- Tokunaga, M., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1979). Subcellular localization of the GABA-shunt enzymes in *Euglena gracilis* Strain Z. *J. Protozool.* 26 (3): 471-473.
- Trevors, J. T. Stratton, G. W., Gadd, G. M. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32, 447-464.
- Vallee B, L., Ulmer D. D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91-128.
- Wang, J., Evangelou, B. P., Nielsen, M.T., Wagner, G. J. (1991). Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles I. Cadmium. *Plant Physiol.* 97: 1154-1160.
- Weber, D. N., Shaw, C. F., Petering, D. H. (1987). *Euglena gracilis* cadmium-binding protein-II contains sulfide ion. *J. Biol. Chem.* 262 (15): 6962-6964.
- Williamson, J. R., Corkey, B. E. (1969). Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. *Meth. Enzymol.* 13: 434-509.
- Wireman, J., Liebert, C. A., Smith, T., Summers, A. O. (1997). Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4494-4503.