

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



Respuesta fisiológica y bioquímica del protista *Euglena gracilis* a metales esenciales (Cu^{2+})

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA:

M. en C. DAVID CERVANTES GARCIA

DIRECTOR

Dr. DANIEL GONZALEZ MENDOZA

Mexicali, Baja California

MARZO DEL 2013

CONTENIDO

CONTENIDO.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
CONSEJO PARTICULAR.....	0
CAPITULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 HIPÓTESIS.....	2
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	3
CAPITULO II.....	4
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1 ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS (EPTs).....	4
2.2 IMPACTO DE LOS EPTs EN LA SALUD DE LOS ECOSISTEMAS.....	5
2.3 TOLERANCIA A EPTs.....	5
2.4 TÉCNICAS BIOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ECOSISTEMAS CONTAMINADOS CON EPTs.....	6
2.5 MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y CELULARES QUE PARTICIPAN EN LA TOLERANCIA A METALES EN ORGANISMOS VIVOS.....	7
2.5.1 METALOTIONEINAS (MTs).....	8
2.5.2 FITOQUELATIN SINTETASA (FQs).....	9
2.5.3 ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DE PÉPTIDOS γ -EC.....	11
2.5.4 ANTIOXIDANTES.....	12
2.5.4.1 COMPUESTOS FENOLICOS O POLIFENOLES.....	12
2.5.4.2 VITAMINA E.....	13
2.6 MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	13
2.6.1 FOLIN-CIOCALTEU.....	13
2.6.2 DPPH.....	14
2.6.3 PROLINA.....	14
2.7 BIOINDICADORES.....	15
2.7.1 CARACTERÍSTICAS DE EUGLENA Y SU IMPORTANCIA.....	16
2.7.2 DOSIS LETAL MEDIA.....	16
2.8 MATERIAL.....	17
2.8.1 LAVADO DE MATERIAL.....	17
2.9 BIBLIOGRAFIA.....	17
CAPITULO III.....	24

Respuesta fisiológica de <i>Euglena gracilis</i> al estrés por cobre	24
3.1 INTRODUCCION	24
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR	26
3.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN CADA EXTRACTO.....	27
3.2.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS.....	27
3.2.4 DETERMINACIÓN DE L-PROLINA DE LOS EXTRACTOS.....	28
3.2.5 MÉTODO PARA EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES TOTALES (FOSFO MOLIBDENO). 29	
3.2.6 ANÁLISIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS	29
3.2.7 PRODUCCIÓN DE VITAMINA E ENCELULAS DE <i>Euglena gracilis</i> EXPUESTAS A Cu ²⁺ . 30	
3.2.8 ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE <i>Euglena gracilis</i>	31
3.3 RESULTADOS	32
3.3.1 EFECTO DEL COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Euglena gracilis</i>	32
3.3.2 FENOLES TOTALES Y ANTIOXIDANTES.....	33
3.3.3 PROLINA	35
3.3.4 VITAMINA E	37
3.3.5 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS	37
3.3.6 DAÑOS AL ADN.....	39
3.4 BIBLIOGRAFIA	40
CAPITULO IV	45
Fluorescencia de rayos X (XRF).....	45
4.1 Análisis de elementos químicos en células de <i>Euglena gracilis</i>	45
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
4.2.1 CALIBRACIÓN.....	48
4.3 RESULTADOS	48
4.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	51
4.4 BIBLIOGRAFIA	51
CAPITULO V	54
ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.....	54
5.1 INTRODUCCIÓN	54
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
5.2.1 INYECCIÓN DE LA MUESTRA.....	58
5.2.2 DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO CELULAR DE <i>Euglena gracilis</i> USANDO MONOBROMOBIMANE (MBRB).....	58

5.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DERIVATIZACIÓN CON mBrB DE LOS COMPUESTOS TIÓLICOS PRESENTES EN CELULAS DE <i>Euglena gracilis</i>	59
5.2.4 EXTRACCIÓN ACIDA DE LOS COMPUESTOS TIÓLICOS.....	59
5.3 RESULTADOS	60
5.4 BIBLIOGRAFIA.....	63
CAPÍTULO VI.....	66
6 INTRODUCCION.....	66
6.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	66
6.2 ADN POLIMERASA	67
6.3 AMPLIFICACIÓN ARITMÉTICA Y/O GEOMÉTRICA.....	68
6.4 EVALUACIÓN DEL PRODUCTO.....	68
6.5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
6.5.1 EXTRACCIÓN DE RNA.....	70
6.5.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FQS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR	70
6.5.3 DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA LOS GENES DE FITOQUELATIN SINTETASA	71
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
6.7 RESULTADOS	72
6.7.1 EXPRESIÓN DEL GEN DE FQS, GSH Y ECS EN BIOMASA DE EUGLENA GRACILIS EXPUESTAS A CU ²⁺	72
6.8 BIBLIOGRAFIA.....	74
CAPITULO VII.....	76
CONCLUSIONES.....	76
A.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Procesos que contribuye a la capacitación microbiana y destoxificación de metales.	11
Figura 2 Biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, y diferentes escalas temporales	16
Figura 3. <i>Euglena</i> spp	16
Figura 4. Curva de crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> expuestas a diferentes dosis (mM) de CuCl ₂ a las 0, 24, 48, 72, 96,120 y 144 h después de la exposición al metal	32
Figura 5. Efecto de diferentes dosis de CuCl ₂ (0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM) en la tasa de crecimiento (k) de células de <i>Euglena gracilis</i> después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas (p≤0.05)	33
Figura 6. Contenido de fenoles totales en <i>Euglena gracilis</i> después de 72 horas de exposición a dosis de 0.4 y 0.8 mM de Cu ²⁺ respectivamente. Medias ± error estándar, n=3.	34
Figura 7. Valores de la actividad anti oxidante total de <i>Euglena gracilis</i> expuestas a dosis de 0.4 y 0.8 mM de Cu ²⁺ , expuestas a 72 horas respectivamente. Las medias ± error estándar, n= 3.	35
Figura 8. Cambios en los niveles de Prolina en <i>Euglena gracilis</i> tratadas con dosis 0.4 y 0.8 mM de Cu ²⁺ a 72 horas de exposición. (Diagrama de cajas, Barras muestran media ± SE; n = 3).	36
Figura 9. Variación de la concentración de Vitamina E en <i>Euglena gracilis</i> después de 72 h de exposición a las dosis de Cu ²⁺ . Medias ± Desviación estándar de la media (SD); n=3	37
Figura 10. Cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos de <i>Euglena gracilis</i> expuestas a 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM de CuCl ₂ después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son	38
Figura 11. Niveles de daño del ADN en <i>Euglena gracilis</i> tratada con 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM de CuCl ₂ a las 144 h después de la exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas (p≤0.05)	40
Figura 12. Proceso para el análisis de las muestras de <i>Euglena gracilis</i> . Empastillado de la muestras (100 mg); exposición al haz de protones, obtención de datos en la computadora.	48
Figura 13. Concentración de Cu ²⁺ (ppm) en células de <i>Euglena gracilis</i> expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre 0, 0.4 mM y 0.8 mM durante 72 h. Los bloques muestras la media, 25 y 75 porciento, las barras indican los valores	49

mínimo y máximo, (n=3).

Figura 14. Siembra, crecimiento y conteo en cámara Neubauer de las células de *Euglena gracilis* expuestas a metales. 55

Figura 15. Equipo de electroforesis capilar HP3DCE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector de fotodiodo. 57

Figura 16. Proceso de preparación del equipo de electroforesis capilar de zona: a) preparación de los capilares, b) inyección de muestra y c) diagrama del software del equipo de electroforesis capilar de zona. 60

Figura 17. Electroferogramas de los compuestos tioólicos presentes en las muestras de *Euglena gracilis* expuesta a una dosis de 0, 0.04 y 0.06 μM de Cd^{2+} durante tres días. 62

Figura 18. Electroferogramas de los compuestos tioólicos presentes en las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a una dosis de 0, 0.4, 0.6 y 0.8 mM de Cu^{2+} durante 3 días. 63

Figura 19. Evaluación de la integridad del cDNA usando el gen de Actina en células de *Euglena gracilis* expuesta a cobre por 72 h. n=2 73

Figura 20. Evaluación de la expresión del fragmento de FQS (líneas 1-2 y 5-6) y GSH (líneas 3-4 y 7-8) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cu^{2+} a las 72 h. n=2 74

Figura 21. Evaluación de la expresión del fragmento de APX expuestas a Cobre: líneas 1-2 (3.0 mM) y líneas 3-4 (0.4mM) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cobre a las 72 h. n=2 74

Figura 22. Evaluación de la expresión del fragmento de APX expuestas a Cobre: pozo 1-2 (3.0 mM) y pozo 3-4 (0.4mM) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cobre a las 72 h. n=2 75

CONSEJO PARTICULAR.

La presente tesis titulada: Respuesta fisiológica y bioquímica del protista *Euglena gracilis* a metales esenciales (Cu^{2+}), realizada por el alumno: David Cervantes García, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

DIRECTOR _____

Dr. Daniel González Mendoza

SECRETARIO: _____

Dr. Onésimo Grimaldo Juárez

SINODAL: _____

Dr. Efraín A. Gutiérrez Galindo

SINODAL: _____

Dr. José Luis Ruvalcaba Sil

SINODAL: _____

Dra. Noemi Guadalupe Torrentera Olivera

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

Debido al crecimiento poblacional, se ha generado un aumento en la producción industrial a nivel mundial, lo cual ha resultado en el incremento de descargas de aguas residuales tanto industriales como de drenaje urbano, resultando en efluentes que contienen una diversa gama de sustancias orgánicas e inorgánicas, las que potencialmente pueden producir efectos tóxicos sobre los organismos, no existiendo en general una sustancia única que tenga un efecto dominante.

Pensar en encontrar una solución no es viable, además de que no es posible responsabilizar de este problema a un solo sector ya que todos participamos en la generación de contaminantes. Sin embargo, pensar en bio-remediación puede colaborar en el saneamiento ambiental de los ecosistemas acuáticos, por lo que en la actualidad, existe un creciente interés en determinar las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas en microorganismos que tienen la capacidad de retirar, almacenar o destoxificar metales contaminantes.

En este sentido el protista unicelular, flagelado acuático de vida libre *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para dilucidar estos procesos y para establecer si la resistencia a metales es ocasionada por una serie de mecanismos que actúan de manera independiente para cada metal o grupo de metales o si, por el contrario, la resistencia es mediada por un mecanismo específico presente en este organismo.

1.2 HIPÓTESIS

Dado que los elementos potencialmente tóxicos (EPTs), esenciales como el Cu^{2+} es un elemento que muestra gran similitud en sus propiedades químicas con otros elementos no esenciales, se espera que el protozoo acuático flagelado *Euglena gracilis* expuesto a Cu^{2+} bioacumule cobre, y active mecanismos comunes de desintoxicación para contrarrestar los posibles efectos negativos de cobre en la fisiología del microorganismo.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Identificar, los mecanismo presentes en *Euglena gracilis* a nivel fisiológico y bioquímico al ser sometida a dosis crecientes de elemento esencial (Cu^{2+}).

1.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la dosis letal media, síntesis de pigmentos fotosintéticos, compuestos antioxidantes, vitamina E, y daños al ADN en células de *Euglena gracilis*. expuestas a diferentes dosis de Cu^{2+}
- ❖ Evaluar la bio-acumulación de elementos esenciales en células de *Euglena gracilis* expuesta a diferentes dosis de Cu^{2+} utilizando la técnica de fluorescencia de rayos "X" (XRF).
- ❖ Evaluar la presencia de fitoquelatinas (FQS) mediante el uso de la técnica por electroforesis capilar de zona en *Euglena gracilis* expuesta a dosis crecientes de Cu^{2+} y Cd^{2+} .
- ❖ Determinar la expresión de los genes en células de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes dosis de Cu^{2+} y Cd^{2+} realizando la técnica cDNA y rt-PCR.

CAPITULO II

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS (EPTs)

Metales como el Cu, Zn, Mg, Fe son oligoelementos cuya presencia en pequeñas cantidades en la naturaleza es esencial para la vida, pero resultan tóxicos en elevadas concentraciones, sin embargo, otros metales como el Hg, Cd, Pb, As no tienen función biológica conocida y pueden ser tóxicos en dosis mínimas, por lo que el termino **elemento potencialmente tóxicos** (EPTs) se refiere a los elementos esenciales y no esenciales que pueden generar síntomas de toxicidad e inhibición del crecimiento mediante el desplazamiento de elementos esenciales y modificación de la actividad biológica o estructural de las proteínas. Se sabe que el umbral de toxicidad para cada metal depende de la especie biológica, tiempo de exposición, concentración y forma química del metal en el medio ambiente (Dietz *et al.*, 1999). No obstante, la toxicidad de un metal depende de la actividad iónica del metal libre más que de su concentración, ya que puede estar unido tanto a complejos orgánicos como inorgánicos. Las condiciones anoxicas se relacionan con altas concentraciones de metal en lugares contaminados (Neuhoff, 1983) El pH del medio influye en la solubilidad del metal y por tanto en su disponibilidad, el potencial *redox* del elemento, influye en la disponibilidad y como resultado en la toxicidad del metal sobre todo en sedimentos. La presencia de otro metales o contaminantes también puede influir en la toxicidad del metal mediante interacciones tanto antagónicas como sinérgicas (Sunda & Huntsman, 1996)

2.2 IMPACTO DE LOS EPTs EN LA SALUD DE LOS ECOSISTEMAS

Entre los contaminantes más estudiados debido a su toxicidad en los organismos y ecosistemas al estar por encima del umbral de disponibilidad, y a su persistencia en el ambiente se encuentran los metales. Son constituyentes del medio ambiente de forma natural, debido a su gran variedad de aplicaciones ha causado un aumento en su obtención, resultando en un dramático incremento de los niveles de los mismos en el ambiente. En el último siglo en minería se extrajo el 90% del total de **cadmio**, **cobre**, plomo, níquel y zinc obtenido a través de la historia (Hill, 2004)

Ambos metales pueden encontrarse en altas concentraciones en ecosistemas acuáticos en donde pueden causar diferentes efectos negativos a la salud de los organismos que los habitan. Aunque se han documentado más ampliamente los efectos y los mecanismos de desintoxicación del Cu^{2+} en los organismos acuáticos que los del Cd^{2+} , de manera general se sabe que ambos metales ocasionan estrés oxidativo y alteraciones celulares (Van Dyk, 2007).

2.3 TOLERANCIA A EPTs

La tolerancia a metales representa un proceso celular o fisiológico que impide, reduce o elimina los efectos tóxicos inducidos por los metales, identificando diversos mecanismos que le proporcionan a la célula y organismos una protección contra la intoxicación por metales. Esos mecanismos están basados en limitar la acumulación del metal y unir de forma inocua el metal a ligandos celulares.

La tolerancia diferencial en plantas a distintos metales que exhiben ciertas especies ha sido atribuida a los péptidos γ -Glu-Cys, debido esto a su capacidad de unir metales. (De Knecht, 1994)

2.4 TÉCNICAS BIOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ECOSISTEMAS CONTAMINADOS CON EPTs.

La acumulación de metales por ciertos organismos ha mostrado ser útil para valorar la contaminación de aguas y sedimentos, estas especies empleadas para monitorear los niveles de contaminación son conocidas como bio-indicadores, indicadores bio-acumulativos y organismos señalizadores. De la misma forma esta capacidad de acumulación de metales por diferentes microorganismos acuáticos ha demostrado ser útil en el proceso de bio-remediación de aguas contaminadas con metales además de ser una tecnología con ventajas ante otros métodos, ya que ofrece un menor impacto ambiental y menor costo económico (Salt, 1998). Cuando la presencia de metales en la solución es del orden de 10 a 100 ppm en el medio resultan caros y poco eficientes los métodos físico-químicos (Volesky, 1990).

Como posibles bio-acumuladores se encuentran bacterias, micro algas y levaduras; los microorganismos juegan un papel fundamental en la transformación de iones metálicos en el ambiente. Las células liberan compuestos orgánicos, así como diversos productos resultado de la biodegradación de diferentes compuestos, que actúan como agentes complejantes y disminuyen la toxicidad. Distintos procesos metabólicos como la fotosíntesis tienen lugar durante el crecimiento celular, todo ello influye en el equilibrio entre iones metálicos libres y de forma unidas, así como en la sedimentación y redisolución en medios acuáticos. Estos microorganismos son

capaces de soportar la toxicidad producida por los metales, y son capaces de acumular una elevada concentración de estos (Kaplan, 2004)

2.5 MECANISMOS FISIOLÓGICOS Y CELULARES QUE PARTICIPAN EN LA TOLERANCIA A METALES EN ORGANISMOS VIVOS.

Ante una situación de exceso de metales en suelo, los organismos vivos responden mediante mecanismos de exclusión o de acumulación del metal contaminante en determinados compartimentos celulares, ligando o no a compuestos quelantes (Van Breusegem, 2001). En caso de superar estas barreras, las plantas generan antioxidantes que previenen o revierten los efectos del estrés oxidativo (Inze y Van Montagu, 1995). Las principales moléculas implicadas son el ascorbato y el glutatión, cuyo metabolismo es interdependiente, estando ambos compuestos relacionados mediante el denominado ciclo de Halliwell-Asada (Smirnoff, 1998).

En otras palabras se podría establecer que la proporción de formas oxidada y reducida del glutatión y/o del ascorbato es una medida del grado de estrés oxidativo de la planta, suponiendo que la presencia de agentes pro-oxidantes derivados de la contaminación metálica provocaría una disminución (pro-oxidación) de los agentes reductores de la célula. Sin embargo tanto el ascorbato como el glutatión son moléculas multifuncionales en las plantas, de esta forma el primero está además implicado en la regulación del crecimiento celular, (Córdoba&González, 1994), mientras que el glutatión actúa como agente tamponador redox, como suministro de grupos tiólicos o como precursor de diversas moléculas como lo son las fitoquelatinas.

