

CAPÍTULO 7. EL ESTADO DEL ARTE EN LA EVOLUCIÓN: LAS ENSEÑANZAS DE LA GST

Brandon Alberto Pulido Hernández

Leticia Guadalupe Navarro Moreno.

Universidad del Papaloapan Resumen

Resumen

La enzima Glutación S-Transferasa (GST), proteína participante en el metabolismo xenobiótico, ha demostrado también la capacidad de responder al estrés oxidativo (EO) generado por metales pesados (MP). Esto junto a su presencia en gran variedad de especies le confieren la facultad de considerarla una posible proteína implicada en el proceso evolutivo. Este trabajo pretende estudiar la capacidad de respuesta al EO de la GST en especies que lograron desarrollarse en ecosistemas acuáticos contaminados por MP, con el fin de establecer una relación entre la tolerancia de dichas especies a metales como el Hg y Cd y la actividad de la GST, y así elucidar el papel de esta enzima como una proteína implicada en la adaptación al EO de diferentes organismos. Se ha determinado las concentraciones tolerantes e inhibitorias de Hg y Cd para los organismos *Hafnia alvei* y *Candida parapsilosis*. Los resultados preliminares muestran la alta capacidad de tolerancia que presentan estos organismos.

Palabras clave: GST, metales pesados, estrés oxidativo, proteína evolutiva.

Introducción

La Teoría de la Evolución ha constituido un pilar fundamental sobre el cual se sostienen áreas de la ciencia como la biología, la bioquímica o la biotecnología. A partir del desarrollo de esta se ha logrado construir y estudiar la teleonomía de la vida en el planeta.

Observada a nivel molecular, la evolución tiene como uno de los constituyentes principales a las proteínas, macromoléculas biológicas compuestas de aminoácidos que han ido modificándose hasta dar lugar a una gran variedad de actividades presentes en los seres vivos a lo largo de su

historia. Ejemplo de ello son la ATP sintetasa o el citocromo c, proteínas altamente conservadas y esenciales en el metabolismo energético y la respiración celular de distintos seres vivos.

La enzima Glutación S-Transferasa (GST), una proteína participe en procesos como el metabolismo oxidativo y el metabolismo de los xenobióticos, ha sido considerada como una posible proteína implicada en el proceso evolutivo, debido a su multifuncionalidad y su presencia en un gran número de especies (Sherrat & Hayes , 2002). Debido a ello, se pretende estudiar su actividad en organismos de diferentes especies, tanto en condiciones normales como en presencia de agentes estresantes, con la finalidad de analizar su comportamiento y poder discernir su posible papel como proteína involucrada en el proceso evolutivo. Complementario a esto es el hecho de que los organismos de estudio (*Hafnia alvei*, *candida parapsilosis*, *Euglena gracilis* y *Penicillium sp*) fueron aislados en sistemas acuáticos contaminados con MP ubicados en la región del Papaloapan. Los MP son especies químicas altamente tóxicas en bajas concentraciones, cuyo principal mecanismo de toxicidad está basado en la generación de EO, por lo que su monitoreo es de alta relevancia en el ámbito de salud ambiental. La enzima GST ha demostrado una capacidad de respuesta ante el EO generado por la exposición a MP, por lo que su estudio en las especies aisladas en estos ecosistemas acuáticos (las cuales además están distribuidas en distintos reinos del árbol filogenético) expuestas a Hg y Cd (dos de los metales pesados más tóxicos y encontrados en los efluentes acuáticos) es importante para elucidar la relación que guardan las: especies de estudio-MP-EO- y la actividad de la GST. E ilustrar el papel de esta en la capacidad de respuesta antioxidante de los organismos y un posible papel como bioindicador de exposición y daño por MP.

Evolución

Las transformaciones del pensamiento son sucesos históricos que han ocurrido debido a teorías que han supuesto un cambio en la forma en la que se concebía al mundo antes de ellas. Las leyes del movimiento de Newton o la teoría de la relatividad de Einstein, e incluso el establecimiento de la tabla periódica significaron una revolución para áreas como la física y la química y todos los desarrollos teóricos y prácticos que vinieron después de ello. Equiparables a ellas es la teoría de la evolución enunciada por primera vez por Charles Robert Darwin, pues significó un punto de

inflexión, no sólo para la biología, sino para todas las ciencias existentes y venideras relacionadas con el estudio de la vida. En ella se postula que la ascendencia de todas las especies se remonta hasta un ancestro original, y que el cambio en las propiedades de grupos de organismos a lo largo de generaciones es resultado del proceso evolutivo (Menor-Salván, 2013).

Publicado en 1859, “El Origen de las Especies” de Charles Darwin supuso un cambio en la manera de concebir y estudiar los procesos que propiciaron la generación de las distintas formas de vida. De este tratado pueden extraerse dos tesis principales.

La primera de ellas postula que todas las especies contemporáneas, así como las extintas, son descendientes de una forma de vida original. Toda especie, con excepción de la forma de vida original tiene un predecesor, denominado ancestro. Aquellas que comparten un ancestro en común fueron en principio muy similares, adquiriendo una diferenciación sustancial con el pasar del tiempo.

La segunda tesis es la teoría de la selección natural, un modelo que postula los agentes de cambio que intervienen en el proceso de diferenciación de las especies. Estos agentes son definidos por la interacción entre las especies y el sistema o entorno en el cual se desarrollan. La selección natural enuncia que la evolución estará dirigida al desarrollo de formas de vida que presenten características que se adecuen mejor al entorno. De esta manera, las especies que posean o desarrollen dichas características se verán favorecidas en su prevalencia en la línea evolutiva con respecto a las que no lo hagan (Futuyma, Evolution., 2005; Darwin, On The Origin of Species by Means of Natural Selection, or The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. , 1859). El trabajo de Darwin representó el paradigma que necesitaban todas las ciencias enfocadas en el área biológica para construir un camino enfocado en encontrar las respuestas a las interrogantes planteadas al estudiar el principio de la biogénesis. El propio paradigma evolutivo fue evolucionando a través del tiempo, surgiendo con ello nuevas corrientes explicativas sobre los principios en los que se generaba el desarrollo evolutivo. Desde el gradualismo, extensión propia de la selección natural o la teoría de los equilibrios puntuados, propuesta por Niles Eldredge y Stephen Jay Gould, en la cual la especiación se realizaba mediante la transformación rápida de poblaciones periféricas, en lugar de cambios graduales, y que entre un evento de especiación y otro existen largos períodos de estabilización o invariabilidad, que aparecen puntuados por

breves períodos de rápida evolución (Eldredge & Gould, 1972; Cachón & Barahona, 2002). Hasta la deriva génica, antítesis de la teoría de la selección natural, en el sentido no de negarla, sino de constituir un fenómeno en esencia opuesto al establecido por esta. La selección natural establece un mecanismo evolutivo de carácter teleonómico, en el que la adaptación es el fin principal. La deriva génica por su parte es un proceso aleatorio, sin un fin específico, en el que las frecuencias alélicas (los alelos son versiones distintas de un mismo gen que se diferencian en su secuencia) de una población cambian a lo largo de varias generaciones debido al azar.

A nivel celular, los paradigmas evolutivos también estuvieron sujetos a cambios. Con “sobre el origen de la célula mitótica” (1967) Lynn Margulis logró cuestionar las teorías neodarwinistas imperantes en la época y dar un giro a la comprensión de la evolución de las especies proveyendo un nuevo enfoque sobre la visión que se tenía acerca de la evolución celular. Margulis terminó de construir una teoría endosimbiótica cuyas bases se remontan a trabajos de biólogos celulares como Ivan Wallin en 1927, Edmund Beecher Wilson en 1925 y Clifford Dobell en 1914. La endosimbiosis parte del análisis hecho de que tanto las mitocondrias como los cloroplastos tienen su propio ADN y ribosomas, y de la pregunta del “¿Por qué necesitarían estos organelos ADN y ribosomas, si hay ADN en el núcleo y ribosomas en el citosol?” Así pues postula que la estructura de la célula eucarionte es resultado de un proceso de simbiosis específico en el cual un organismo vive dentro de otro. Las bacterias, mitocondrias y cloroplastos tienen ADN y ribosomas similares, por lo cual se piensa que las células eucariontes, otrora hospederas, y las bacterias formaron una relación endosimbiótica hace mucho tiempo, cuando estas células hospederas individuales tomaron las bacterias aerobias y fotosintéticas, pero no las destruyeron, sino que las asimilaron. Así, después de millones de años de evolución, las bacterias aerobias se convirtieron en mitocondrias y las bacterias fotosintéticas se volvieron cloroplastos (figura 1). Esta teoría es promotora del gradualismo, al menos en el proceso evolutivo de la célula eucarionte (Lane N. , 2017).