2.5.1 METALOTIONEINAS (MTs)

El comité Internacional para la Nomenclatura de las Metalotioneinas (MT), define como tales a toda biomolécula que presenta las siguientes características: bajo peso molecular (6-8 kDa), alta capacidad de fijación de metales pesados (superior a 6 átomos de metal por molécula), composición característica de aminoácidos (no debe contener aminoácidos aromáticos ni tampoco histidina y el contenido de cisteína debe ser superior al 30%), secuencia aminoacídica característica (distribución de los residuos cisteína Cys-X-Cys), características espectroscópicas típicas de los tiolatos metálicos (bandas de transferencia de carga) y localización de los metales en “clusters” metal-tiolato con coordinación tetraédrica, (Fowler, 1987).

Las metalotioneinas (MTs) en los organismos son proteínas pequeñas de 45-85 aminoácidos, las cuales tienen la capacidad de ligar iones metálicos por su alto contenido en residuos de cisteína (30 % del total de la proteína) evitando así la intoxicación por metales.

Se reconocen diferentes clases de MT. La clase I incluye polipéptidos cuyas cisteínas tienen posiciones homologas a la de la metalotioneína de corteza renal de equino (MT arquetípica); la cual se describió por primera vez cuando fue descubierta como una proteína quelante del Cd^{2+} en el riñón de caballo. En las plantas las MTs forman una familia más heterogénea que las que se encuentran presentes en los animales identificándose por primera vez en embriones maduros de trigo como una proteína quelante del Zn (Lane, 1987). De acuerdo al ordenamiento de los residuos de cisteína en la proteína y su localización en los diferentes tejidos en plantas las MTs se agrupan en cuatro diferentes tipos MT1, MT2, MT3 y MT4 (Cobbet & Goldsbrough, 2002).

Estudios realizados en levaduras, algas y plantas superiores han permitido el aislamiento de componentes de aproximadamente 9 kDa que ligan Cu^{2+} y Cd^{2+} y donde Cys, Glu y Gly representan entre 45 y un 97 % de los aminoácidos totales (Grill E., 1987).

Las MTs en las plantas participan en la tolerancia a metales a través de dos posibles mecanismos:

- La quelación de metales por la cisteína que conforman la estructura de la proteína, esto se ha observado principalmente en las hojas senescentes en donde las MTs regulan la concentración de metales mediante la quelación y transporte hacia hojas nuevas (Hsieh, 1996).
- La retención de las especies reactivas de oxígeno en los grupos tioles de cisteína que conforman la estructura de las MTs; esto se ha observado en plantas tratadas con Cd^{2+} y Cu^{2+} por separado, en donde se observó que los niveles de especies reactivas al oxígeno (ERO) generadas por el metal disminuyeron a medida que se incrementó la presencia de MTs en las células (Akashi *et al*, 2004).

2.5.2 FITOQUELATIN SINTETASA (FQs)

La fitoquelatin sintetasa, es una proteína rica en cisteína (γ -glutamilcisteína (γ -Glu-Cys) dipeptidil transpeptidasa), que se localiza en el citoplasma en donde participa en la síntesis de fitoquelatinas (FQs), a partir del glutatión (GSH) en presencia de ciertos metales, en donde genera un complejo FQs-metal que son transportados a la vacuola, contribuyendo así a disminuir el impacto negativo de los metales en la celular (Loscos, 2006).

En 1999 por tres diferentes laboratorios se realizó la identificación, clonación y caracterización de los genes de la fitoquelatin sintetasa (FQs).

Adicionalmente la comparación de las secuencias de los genes de FQs de diferentes especies de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas indican que esta proteína es altamente conservada entre todas las diferentes plantas (Cobbett, 2001).

Se ha establecido que la vía de síntesis de glutatión y fitoquelatinas están involucrada en el mecanismo de resistencia y acumulación de metales pesados tóxicos, en particular Cd^{2+} (Mendoza-Cózatl, 2006). Sin embargo, no existen datos disponibles sobre el efecto de metales como el Cu^{2+} y Cd^{2+} en la inducción de los genes de la ruta del glutatión y fitoquelatinas en *Euglena gracilis*, aunque si está bien documentado para plantas superiores y levaduras. Además, tampoco se ha esclarecido la participación de los genes de otras rutas metabólicas que pudieran ser inducidos como resultado de la exposición de *Euglena gracilis* a metales pesados.

Técnicas moleculares como lo son RT-PCR, hibridación in situ y Northern blot, han permitido demostrar la existencia de una posible relación entre la sobre expresión de las FQs y una mayor producción de fitoquelatinas como mecanismo de tolerancia en plantas expuestas a metales (Lee & Korban, 2002)

Clemens (2006) y Rea (2006) sugieren que el mecanismo de activación de las FQS, se realiza en el dominio amino-terminal en donde se localiza el centro catalítico de esta enzima. La unión del metal al centro catalítico es mediada por el dominio carboxilo-terminal de la enzima, el cual actúa como un sensor uniéndose a los iones (posiblemente a través de la cisteína) facilitando, el contacto con el centro catalítico de la proteína.

Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos.

2.5.3 ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DE PÉPTIDOS γ -EC

Tabla 1 Familias de péptidos γ -EC

Familia de péptidos γ -EC	Estructura básica	Tripeptido Relacionado
1	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$ (glutación)
2	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-}\beta\text{-Ala}$ (homo glutación)

El diagrama muestra un óvalo central etiquetado como 'INTRACELULAR' que contiene: Metalotioneinas, Péptidos de metal gamma-glutamil cisteina, Enlazamiento no específico/quelación, Comparta mentalización en organelos, Reacciones Redox/ transformaciones. Alrededor del óvalo hay cuatro cuadros que describen interacciones en diferentes niveles:

- Membrana celular / espacio periplasmico:** Adsorción / intercambio iónico, Reacción Redox / transformaciones, Precipitación, Difusión y transporte ("captación y expulsión").
- Pared celular:** Adsorción, intercambio iónico y unión covalente, Atrapamiento de partículas, Reacciones Redox, Precipitación.
- Materiales asociados a células:** (Polisacáridos, mucilago, capsulas, etc.), Intercambio iónico, Atrapamiento de partículas, Enlazamiento no específico, Precipitación.
- Reacciones extra celulares:** Precipitación por productos excretados, Formación de complejos y quelación, Sideroforos.

 Flechas indican la dirección de las interacciones entre estos niveles.

3	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$	$\gamma\text{-Glu-Cys}$
4	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-Ser}$ (hidroximetilglutación)
5	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$	$\gamma\text{-Glu-Cys-Glu}$

Se conoce la estructura primaria de cinco familias de péptidos γ -EC (Tabla 1). En la primera de ellas la estructura primaria corresponde a la secuencia $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde $n=2-4$, que es análogo a tripeptido glutación

(GSH, γ -Glu-Cys-Gly), sugiriendo la participación de GSH en la biosíntesis de FQ, (Grill E., 1987)

Una segunda familia de péptidos con afinidad por el Cd^{2+} es el tripeptido homoglutación (γ -Glu-Cys- β -Ala), de donde proviene la denominación de “homofitoquelatinas” (γ -Glu-Cys)_n- β -Ala.

La tercer familia de péptidos (γ -Glu-Cys)_n fue encontrada como un constituyente menor en *Schizosaccharomyces pombe* y posteriormente se encontró como un constituyente mayor en maíz, verificado por espectrofotometría de masas (EM), Rauser, (1995).

Otro grupo de péptidos afines (γ -Glu-Cys)_n-Ser, fue detectado en ciertas especies de gramíneas, se han aislado recientemente polipeptidos del maíz con una estructura (γ -Glu-Cys)_n-Glu, relacionada con el tripeptido γ -Glu-Cys-Glu Meuwly, (1995).

2.5.4 ANTIOXIDANTES

2.5.4.1 COMPUESTOS FENOLICOS O POLIFENOLES.

Los compuestos fenólicos o poli fenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de ocho mil compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos.

Como antioxidantes, los poli fenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por radicales libres (Martínez, 2002). El estrés oxidativo se define comúnmente como el

desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular en un organismo (Miller, 1993).

2.5.4.2 VITAMINA E

La vitamina E conformada por la mezcla de cuatro tocoferoles (α , β , γ , δ) de los cuales el d - α – tocoferol representa un 90 % del total. Esta molécula se considera el principal antioxidante liposoluble y se encuentra tanto en el plasma vinculado con los lípidos circulantes como en las membranas celulares (Hicks, 2007).

La principal función biológica de la Vitamina E en los organismos está directamente relacionada con las respuestas de inhibición de radicales libres y reducción del proceso de lipoperoxidacion en las células de diversos organismos (Hsu y Guo, 2002)

2.6 MÉTODOS UTILIZADOS PARA MEDIR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.6.1 FOLIN-CIOCALTEU

Uno de los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales es el ensayo de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico–fosfotungstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico–fosfotungstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiito, 1985).

2.6.2 DPPH

Es un método muy usado se basa en la estabilidad del radical difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), lo cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrogeno o con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la perdida de la absorbancia. El parámetro IC_{50} , que es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto, es generalmente usado para la interpretación de este método (Molyneux, 2004).

2.6.3 PROLINA

La L – Prolina se acumula en muchas plantas como respuesta a diversos estreses, como lo es la escasez de agua y salinidad. Se piensa que juega un papel relevante en el ajuste osmótico en plantas, entre otras sustancias como polialcoholes del tipo sorbitol o manitol. Así mismo, la acumulación de prolina estar asociado a la protección de proteínas frente a su desnaturalización. Para su análisis se emplea una reacción calorimétrica, en la que la prolina extraída se hace reaccionar en un medio ácido con ninhidrina. Posteriormente de su incubación, se determina la absorbancia a 520 nm. Siguiendo la técnica propuesta por Bates, (1973).

2.7 BIOINDICADORES

Las especies empleadas para monitorear los niveles contaminantes son conocidas como bioindicadores, indicadores bioacumulativos, biomonitores u organismos señaladores. Las especies bioindicadores deben reflejar la biodisponibilidad en el ambiente, ser buenos acumuladores, estar distribuido geográficamente y ser fácilmente identificable taxonómicamente (Kennish, 1997).

Beyer et al (1996) los definió como “las respuestas biológicas o los efectos que pueden ser relacionados con la exposición a uno o varios compuestos químicos del ambiente”. Uno de los principales objetivos de un biomarcador es alertar de forma temprana la entrada de algún compuesto extraño a los organismos que esté ocasionando algún efecto a su salud.

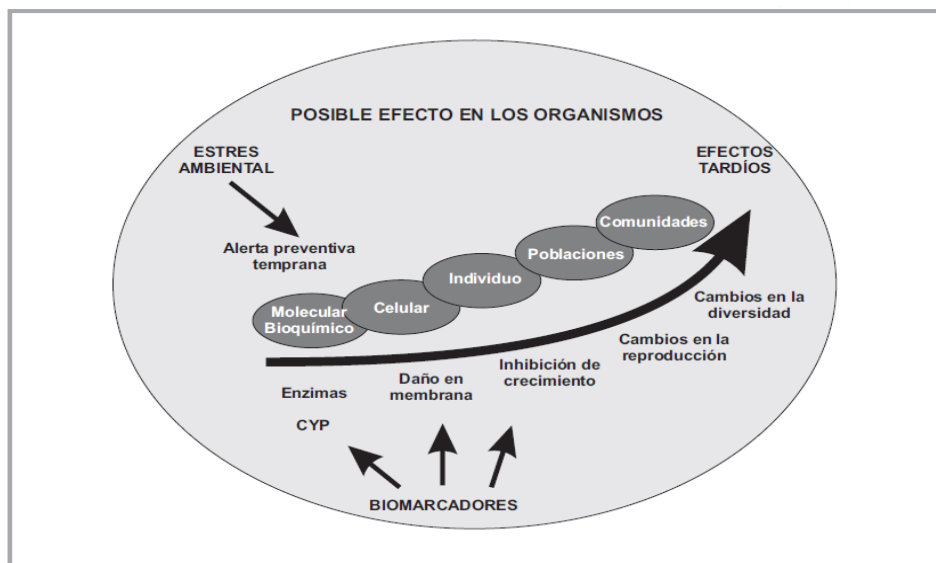


Figura 2. Biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica, y diferentes escalas temporales (Zapata-Pérez, 2002)

2.7.1 CARACTERÍSTICAS DE EUGLENA Y SU IMPORTANCIA.

El protista unicelular flagelado de vida libre *Euglena gracilis* puede proliferar en presencia de concentraciones altas de metales (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+}), (Cervantes, 2001).



Figura 3. *Euglena spp*

La elección de este microorganismo para el desarrollo de la investigación se debe básicamente a las siguientes razones:

Este protista puede cultivarse de manera autótrofa y heterótrofa, utilizando una extensa variedad de fuentes de carbono (glucosa, lactato, glutamato, malato, etanol, acetato) y en un amplio margen de valores de pH desde 3.0 a 8.0 (Kempner, 1982).

Dentro de las 24 a 76 especies de algas y protozoarios que se identificaron en cuerpos de agua que reciben el drenaje ácido de la actividad minera, se ha detectado en abundancia *Euglena*, (Casiot., 2004) y dentro de un muestreo de efluentes industriales, la única especie fotosintética detectada fue *Euglena gracilis* (Hargreaves et al., 1975), por lo que su presencia denota que puede ser un importante evaluador de ambientes contaminantes.

2.7.2 DOSIS LETAL MEDIA

Cantidad de material tóxico, que como mínimo debe introducirse en cada organismo viviente de un lote de "n" individuos para que produzca la muerte de

al menos el 50% de ellos, es decir, la muerte de $n/2$ individuos. Se expresa en mg/kg de peso vivo en condiciones de laboratorio. La dosis letal media será distinta para las diferentes sustancias tóxicas y para diferentes organismos y diferentes vías de penetración Símbolo: DL50 ó LD50. El valor de DL_{50} es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia, el cual se empieza a desarrollar en 1927 por J. W. Trevan y se define como: "aquella dosis que origina la muerte del 50% de los animales", (Jurado, 1989).

2.8 MATERIAL

2.8.1 LAVADO DE MATERIAL

Uno de los principales problemas que se plantea en las investigaciones de toxicidad de los iones metálicos, es que el metal puede quedar adsorbido a las paredes del material después de haber sido usado, por lo que al añadir nuevo medio con una determinada cantidad de metal su concentración final puede ser distinto de la esperada.

Debido a estos se debe de someter todo el material a utilizar a un lavado con jabón neutro y dejarlo por 24 horas, posteriormente se enjuaga con agua destilada y se sumerge durante 48 horas en HCl al 10 %, finalmente se lava con agua destilada Milli-Q y se deja en ella durante 24 horas.

2.9 BIBLIOGRAFIA

Dietz K.J., Baier M, Krämer U.1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. Berlin: Springer-Verlag, 73–97

Neuhoff H.G. 1993. Synergistic physiological effects of low copper and various oxygen concentrations on *Macoma balthica*. Mar. Biol. 77:39

Sunda G.W., Huntsman S.A. 1996. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnol. Oceanogr.* 41: 373-387

Hill M. K. 2004. *Understanding Environmental Pollution. A primer* Cambridge: Cambridge University Press.

Van Dyk, J.C., Pieterse G.M., Van Vuren J.H.J. 2007. Histological changes in liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 66: 432-440

De Knecht J.A, Van Dillen M., Koevoets P.L.M, Schat H., Verkleij J.A.C., 1994. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Chain length distribution and sulphide incorporation. *Plant Physiology* 104:255-261.

Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. 1998 *Phytoremediation. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:643–668

Volesky, B. 1990 Removal and recovery of heavy metals. *Biosorption*. In *Biosorption of Heavy Metals*; Press: Boca Raton. 7-44.

Kaplan D. 2004. Water pollution and bioremediation by microalgae. *Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae*. Book. Richmond A (ed) Iowa Blackwell Science 439-447.

Van Breusegem F., Vranova E., Dat F J., Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction *Plant Science* 161: 405–414

Inzé D., Van Montague M. 1995. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 153–158.

Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (2): 214-9

Cordoba F., Gonzalez – Reyes, J.A. 1994. Ascorbate and plant cell growth. *J Bioenerg Biomembr.* 4: 399-405

Fowler B.A., Oskarsson A. Woods J.S. 1987. Metal- and metalloid-induced porphyrinurias: Relationships to cell injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 514:172–182.

Lane B., Kajoika R., Kennedy T. 1987. The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem Cell Biol* 65 :1001–1005

Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 53: 159-182

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.

Hsieh H.M., Liu W.K., Chang A., Huang P.C. 1996. RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology* 32:525–529.

Akashi K., Nishimura N., Ishida Y., Yokota A. 2004 Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun.*323 :72-78

Loscos J., Naya L., Ramos J., Clemente M., Matamoros M.A., Becana M. 2006. A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiology* 140: 1213–1221.

Cobbett C.S. 2001 Heavy metal detoxification in plants: phytochelatin biosynthesis and function. *IUBMB Life* 51:183-188

Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez R. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. *Pathway modeling for plants. J. Theor. Biol.* 238:919-936.

Lee S., Korban S.S. 2002 Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* 215: 689-693.

Clemens S. 2006. Evolution and function of phytochelatin synthases. *J Plant Physiol.* 163: 319–332.

Rea P.A. 2006 Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 507–508.

Grill E., Winnacker E-L., Zenk M.H. 1987 Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 439–443.

Rauser W.E., Meuwly P. 1995 Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol* 109:1141–1149.