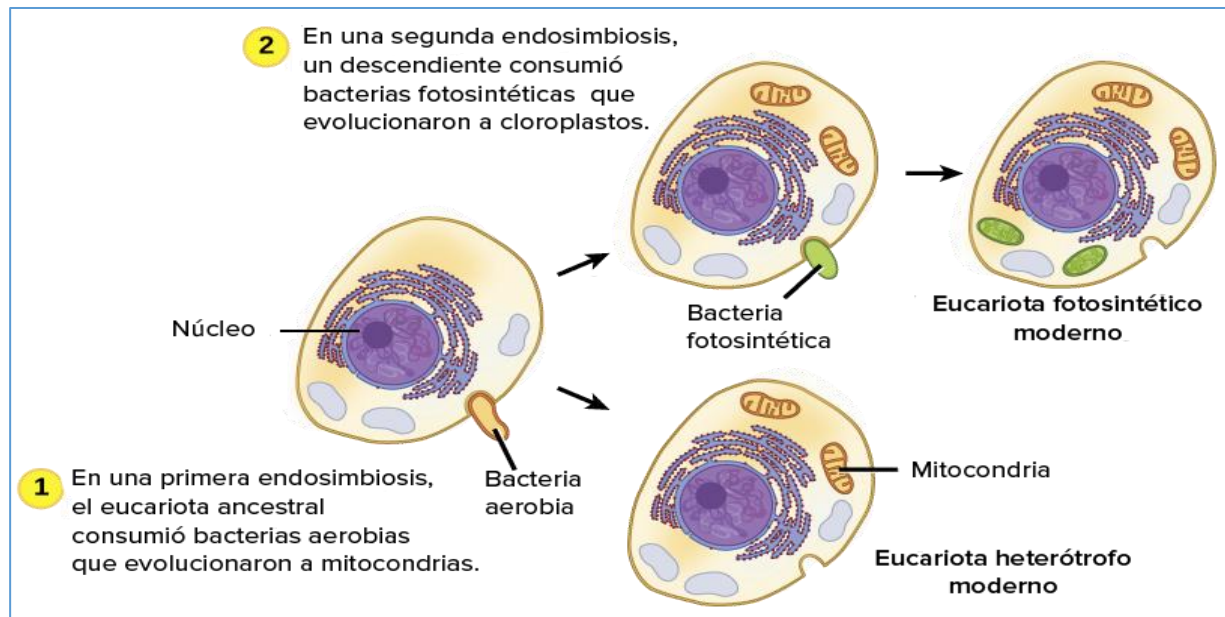


Figura 1. Representación del mecanismo de endosimbiosis (Fuente: OpenStax College, Biology, (CC BY 4.0).)

Proteínas y evolución

Descendiendo unos órdenes de magnitud en la escala biológica podemos encontrarnos con las proteínas, biomoléculas designadas por las leyes físicas y naturales como un factor importante en el desarrollo de las especies en la evolución biológica. Las funciones llevadas a cabo por las proteínas están dirigidas a la prevalencia de las distintas especies. La elucidación de las funciones de las proteínas constituye una parte importante de la comprensión de los procesos naturales fundamentales, incluida la interacción de las especies con sus entornos. Evidencias sugieren, por ejemplo, que los objetivos de la selección natural son, en primera instancia, la estabilidad globular de la proteína, seguida de la optimización de la función que esta desarrolle, fin último del proceso y que conlleva a mejores posibilidades de adaptación (Bastolla, Dehouck, & Echave, 2017). Este mecanismo es tan relevante que existen incluso hoy en día proyectos dedicados a la evolución dirigida de proteínas con actividades específicas a través de la replicación del proceso de selección natural por ingeniería de proteínas (Lane & Seelig, 2014; d’Oelsnitz & Ellington, 2018)

Si bien la selección natural establece en gran medida la tendencia evolutiva de las proteínas, existen proteínas que después de desarrollar funciones más versátiles, llegaron a volverse esenciales en el desarrollo de muchas especies. Ejemplo de ello es el citocromo c, una enzima esencial para la respiración en animales y muy conservada en estos, lo cual significa que a pesar de las variaciones en su secuencia de aminoácidos, la molécula ha cambiado poco a través del tiempo. La teoría de la evolución postula que las moléculas en especies con un antepasado común reciente deben compartir ciertas secuencias de aminoácidos. Mientras más estrechamente se relacionen las especies, compartirán un número mayor de secuencias. En la figura 2 se muestra el árbol filogenético de la secuencia de aminoácidos del citocromo c para diferentes especies del dominio Eucaria y la variación de esta secuencia con respecto a su relación (Biología 2 » Unidad 1 » Evidencias de Evolución. Evidencias bioquímicas., 2019). Otro ejemplo relevante es la ATP sintetasa, complejo enzimático encargado de proveer a la célula la energía necesaria para realizar sus procesos vitales mediante la síntesis de ATP, y que es encontrado tanto en bacterias como en levaduras, plantas, mamíferos, etcétera (Cano-Estrada & González-Halphen, 2011).

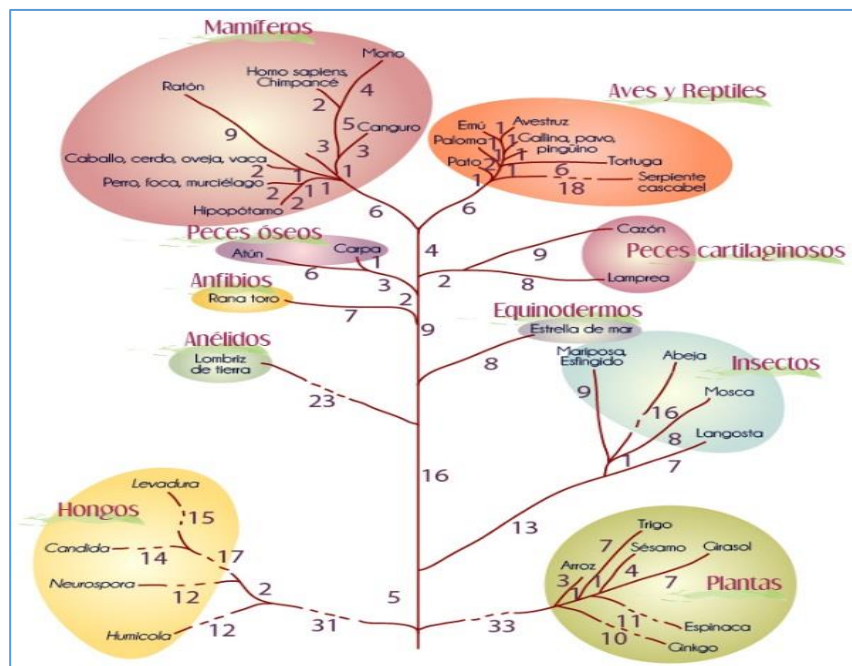


Figura 2. Árbol filogenético de la molécula de citocromo c basado en sustituciones de aminoácidos. Los números indican la cantidad de aminoácidos sustituidos. (Fuente: Portal Académico CCH. UNAM).

Glutathion S-Transferasa

El glutatión s-transferasas son una familia de isoenzimas diméricas multifuncionales. Suelen clasificarse en tres grupos, de acuerdo con su presencia en los distintos componentes celulares: mitocondriales, citosólicas y microsomales. La GST presenta una amplia gama de actividades metabólicas, pues participa en varios procesos de desintoxicación y prevención. El principal papel ejercido por esta se localiza dentro de la fase II del metabolismo de los xenobióticos. Además, participa dentro del metabolismo de leucotrienos y prostaglandinas; dentro de diversos mecanismos de prevención del proceso de carcinogénesis; juega un papel dentro de la vía de transducción de señales y actualmente se ha postulado como bioindicador de daño en órganos como hígado y riñón (Hayes & Pulford, 1995; Armstrong, 1991; Jakobsson, 1996; Tsuchida & Sato, 1992; Hayes & Strange, 2000; Kilty, Doyle, Hassett, & Manning, 1998).