Meuwly P., Thibault P., Schwan A.L., Rauser W.E. 1995. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant journal*. 7: 391-400

Martinez F.S., Gonzales G.J., Culebras J.M., Tuñon M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nut Hosp* 6: 271 – 278.

Miller J.K., Brzezinska–Slebodzinska E. 1993 Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function, *Journal of Dairy Science*. 76: 2812-2823

Hicks J.J, Montes-Cortes D.H., Cruz-Dominguez M.P., Medina-Santillan R., Olivares-Corichi I.M. 2007 Antioxidants decrease reperfusion induced arrhythmias in myocardial infarction with ST-elevation. *Front Biosci* 12: 2029-2037

Hsu P.C., Guo Y.L. 2002 Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*. 180:33-44.

Peterson G.L, 1979. Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*. Vol. 100:201-220

Julkunen-Tiitto R. 1985. Phenolics constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 213–217.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.* 26 (2): 211-219

Bates L-S., Waldren R.P., and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil*. 39:205-208.

Kennish M. J. 1997. *Practical handbook of Estuarine and Marine pollution*. Boca Raton CRC Press

Beyer, J., S. Morten, H. Ketil, E. Fjeld, E. Egaas, E. Aas, J. Utne, y A. Goksyr, 1996. Contaminant accumulation and biomarkers responses in flounder (*Platichthys flesus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed by caging to polluted sediment in Sorsjorden, Norway. *Aquat Toxicol*, 36: 75-98.

Zapata-Pérez, O., 2002. CYP1A en tilapia *Oreochromis niloticus*. Caracterización y regulación por xenobióticos. Tesis de Doctorado. Departamento de Farmacología y Toxicología. CINVESTAV-IPN, 118 p.

Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *Microbiol Rev*. 3:335-47

Kempner E.S. 1982. Stimulation and inhibition of metabolism and growth of *Euglena gracilis*. *The Biology of Euglena*, Buetow. Ed.. Academic Press, New York. Vol.III 197-252.

Casiot C., Brunel O., Personne J.C., Leblanc M. 2004. Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage. *Sci Total Environ*. 320:259-67

Hargreaves J.W., Lloyd W.J.H. and Witton B.A. 1975 Chemistry and vegetation of highly acidic streams. *Freshwater Biol.* 5:563-576.

Jurado R. 1989. *Toxicología Veterinaria. Segunda Edición.* Salvat. Madrid, España. 618.

CAPITULO III

Respuesta fisiológica de *Euglena gracilis* al estrés por cobre

3.1 INTRODUCCION

Durante, las últimas décadas, como resultado del desarrollo de asentamientos poblacionales y el impulso de diferentes actividades industriales se ha favorecido una mayor persistencia y bio-disponibilidad de compuestos químicos como los metales pesados en diferentes ecosistemas acuáticos. (Gale, 2006).

Los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) pueden ser esenciales o no esenciales para los seres vivos, pero todos ellos en exceso representan un riesgo latente para la salud de las especies que habitan estos ecosistemas entre ellas al ser humano. Dentro de los EPTs que tienen gran relevancia en la agricultura es el Cobre (Cu^{+2}), el cual es requerido en el metabolismo y procesos celulares de las plantas, pero en cantidades elevadas puede generar serios problemas en la salud de los sistemas acuáticos. (Yruela, 2005).

Lo anterior ha generado la necesidad de desarrollar tecnologías para la remediación de ambientes acuáticos afectados por metales. En este sentido, el uso de microorganismos tolerantes con capacidad de almacenar metales ha demostrado ser una biotecnología con ventajas sobre los métodos físicos-químicos, ya que ofrece un menor impacto ambiental y menor costo económico. (Mullapudi, 2008). En este sentido el protista acuático de vida libre *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para ser empleado en procesos de bio-remediación. Este microorganismo forma parte del plancton de aguas dulces y puede ser cultivado de manera eficiente en condiciones

controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono. Además presenta propiedades metabólicas y genéticas que le permite desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales esenciales y no esenciales a diferentes valores de pH y bajo un régimen heterotrófico o fotosintético. . (Rodríguez-Zavala, 2007)

Estas propiedades hacen que *Euglena gracilis* pueda ser considerada como un organismo con potencial biotecnológico en la bio-remediación de sistemas acuáticos impactados por EPTs. En la actualidad existen diversos trabajos sobre el estudio del efecto de metales en este organismo siendo el cadmio el metal más estudiado. (Mendoza-Cózatl, 2005). Sin embargo; el efecto toxico del cobre en la fisiología de *Euglena gracilis* ha sido poco abordado, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto toxico del Cu^{2+} en el desarrollo fisiológico de *Euglena gracilis*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

La cepa de *Euglena gracilis* se mantiene vigente mediante una constante resiembra del stock que se mantiene en condiciones controladas de luz y oscuridad, pH de 7, temperatura en un rango de 22 a 28 °C y nutrientes (medio de cultivo), en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. La siembra se realiza cuidando al máximo las medidas de inocuidad para evitar cualquier posible foco de infección por hongos o bacterias presentes en el ambiente, por lo que se realiza dentro de una campana de bioseguridad, desinfectando con cloro al 80% y/o etanol al 80%, se prenden mecheros y se destapan los matraces después de temperarlos dentro de la campana para su manipulación, con pipetas se colecta *Euglena gracilis* cepa Z para depositar en matraces de 1

litro y 1.8 litros que contienen medio de cultivo axenicos con la siguiente formulación: acetato de sodio (1g/L), extracto de carne (1g/L), Triptona (2g/L), extracto de levadura (2g/L) y $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_2$ (10mg), a un pH de 7, previamente esterilizado, se dejan en reposo en campanas de crecimiento bajo condiciones controladas de luz y aire con un fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad, diario se tiene que revisar a simple vista y darle una leve agitación al matraz, a los 5 días se muestrea para conocer el crecimiento poblacional, haciendo un conteo en la cámara de Neubauer y ver el desarrollo de la cepa, para iniciar el experimento.

Los matraces contienen una población homogenizada y se aplica las distintas dosis de metal a analizar Cd^{2+} (0, 0.02mM, 0.07mM, 0.14mM, 0.2mM) y Cu^{2+} (0, 0.4mM, 0.8mM), dejando los matraces durante 5 días a partir que es expuesto al metal, se toman 1 ml de muestra cada 8 horas durante 3 días para conocer el desarrollo de la cepa.

A los cinco días es centrifugado el contenido total del matraz, apartando 3 muestras en tubos de 1.5 ml para poder realizar las respectivas determinaciones con biomasa fresca, el resto de la biomasa centrifugada se guarda en tubos falcón de 50 ml y se congela para su posterior liofilizada.

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

La densidad celular (N) se mide cada 24 h por conteo directo en microscopio utilizando cámara de Neubauer durante 7 días y se determina la tasa de crecimiento k en número de divisiones celulares por día (divisiones/día) a partir de la siguiente fórmula:

$$k = 3.332 \frac{\log N_n - \log N_o}{tn}$$

Donde N_n es la densidad celular al final del bioensayo; N_0 es la densidad celular inicial nominal y t_n es el tiempo transcurrido entre el inicio y final del bioensayo (en días).

También se determina el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento (I_k) usando la siguiente fórmula:

$$I_k = \frac{k_c - k_i}{k_c} (100)$$

Donde k_c es la tasa de crecimiento para la concentración k ; y k_i corresponde a la tasa de crecimiento promedio para el control. El experimento se realiza por triplicado con muestreos diarios.

3.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN CADA EXTRACTO.

El contenido de fenoles totales se determina mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo la técnica mencionada por Waterhouse (2002).

3.2.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS.

La capacidad para capturar radicales libres se determina, utilizando como referencia la disolución de 1-1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo al método reportado por Huang & Mau (2006).

El DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por resonancia. Por esta propiedad, el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres.

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes dosis de metal, se tomaron 800µl de

extracto de *Euglena gracilis* 200 µl de solución de DPPH (0.1mM, en 95% metanol). La reacción es homogenizada y se incuba en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente. En seguida se mide la absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro, Thermo Scientific, Genesys 20.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \%I = \frac{A - A_1}{A} (100)$$

donde A es la absorbancia del blanco, y A₁ es la absorbancia de la muestra.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE L-PROLINA DE LOS EXTRACTOS.

Para la determinación de L- Prolina se homogenizan 100 mg del extracto a evaluar en 1 mL de la disolución extractora, se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifuga a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante se transfiere 0.5 mL a un tubo Eppendorf de 2 mL con rosca, al que posteriormente se añade 0.5mL del reactivo de ninhidrina. Se mezcla bien por agitación vigorosa y se incuba a 90 °C, junto con la recta patrón. Se adiciona 1mL de Tolueno una vez que se ha enfriado, se agita vigorosamente y se separan las fases acuosa y orgánica mediante centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos. Unos 800 µl de la fase orgánica superior se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 mL limpio, y se procede a la medida de la absorbancia a 520 nm.

3.2.5.1 RECTA PATRÓN

La concentración de L – Prolina en los extractos se determina mediante la interpolación en una recta de calibrado elaborada a partir de una disolución madre de prolina 25 mM.

Tabla 2. Volúmenes para elaboración de la recta de calibrado (μL).

Concentración recta (mM)	0.0	0.05	0.01	0.02	0.5	1.0	2.0
Disolución prolina 12.5 mM	0	4	8	16	40	80	160
dH ₂ O	500	496	492	484	460	420	340
Disolución sulfosalicilico 6%	500	500	500	500	500	500	500

3.2.5 MÉTODO PARA EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES TOTALES (FOSFO MOLIBDENO).

La actividad antioxidante del extracto fue evaluada por el método fosfomolibdeno de acuerdo al procedimiento descrito por Prieto (1999).

A 0.1 ml de extracto se mezcla con 1ml del reactivo (0.6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sodio y 4 mM molibdeno de amonio). Se realiza una incubación a 95 °C por 90 minutos. Posteriormente se enfría en hielo y se cuantifica en espectrofotómetro a 695 nm

3.2.6 ANÁLISIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Las muestras de células de *Euglena gracilis* fueron colectadas por centrifugación (2500 rpm) a las 72 y 144 h después de la exposición a las diferentes dosis de Cu^{2+} . Posteriormente, 100 mg de biomasa fresca de *Euglena gracilis* fueron homogenizados en oscuridad con 1 mL de acetona fría (100%) por 1 min. Una vez homogenizados, los tubos eppendorf de 2 mL conteniendo las muestras de *Euglena gracilis* y acetona fueron centrifugados a

2500 rpm por 5 min a 4°C. Finalizado el proceso de centrifugación, el sobrenadante de cada muestra fue colectado y el contenido de carotenoides totales y clorofila a y b fueron evaluados a 470 y 662, 649 nm usando un espectrofotómetro. Donde se empleó las ecuaciones de Lichtentaler & Wellbum (1985), que a continuación se describen para el cálculo de los pigmentos fotosintéticos:

$$Ca = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$Cb = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$Cx + c = 1000 A_{470} - 2.270Ca - 81.4Cb/227$$

Donde Ca (clorofila a); Cb (clorofila b); y C_{x+c} (carotenoides totales).

3.2.7 PRODUCCIÓN DE VITAMINA E ENCELULAS DE *Euglena gracilis*

EXPUESTAS A Cu²⁺

La concentración intracelular de la vitamina E se determinó espectrofotométricamente usando el método descrito por Afiukwa & Ogbonna (2007). El procedimiento consistió en concentrar las células de *Euglena gracilis* de cada tratamiento para esto se centrifugaron 30 ml del medio de cultivo de cada tratamiento a 3000 rpm por 10 minutos.

El sobrenadante se descarta y las pastillas de cada tratamiento obtenido se lavan con agua destilada. Posteriormente, a las pastillas se le adiciono 5 ml de acetona fría y se dejó en reposo a 5°C por 10 min para favorecer la obtención de la vitamina. Pasado este tiempo a las muestras se les adiciono 2 ml de agua y 5 ml de éter de petróleo entonces se procedió a separar la fase superior de cada muestra y se colocada en una celda para determinar la

concentración de la vitamina E mediante la lectura al espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

La concentración celular de la vitamina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Conc(mg/g) = \frac{A(FD)}{coef\ Ext(Espe\ celda)(PS)}$$

donde A es la absorbancia; FD es el factor de dilución; Coef.Ext.: es coeficiente de absorción (1026 para la vitamina E en $mg^{-1}cm^{-1}ml$); Espe.celda (1 cm) y PS (peso seco de las células usadas (gml^{-1})).

3.2.8 ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN DE *Euglena gracilis*

Biomasa de *Euglena gracilis* (100 mg) expuestas a las diferentes dosis del metal fueron colectadas por triplicado al final del experimento de acuerdo a la técnica propuesta por González-Mendoza, (González Mendoza 2010). Una vez obtenido las muestras de ADN, estas fueron observadas por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio por 25 min. Posteriormente los fragmentos fueron visualizados y el porcentaje de daño se calculó por densitometría usando el programa image j.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 EFECTO DEL COBRE SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Euglena gracilis*

Las células del protozooario *Euglena gracilis* se sometieron a distintas concentraciones de CuCl_2 (0.05, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM), preparando además un cultivo control sin adición de metal, el crecimiento de *Euglena gracilis* disminuyó al aumentar la dosis del metal. (Figura 3).

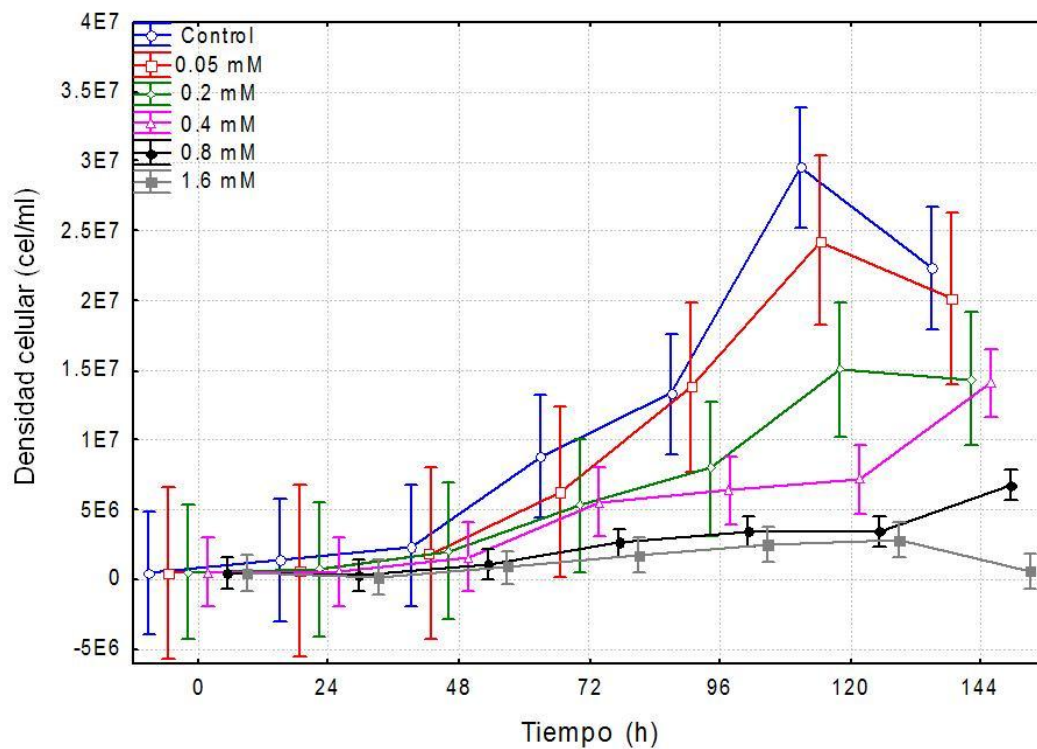


Figura 4. Curva de crecimiento de *Euglena gracilis* expuestas a diferentes dosis (mM) de CuCl_2 a las 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h después de la exposición al metal

Siendo significativamente mayor la inhibición del crecimiento (0.54 y 0.30) con las dosis de 0.8 y 1.6 mM de CuCl_2 , respectivamente al final del experimento. (Figura 4).

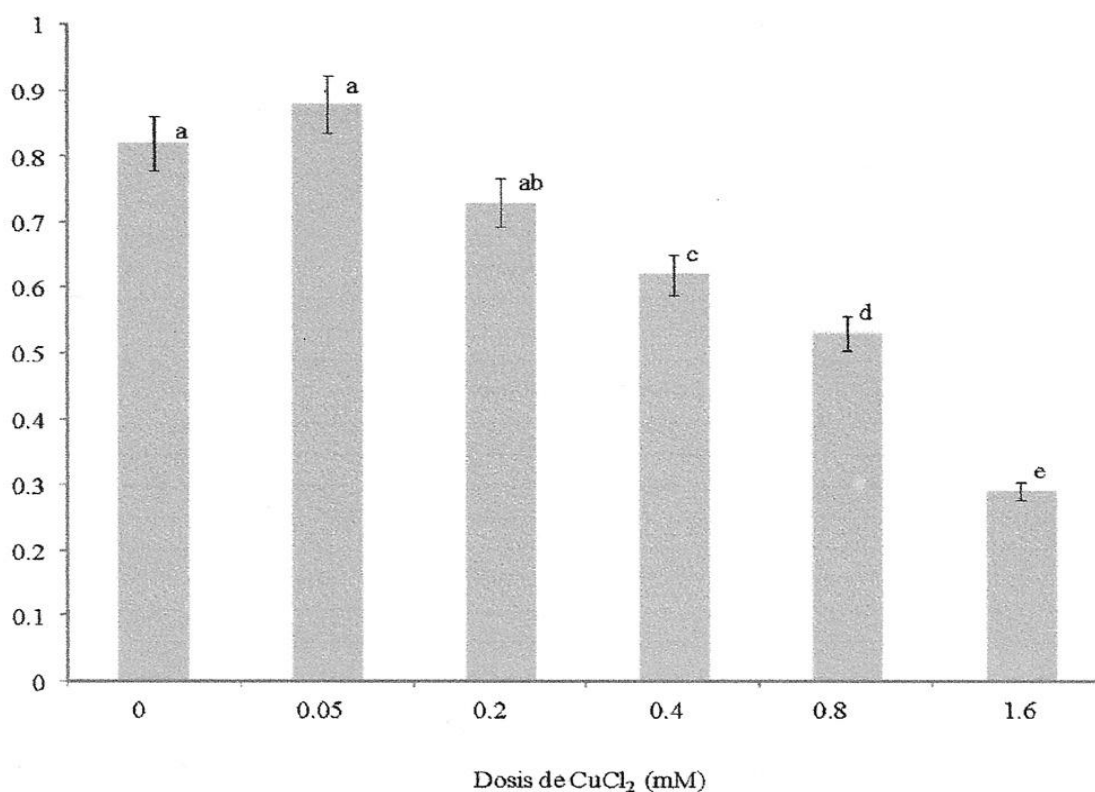


Figura 5. Efecto de diferentes dosis de CuCl₂ (0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM) en la tasa de crecimiento (k) de células de *Euglena gracilis* después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

Los resultados de la dosis media inhibitoria (IC₅₀), al evaluar el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento fue de 0.66 mM de CuCl₂, en contraste con la IC₅₀ de 0.22 mM de CuCl₂ reportado por Einecker et al (2002), el 90 % de muerte en células de *Euglena gracilis* a los 7 días de exposición con dosis de 50 μ M de Cu²⁺ reportados por Rochetta y Kupper (2009).