La estructura terciaria de la mayoría de estas GST's es un dímero globular cuyo peso molecular de las subunidades de estas estructuras varía de 23 kD a 29 kD y cada una de ellas consta de dos dominios distintos: el dominio N-terminal, capaz de unirse al glutatión (GSH), y el dominio C-terminal, el cual parece combinarse con diferentes compuestos electrofílicos, presentes en diferentes sustratos (Yuan, y otros, Cloning and Characterization of a Novel Glutathione Transferase Gene from *Penicillium chrysogenum*, 2007). Dentro de la clasificación general de estas enzimas suelen haber subclasificaciones, denominando a los distintos subgrupos de enzimas en clases, la cuales son designadas por los nombres de las letras griegas. Se han identificado alrededor de quince clases de GST: Alfa (α), Mu (μ), Pi (π), Sigma (σ), Teta (θ), Zeta (ζ), Omega (ω), y Kappa (κ) encontradas en los mamíferos (clase perteneciente al reino animalia y al dominio Eucaria); Beta (β), Teta (θ), Zeta (ζ), Nu (ν), Rho (ρ) encontradas en bacterias; Delta (δ), Epsilon (ϵ), Omega (ω), Sigma (σ), Theta (θ) y Zeta (ζ) en insectos (clase perteneciente al reino animalia y al dominio Eucaria); Phi (Φ), Zeta (ζ), Tau (τ), y Teta (θ) encontradas en plantas (reino perteneciente al dominio Eucaria). (Sherrat & Hayes , 2002; Sheehan, Meade, Foley, & Dowd, 2001; Mannervik, Board, Hayes, Listowsky, & Pearson, 2005). En la tabla 1 se ilustra la presencia de las diferentes clases en estos grupos de organismos.

Estas características transforman a la GST en una posible candidata de estudio como proteína participante del proceso evolutivo. De hecho, algunos trabajos han utilizado las secuencias de distintos tipos de GST's comparándolas y construyendo arboles filogenéticos tratando de identificar los patrones de divergencia. En la figura 3 se muestra un árbol filogenético basado en las distintas secuencias de GST's reportadas (Sheehan, et al., 2001).

Tabla 1. Clases de GST en cuatro especies de organismos (Fuente: Mannervik, et al.; 2005; Sherrat & Hayes , 2002).

Clase de GST	Grupos de organismos				Órgano/organelo predominante
	Mamíferos	Bacterias	Insectos	Plantas	
Alfa	X				Cerebro, hígado
Beta		X			Citoplasma
Delta			X		No determinado
Épsilon			X		No determinado
Zeta	X	X	X	X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Teta	X	X	X	X	Pulmón
Kappa	X				Peroxisomas
Mu	X				Testículos, hígado
Un		X			Citoplasma
Pi	X				Riñón, testículos
Rho		X			Citoplasma
Sigma	X		X		Placenta
Tau				X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Phi				X	Citosólica (plétora, raíz, tallo)
Omega	X		X		Esófago

(X significa la especie en la cual la clase de GST es predominante)

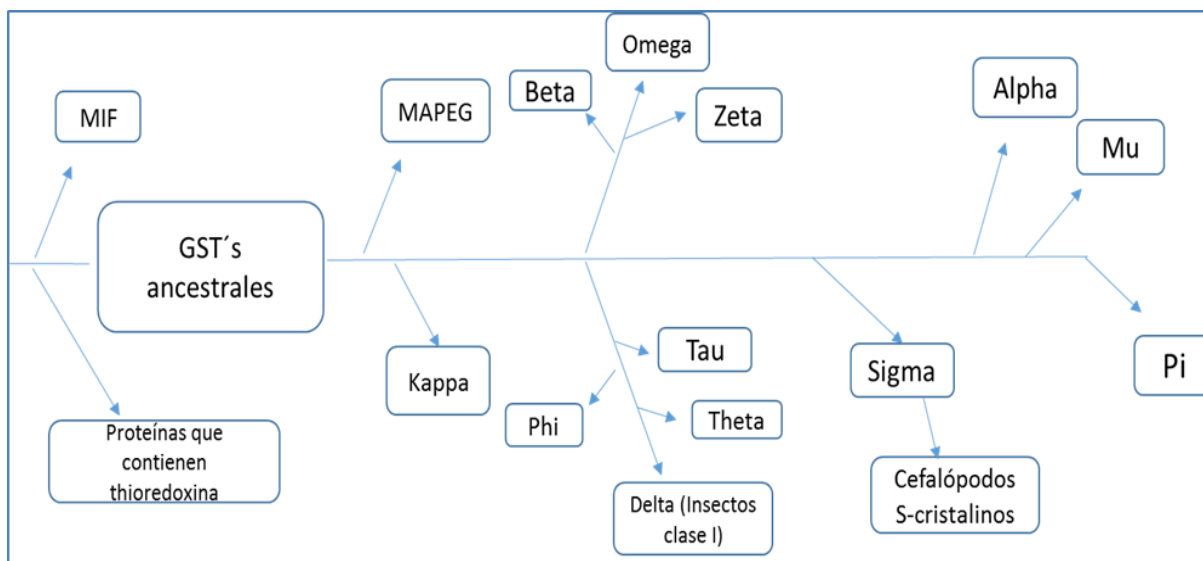


Figura 3. Posible patrón de divergencia en la superfamilia GST. Basados en los alineamientos secuenciales descritos por Board, P.G. *et al.*, Kanoaka, Y. *et al.* Y Snyder, M. J. *et al.* (Sheehan, *et al.*, 2001).

Sin embargo, a pesar de la relación cuasievidente entre la GST y el proceso evolutivo de las especies, no existe un estudio concluyente para determinar cuál es su papel en dicho proceso.

Relación de la GST con la intoxicación con metales pesados.

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de acción por el cual los MP son capaces de generar alteraciones en el organismo es a través de la generación de EO dado por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) en conjunción con la inhibición de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) o la unión a grupo sulfhídricos, unión que eventualmente causa alteraciones metabólicas (Agrawal, Flora, Bhatnagar, & Flora, 2014; Almeida Lopes, y otros, 2017; Matovic, Buha, Ethukic-Cosic, & Bulat, 2015; Clarkson & Magos, 2006).

La GST ha mostrado un aumento en su actividad concordante al aumento de EO generado por la exposición a MP allí donde otras enzimas antioxidantes como la SOD o el glutatión peroxidasa (GPx) se han visto inhibidas. El mecanismo de acción de la GST en este proceso aún no está del todo establecido. Sin embargo, es posible que esta enzima catalice la actividad que tiene el GSH sobre ERO's como el H_2O_2 , O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} . Un mecanismo similar al utilizado por la GPx. Empero, en tanto que la GPx comprende una enzima de carácter antioxidante, la GST ha demostrado una relación dosis agente estresante-respuesta EO mayor que la primera (Zhang, Li, Liu, & Chen, 2016;




Zhang Y., y otros, 2019; Zanette, y otros, 2011; Ku, et al., 2014). Esto debido posiblemente a que la GST ha evolucionado para constituir un mecanismo de respuesta y de defensa contra el EO.

Metales pesados

En la literatura científica suele considerarse MP a aquellas sustancias que presentan determinadas características de densidad ($> 4 \text{ g/cm}^3$), peso atómico (por encima de 20) y/o efectos bioquímicos tóxicos para el medio ambiente y la salud. Sin embargo, a pesar de que su nombre lo indica, la clasificación de MP no se restringe únicamente a los elementos que presentan esta “naturaleza metálica”, puesto que aunque el termino ha prevalecido, la familia de los MP se ha expandido hasta considerarlos como un grupo de sustancias en la que se pueden incluir metales, semimetales (As), no metales (Se) e incluso compuestos como el metilmercurio (Londoño-Franco, Londoño-Muñoz, & Muñoz-García, 2016)

Su presencia en el medio ambiente implica severas consecuencias en la salud de los seres vivos. Estos pueden encontrarse en el aire, suelo, en productos alimenticios y sobretodo en ecosistemas acuáticos contaminados por vía natural o antrópica (Singh, Sharma, & Marshal, 2010; Li, Kang, Pan, Zeng, & Zhang, 2015). Dependiendo de la especie química, pueden provocar distintas patologías. Los MP considerados más tóxicos son el Hg, Pb, Cd, Cr y As.