3.3.2 FENOLES TOTALES Y ANTIOXIDANTES

Los resultados obtenidos demuestran una correlación entre los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de *Euglena gracilis* expuesta a las distintas dosis de Cu²⁺. En este sentido para las células de *Euglena gracilis* tratadas con 0.4mM de Cu²⁺ se observó un aumento inmediato en los antioxidantes y la actividad de los compuestos fenólicos totales en

comparación con el control ($P = 0.0010$ y 0.007 , respectivamente) posterior a las 72 horas de exposición al tratamiento. (Figura 5).

En contraste, (Figura 5) la actividad antioxidante y los compuestos fenólicos totales en células de *Euglena gracilis* expuestas a una alta concentración de cobre (0.8mM Cu^{2+}), mostro una disminución significativa en comparación con las células expuestas a dosis bajas después de 72 horas de exposición al tratamiento ($P = 0.04$ y 0.03).

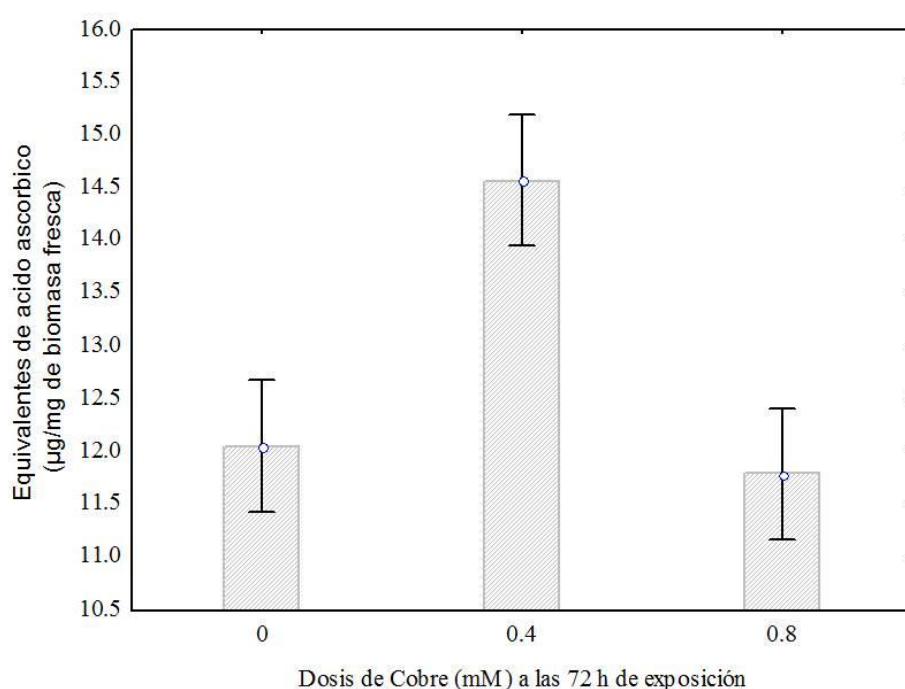


Figura 6. Contenido de fenoles totales en *Euglena gracilis* después de 72 horas de exposición a dosis de 0.4 y 0.8 mM de Cu^{2+} respectivamente. Medias \pm error estándar, $n=3$.

La exposición de *Euglena gracilis* a metales, incremento los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante podrían ser un primer mecanismos para disminuir la presencia del estrés oxidativo causado por los metales (Sánchez, 2010) En plantas de *Lens culinaris*, Janas (2010) encontro que dosis altas de Cu^{2+} podrian estimular la generacion de compuestos fenolicos, sin embargo

estos no se producen en cantidades suficientes para prevenir la lipoperoxidación celular.

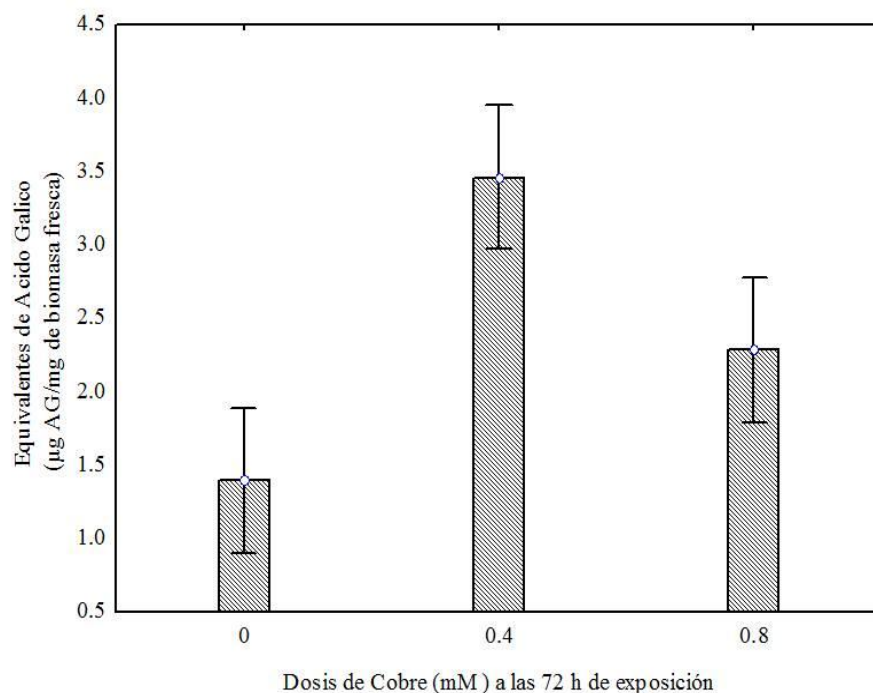


Figura 7. Valores de la actividad antioxidante total de *Euglena gracilis* expuestas a dosis de 0.4 y 0.8 mM de Cu^{2+} , expuestas a 72 horas respectivamente. Las medias \pm error estándar, $n = 3$.

3.3.3 PROLINA

El aminoácido Prolina se utiliza como un indicador de estrés ambiental, sin embargo se considera también como un importante molécula que protege a las células contra el estrés por metales pesados, (Hall, 2002). Diversos autores han sugerido que la Prolina puede actuar como un agente osmoprotector o como un inhibidor de la lipo-peroxidación actuando en la reducción de las especies reactivas al oxígeno en el organismo, (Alia, 2001).

Los resultados del análisis estadístico mostraron diferencias significativas entre las células de *Euglena gracilis* expuestas a una dosis alta y otra baja de Cu^{2+} ($P = 0.042$); el contenido de prolina se incrementa en las células de *Euglena gracilis* expuestas a 0.4 mM Cu^{2+} , en contraste con la

disminución significativa que se observa en la células de *Euglena gracilis* expuestas a una dosis de 0.8mM y que esta es mayor a las del control. (Figura7).

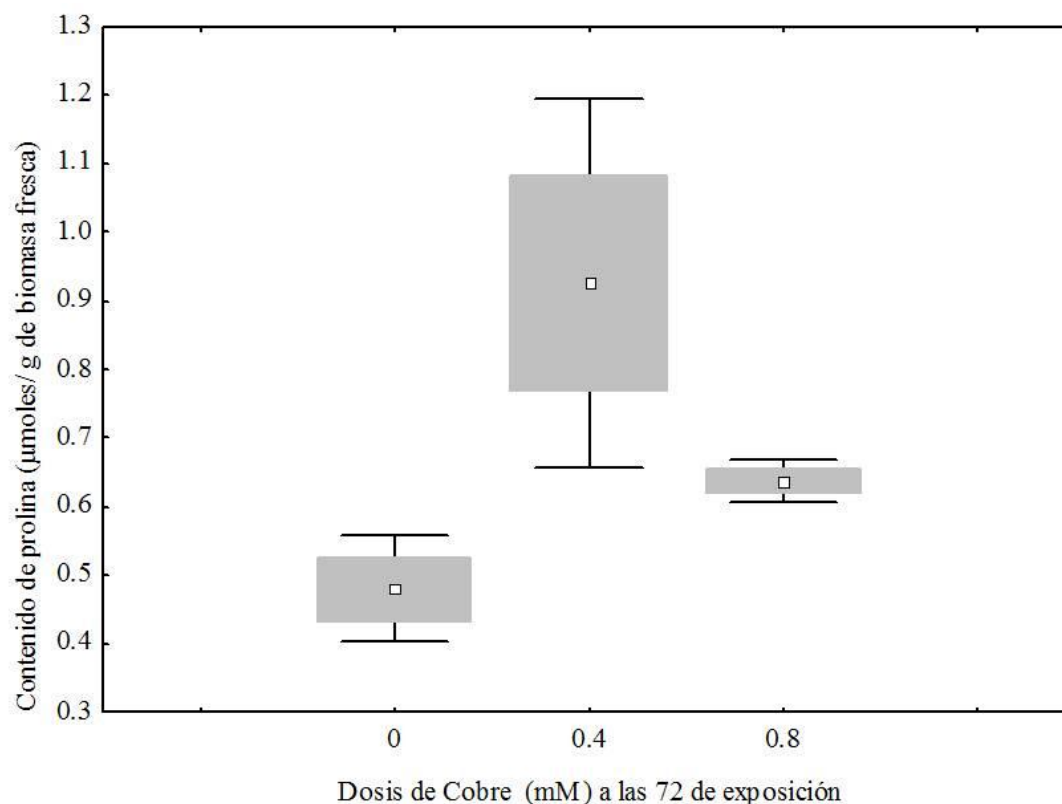


Figura 8. Cambios en los niveles de Prolina en *Euglena gracilis* tratadas con dosis 0.4 y 0.8 mM de Cu^{2+} a 72 horas de exposicion. (Diagrama de cajas, Barras musetran media \pm SE; n = 3).

Prolina puede actuar en *Euglena gracilis* como un antioxidante que evita que las especies reactivas de oxigeno reaccionen con el glutation, lo que facilita la sintesis de fitoquelatinas, lo cual ha sido confirmado por Yonamine (2004), en cultivos celulares de *Nicotina tabacum*, donde la induccion temporal del gen 'NtHAL3a' mostraron altos niveles de prolina libre que disminuyo la presencia de especies reactivas al oxigeno que dio como resultado una mayor tolerancia de las celulas de Li.

3.3.4 VITAMINA E

La exposición de *Euglena gracilis* a Cobre mostraron una tendencia a incrementarse a dosis bajas de Cobre (0.4 mM) y una significativa reducción de la producción de esta vitamina a medida que se incrementa la dosis de cobre dosis altas con respecto al control (Figura 8).

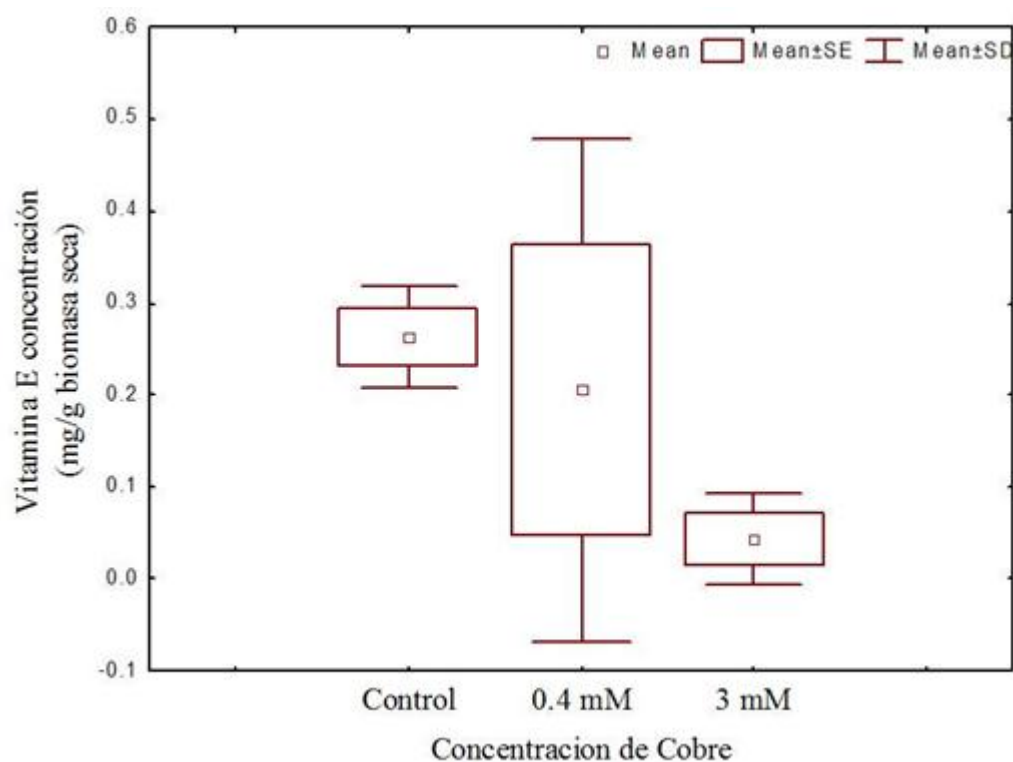


Figura 9. Variación de la concentración de Vitamina E en *Euglena gracilis* después de 72 h de exposición a las dosis de Cu^{2+} . Medias \pm Desviación estándar de la media (SD); n=3

3.3.5 PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

La producción de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides totales) presentaron un comportamiento dosis dependiente ya que se observó una disminución significativa a mayores dosis del metal (Figura 9). Utilizando este parámetro para valorar la capacidad de adaptación de *Euglena gracilis* al

CuCl₂, debido a que se encuentran relacionados con la viabilidad celular ya que se asocian con la capacidad fotosintética del organismo (Mac Farlane, 2001)