De acuerdo con (Agrawal et al., 2014), algunas patologías relacionadas con la exposición crónica a estos son:

-  Mercurio: Asociado con varios trastornos como necrosis tubular renal, asma, dermatitis, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.
-  Plomo: Inhibición de la biosíntesis del grupo hemo (grupo presente en distintas proteínas, entre las que destaca la hemoglobina), alteración de vías dependientes del calcio en donde el plomo “imita el comportamiento” de este inhibiendo su participación.
-  Cadmio: Edema pulmonar, capacidad de cruzar la barrera placentaria y alcanzar el tejido fetal ejerciendo efectos dañinos, neurotoxicidad, polineuropatía periférica (PNP), efectos en enfermedad de las neuronas motoras (MND) (Rehman, Fatima, Waheed, & Akash, 2018).

- ✚ Arsénico: enfermedades de la piel (hiperqueratosis, hiperpigmentación, cáncer de la piel), hipertensión, trastornos gastrointestinales, diabetes mellitus, trastornos neurológicos.

En la tabla 2 se muestran los límites permisibles para MP establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996, 2003) en fuentes acuáticas y de suelo.

Mercurio y cadmio

El mercurio es un metal líquido a temperatura ambiente, el cual puede hallarse tanto en derivados inorgánicos como derivados orgánicos. Elementalmente, puede emitir vapores tóxicos y su inhalación puede causar intoxicaciones agudas y crónicas. Sin embargo, suele encontrarse también en forma molecular, como sulfuro o metilmercurio, este último es una de las formas más tóxicas y más fácilmente bioacumulables del metal. Entre sus consecuencias se encuentran el daño al sistema nervioso y al cerebro en estado fetal (Reyes, Vergara, Torres, Díaz, & González, 2016).

A la par con el Hg, el Cd es otro metal reconocido como una especie altamente tóxica, que puede dañar órganos como cerebro, hígado, riñón, pulmones y testículos. Los efectos nocivos generados por el Cd en estos órganos suelen estar implicados con las ERO's, pues hay evidencia de la producción de radicales libres en animales después de una sobrecarga aguda de Cd, el cual suele provocar procesos de intoxicación generando nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, aparición de tumores, entre otros (Patra, Rautray, & Swarup, 2011)

Tabla 2. Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados en agua y suelo. Fuente: Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996.

Metales	Ríos (uso en riego agrícola/urbano/ protección de vida acuática) en ppm	Embalses naturales y artificiales (Uso en riego agrícola/uso público urbano) en ppm	Aguas costeras (explotación pesquera y navegación/recreación/estuarios) en ppm	Suelo (uso en riego agrícola) en ppm
Cadmio	0.2/ 0.1 /0.1	0.2/0.1	0.1/ 0.2 /0.1	0.05
Cromo	1.0/ 0.5 /0.5	1.0/0.5	0.5/ 1.0 /0.5	0.5
Mercurio	0.01/ 0.005 /0.005	0.01/0.005	0.01/ 0.01 /0.01	0.005
Plomo	0.5/ 0.2 /0.2	0.5/ 0.2	0.2/ 0.5 /0.2	5

En trabajos previos realizados en la Universidad del Papaloapan se encontraron en la región de Tuxtepec fuentes acuáticas con presencia de MP como Hg, Cd, Pb y Cr (0.0072, 0.75, 1.2 y 2.3 ppm respectivamente). Concentraciones superiores a las permitidas en este tipo de ecosistemas. Además de ello en dichos lugares se lograron aislar organismos capaces de crecer en esos ambientes contaminados. Tales organismos son: *Hafnia alvei*, *candida parapsilosis*, *Penicillium sp* y *Euglena gracilis* (Galicia, 2013).

Hafnia alvei

Hafnia alvei pertenece al dominio Bacteria. Se trata de una bacteria gram negativa, no esporulada, aeróbica facultativa y móvil gracias a flagelos peritricos. Es perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Hafnia*. Originalmente fue asignada al género *Enterobacter* debido a las similitudes en sus perfiles bioquímicos, sin embargo, gracias a un estudio de hibridación de ADN que reveló que tenía una proporción de unión de sólo 20% con *Ent. Cloacae* fue, posteriormente, reasignada a su propio género, constituyendo la única especie de este (Okada & Gordon, 2013). *Hafnia* ha sido estudiada como un microorganismo resistente a MP en suelos y

efluentes. En el primero se determinó la presencia de esta junto con otras especies de bacterias en muestras de suelo contaminadas por MP a causa de una fábrica industrial química. Lo que sugiere una elevada capacidad de resistencia de *Hafnia* a estas especies químicas (Chihching & otros, 2008). En tanto que en el segundo estudio se evaluó la resistencia y capacidad de asimilación de metales como Pb, Cd y Cr por una cepa aislada de efluentes de curtiembre, la cual mostró una mayor sensibilidad hacia Cr (Marzan & otros, 2017)

Candida Parapsilosis

Cándida parapsilosis es una levadura perteneciente al género *Cándida*, al reino Fungi y al dominio Eukarya. Fue aislada por primera vez en 1928 a partir de muestras de piel y uñas de las manos de enfermeras y otros profesionales del área de salud, por lo que se ha establecido que esta levadura forma parte de la flora comensal humana normal (Treviño-Rangel, González-González, Garza-González, & González, 2012). Pertenecientes también al mismo género se encuentran *C. oleophila*, *C. glabrata* y *C. albicans*. No se ha estudiado la respuesta de *Candida parapsilosis* ante el EO, sin embargo, en las tres especies de *candida* también mencionadas se ha observado una alta resistencia al H₂O₂, molécula perteneciente a las ERO's (Jamieson, Stephen, & Terrière, 1996; Wang & otros 2018; Liu & otros, 2012). Además, en cepas de *Cándida glabrata* se estudió la generación de ERO's inducidas por fluconazol y se evaluó la susceptibilidad y resistencia a éste en la fase de crecimiento estacionario, además de la medición de la activación de enzimas antioxidantes como Glutación peroxidasa (GPx), SOD y GST (Mahl & otros, 2015).

Penicillium sp

Penicillium sp es un organismo perteneciente al dominio Eukarya, al reino Fungi y al género *Penicillium*. Los estudios sobre GST en hongos son escasos y para el género *Penicillium* los escasos es más marcada. Las enzimas GST fúngicas más caracterizadas son diferentes de las clases comúnmente encontradas en mamíferos, plantas, insectos o bacterias (McGoldrick, O'Sullivan, & Sheehan, 2005). Sin embargo, en algunos trabajos se ha medido la actividad total de la enzima GST en organismos que forman parte del mismo género. Para *Penicillium chrysogenum* (una cepa

importante que se utiliza para la producción industrial de antibióticos β -lactámicos-penicilina), fue clonado un nuevo gen de GST conocido como PcgstB y la actividad de esta enzima fue medida a través de la reacción del ligante GSH con el sustrato 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (Yuan & otros, 2007). En otro trabajo se evaluó el efecto de *Penicillium digitatum* (inducido por limoneno) en la generación de moho verde en cítricos mediante la regulación de la homeostasis de las ERO's. La medición de la actividad de la enzima GST en este estudio mostró una relación inversa con el contenido de ERO's aumentando su actividad transcurridas 5 horas, pero disminuyendo esta después de 7 horas. Encontrando que a mayor actividad de GST, menor contenido de ERO's en las esporas y viceversa (Taoa, Chena, Wua, Wanga, & Lia, 2019).