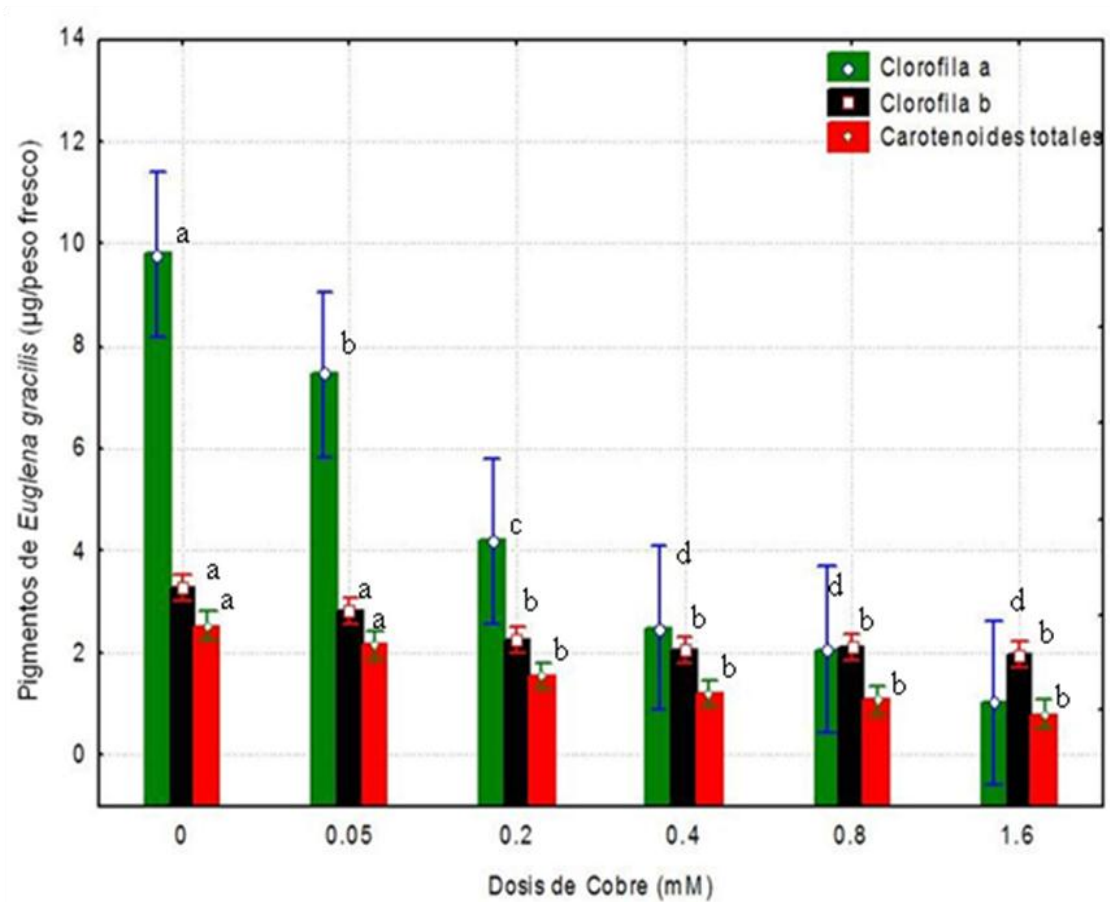


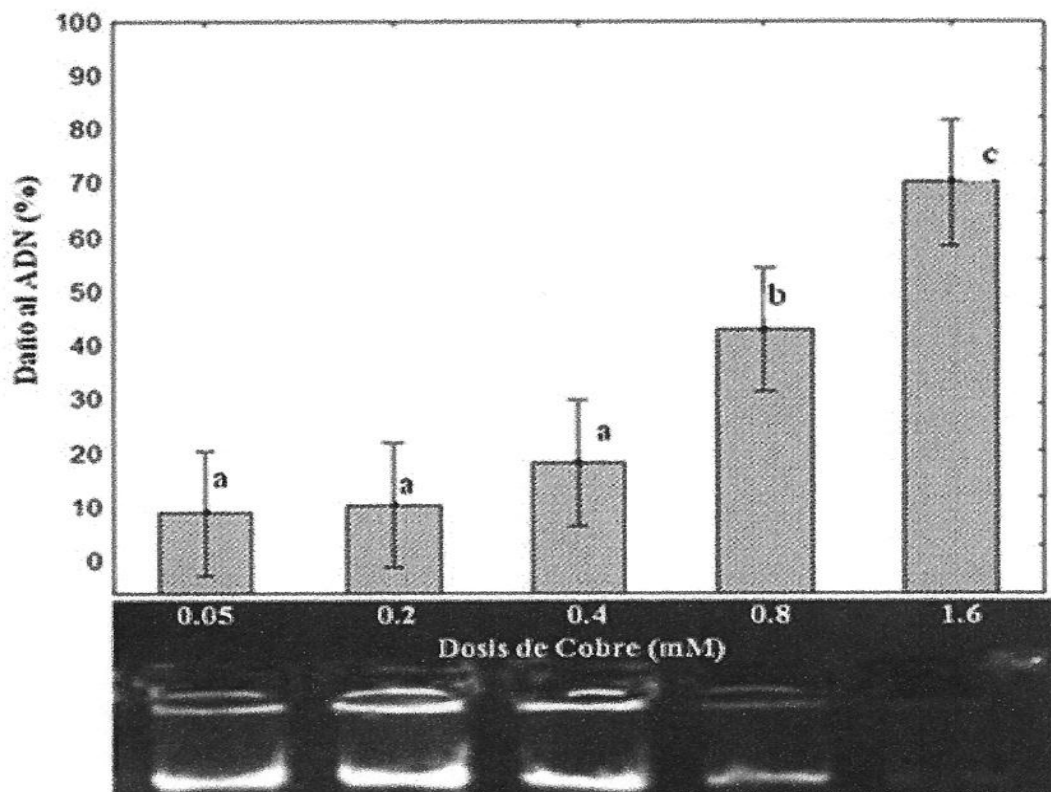
Figura 10. Cambios en los niveles de pigmentos fotosintéticos de *Euglena gracilis* expuestas a 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM de CuCl₂ después de 144 h de exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

La reducción en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos puede deberse al efecto directo de los iones de Cu²⁺ que pueden inhibir la síntesis de la clorofila y carotenoides. (Xing, W. 2010); además, el posible modo de acción del metal en los pigmentos fotosintéticos podría ser debido al incremento de especies reactivas de oxígeno (vía reacción de Fenton), y la disminución de la capacidad antioxidante de la célula. Así como a la capacidad de los iones de Cu²⁺ de interactuar con los grupos N y S de proteínas y alterar la permeabilidad

de la membrana (González M. 2009). Similares resultados se han observado en *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae), donde dosis subletales de Cu^{2+} , ocasionan una velos inactivación del fotosistema II, posiblemente como resultado de una disminución de los pigmentos fotosintéticos. (Perales V. 2007).

3.3.6 DAÑOS AL ADN

La exposición de *Euglena gracilis* a dosis altas de CuCl_2 (0.8 y 1.6 mM) generan cambios significativos en la integridad del ADN (% de daño del ADN) en comparación con el control (Figura 12); siendo similares estos resultados a



los reportados por Cai y Cherian (2003).

Figura 11. Niveles de daño del ADN en *Euglena gracilis* tratada con 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mM de CuCl₂ a las 144 h después de la exposición. Barras de error estándar con letras diferentes son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$)

Los radicales libres generados por la exposición a metales pueden alterar el balance redox de las bases pirimidínicas y dañar al ADN, esto posiblemente a que el ion Cu²⁺, ha mostrado tener un mayor impacto en la modificación de las bases nitrogenadas del ADN, reflejándose en un mayor daño celular. (Frenzilli, 2007).

3.4 BIBLIOGRAFIA

Gale S. A.; King C. K.; Hyne R. V. 2006 Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): evaluation using metal-spiked and field-contaminated sediments.; *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1887.

Yruela I. 2005. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* vol.17, n.1, pp. 145-156.

Mullapudi S.; Siletsky M.; Kathariou S. 2008 Heavy-Metal and Benzalkonium Chloride Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from the Environment of Turkey-Processing Plants; *Appl Environ Microbiol.* 74(5): 1464–1468.

Rodríguez-Zavala J. S.; García-García J. D.; Ortiz-Cruz M. A.; Moreno-Sánchez R. 2007. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis* *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard.* 42, 1365.

Mendoza-Cózatl D. G.; Moreno-Sánchez R. 2005. Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706, 88.

Waterhouse A. 2002. Determination of total phenolics. Wrolstad RE (ed). Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley and Sons. New York 1.1.1-1.1.8

Huang S., Tsai S., Mau J. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT- Food Sci. Technol.* 39 (4): 379-387

Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269: 337-341.

Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R. 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. *Biol. Soc. Trans.*, 11: 591-592

Afiukwa C. A., Ogbonna J. C. 2007. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (22): 2612-2615

González-Mendoza D.; Argumedo-Delira R.; Morales-Trejo A.; Pulido-Herrera A.; Cervantes-Díaz L.; Grimaldo-Juarez O.; Alarcón A. 2010. A rapid

method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genet. Mol. Res.* 9 (1): 162-166

Einicker-Lamas M., G.A. Mezian T.B., Fernandes F.L., Silva F., Guerra., Miranda 2002. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution* 120:779–786.

Rocchetta I., Küpper H. 2009. Chromium and Copper induced inhibition of photosynthesis in *Euglena gracilis* analysed on the single-cell level by fluorescence kinetic microscopy. *New Phytologist*. 182: 405-420.

Sanchez-Viveros G., González Mendoza D., Alarcon A., Ferrera- Cerrato R. 2010. Cooper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. *IJAB*, 12(3): 365- 368.

Janas K.M., Zielińska-Tomaszewska J., Rybaczek D., Maszewski J., Posmyk M.M., Amarowicz R., Kosińska A. 2010. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *J Plant Physiol*. 167(4):270-6

Hall J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal Experimental. Botanyt.*, 53 (366): 1-11.

Alia M.P., Hanty M.O., Matysik J. 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*. 21 (2): 195-200

Yonamine I., Yoshida K., Kido K., Nakagawa A., Nakayama H., Shinmyo A. 2004. Overexpression of NtHAL 3 genes confers increased levels of proline biosynthesis and the enhancement of salt tolerance in cultured tobacco cell. *J. Exp. Bot.* 55(396): 387-395

MacFarlane G. R.; Burchett M. D. 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 233

Xing W., Huang W.M., Liu G.H. 2010 Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid, *Environ. Toxicol.* 25 103e112.

González-Mendoza D.; Quiroz-Moreno A.; Medrano R. E.; Grimaldo-Juarez O.; Zapata-Perez O. 2009. Cell viability and leakage of electrolytes in *Avicennia germinans* exposed to heavy metals. 64:391-394.

Perales-Vela H. V., Gonzalez-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Cañizares-Villanueva R.O. 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere.* 67 (11): 2274-81.

Cai L., Cherian M.G. 2003 Zinc-metallothionein protects from DNA damage induced by radiation better than glutathione and copper- or cadmium-metallothioneins. *Toxicol Lett* 136: 193-198.

Frenzilli G., Ferrucci M., Giorgi F.S., Blandini F., Nigro M., Ruggieri S., Murri L., Paparelli A., Fornai F. 2007 DNA fragmentation and oxidative stress in

the hippocampal formation: a bridge between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) intake and long-lasting behavioral alterations. *Behav. Pharmacol.* 18(5-6): 471-81.

CAPITULO IV

Fluorescencia de rayos X (XRF)

4.1 Análisis de elementos químicos en células de *Euglena gracilis*.

El análisis de elementos químicos acumulados en las células de *Euglena gracilis* se llevó a cabo mediante la técnica de fluorescencia de rayos X (XRF) por dispersión de energía empleando el sistema SANDRA (Sistema de Análisis No Destructivo por Rayos X) desarrollado en el Instituto de Física Nuclear de la UNAM, México. En el sistema SANDRA se dispuso un tubo de rayos X de Mo ($17.5 \text{ K}\alpha$ de KeV) de 1.5 mm de diámetro. Las células de *Euglena gracilis* que se empastillaron se colocaron a 10 mm del colimador de salida de rayos X, y la región y distancia de análisis se determinó por la interacción de dos láseres. El área analizada corresponde a 1.8 mm^2 de diámetro en las pastillas de células de *Euglena gracilis*. El tiempo que duró la irradiación en cada muestra fue de 5 minutos, tiempo adecuado para determinar con una estadística adecuada (error menor de 5%) en las intensidades de los rayos X característicos de los elementos detectables por esta técnica (Ruvalcaba, 2010)

El proceso de análisis consistió en hacer incidir el haz de rayos X sobre la superficie de la pastilla de células de *Euglena gracilis*, provocando que los átomos capaces de absorber los rayos X, pasen del estado fundamental a estados excitados o de mayor energía debido a la salida de electrones de las capas internas del átomo. Los estados excitados son inestables, y el átomo tiende a volver al estado fundamental, por lo cual se producen transiciones de electrones desde los niveles más externos hacia los niveles más internos, y ocupar los huecos producidos en las capas electrónicas. Este proceso da lugar

a la emisión de energía en forma de radiación de rayos X secundaria llamada fluorescencia de rayos X, la cual es característica de cada elemento.

Los rayos X característicos se midieron con un detector de rayos X Si-PIN, ventana de 0.5 μm de Be, superficie de 6 mm^2 y espesor de 500 μm de Amptek. Las intensidades de rayos X (número de cuentas o fotones detectables), son proporcionales a la concentración del elemento en las células de *Euglena gracilis*. Las señales del detector se procesaron en un amplificador PX4 de Amptek conectado a una computadora. Los espectros fueron analizados mediante el programa AXIL (Vekemens et al, 1994) para determinar las intensidades de los picos de rayos X. Las concentraciones elementales se determinaron siguiendo el modelo descrito por Rousseau et al. (1996), Tsutsumimoto y Tsuji (2007), y con base en los espectros de materiales de referencia de hojas de tomate (NIST, SRM, 1573a), liquen (IAEA 482, IAEA 386) y acelga (IAEA 16).

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Euglena gracilis* se mantiene vigente mediante una constante resiembra del stock que se mantiene en condiciones controladas de luz blanca fría continua con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a una temperatura de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y con agitación manual dos veces al día, pH de 7, nutrientes (medio de cultivo), en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. La siembra se realiza cuidando al máximo las medidas de inocuidad para evitar cualquier posible foco de infección por hongos o bacterias presentes en el ambiente, por lo que se realiza dentro de una campana de bioseguridad,

desinfectando con cloro al 80% y/o etanol al 80%, se prenden mecheros y se destapan los matraces después de temperarlos dentro de la campana para su manipulación, con pipetas se colecta *Euglena gracilis* cepa Z para depositar en matraces de 1 litro y 1.8 litros que contienen medio de cultivo axenicos con la siguiente formulación: acetato de sodio (1g/L), extracto de carne (1g/L), Triptona (2g/L), extracto de levadura (2g/L) y $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_2$ (10mg), a un pH de 7, previamente esterilizado, se dejan en reposo en campanas de crecimiento bajo condiciones controladas.

Posteriormente se homogeniza la población inicial de los matraces inoculando 2×10^5 y se aplica una dosis mayor y una dosis menor a la dosis letal media obtenida de 0.6mM, de sulfato de cobre (0.4mM, 0.8mM respectivamente). A los tres días después de la exposición con cobre la biomasa fue colectada por centrifugación (1000 x g para 10 min en 10 °C) y fueron re suspendidas en una solución de EDTA 0.02 M disuelta con agua bidestilada y des ionizada (el lavado con EDTA extrae el cobre adsorbido a la superficie celular). Las células permanecieron en esta solución por 3 min; posteriormente se centrifugaron, descarto el sobrenadante y los tubos falcón de 50 ml y se congela para su posterior liofilizada durante 16 horas.

Una vez liofilizada se realiza la pulverización de la muestra en mortero, y se lleva a cabo el empastillado cuidando que sea siempre el mismo tiempo y la misma presión aplicada sobre la muestra que se va a analizar.

La pastilla se manipula con pinzas de disección para colocarla bajo la incidencia del haz del rayo Gama o del rayo X y llevar a cabo las mediciones de energía en grados KeV.



Figura 12.Proceso para el análisis de las muestras de *Euglena gracilis*. a) empastillado de la muestras (100 mg); b) interacción del haz de rayos X del tubo de Mo y el haz de rayos X elementales sobre la pastilla de células de *Euglena gracilis*, c) obtención de datos en la computadora.

4.2.1 CALIBRACIÓN

La calibración del equipo se realizó usando material de referencia certificado. La absorción de los iones de Cu^{2+} en los diferentes tejidos de *Euglena gracilis*, se calculó usando el factor de bioacumulación (FBA) el cual nos proporciona información sobre la habilidad de la planta de acumular metales con respecto a la concentración de metales presentes en la solución nutritiva. El FBA se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\text{FBA} = \frac{[\text{metal en biomasa de Euglena(ppm)}]}{[\text{inicial del metal adicionado la solución nutritiva(ppm)}]}$$

4.3 RESULTADOS

La acumulación del Cu^{2+} en las células de *Euglena gracilis* tratadas con respecto al control, indican que tiene la capacidad de acumular alto contenido del metal de una manera dosis dependiente, esto es a medida de que se incrementa la dosis de Cobre se observa una mayor acumulación del metal en la biomasa de *Euglena gracilis* con respecto al control (Figura 13).

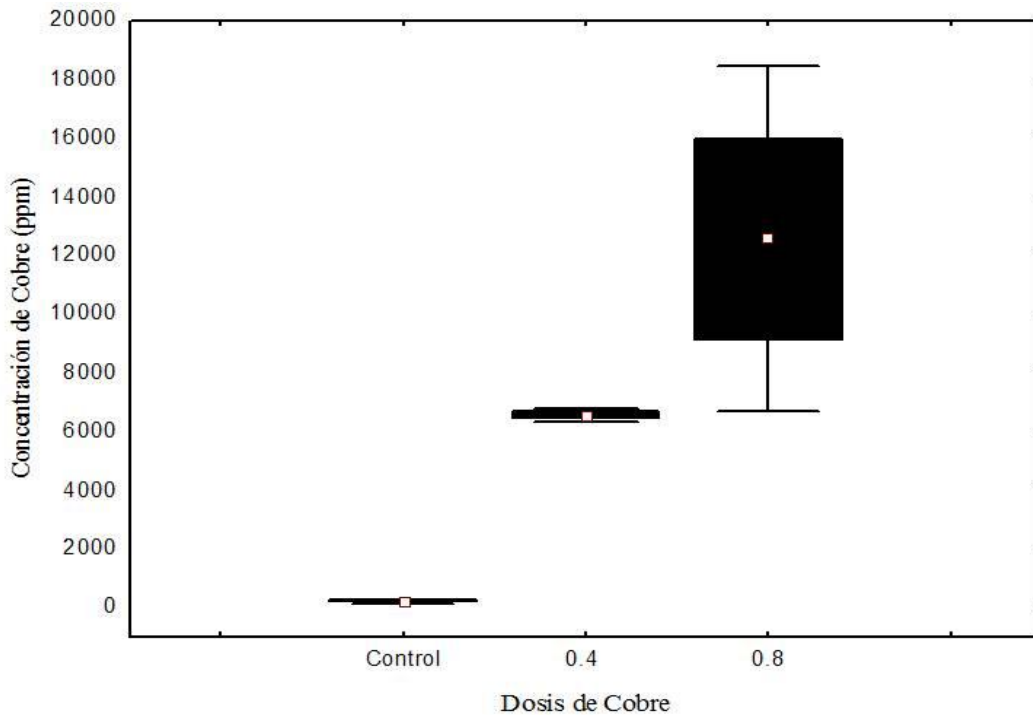


Figura 13. Concentración de Cu^{2+} (ppm) en células de *Euglena gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de sulfato de cobre 0, 0.4 mM y 0.8 mM durante 72 h. Los bloques muestran la media, 25 y 75 por ciento, las barras indican los valores mínimo y máximo, (n=3).

Esto es desde el punto de vista ecotoxicológico, se puede emplear a *Euglena gracilis* como un organismo bioindicador de contaminación por elementos potencialmente tóxicos en sistemas acuáticos, como lo es el cobre. Lo anterior también ha sido propuesto por Hoda y colaboradores en el 2010 quienes observaron que dosis crónicas de cobre tienden a generar cambios en parámetros fotosintéticos en *Euglena gracilis*.

Así mismo el análisis no paramétrico Krustal Wallis (Tabla 3); mostro diferencias significativas entre los tratamientos de Cobre ($P= 0.0273$). Con respecto al factor de bioacumulación (FBA), los resultados indicaron que la *E. gracilis* tiene un FBA alto y que este puede incrementarse a medida que se incrementa la dosis del metal presente en el medio de cultivo.

Tabla 3. Medias seguidas con letras iguales no son estadísticamente diferentes a $P= 0.05$ (valores son expresados como medias \pm DS para $n=3$)

Factor de Bioacumulacion de <i>Euglena gracilis</i> expuestas a diferentes dosis de cobre	
Dosis de Cu²⁺ (mM)	Factor de Bioacumulacion (FBA)
Control	0
0.4	114 \pm 10.73 ^a
0.8	133 \pm 30.42 ^{ab}

Siguiendo el criterio de Brooks (1998), quien clasifica a los organismos, como hiperacumuladores como aquellos que presentan más de 1000 ppm de metal(es) en sus tejidos, es posible sugerir en base a nuestros resultados que *Euglena gracilis* es un organismo hiperacumulador de Cu²⁺ dadas las altas concentraciones detectadas en su biomasa. Menciona Navarro (1997) y Aviles (2005) que *Euglena gracilis* tiene la capacidad de acumular cantidades significativas de otros metales no esenciales tales como Pb²⁺ y Zn²⁺.

Además, estos resultados nos indican la presencia de una estrategia de acumulación que podrían involucrar la participación de una serie de múltiples procesos, tales como, la producción de vacuolas, lo cual ha sido propuesto

como un mecanismo que contribuyen a la acumulación de Cu^{2+} en este organismo (Einicker-Lamas, 2002).

Por otra parte la presencia de ligandos de alta afinidad no se descarta, por ejemplo es posible que proteínas como la fitoquelatin sintetasa esté presente; esta es una proteína rica en cisteína (γ -glutamilcisteína (γ -Glu-Cys)dipeptidil transpectidasa), y que se localiza en el citoplasma en donde participa en la síntesis de las fitoquelatinas (FQs), a partir del glutatión (GSH) en presencia de ciertos metales (Loscos,2006).

4.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El experimento se realizó completamente al azar con 3 repeticiones. Las diferencias significativas entre las muestras tratadas y control fueron analizadas usando la prueba de Kruskal-Wallis (Statistical Package version 5.5, Statsoft, USA).

4.4 BIBLIOGRAFIA

Ruvalcaba Sil J.L, Mianda R.H., Aguilar M.V., Picazo N.F. 2010 SANDRA: A portable XRF system for the study of mexican culture heritage. X-Ray Spectrometry, vol 39, 338-345

Vekemans B. K., Janssens L., Vincze F., Adams P., Van Espen. 1994. Analysis of X-ray spectra by iterative least squares (AXIL): New Developments, X-Ray Spectrometry, vol. 23, 278-285.

Rousseau R.M., Willis J.P., Duncan.A.R. 1996. Practical XRF calibration procedures for major and trace elements. X- Ray Spectrometry. Vol. 25, 179-189.

Tsutsumimoto K., Tsuji K. 2007. Time resolved X-Ray fluorescence for monitoring the intake of mineral nutrients in living plants. X- Ray Spectrometry. Vol 36, 324-327.

Hoda A.; Häder D.P. 2010 A fast algal bioassay for assessment of copper toxicity in water using *Euglena gracilis*. Source: Journal of Applied Phycology. 22 (6): 785-792

Brooks R.R. 1998. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals, Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining. CAB International, Oxon, UK 289-312

Navarro L., Torres-Márquez M. E., González-Moreno S., Devars S, Hernández R., Moreno-Sánchez R. 1997. Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 116: 265-272

Avilés C., Torres-Márquez M.E., Mendoza-Cózatl D., Moreno-Sánchez R. 2005. Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. Arch Microbiol. 184 (2): 83-92.

Einicker-Lamas M., Mezan G.A., Fernandes T.B., Silva F.L., F. Guerra., Miranda K. 2002. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺

toxicity and accumulation in eukaryotic cells. *Environmental Pollution* 120:779–786.

Loscos J., Naya L., Ramos J., Clemente M., Matamoros M.A., Becana M. 2006. A reassessment of substrate specificity and activation of phytochelatin synthases from model plants by physiologically relevant metals. *Plant Physiology* 140: 1213–1221.

CAPITULO V

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

5.1 INTRODUCCIÓN

El análisis de las fitoquelatinas en muestras biológicas generalmente se realiza mediante la técnica de HPLC en fase reversa. En el caso de la técnica de electroforesis capilar de zona se han reportado que presenta ventajas sobre la del HPLC-FR en la determinación de fitoquelatinas principalmente porque involucra una instrumentación más simple, pequeñas cantidades de reactivos y la capacidad de procesar gran cantidad de muestras (Torres, 1997).

Mediante esta técnica es posible separar cationes, aniones, aminoácidos, péptidos, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas de forma simultanea (Castagnino, 1999). Actualmente, la electroforesis capilar en zona (CZE) es la técnica de electro separación más frecuentemente empleada para el análisis cuantitativo de péptidos (Righetti, 2001) además de que se ha empleado en la identificación de fitoquelatinas en micro algas principalmente (Pérez-Rama, 2005). Por lo que representa una técnica novedosa y alterna a la de HPLC-FR, para la determinación de fitoquelatinas en células de *Euglena gracilis*.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Euglena gracilis* se creció y sembró en el laboratorio de biología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Coruña a partir del stock que se encuentra en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California en matraces

de 1 litro y 1.8 litros que contienen medio de cultivo axenicos con la siguiente formulación: acetato de sodio (1g/L), extracto de carne (1g/L), Triptona (2g/L), extracto de levadura (2g/L) y $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}_2$ (10mg), a un pH de 7, previamente esterilizado, se dejan en reposo en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas..

La siembra se realiza cuidando al máximo las medidas de inocuidad para evitar cualquier posible foco de infección por hongos o bacterias presentes en el ambiente, desinfectando con etanol al 80%, se prenden mecheros y se destapan los matraces para su manipulación, con micro pipetas se colecta *Euglena gracilis* cepa Z para depositar en matraces con 250 mL de medio de cultivo, se homogeniza la población inicial de los matraces inoculando 2×10^5 células obtenidas en la fase exponencial con 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 μM de CdCl_2 y 0.4, 0.6 y 0.8 mM Cobre de manera independiente.



Figura 14. a) Siembra, **b)** crecimiento y **c)** conteo en cámara Neubauer de las células de *Euglena gracilis* expuestas a metales.

Se determinó la densidad celular (N) a los tres días por conteo directo en microscopio utilizando cámara de Neubauer.

Se centrifuga los 200 mL de cultivo con diferentes dosis, obteniendo el pellet celular el cual se re suspende con un apropiado volumen de HCl 0.1M verificando que el pH este entre 1-2, se someten a la acción de ultrasonido con el fin de romper las células y así liberar el contenido citoplasmático, se realiza con un equipo Soniprep 150 MSE, a una amplitud de 14µm durante 2 minutos, estando las muestras inmersas en un baño de hielo, se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se pipetea el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1000µL y se realiza una centrifugación de clarificación del extracto celular a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se toman 500 µL del sobrenadante al cual se le añaden 500 µL de tampón de derivatización (tampón borato 1M, pH 9, DTPA 1mM y agente reductor NaBH₄ a una concentración de 10 mg/L) el cual debe de ser preparado al momento; la proporción de tampón borato y agente reductor es de 24:1.

Se incuban las muestras durante 20 minutos en un baño con hielo, posteriormente se añade 8µL de solución de mBrB y en oscuridad a temperatura ambiente se incuban durante 1 hora, por último se realiza una centrifugada para clarificar las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos, transfiriendo 600 µL del sobrenadante a viales específicos de electroforesis capilar para ser inyectados y analizados por ECZ.



Figura 15.Equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector de fotodiiodo.

La separación de los compuestos que presentan grupos tiol, procedentes del extracto de *Euglena gracilis* se lleva a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con un detector de fotodiiodo. El análisis de datos (electroferograma) se realiza mediante el programa informático HP^{3D}CE ChemStation de Hewlett Packard (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Se utiliza un capilar (Composite Metal Services Ltd., UK Block) que presenta un diámetro interno de 50 μm y 375 μm de diámetro externo, con una longitud total de 38 cm, y una longitud efectiva (desde el extremo del inyector al detector) de análisis de 30cm.

El capilar es acondicionado previamente, pasando una solución de NaOH 0.1 M durante 3 minutos, seguida de un lavado con agua Milli-Q durante 3 minutos; seguido el capilar se rellena con una solución electrolítica compuesta por ácido fosfórico (H_3PO_4) 150 mM y pH 2.15. La solución electrolítica se filtra con filtros de nitrocelulosa de 0.22 μm y se des gasifica antes de su uso.

Entre muestra y muestra a analizar se debe de lavar el capilar con la solución electrolítica durante 3 minutos con la finalidad de evitar que se quede adherido a las paredes del capilar cualquier residuo. Posteriormente se realiza la inyección de la muestra en el capilar mediante una presión de 50 mbar durante 15 segundos. Una vez cargada la muestra se aplica un voltaje de +14 KV. La detección se realiza mediante absorbancia a una longitud de onda de 390 nm. La temperatura del capilar se mantuvo a 25°C ±1°C. Cada análisis de las diferentes muestras ensayadas se repite dos veces para asegurar la reproducibilidad del análisis.

5.2.1 INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Para poder obtener una mayor sensibilidad, sin perder eficiencia en el método desarrollado, se probaron diferentes volúmenes de inyección, a una misma presión 50 mbar analizando y variando el tiempo de inyección 15, 17, 20 y 25 segundos. La introducción de muestra en el capilar durante 20 segundos o más de inyección provoco una pérdida de resolución. Sin embargo con un tiempo de inyección de 15 segundos, la sensibilidad de detección de los picos disminuyo y los picos pertenecientes a (y -EC) 6G, presentes en una baja concentración no se detectan. Dado que con los tiempos más altos de inyección no se detectaron nuevos picos que podrían estar en concentraciones más bajas y había una pérdida de resolución, la inyección de las muestras se realizó a una presión de 50 mbar durante 17 segundos.

5.2.2 DERIVATIZACIÓN DEL EXTRACTO CELULAR DE *Euglena gracilis* USANDO MONOBROMOBIMANE (MBRB).

Los compuestos tiolicos se separan y analizan mediante electroforesis Capilar en Zona (CZE), sometiendo previamente los extractos celulares a una derivatización con monobromobimane (mBrB).

El mBrB es un compuesto fluorescente perteneciente al grupo de los bromobimanes que reacciona selectivamente con los compuestos tiólicos. Este fluorocromo reacciona específicamente con los tioles dando lugar a un derivado soluble en agua que presenta fluorescencia al excitarse a 380 nm y emite luz a 480 nm, es detectable en la región visible a 390 nm, siendo esta longitud de onda la que se emplea para la detección específica de los compuestos tiólicos que llevan unidos el mBrB.

Estándares de GSH y fitoquelatinas se derivatizan por el mismo procedimiento y serán empleadas para identificar los diferentes picos que aparecerán en el espectroferograma.

5.2.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y DERIVATIZACIÓN CON mBrB DE LOS COMPUESTOS TIÓLICOS PRESENTES EN CELULAS DE *Euglena gracilis*.

Se han probado diferentes tampones para la extracción y derivatización con mBrB de los compuestos tiólicos, esto con la finalidad de conseguir una adecuada separación electroforética con tampón fosfato 150 mM, pH 1.60 y metanol al 2.5 % v/v, sin perder la eficiencia de este. Se aplicó un voltaje de 13 kV y se utilizó un capilar de 30 cm de longitud efectiva. La inyección de la muestra se llevó a cabo mediante presión de 50 mbar durante 17 segundos.

5.2.4 EXTRACCIÓN ACIDA DE LOS COMPUESTOS TIÓLICOS.

En lo que se refiere a la extracción ácida, el HCl produjo picos claramente separados y diferenciados, obteniendo además una resolución y sensibilidad mejor que la que se obtiene con ácido sulfosalicílico, por lo que el HCl fue el ácido que se eligió para la extracción de los compuestos tiólicos de *Euglena gracilis*.



Figura 16.Proceso de preparación del equipo de electroforesis capilar de zona: a) preparación de los capilares, b) inyección de muestra y c) diagrama del software del equipo de electroforesis capilar de zona.

5.3 RESULTADOS

En el caso de *Euglena gracilis* nivel bioquímico, uno de los principales mecanismos de tolerancia, acumulación e inactivación de metales principalmente para Cd^{2+} es la síntesis de fitoquelatinas y glutatión (Rodríguez-Zavala, 2007); otro mecanismo es la compartimentalización del ion libre y en forma de complejo con fitoquelatinas, en cloroplastos y mitocondrias (Avilés, 2005), las cuales tienen un papel clave principalmente como moléculas quelatantes (Mendoza-Cózatl, 2006);. En este sentido los resultados obtenidos mostraron que la exposición de las células de *Euglena gracilis* a dosis menores de Cd^{2+} (0.04 mM) estimula una mayor síntesis de fitoquelatinas (FQs) principalmente las fitoquelatinas 2,3 y 4 con respecto al control; así como una

disminución en la presencia de GSH, γ -EC y Cys. Caso contrario las células expuestas a dosis de 0.06 mM se observaron presencia de GSH, γ -EC y Cys y nulos valores de PC (Figura 17).

Se tienen experiencias de estudios con fitoplancton expuesto a concentraciones sub letales de metales, encontrando un aumento significativo en la expresión de péptidos, esto concuerda con la idea de que los péptidos γ -EC podrían ser indicadores cuantitativos de la expresión de metales, (Lee, 1996); igualmente se ha observado que plantas expuestas a metales el glutatión al igual que el ascorbato varia su concentración, expuestas a cadmio (Vogeli-Lange & Wagner, 1996), cobre (Nagalakshmi & Prasad, 2001), plomo (Gupta, 1995). La exposición excesiva a este metal es extremadamente toxica ya que los iones Cd^{2+} penetran a la célula a través de los sistemas de transporte celular que utilizan los iones fisiológicamente activos, como el Zn^{2+} (Nieboer, 1980) además de que interaccionan con grupos SH y carboxilo de proteínas y otras biomoleculas, promoviendo la desnaturalización de proteínas, peroxidacion de lípidos y ruptura de cadena de DNA, (Valle, 1972).

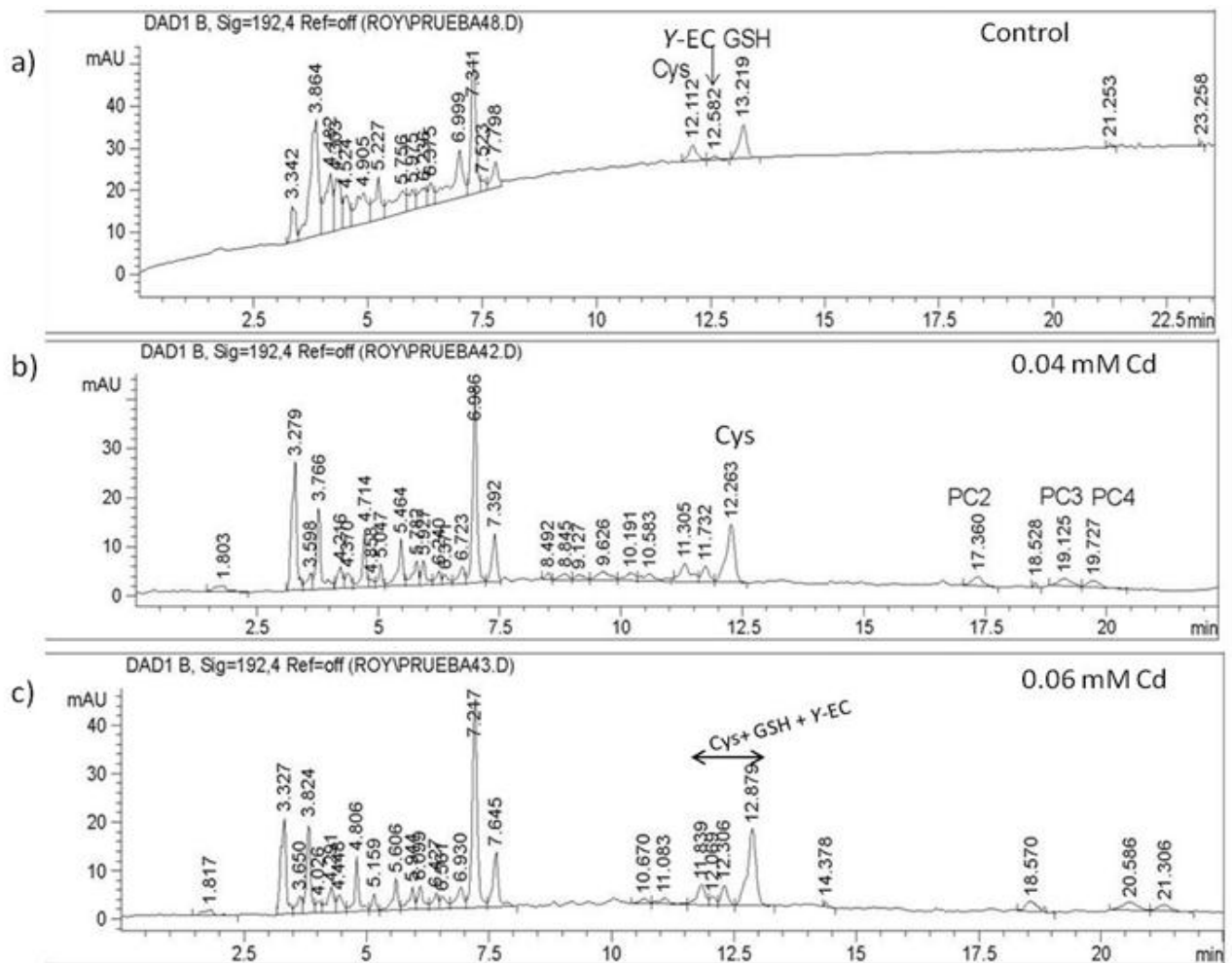


Figura 17. Electroferogramas de los compuestos tiolicos presentes en las muestras de *Euglena gracilis* expuesta a una dosis de 0, 0.04 y 0.06 μM de Cd^{2+} durante tres días.