Euglena gracilis

Euglena gracilis es un protista flagelado unicelular, perteneciente al género *Euglena* y al dominio Eukarya. Se ha tomado como organismo modelo para la investigación en biología de células eucariotas además del estudio de la ecotoxicidad o genotoxicidad de diversos factores de estrés ambiental, tales como contaminantes orgánicos, nanopartículas o metales pesados (Foltí nová & Grones, 1997; Li & otros 2009; Hua, y otros, 2015; Sánchez-Thomas, Moreno-Sánchez, & García-García, 2016). Por ejemplo, la capacidad acumulativa del Zn^{+2} (13–65.4 ppm o 200–1,000 μM) de *Euglena gracilis klebs* y su efecto en la acumulación de Cd^{+2} , fue evaluada, encontrando que un aumento de zinc intracelular brinda una mayor protección contra la toxicidad del Cd^{+2} y una mayor acumulación de este. Posicionando a *Euglena gracilis* como un organismo potencialmente participante en procesos de biorremediación de sistemas acuáticos contaminados con Cd^{+2} (Sánchez-Thomas, et al., 2016). Esta capacidad de *E. gracilis* para eliminar MP depende parcialmente de la formación de complejos con la cisteína (Cys) del glutatión reducido (GSH), a través de la formación del complejo metal-grupo tiol. Se ha demostrado que la exposición de cepas de *Euglena gracilis* (Z y SMZ) a cadmio (alrededor de 100 μM por 8h) incrementa la biosíntesis de GSH (Santiago-Martínez, y otros, 2015; Watanabe & Suzuki, 2004). Este dato constituye un hecho importante, dado que el GSH es el ligante utilizado por la enzima GST en el proceso de desintoxicación celular.

Rattus norvegicus (wistar)

El estudio con *rattus norvegicus* (ratas Wistar) fue incluido para generar un panorama más completo respecto a la influencia de la enzima GST en distintas especies del árbol filogenético. Las ratas de la cepa Wistar, desarrolladas en el Instituto Wistar en 1906 para su uso en la investigación biológica y médica, son una cepa de ratas que sirven como organismo modelo para el entendimiento de diversos procesos bioquímicos llevados a cabo en mamíferos. El grupo de investigación de Bioquímica de la Universidad del Papaloapan ha estudiado la enzima GST y su relación con MP. Navarro-Moreno (1999), realizó un estudio *in vivo* en ratas de la cepa Wistar expuestas a 500 ppm de Pb durante siete meses vía oral. Los resultados mostraron una relación directamente proporcional entre la actividad de la GST y la exposición a Pb en riñón, orina y suero. Por ello se propuso que el incremento de la actividad enzimática podría implicar una relación directa con la formación de las ERO's. Hernández (2013), estableció un modelo experimental *in vivo* fundamentado quimiométricamente, en donde se reforzó la propuesta por Navarro de la relación entre la actividad enzimática de la GST con el aumento de las ERO's como consecuencia de la intoxicación con Pb en ratas Wistar macho. Méndez (2016) estudió la actividad de la GST *in vivo* en ausencia y presencia de Pb en el riñón y un posible tratamiento con diferentes antioxidantes. Observó que el daño renal por la intoxicación con Pb aumentó la concentración de las ERO's a la par con el aumento en la actividad de la GST. El tratamiento con extractos naturales, ricos en antioxidantes externos (Aloe vera y Blue Berry) ayudaron a disminuir el aumento de las ERO's ocasionado por exposición al metal, así como a reestablecer la actividad de la GST y finalmente a disminuir los daños renales. Cruz (2016) realizó estudios de la actividad de la GST *in vivo* en presencia y ausencia de Hg en el riñón y los efectos de un tratamiento con micronutrientes (Se y Zn) y el agente quelante ácido dimercapto succínico (DMSA). Observó que la actividad de la GST incrementó en presencia de Hg junto con un aumento de las ERO's y una disminución de la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante celular como la CAT, y la SOD. El tratamiento con los micronutrientes Se y Zn activó las defensas antioxidantes enzimáticas y la remoción del Hg con el DMSA, redujo los daños renales y la actividad de la GST se reestableció. Raymundo, (2016) estudió la dinámica molecular de la interacción de la GST con el GSH y el sustrato DNCB, observando los residuos involucrados en la catálisis enzimática, el efecto

estructural ocasionado por el Pb y el establecimiento de un posible modelo teórico-experimental de la actividad de la GST y la inhibición por Pb en experimentos in vitro.

La justificación de este trabajo versa en que debido a su multifuncionalidad metabólica, su presencia y conservación en diversos organismos, su compartimentalización (microsoma, citosol y mitocondria), aunado a la implicación que parece mostrar en el EO, realizar un estudio en busca de elucidar la posible relación que tiene la GST como mecanismo de defensa antioxidante con el proceso evolutivo de las especies que serán estudiadas es justificado por el hecho de que dicho estudio puede proveer nuevas evidencias sobre el funcionamiento de esta enzima en distintas especies y brindar un poco de luz sobre el papel de esta en el proceso evolutivo. Trabajos en los cuales se han establecido análisis de distintas enzimas a través de estudios bioquímicos justifican también la metodología a seguir en este proyecto, la cual está enfocada en desarrollar experimentos bioquímicos complementados con herramientas de la biología evolutiva, con la finalidad de realizar un trabajo y análisis más completo.

Los objetivos cubiertos en este trabajo fueron llevar a cabo un estudio dosis-respuesta evaluando, de manera microbiológica, el efecto de diferentes concentraciones de Hg y Cd sobre el crecimiento de las especies *Hafnia alvei*, *Candida parapsilosis*, *Euglena gracilis*, *Penicillium sp* y *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar. Así como determinar las concentraciones en donde se observe inhibición y tolerancia a los metales Hg y Cd en las especies *Hafnia alvei*, *Candida parapsilosis*, *Euglena gracilis*, *Penicillium sp* y *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar.

Metodología

La metodología descrita a continuación aborda la forma en la que se llevará a cabo el estudio del presente proyecto de manera que se cumplan con los objetivos planteados. La tabla 3 muestra las especies que serán objeto de estudio en este trabajo. Cuatro de ellas se encuentran distribuidas en el dominio Eucaria y una en el dominio Bacteria, tal y como se muestra en la figura 4.

Tabla 3. Especies a utilizar para la realización del estudio bioquímico.

Bacteria	Levadura	Alga	Hongo	Mamífero
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Penicillium sp</i>	Ratas Wistar

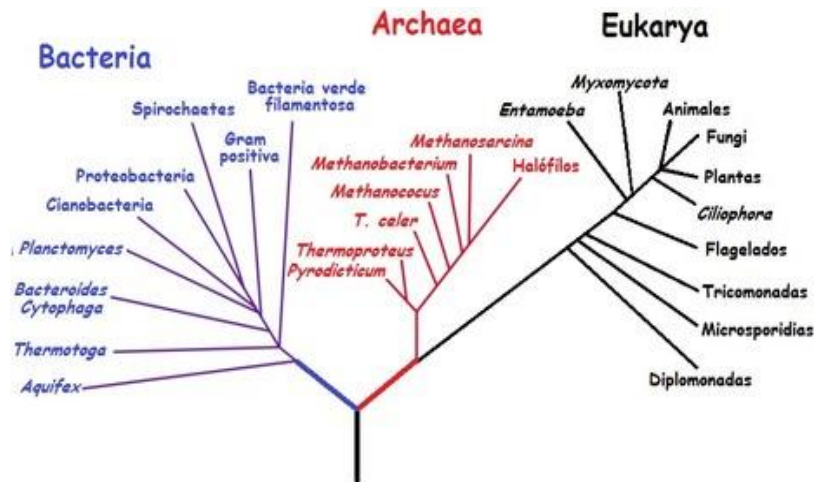


Figura 4. Árbol filogenético que comprende las especies establecidas en los tres dominios, Bacteria, Arquea y Eucaria. Los organismos de estudio comprenden el dominio Bacteria (*Hafnia alvei*) y Eucaria (*Candida parapsilosis*, *Euglena gracilis*, *Penicillium sp* y ratas Wistar).

Determinación de las concentraciones tolerantes e inhibitorias de Hg y Cd en las especies de estudio.

Las concentraciones de Hg y Cd con las cuales se observe inhibición y tolerancia en el crecimiento de las especies de estudio se determinarán con el propósito de establecer cuáles de estas se emplearán para realizar la cuantificación de la actividad de la GST y de las ERO's bajo la premisa de que evaluando concentraciones en las que no se genere inhibición con respecto a las cuales sí, se podrá monitorear mejor la respuesta de la enzima al EO. Las concentraciones base utilizadas de HgCl₂ y CdCl₂ comprenderán un intervalo de 0.05µM a 6.59mM. Estas elegidas debido a las observaciones llevadas a cabo en un estudio previo, realizadas por el grupo de bioquímica de la Universidad del Papaloapan. (Galicia, 2013)

Hafnia alvei* y *candida parapsilosis

La determinación de las concentraciones de Hg y Cd para *Hafnia alvei* y *Candida Parapsilosis* se realizará bajo un procedimiento similar. Ambos organismos serán sembrados por los métodos de estría y expansión (Figura 5) para observar la morfología colonial y microscópica y para evaluar la inhibición del crecimiento radial de ambos organismos, respectivamente. En la evaluación de la inhibición del crecimiento radial se utilizarán discos de papel filtro estériles embebidos en concentraciones crecientes de HgCl₂ y CdCl₂, los discos serán depositados y organizados en el sembrado del microorganismo. Después de 24h se medirá el diámetro del halo de inhibición de crecimiento. El procedimiento se efectuará por triplicado y los medios de cultivo utilizados para *H. alvei* y *C. Parapsilosis* serán agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (PDA), respectivamente. Una vez realizada la determinación y elegidas las concentraciones de MP a utilizar, se hará una estandarización por medio de los métodos de cinética de crecimiento y unidades formadoras de colonias (UFC) y en base a los resultados se determinarán las concentraciones a utilizar para los experimentos de medición de actividad de GST y cuantificación de ERO's.

Penicillium sp.

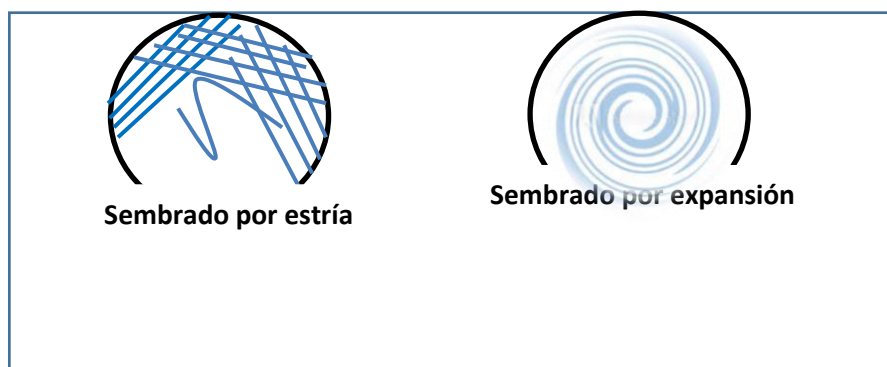


Figura 5. Representación de las técnicas de sembrado por estría y por expansión.

Para *Penicillium sp* el sembrado será generado por los métodos de picadura y microcultivo. El primero utilizado para observar el efecto de las diferentes concentraciones en el crecimiento del hongo en el medio de cultivo PDA (medio específico para el crecimiento de hongos) (Faddin, 1985; Ito, 2001), al cual se le añadirán las diferentes concentraciones de metales pesados a evaluar. Una

vez que se seleccionen las concentraciones en donde se observe inhibición y tolerancia se llevará a cabo una estandarización por medio del conteo de UFC (Faddin, 1985), para después por medio del método de micro cultivo evaluar los efectos microbiológicos, así como la determinación de ERO's y la actividad de la GST.

Euglena gracilis

Euglena gracilis será sembrado en un matraz en el medio Hutner (medio ácido organotrófico suplementado con glutamato y malato como fuentes de carbono) bajo agitación constante por 24h. Después de transcurrido ese tiempo se procederá a contar el número de organismos mediante una cámara de Neubauer, determinando el número de euglenas por mililitro. Posteriormente se ajustará la cantidad de microorganismos para sembrarse en medios de cultivo suplementados con las diferentes concentraciones de los metales pesados Hg y Cd. Transcurridas 24h se tomarán alícuotas para contar los microorganismos y hacer los cálculos matemáticos necesarios para determinar el efecto de cada metal sobre el crecimiento de las algas. Se realizará pues una cinética de crecimiento evaluando los tiempos óptimos para realizar la cuantificación de la actividad de la GST y las ERO's.

***Rattus norvegicus* de la cepa wistar**

En el caso de las ratas Wistar se utilizarán soluciones de $HgCl_2$ y $CdCl_2$ (25 mg y 50mg/Kg de peso, respectivamente) basado en trabajos precedentes en donde se ha determinado la dosis a la cual se observa un efecto negativo general en los animales de experimentación bajo esas condiciones (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951; Habig, 1974)

Resultados y discusión preliminar

La actividad desempeñada en el proyecto actualmente consta de la determinación de las concentraciones inhibitorias y tolerantes de Hg y Cd para los organismos *H. alvei* y *C. parapsilosis*. En la tabla 4 y 5 se muestra la asignación de las distintas concentraciones utilizadas en el intervalo establecido y los valores del diámetro de inhibición obtenidos para cada concentración,

respectivamente. En las tablas subsecuentes (6, 7, 8 y 9) se relacionan las concentraciones de MP utilizados con respecto al diámetro de inhibición resultante de la exposición.

Tabla 4. Asignación para las concentraciones de HgCl₂ y CdCl₂ utilizadas en el método de crecimiento radial para *H. alvei* y *C. Parapsilosis*

Asignación	[HgCl ₂]	Asignación	[CdCl ₂]
1	6.59mM	1	6.59mM
2	5.66mM	2	5.66mM
3	1.95mM	3	1.95mM
4	0.75mM	4	0.75mM
5	0.67mM	5	0.67mM
6	0.33mM	6	0.60mM
7	0.24mM	7	0.33mM
8	0.12mM	8	0.24mM
9	0.10mM	9	0.12mM
10	0.05mM	10	0.05mM
11	3μM	11	10μM
12	0.5μM	12	5μM
13	0.1μM	13	0.1μM
14	0.05μM	14	0.05μM
15	0.01μM		

La etiqueta fue establecida en orden decreciente, asignando el número 1 a la concentración de HgCl₂ y CdCl₂ más alta (6.59mM), y el número 14 y 15 para las concentraciones más bajas (0.05μM y 0.01μM, respectivamente).

La tabla 5 muestra los valores de los diámetros de inhibición obtenidos para las distintas concentraciones de HgCl₂ y CdCl₂ utilizadas. Esta se distribuye en dos columnas principales, correspondientes a los microorganismos estudiados, seguido de cuatro columnas por microorganismo, dos de ellas pertenecientes a las concentraciones y las otras dos a los diámetros de inhibición resultantes. En las columnas pertenecientes a las concentraciones se muestra la asignación seguida de la concentración establecida (número: concentración).

Tabla 5. Diámetros de inhibición generados por las concentraciones de HgCl₂ y CdCl₂

<i>C. parapsilosis</i>				<i>H. alvei</i>			
[HgCl₂]	Halo inhibición	[CdCl₂]	Halo inhibición	[HgCl₂]	Halo inhibición	[CdCl₂]	Halo inhibición
1: 6.59mM	2.26 cm	1: 6.59mM	3 cm	1: 6.59mM	1.96 cm	1: 6.59mM	---
2: 5.66mM	2.06 cm	2: 5.66mM	2.76 cm	2: 5.66mM	1.96 cm	2: 5.66mM	---
3: 1.95mM	1.56 cm	3: 1.95mM	2.23 cm	3: 1.95mM	1.30 cm	3: 1.95mM	---
4: 0.75mM	1.23 cm	4: 0.75mM	1.33 cm	4: 0.75mM	1.06 cm	4: 0.75mM	---
5: 0.67mM	1.13 cm	5: 0.67mM	1.33 cm	5: 0.67mM	0.96cm	5: 0.67mM	---
6: 0.33mM	0.93 cm	6: 0.60mM	1.53 cm	6: 0.33mM	0.80 cm	6: 0.60mM	---
7: 0.24mM	0.93 cm	7: 0.33mM	1.05 cm	7: 0.24mM	0.65 cm	7: 0.33mM	---
8: 0.12mM	1 cm	8: 0.24mM	---	8: 0.12mM	0.60cm	8: 0.24mM	---
9: 0.10mM	1 cm	9: 0.12mM	---	9: 0.10mM	---	9: 0.12mM	---
10: .05mM	0.65 cm	10: .05mM	---	10: .05mM	---	10: .05mM	---
11: 3μM	---	11: 10μM	---	11: 3μM	---	11: 10μM	---
12: 0.5μM	---	12: 5μM	---	12: 0.5μM	---	12: 5μM	---
13: 0.1μM	---	13: 0.1μM	---	13: 0.1μM	---	13: 0.1μM	---
14: 0.05μM	---	14: 0.05μM	---	14: 0.05μM	---	14: 0.05μM	---
15: 0.01μM	---			15: 0.01μM	---		