Caso contrario en las células expuestas a Cobre los resultados mostraron la nula presencia de fitoquelatinas a las dosis empleadas (Figura 18). Estos resultados confirman lo mencionado por diversos investigadores en donde se indica que los iones de Cd^{2+} son los más potentes inductores de fitoquelatinas y en menor proporción por la presencia de metales como Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^+ , y Ag^+ en donde la producción de las fitoquelatinas depende de la dosis, tipo de organismo y tiempo de exposición (Clemens (a), 2006). Adicionalmente, Inouhe (2000) menciona que el efecto del Cu^{2+} podría estar envuelto en la inhibición del GSH o biosíntesis de FQs en el cultivo de células

vegetales. Lo cual refuerza la posibilidad de que existan otros mecanismos involucrados en la tolerancia de *Euglena gracilis* a Cobre.

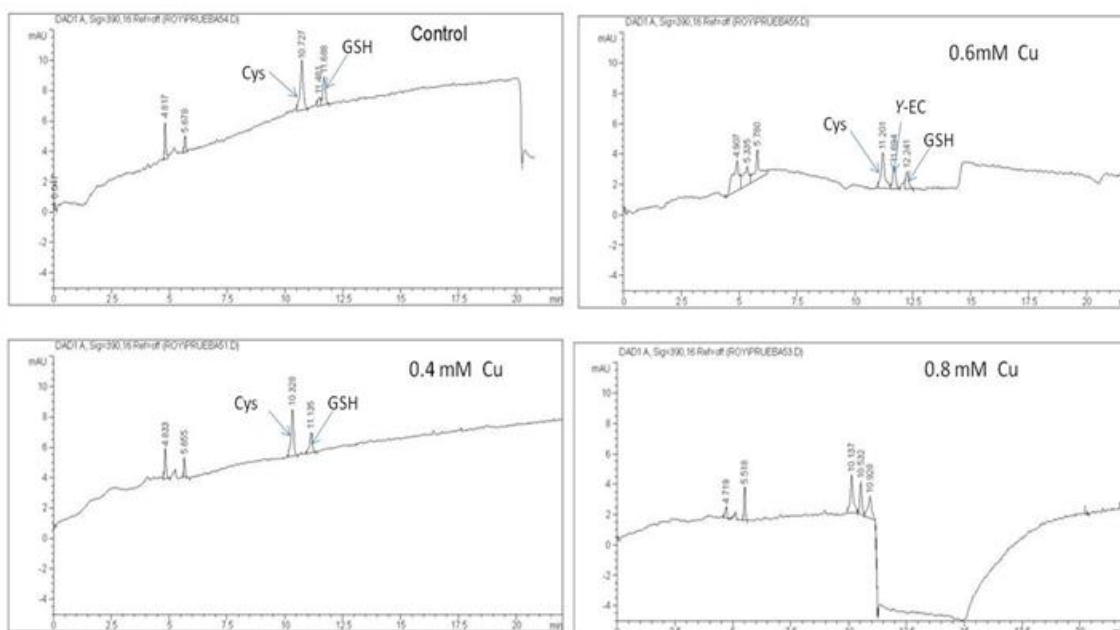


Figura 18. Electroferogramas de los compuestos tiolicos presentes en las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a una dosis de 0, 0.4, 0.6 y 0.8 mM de Cu^{2+} durante 3 días.

Nota: Condiciones para realizar los espectoferogramas.

Solución electrolítica H_3PO_4 159 mM, pH 1.6 y metanol al 2.5 % v/v. Condiciones de la ECZ: capilar de sílice fundido sin recubrir de 30 cm de longitud efectiva x 50 μm de diámetro interno (longitud total de 38 cm), las muestras introducidas por presión de 50 mbar durante 17s; voltaje aplicado de 14 kV; la detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 390 nm. Procedimiento de extracción HCl 0.1 M. Agente reductor 1.5 mg/ml de NaBH_4 .

5.4 BIBLIOGRAFIA

Torres E., Cid A., Fidalgo P., Abalde J. 1997. Rapid assay for the analysis of class III metallothioneins by capillary zone electrophoresis in crude extracts of microalgal cells exposed to cadmium. *Journal of Chromatography A*. 775 (1-2):339–347

Castagnino, J. M. 1999. Capillary electrophoresis. *Acta bioquím. clín. Latinoam*, 33(3):297-329

Righetti P.G. 2001 Capillary electrophoretic analysis of protein and peptides of biomedical and pharmacological interest. *Biopharm. Drug. Dispos.* 22 : 337- 351

Pérez-Rama M, Abalde A.J, Torres E. 2005. Capillary zone electrophoresis for analysis of phytochelatin and other thiol peptides in complex biological samples derivatized with monobromobimane. *ELECTROPHORESIS* 26 (3): 610–620

Rodríguez-Zavala J.S., García-García J., Ortiz-Cruz M., Moreno-Sánchez R. 2007. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 42: 1365-1378.

Avilés C, Torres-Márquez ME, Mendoza-Cózatl D, Moreno-Sánchez R. 2005. Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol.* 184 (2): 83-92.

Mendoza-Cózatl, D. and R. Moreno-Sánchez. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. *Pathway modeling for plants. J. Theor. Biol.* 238:919-936.

Lee J.G., Ahner B.A., Morel F.M. 1996. Export of Cadmium and Phytochelatin by the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Trans. Environ. Sci. Technol.* 30 (6): 1814–1821

Vogeli-Lang R., Wagner G.J. 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science* 114: 11-18.

Nagalakshmi N., Prasad M.N.V., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.* 160: 291-299.

Gupta M., Rai U. N., Tripartite R. D., Chandra P. 1995. Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle. *Chemosphere* 30 (10): 2011-2020

Valle 1972 DNA

Clemens S (a).2006.Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants.*Biochimie.* 88: 1707–1719.

Inouhe-Masahiro, Ito R., Ito S., Sasada N., Tohoyama H., Masanori J. 2000. Azuki Bean Cells Are Hypersensitive to Cadmium and Do Not Synthesize Phytochelatins¹.*Plant Physiol.* 123(3): 1029–1036.

CAPÍTULO VI

6 INTRODUCCION

6.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR (Polymerase Chain Reaction), es una técnica utilizada en biología molecular, cuyo objetivo se fundamenta en la propiedad natural de la enzima polimerasa para replicar hebras de ADN. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos, también llamados cebadores o primers, de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, sintetizados por métodos químicos y cuyas bases son complementarias de los extremos iniciales y finales del fragmento de ADN que se va a copiar. Se utiliza un oligonucleótido diferente para cada uno de los dos extremos del fragmento de ADN, debido a que las hebras de ADN son copiadas en direcciones opuestas ya que la replicación siempre se realiza en un sentido 5' – 3' en cada una de las hebras de ADN. La copia de un fragmento de ADN se realiza en un período de aproximadamente uno a dos minutos, y ésta se repite por lo menos 30 ciclos. Cada ciclo consta de tres fases que se realizan a distinta temperatura: desnaturalización del ADN, alineación de los oligonucleótidos y por último la extensión y síntesis del fragmento de interés. En el primer ciclo se ha obtenido una copia del fragmento de ADN, en los ciclos siguientes cada una de las copias del fragmento de ADN es copiada de nuevo, por esto se dice que la amplificación se realiza de forma exponencial (Paniagua, 2007).

6.1.1 DESNATURALIZACIÓN DEL ADN.

Separación total de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar. Para hacerlo se calienta el ADN a 94 °C. Ambas cadenas obtenidas servirán de "base" a las reacciones que le siguen.

6.1.2 ALINEACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS: (ANNEALING).

La temperatura es disminuida para alcanzar la temperatura de alineación, que permite que cada oligonucleótido se fije a una sola cadena de ADN en el extremo 3' o 5'. En este momento interviene la enzima ADN polimerasa que alarga la extremidad de los oligonucleótidos utilizando desoxinucleotidos tri fosfatados (dNTPs).

6.1.3 EXTENSIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

El último paso consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa. Formando dos cadenas complementarias dando lugar a dobles cadenas de ADN. Este proceso se repite varias veces, por lo que la reacción en cadena, permite obtener cantidades importantes del ADN original.

Tanto la alineación de los oligonucleótidos como la síntesis de ADN se efectúan a temperaturas elevadas para evitar la formación de secuencias que no son complementarias.

6.2 ADN POLIMERASA

Para efectuar una PCR, se deben utilizar ADN polimerasas termoestables. La Taq DNA polimerasa, fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que habita en medios acuáticos calientes de temperaturas de alrededor de 70°C. Esta polimerasa funciona de manera óptima a 72°C. La vida media de

ésta enzima calentada a 96°C es de 40 minutos. La polimerasa Taq puede ser añadida al comienzo de la reacción y funciona hasta el fin de la reacción de amplificación sin problemas.

La Taq DNA polimerasa posee una actividad 5'→3' polimerasa y 5'→3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3'→5'. También posee una actividad terminal transferasa que ajusta un sólo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del fragmento amplificado. Esta habilidad es a menudo utilizada en los métodos de clonación. Dos formas de Taq polimerasa son disponibles: enzima nativa purificada de *Thermus aquaticus* y una enzima genéticamente producida en *E. coli*. Como la Taq I ADN polimerasa no tiene actividad exonucleasa 3'→5', no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma (Saiki, 1988).

6.3 AMPLIFICACIÓN ARITMÉTICA Y/O GEOMÉTRICA

Los ciclos sucesivos producen segmentos de secuencias largas y cortas. El número de los oligonucleótidos es copiado de manera aritmética (1,2,3,4), mientras que los segmentos cortos son copiados de manera geométrica (1, 2, 4, 8, 16, 32...)

El producto de la reacción geométrica es un fragmento de ADN donde las extremidades están marcadas por el final 5' de los oligonucleótidos utilizados como moldes y por tanto la longitud del fragmento es corta.

6.4 EVALUACIÓN DEL PRODUCTO

Producto de PCR se evalúa mediante un gel de agarosa en electroforesis, coloreado con bromuro de etidio. Generalmente el tamaño de los fragmentos se sitúa alrededor de 0,2 a 2 kb, pero pueden llegar a 15 kb. Si la

secuencia a amplificar se conoce, se puede verificar que el tamaño del producto PCR total corresponda al tamaño calculado esto con un marcador de peso molecular. Se puede también verificar, mediante la digestión del producto PCR y con enzimas de restricción. (Saiki, 1988)

6.5 MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *Euglena gracilis* se mantiene vigente mediante una constante resiembra del stock que se mantiene en condiciones controladas de luz blanca fría continua con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y con agitación manual dos veces al día, pH de 7, nutrientes (medio de cultivo), en el laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. La siembra se realiza cuidando al máximo las medidas de inocuidad para evitar cualquier posible foco de infección por hongos o bacterias presentes en el ambiente, por lo que se realiza dentro de una campana de bioseguridad, desinfectando con cloro al 80% y/o etanol al 80%, se prenden mecheros y se destapan los matraces después de temperarlos dentro de la campana para su manipulación, con pipetas se colecta *Euglena gracilis* cepa Z para depositar en matraces de 250 mL litros que contienen medio de cultivo axenicos con la siguiente formulación: acetato de sodio (1g/L), extracto de carne (1g/L), Triptona (2g/L), extracto de levadura (2g/L) y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10mg), a un pH de 7, previamente esterilizado, se dejan en reposo en campanas de crecimiento bajo condiciones controladas.

Posteriormente se homogeniza la población inicial de los matraces inoculando 2×10^5 y se aplica una dosis mayor y una dosis menor a la dosis letal media obtenida de 0.6mM, de sulfato de cobre (0.4mM, 3mM respectivamente).

A los tres días después de la exposición con cobre la biomasa fresca colectada por centrifugación (4000 x g para 7 min en 10 °C)

Se inicia con la extracción de RNA siguiendo la técnica propuesta por González (2009).

6.5.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Se prepara el búfer de extracción el cual contiene 3% de Sulfato de sodio (SDS), 0.5 mM EDTA, 0.1 mM Tris – HCl, 0.1% DEPC.

A 200 mg de biomasa fresca se le adiciona 200 mL de búfer se le da un vortex por 15 segundos, se agrega 200 mL de fenol cloroformo, (relación 1:1); se incuba durante 5 minutos a una temperatura de 65°C y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo donde se inyecta isopropanol refrigerado y se deja incubar a -20°C durante un periodo de 20 minutos. Posteriormente se centrifuga a 10 000 rpm durante 10 minutos y se decanta para realizar el lavado con etanol a 75% al pellet que debe de estar adherido al fondo del tubo. Se lleva a cabo una segunda centrifugada y nuevamente un lavado del pellet con etanol al 80%, después de completar esta fase se re suspende el pellet con 30 µL de agua DEPC.

6.5.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE FQS MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR

La evaluación de la expresión se realizó mediante la reacción de RT-PCR utilizando un termociclador Hybaid Modelo 610. Para ello se utilizó 2 µl de ADNc como templado, 3 µl de búfer 10x, 2.5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de la mezcla de dNTP's (10mM), 0.2 µl de la enzima Taq ADN polimerasa (5 U/µl) y 2 µl de los iniciadores correspondientes a cada gen previamente mencionado.

Adicionalmente, se utilizaron, los iniciadores de actina (AmbionR) como controles internos para evaluar la expresión de ambos genes y la integridad del cDNA. El programa de PCR utilizado consistió en: 35 ciclos a 93 °C por 3 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1 min para los genes FQS; 40 ciclos a 93 °C por 3 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min para los genes GSH y ECS. Así como 35 ciclos a 93 °C por 3 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min para el gen APX. Una vez obtenidos los productos de PCR, éstos se separaron y se visualizaron por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Los fragmentos observados se analizaron por densitometría mediante la utilización del programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los niveles de expresión del transcrito se reportan como unidades relativas de expresión resultado de la normalización con el control interno (actina).

6.5.3 DISEÑO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA LOS GENES DE FITOQUELATIN SINTETASA

Con la finalidad de identificar los posibles genes que estarían participando en la tolerancia al metal, se diseñaron iniciadores específicos para los fragmentos a identificar: fitoquelatín sintetasa (FQS); gamma-glutamil cisteína sintetasa (ECS), glutatión sintasa (GSH) y ascorbato peroxidasa (APX) en base a las secuencias conservadas presentes en otros organismos utilizando el programa DNASTAR (Lasergene Primer Select Program, DNASTar, Madison, WI). El par de iniciadores para el gen FQS consistió en las siguientes secuencias: 5'-ATC TTA CTG CCA TCA CAT CTTT-3' (forward) y 5 '-CAG CAT TAT ATAG CCACCAATAGG-3'(reverse). Para el gen ECS, el par de iniciadores para su identificación estuvo formado por las siguientes secuencias: 5'-GACATACCM ATM ATG CCT AAGG3'(forward) y 5'CCATCAGCT

CCTCTCATCTC-3'(reverse). Finalmente para el gen APX, se emplearon los siguientes iniciadores:5'- GACCTGCCGACGTGGGTGCGGG-3'(forward) y 5' GCAGACCGGGGG GAAGGC GGCGGACGCGTG -3'(reverse), que han sido previamente reportados para este organismo por Madhusudhan y colaboradores en el 2003.

6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se expresaron como medias \pm desviación estándar de la media (SD). Las diferencias significativas entre medias fueron determinadas usando la prueba de Kruskal–Wallis (Statistical Package versión 5.5, Statsoft, USA).Las medias se consideraron significativas cuando existieron diferencias de $P < 0.05$.

6.7 RESULTADOS

6.7.1 EXPRESIÓN DEL GEN DE FQS, GSH Y ECS EN BIOMASA DE EUGLENA GRACILIS EXPUESTAS A CU²⁺

En el presente estudio la integridad del proceso de RT-PCR se confirmó mediante la amplificación del fragmento de actina (Figura 19).

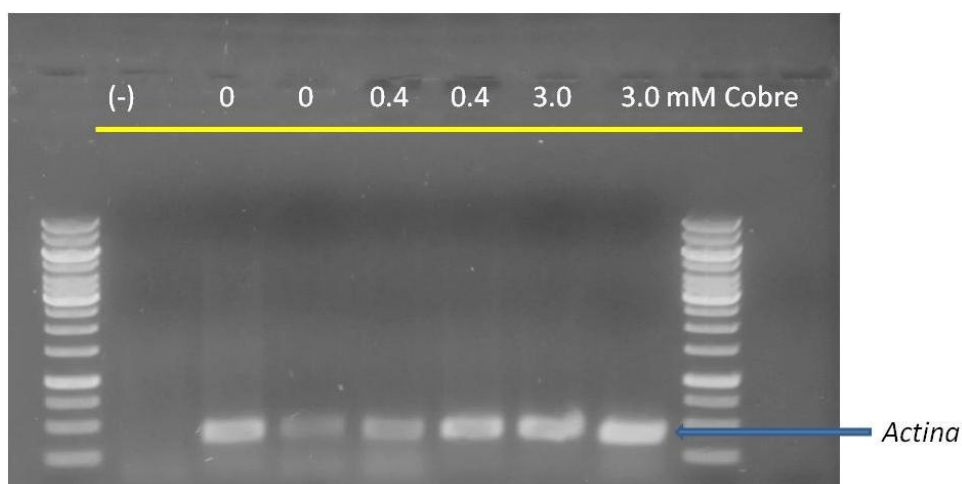


Figura 19. Evaluación de la integridad del cDNA usando el gen de Actina en células de *Euglena gracilis* expuesta a cobre por 72 h. n=2

No obstante, los resultados del experimento de *Euglena gracilis* tratadas con Cu^{2+} , mostraron que el diseño de las secuencias para amplificar los genes

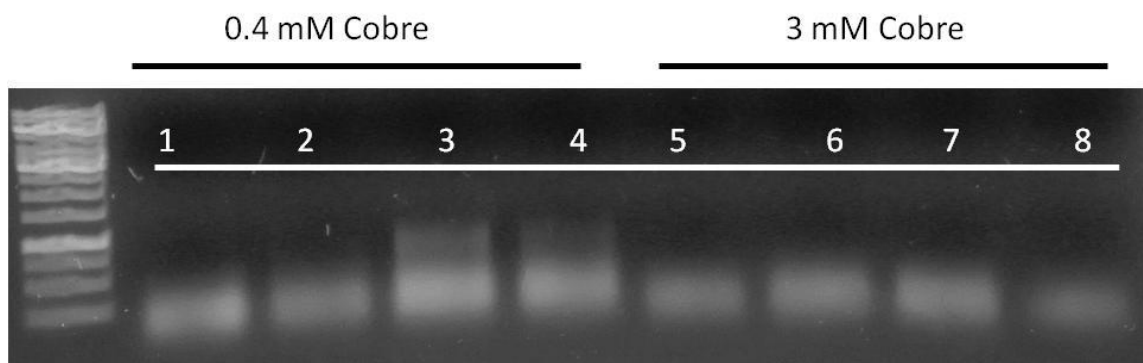


Figura 20. Evaluación de la expresión del fragmento de FQS (líneas 1-2 y 5-6) y GSH (líneas 3-4 y 7-8) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cu^{2+} a las 72 h. n=2

de FQS, GSH y ECS, no permitió la amplificación de los fragmentos esperados (Figura 20).

En contraste, se detectó de manera ligera la expresión del fragmento del gen APX en las muestras de las células tratadas con 3.0 y 0.4 mM de Cu^{2+} al final del experimento (Figura 21). Lo cual podría ser una respuesta inicial para atenuar la toxicidad celular del estrés oxidativo causado por el Cobre.

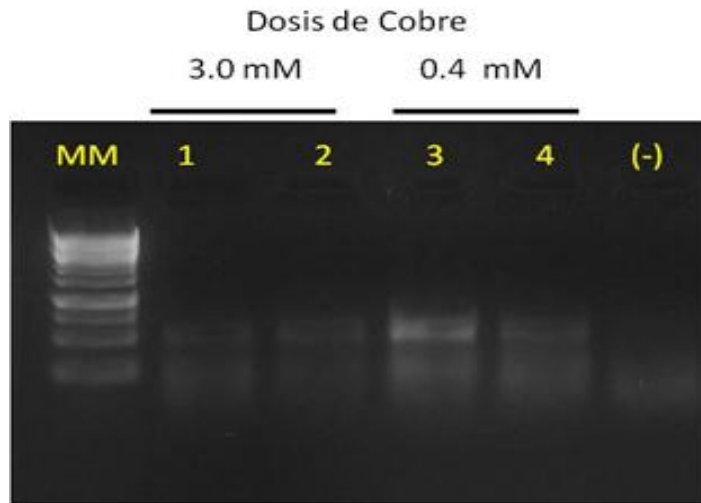


Figura 21. Evaluación de la expresión del fragmento de APX expuestas a Cobre: líneas 1-2 (3.0 mM) y líneas 3-4 (0.4mM) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cobre a las 72 h. n=2

Mientras que en la expresión del fragmento del gen ECS no se observó en las células de *Euglena gracilis* expuestas a Cu^{2+} (Figura 22).

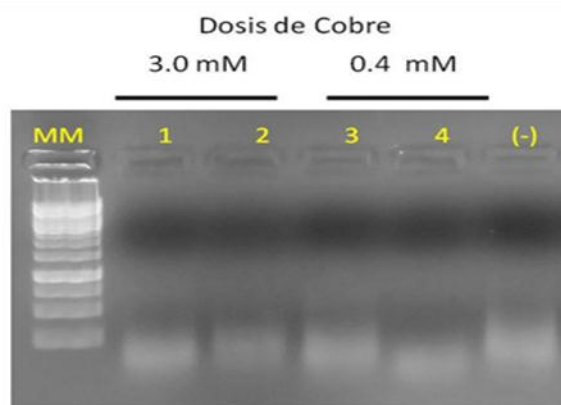


Figura 22. Evaluación de la expresión del fragmento de APX expuestas a Cobre: pozo 1-2 (3.0 mM) y pozo 3-4 (0.4mM) de las muestras de *Euglena gracilis* expuestas a Cobre a las 72 h. n=2

6.8 BIBLIOGRAFIA

Paniagua G.L., Monroy E., García-González O., Alonso J., Negrete E., Vaca S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 6:17.

Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi R., Horn G., Mullis, K., Erlich H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91

Madhusudhan R., Ishikawa T., Sawa Y., Shigeoka S., Shibata H. 2003. Post-transcriptional regulation of ascorbate peroxidase during light adaptation of *Euglena gracilis*. *Plant Sci.* 165: 233-238

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

La técnica de Fluorescencia de rayos X por dispersión de energía no es una técnica tradicional para el análisis de material biológico, sin embargo mostro ser una técnica versátil y multielemental, rápida y no invasiva para determinar de manera eficaz la concentración de Cu^{2+} y otros elementos esenciales en las células de *Euglena gracilis* expuestas a dosis crecientes de cobre.

Euglena gracilis es un organismo hiperacumulador de Cu^{2+} dadas las altas concentraciones detectadas en su biomasa.

Entre las posibles causas que no permitieron la identificación de los fragmentos buscados se puede mencionar: a) que el tiempo y dosis de exposición empleadas no hayan sido las adecuadas para detectar la inducción de los fragmentos de los genes buscados; b) que la respuesta de *Euglena gracilis* a la exposición al metal no induzca la expresión de los genes propuestos; lo cual indicaría la presencia de otra ruta alterna para la tolerancia al metal; c) que en el diseño de las secuencias no se hayan considerado la región conservada de los genes buscados o estos muestren una homología diferente en *Euglena gracilis*.

Todas estas propiedades hacen que *Euglena gracilis* pueda ser considerado como un organismo con potencial biotecnológico en la bioremediación de sistemas acuáticos impactados por metales.

Anexos

Production of Phenolics and Flavonoids Compounds in *Euglena Gracilis* Under Copper Stress

David Cervantes-Garcia¹, Rosalba Troncoso-Rojas², Alberto Sánchez-Estrada²,
Daniel González-Mendoza^{1*} and Onecimo Grimaldo-Juarez¹

¹Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC).

Carretera a Delta s/n C.P. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Carretera a La Victoria km. 0.6, Hermosillo, Sonora 83000, México

(Received: 12 August 2012; accepted: 24 September 2012)

In the present study the identification of phenolics acids and flavonoids compounds from *E. gracilis* exposed at two copper sulfate (CuSO_4) concentrations (0.4 and 3 mM) in the culture medium was evaluated using high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that *E. gracilis* treated with 0.4 mM Cu^{+2} , increased significantly, the total phenolics content ($718.86 \pm 12.61 \mu\text{g GA/g}$) and total flavonoids ($361.46 \pm 51.93 \mu\text{g QE/g}$) with respect to control ($137.04 \pm 19.80 \mu\text{g QE/g DW}$ and $669 \pm 0.57 \mu\text{g GA/g DW}$ respectively). However, a non-significant increased of total phenolics content ($667.2 \pm 6.29 \mu\text{g GA/g DW}$) and total flavonoids ($150.17 \pm 24.23 \mu\text{g QE/g DW}$) were observed in *E. gracilis* exposed to 0.8 mM Cu^{+2} with respect to control. The HPLC analysis showed that the exposure of *E. gracilis* at high doses (0.8 mM Cu^{+2}) stimulated the presence of feluric and chlorogenic acids with respect to control. In contrast, the presence of flavonoids quercetin, and kaempferol were mainly observed in *E. gracilis* treated with 0.4 mM Cu^{+2} . Finally, the present study clearly showed change in the phenolics and flavonoids in *E. gracilis* exposed to copper. Therefore, the present data could suggest that feluric, chlorogenic acids, quercetin and kaempferol production are involved in Cu^{+2} detoxification.

Key words: copper, flavonoids, phenolics acids, *Euglena gracilis*, HPLC

Heavy metals are common pollutants in urban aquatic ecosystems, arising from effluent discharges, urban and agricultural runoff and solid waste dumping. The metals most often elevated in contaminated water bodies, and thus of greatest ecotoxicological concern, are zinc (Zn), copper (Cu) and lead (Pb) due to their effect to human health and prevalence in estuarine sediments. The occurrence of toxic metals in urban aquatic

ecosystems adversely affects the lives of local people since they utilize this water for daily requirements. These heavy metals can be incorporated into food chain and their levels can increase through biological magnification (Cardwell *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2008). Numerous metals are essential for living organisms at very low concentrations, but at high concentrations most are toxic and have a direct and adverse influence on various physiological and biochemical processes. In this sense the copper is an essential metal that participates in growth, metabolism and enzyme activities (Ke *et al.*, 2007). Although, the copper excess may stimulate the formation of free radical and reactive oxygen species, perhaps resulting in oxidative stress in the organism (Sanchez-Viveros *et al.*,

* To whom all correspondence should be addressed.
E-mail: daniasaf@gmail.com

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Euglena gracilis* AL ESTRÉS POR COBRE

David Cervantes García, Daniel González-Mendoza*, Lourdes Cervantes-Díaz, Adriana Morales Trejo y Onecimo Grimaldo Juárez

Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n, Código Postal 21705, Ejido Nuevo León - Baja California, México

Roberto Zamora-Bustillos

Instituto Tecnológico de Conkal, km 16.3, Antigua Carretera Mérida-Motul, C. P. 97345 Conkal - Yucatán, México

Recibido em 1/1/11; aceito em 21/2/11; publicado na web em 15/4/11

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Euglena gracilis* TO COPPER STRESS. The objective of this study was to evaluate the toxic effect of Cu^{2+} in the physiological development of *E. gracilis*. The results showed that *E. gracilis* had an effect on the dose-dependent growth to the concentration of metal. The exposure of *E. gracilis* metal at doses of 0.8 and 1.6 mM of Cu^{2+} showed a significant negative effect on the stability of DNA and photosynthetic pigments involved in capturing light in the antenna complex after 144 h of exposure to the metal.

Keywords: *Euglena gracilis*; copper; photosynthetic pigments.

INTRODUCCIÓN

Durante, las últimas décadas, como resultado del desarrollo de asentamientos poblacionales y el impulso de diferentes actividades industriales se ha favorecido una mayor persistencia y bio-disponibilidad de compuestos químicos como los metales pesados en diferentes ecosistemas acuáticos.¹

Los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) pueden ser esenciales o no esenciales para los seres vivos, pero todos ellos en exceso representan un riesgo latente para la salud de las especies que habitan estos ecosistemas entre ellas al ser humano. Dentro de los EPTs que tienen gran relevancia en la agricultura es el Cobre (Cu^{2+}), el cual es requerido en el metabolismo y procesos celulares de las plantas, pero en cantidades elevadas puede generar serios problemas en la salud de los sistemas acuáticos.²

Lo anterior ha generado la necesidad de desarrollar tecnologías para la remediación de ambientes acuáticos afectados por metales. En este sentido, el uso de microorganismos tolerantes con capacidad de almacenar metales ha demostrado ser una biotecnología con ventajas sobre los métodos físicos-químicos, ya que ofrece un menor impacto ambiental y menor costo económico.³ En este sentido el protista acuático de vida libre *Euglena gracilis* representa un modelo biológico idóneo para ser empleado en procesos de biorremediación. Este microorganismo forma parte del plancton de aguas dulces y puede ser cultivado de manera eficiente en condiciones controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono. Además presenta propiedades metabólicas y genéticas que le permite desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales esenciales y no esenciales a diferentes valores de pH y bajo un régimen heterotrófico o fotosintético.⁴

Estas propiedades hacen que *Euglena gracilis* pueda ser considerada como un organismo con potencial biotecnológico en la biorremediación de sistemas acuáticos impactados por EPTs. En la actualidad existen diversos trabajos sobre el estudio del efecto de metales en este

organismo siendo el cadmio el metal más estudiado.⁵ Sin embargo, el efecto tóxico del cobre en la fisiología de *E. gracilis* ha sido poco abordado, por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto tóxico del Cu^{2+} en el desarrollo fisiológico de *E. gracilis*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron experimentos empleando cultivos axénicos de *Euglena gracilis* cepa Z (generosamente donada por el Dr. T. Ishikawa). El experimento consistió en realizar el crecimiento del microorganismo en un medio de cultivo mínimo con la siguiente formulación: acetato de sodio (1 g/L), extracto de carne (1 g/L), Triptona (2 g/L), extracto de levadura (2 g/L) y $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mg). Los experimentos se realizaron inoculando 1×10^6 de células obtenidas de la fase exponencial (6 días de crecimiento) en matraces de 50 mL con 0, 0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.6 mM de CuCl_2 . Los matraces se mantuvieron bajo luz blanca fría continua con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y con agitación manual dos veces al día. La densidad celular (N) se determinó cada 24 h por conteo directo en microscopio utilizando cámara de Neubauer durante 7 días y se determinó la tasa de crecimiento k en número de divisiones celulares por día (divisiones/día) a partir de la siguiente fórmula:

$$k = 3.332 \frac{\log N_n - \log N_o}{m}$$

donde N_n es la densidad celular al final del bioensayo; N_o es la densidad celular inicial nominal y m es el tiempo transcurrido entre el inicio y final del bioensayo (en días).

También se determinó el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento (Ik) usando la siguiente fórmula:

$$Ik = \frac{kc - ki}{kc} \times 100$$

donde kc es la tasa de crecimiento para la concentración k ; y ki corresponde a la tasa de crecimiento promedio para el control. El experimento se realizó por triplicado con muestreos diarios.

*e-mail: daniasaf@gmail.com

Full Length Research Paper

Changes on proline, phenolics compounds and antioxidants status in *Euglena gracilis* exposed to copper

David Cervantes-García, Daniel González-Mendoza*, Onecimo Grimaldo-Juárez and Silvia Aviles-Marin

Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC),
Carretera a Delta s/n C.P. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

Accepted 9 November, 2011

The effects of copper toxicity on the content of bioactive compounds in *Euglena gracilis* were investigated using two CuSO_4 concentrations (0.4 and 0.8 mM) added in medium culture. Proline, phenolic compounds and antioxidant activity were measured after 72 h of copper stress. Results obtained in this study show that increasing levels of copper (0.4 and 0.8 mM) resulted in a general increased proline, total phenolic compound and antioxidant activity in the cells of *E. gracilis* exposed to doses of 0.4 mM Cu^{2+} in contrast one decreased significantly was observed when the doses was increasing to 0.8 mM with respect to control. These changes suggesting that the phenolic contents and the presence of proline as well as the synergistic effects among them affect the total antioxidant capacity of *E. gracilis*. Finally, these results provide useful and important information for researchers in order to increase the studies about antioxidant capacity and functional value of *E. gracilis* for bioremediation programs. Such information can be used to closely scrutinize the strategy of bioremediation programs for selecting *E. gracilis* strain for targeted biotechnologies purposes.

Key words: Heavy metals, tolerance, *Euglena gracilis*, bioactive compounds.

INTRODUCTION

In recent years, the anthropogenic activities like ultimate disposal of treated and untreated waste effluents containing toxic metals as well as metal chelates from different industries, for example steel plants, battery industries, thermal power plants etc. and also the indiscriminate use of heavy metal containing fertilizers and pesticides in agriculture resulted in deterioration of water quality rendering serious environmental problems posing threat on human beings (Amman et al., 2002). Due to their occurrence and persistence in aquatic pollution, the metals are one group of contaminants commonly assessed (Johnston and Roberts, 2009). The copper (Cu^{2+}) is an essential plant micronutrient and often occurs in high concentrations in the aquatic ecosystems (Rauf et al., 2009). The copper excess may stimulate the formation of free radical and

reactive oxygen species, perhaps resulting in oxidative stress in the organism (Sanchez-Viveros et al., 2010). In this way the organisms (plants) present a variety of mechanisms by which can reduce heavy metal toxicity including production of heavy metal binding factors and proteins (metallothionein and phytochelatin conjugates), exclusion of toxic heavy metals from cells by ion-selective metal transporters, and excretion or compartmentalization (Gonzalez-Mendoza et al., 2008). One mechanism by which many plants or microalgae respond to and apparently detoxify toxic heavy metals is the production of Proline (Choudhary et al., 2006; Zhang et al., 2008). Proline plays important roles in osmoregulation, protection of enzymes, stabilization of the machinery of protein synthesis, scavenging of free radicals and effective singlet oxygen quencher (Alia et al., 2001; Gonzalez-Mendoza and Zapata-Pérez, 2008).

On the other hand, *E. gracilis* has been shown to be one of those especially suited organisms for different kinds of studies and could be a biotechnological option

*Corresponding author. E-mail: daniasaf@gmail.com.