Inhibición de crecimiento radial de *hafnia alvei* expuesta a HgCl₂ y CdCl₂

Hafnia alvei mostró una capacidad de tolerancia variable de acuerdo a la especie metálica a la que fue expuesta. En Hg se comenzó a ver inhibida a los 0.12mM (32.6ppm) de la solución de HgCl₂ (tabla 6). En tanto que para CdCl₂, incluso la más alta concentración de esta especie (6.59mM=1208ppm) no provocó la inhibición del crecimiento del organismo (tabla 7). Estos datos revelan la alta capacidad de tolerancia de este microorganismo con respecto a la exposición de distintas concentraciones de Hg y Cd. Dichas concentraciones, expresadas en ppm, superan ampliamente los límites permisibles para MP establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, en fuentes acuáticas y de suelo, mostrados en la tabla 2.

Tabla 6. Halos de inhibición generados por HgCl₂ en *Hafnia alvei*.

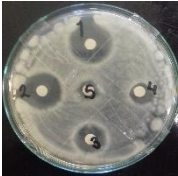

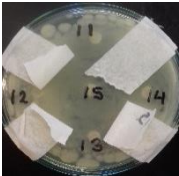
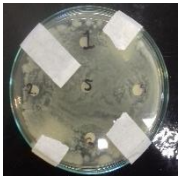

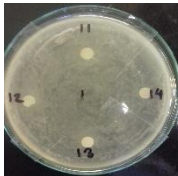
<i>H. alvei</i> /HgCl ₂	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	1.96	1.96	1.30	1.06	0.96	0.80	0.65	0.60	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Tabla 7. Halos de inhibición generados por CdCl₂ en *Hafnia alvei*

<i>H. alvei</i> /CdCl ₂	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

La evidencia anterior sugiere que este microorganismo debe poseer un mecanismo de defensa altamente calificado para combatir la toxicidad generada por estos MP. En bacterias, por ejemplo, un mecanismo de defensa contra la exposición a Hg está basado en la reducción enzimática del

Hg inorgánico (Hg^{+2}) a su forma metálica, menos tóxica y volátil (Hg^0), catalizada por la reductasa mercúrica. El proceso se lleva a cabo a través de la captura y transferencia del Hg^{+2} por parte de las cisteínas de proteínas encargadas de llevar el metal a la reductasa. El primer paso es la captura del metal en el exterior por las cisteínas de la proteína periplásmica (MerP), la cual transfiere el Hg^{+2} a otro par de cisteínas de la proteína membranal (MerT), quienes a su vez lo transfieren a las cisteínas presentes en la reductasa y las cuales son las encargadas de conducir el Hg^{+2} al sitio activo de la enzima. Así, en este proceso se procura que el Hg^{+2} no se encuentre libre, protegiendo el citoplasma de la toxicidad del metal (Moreno-Sanchez & Cervantes, 1999). En el caso del Cd, las bacterias gramnegativas (a la cuales pertenece *H. alvei*) tienen mecanismos basados en sistemas de transporte especializados en las cuales intervienen un transportador de la membrana interna, un transportador de la membrana externa, y un polipéptido que atraviesa a ambas membranas y que sirve de puente para asegurar que los cationes sean expulsados al exterior de la célula y no sólo al espacio periplásmico. Se ha establecido también que este proceso ocurre por un sistema antiportador Cd/ H^+ . (Diels, Dong, van der Lelie, Baeyens, & Mergeay, 1995; Nies, 1995; Nies & Silver, 1995). Otro mecanismo de resistencia al Cd se basa en la síntesis de proteínas ricas en cisteínas capaces de capturar los iones del metal (Higman, Sadler, & Scawen, 1984).

Inhibición de crecimiento de *Candida parapsilosis* expuesta a HgCl_2 y CdCl_2

Candida Parapsilosis mostró una tendencia similar a *Hafnia alvei* en el sentido de presentar una tolerancia mayor para Cd que para Hg. Para *C. parapsilosis*/Hg se comenzaron a observar sutiles halos de inhibición de aproximadamente 0.65cm de diámetro a una concentración de HgCl_2 de 0.05mM (13.5ppm), estos halos incrementaron con respecto al aumento de la concentración de HgCl_2 (tabla 8). En tanto, en lo que respecta a *C. parapsilosis*/Cd la inhibición se presentó a concentraciones por encima de los 0.24mM (55ppm) (tabla 9). Aun así, ambas concentraciones en las que el crecimiento del microorganismo apenas comenzó a verse inhibido superan los límites permisibles para MP definidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 (tabla 2).

Tabla 8. Halos de inhibición generados por HgCl₂ en *Candida Parapsilosis*.


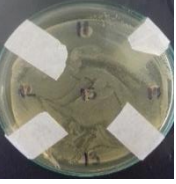
<i>C. Parapsilosis</i> /HgCl ₂	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	2.2 6	2.0 6	1.5 6	1.2 3	1.1 3	0. 93	0. 93	1	1	0. 65	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Tabla 9. Halos de inhibición generados por CdCl₂ en *Candida Parapsilosis*.

<i>C. Parapsilosis</i> /CdCl ₂	Concentraciones 1-5					Concentraciones 6-10					Concentraciones 11-15				
Asignación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Diámetro de inhibición (cm)	3	2.7 6	2.2 3	1.3 3	1.3 3	1.5 3	1.0 5	---	---	---	---	---	---	---	---
Halo de inhibición															

Candida Parapsilosis es una levadura perteneciente al reino fúngico, algunos de los mecanismos biológicos implicados en la supervivencia de este tipo de organismos a la exposición a MP son la transformación de especies metálicas (reacciones oxido-reducción), la precipitación extracelular, la impermeabilidad o la biosorción a paredes celulares (Moreno-Sanchez & Cervantes, 1999). La formación de complejos entre el metal y diversas moléculas también constituye otro mecanismo relevante en el procesamiento de MP. Por ejemplo: las fitoquelatinas (FQ) o cadistinas, que inducidas en los hongos por la presencia de MP con capaces de formar complejos con estos (Grill,

Loeffler, Winnacker, & Zenk, 1989). Otras proteínas muy importantes ricas en cisteínas que pueden formar complejos proteína-MP son las metalotioneínas (MT) cuyo diseño biológico permite captar distintos metales. Levaduras como *S. cerevisiae*, *C. glabrata* y *S. pombe* por ejemplo, presentan un mecanismo predominante de captación de Cd basado en la formación del complejo MT-Cd (Yu, Santhanagopalan, Sewell, Jensen, & Winge, 1994).

Además de estos mecanismos mencionados, tanto para *hafnia* como para *candida*, en este trabajo se propone también a la enzima GST como posible factor de defensa contra los MP, debido a que ha exhibido la facultad de responder ante el EO, mecanismo subyacente de toxicidad de los MP. Esta respuesta puede deberse al hecho de que esta enzima contiene varias cisteínas en su estructura, las cuales, como ya se mencionó, son aminoácidos que ejercen un papel importante en los mecanismos de desintoxicación de MP. Otra posibilidad es el uso del GSH por parte de la GST como agente quelante y/o antioxidante en la reconstitución del equilibrio redox desplazado por la presencia intracelular de MP (Tapia, 2002). Puesto que en el metabolismo de xenobióticos la enzima utiliza al GSH como ligante de las reacciones de desintoxicación.

Conclusiones parciales

En ambos organismos se vislumbra la elevada tolerancia que parecen presentar ante la exposición a Hg y Cd, acentuándose dicha tolerancia para esta última especie química. Se puede observar que, independientemente de la fuente, los microorganismos hasta ahora estudiados (*hafnia alvei* y *candida parapsilosis*) mostraron soportar concentraciones de Hg y Cd mucho mayores que las concentraciones nocivas consideradas para seres humanos.

Por tanto, el siguiente paso con respecto al estudio de estas especies consiste en la elección de las concentraciones a utilizar para realizar el posterior análisis de la actividad de la enzima GST y la cuantificación de ERO's. Para ello se seleccionarán las concentraciones de Hg y Cd que generaron mayor y menor inhibición, así como una concentración intermedia (mostradas en la tabla 10).

Tabla 2. Concentraciones seleccionadas para el análisis de la actividad de la GST y la cuantificación de ERO's en las especies *C. parapsilosis* y *H. alvei*.

Organismo	HgCl ₂ 1	HgCl ₂ 5	HgCl ₂ 10	CdCl ₂ 1	CdCl ₂ 4	CdCl ₂ 7
<i>C. parapsilosis</i> Medio: PDA	6.59mM (1321ppm)	0.67mM (134ppm)	0.05mM (10ppm)	6.59mM (740ppm)	0.75mM (84ppm)	0.33mM (37ppm)
Organismo	HgCl ₂ 1	HgCl ₂ 4	HgCl ₂ 8	CdCl ₂ X	CdCl ₂ X	CdCl ₂ X
<i>H. alvei</i> Medio: AN	6.59mM (1321ppm)	0.75mM (150ppm)	0.12mM (24ppm)	-----	-----	-----

No obstante, dado que *H. alvei* no presentó inhibición alguna con CdCl₂ en el rango de concentraciones estipulado, se procederá a preparar una serie de concentraciones más altas de CdCl₂ para determinar aquellas que serán utilizadas para la medición de GST y ERO's. De igual forma se evaluarán los efectos producidos por las concentraciones de la tabla 5 en las especies *Penicilium sp* y *Euglena gracilis*. En el caso de las ratas Wistar, estas serán expuestas a HgCl₂ y CdCl₂ por los métodos ya señalados para su estudio.

Todas estas actividades mencionadas están dirigidas en el marco de las labores a realizar a partir de los resultados plasmados en los avances de este trabajo.

Bibliografía

- Agrawal , S., Flora, G., Bhatnagar, P., & Flora, S. J. (2014). Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 60, 13-21.
- Almeida Lopes, A. C., Urbano, M. R., Souza-Nogueira, A., Oliveira-Paula, G. H., Michelin, A. P., Carvalho, M. F., . . . Paoliello, M. M. (2017). Cabrera, M.A.S., Association of lead, cadmium and mercury with paraoxonase 1 activity and malondialdehyde in a general population in Southern Brazil. *Environ. Res.*, 156, 674–682.
- Armstrong, R. N. (1991). Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research in Toxicology*, 4(2), 131-140.
- Bastolla, , U., Dehouck, Y., & Echave, J. (2017). What evolution tells us about protein physics, and protein physics tells us about evolution. *Current Opinion in Structural Biology*, 42, 59–66.
- Cachón, V., & Barahona, A. (2002). La Transición de la Teoría del Equilibrio Puntuado hacia una Teoría de Rango Medio. . *Asclepio*, LIV-2, 83-107.
- Cano-Estrada, A., & González-Halphen, D. (2011). F1F0-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *REB*, 30(3), 98-108.
- Chihching, C. Y. (2008). Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 359–363.
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 609–662.
- Cruz, D. (2016). Actividad de la enzima Glutación S-Transferasa expuesta a mercurio y micronutrientes. . Congreso AMIDIQ.

- d'Oelsnitz, S., & Ellington, A. (2018). Continuous directed evolution for strain and protein engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 158–163.
- Darwin, C. R. (1859). *On The Origin of Species by Means of Natural Selection, or The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* .
- Darwin, C. R. (1859). *On The Origin of Species by Means of Natural Selection, or The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* .
- Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W., & Mergeay, M. (1995). The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to removal of heavy metal. *J. Indust. Microbiol.*, 14, 142-153.
- Eldredge , N., & Gould, S. J. (1972). Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism. . *Models of Paleobiology*, San Francisco, Freeman, Cooper & Co., 82-115.
- Faddin, M. (1985). *Media for isolation-cultivation- identification, maintenance of medical bacteria*. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimos, Md.
- Folti'nová, P., & Grones, J. (1997). *Euglena gracilis* as an eukaryotic test organism for detecting mutagens and antimutagens. *Mutat. Res./Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 393, 1–6.
- Futuyma , D. J. (2005). *Evolution*. Cap. 1 *Biología Evolutiva.* . Sinauer Associates, Inc., Publishers. , 2-17.
- Futuyma, D. J. (2005). *Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Galicia, J. A. (2013). Efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de efluentes contaminados. Efecto de la exposición a plomo en bacterias aisladas de efluentes contaminados. San Juan Bautista, Tuxtepec., Oaxaca, México: Universidad del Papaloapan. Tesis de Grado. .

- Grill, E., Loeffler, S., Winnacker, E., & Zenk, M. (1989). Phytochelatins, the heavy metal binding complexing peptides of plants, are synthesized from glutathioneins by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6838-6842.
- Habig, W. H. (1974). The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 (10), 3879–82.
- Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445–600.
- Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Hernández, M. (2013). Estudio de los efectos del plomo en roedores desde una perspectiva quimiométrica. . Estudio de los efectos del plomo en roedores desde una perspectiva quimiométrica. . Oaxaca: Universidad del Papaloapan. Tesis de Grado.
- Higman, D., Sadler, P., & Scawen, M. (1984). Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science*, 225, 1043-1046.
- Hua, C., Wang, Q., Zhao, H., Wanga, L., Guo, S., & Li, X. (2015). Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere*, 128, 184–190.
- Ito, D. a. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. . 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

- Jakobsson, P. J. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. *J Biol Chem*, 271(36), 22203-22210.
- Jamieson, D. J., Stephen, D.-W. S., & Terrière, E. C. (1996). Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 138, 83-88.
- Kilty, C., Doyle, S., Hassett, B., & Manning, F. (1998). Glutathione S-transferases as biomarkers of organ damage: applications of rodent and canine GST enzyme immunoassays . *Chemico-Biological Interactions*, 123-135.
- Ku, P. W. (2014). Effects of triclosan on the detoxification system in the yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Expressions of CYP and GST genes and corresponding enzyme activity in phase I, II and. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 166, 105–114.
- Lane, M. D., & Seelig, B. (2014). Advances in the directed evolution of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, 22, 129–136.
- Lane, N. (2017). Serial endosymbiosis or singular event at the origin of eukaryotes? *Journal of Theoretical Biology*, 434, 58–67.
- Li, M., & Hu, C. G. (2009). Genotoxicity of organic pollutants in source of drinking water on microalga *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, 18, 669–676.
- Li, N., Kang, Y., Pan, W., Zeng, L., & Zhang, Q. (2015). Concentration and transportation of heavy metals in vegetables and risk assessment of human exposure to bioaccessible heavy metals in soil near a waste-incinerator site, South China. *Science of the Total Environment*, 144–151.

- Liu, J. W. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 80, 578–590.
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T., & Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 1, 14(2), 145-153.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Mahl, C. B. (2015). Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82, 203–208.
- Mannervik, B., Board, P., Hayes, J., Listowsky, I., & Pearson, W. (2005). Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases. *Methods in Enzymology*, 401(5), 1-8.
- Marzan, L. W. (2017). Azalsolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43, 65–74.
- Matovic, V., Buha, A., Ethukic-Cosic, D., & Bulat, Z. (2015). Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem. Toxicol.*, 78, 130–140.
- McGoldrick, S., O'Sullivan, S. M., & Sheehan, D. (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol Lett*, 242(1), 1-12.
- Méndez, S. (2016). Antioxidantes como tratamiento alternativo contra la intoxicación renal con plomo. . Antioxidantes como tratamiento alternativo contra la intoxicación renal con plomo. San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca: Universidad del Papaloapan. Tesis de grado.