

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires, Argentina.

## ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN 2 CEPAS DE *EUGLENA GRACILIS*

*Dra. Iara Rocchetta, Dra. Laura Ruiz, Dra. Visitación Conforti y Dra. María del Carmen Ríos de Molina*

### RESUMEN

Se realizaron estudios de estrés oxidativo en 2 cepas de *Euglena gracilis* (MAT y UTEX). Se sometieron los cultivos a diferentes concentraciones de cromo hexavalente. Se determinó la actividad superóxido dismutasa, la cantidad de lípidos totales, la concentración de clorofila a y se realizaron las respectivas curvas de crecimiento. Los resultados obtenidos demuestran que el cromo, además de afectar la producción de lípidos, clorofila y crecimiento celular, aumenta la actividad superóxido dismutasa y se observan notables diferencias entre ambas cepas.

*DeCS:* ESTRÉS OXIDATIVO; EUGLENA GRACILIS; CROMO; CLOROFILA.

Los radicales libres se pueden producir, en distintos tipos de células, a partir de sustratos endógenos por distintas vías metabólicas, o en respuesta a estímulos exógenos. Los metales pesados (frecuentes contaminantes ambientales), pueden llegar a provocar un aumento en la concentración del anión superóxido, el cual es luego neutralizado dentro del organismo por la enzima superóxido dismutasa (SOD) o entra en la cadena de radicales libres, que puede llegar a provocar la muerte celular, cuando el estrés oxidativo es muy severo. Wang y otros,<sup>1</sup> trabajando con células epiteliales de pulmón humano, demostraron que el Cr (VI) provoca un aumento en la cantidad de SOD, en respuesta al estrés oxidativo desencadenado por este metal. En estudios rea-

lizados en el laboratorio con *Euglena gracilis*, los autores de este trabajo han encontrado que el Cr (VI) produce cambios tanto al nivel morfológico como metabólico. El objetivo primario del presente trabajo ha sido comparar el comportamiento de las cepas en estudio con respecto a una posible respuesta antioxidante (aumento en la actividad SOD) generada por exposición a cromo hexavalente.

### MÉTODOS

Se realizaron bioensayos de toxicidad con 2 cepas de *Euglena gracilis*: MAT, provenientes de un río altamente contaminado (río Matanza, Buenos Aires, Argentina) y

UTEX, proveniente del cepario de la Universidad de Texas. Los cultivos fueron desarrollados en un medio mineral.<sup>2</sup> El metal pesado utilizado fue el cromo hexavalente, en su forma de sal de potasio ( $K_2CrO_7$ ). Los cultivos fueron expuestos a concentraciones de cromo cercanas a las IC50 (dosis que inhibe 50 % del crecimiento celular), determinadas en este laboratorio. Las sucesivas determinaciones se realizaron a las 96 h de iniciado el ensayo (cuando los cultivos estaban en la fase logarítmica de crecimiento). Se calculó el crecimiento celular utilizando una cámara de recuento Neubauer, aplicando la fórmula de Venrick<sup>3</sup> con un error menor que 10 %. El contenido de clorofila a se determinó utilizando el método de Devars.<sup>4</sup> Se cuantificó la cantidad de lípidos totales según el método de Blich and Dye, descrito por *Kates*<sup>5</sup> y se midió la actividad SOD por el método de Misra y Fridovich.<sup>6</sup> Dado que en estas muestras algales se evidenció una actividad oxidante, se relacionó la actividad SOD con la cantidad de enzima necesaria para producir un descenso de 50 % en la actividad relativa en lugar de la actividad absoluta, como lo indica el método tradicional, de Misra y Fridovich.<sup>7</sup> El resultado se normalizó por número de células.

## RESULTADOS

Como se puede observar en la figura 1 (barras) el crecimiento celular y el contenido de clorofila disminuyen al aumentar las concentraciones de Cr (VI). Esto fue observado también por Fasulo, quien comprobó además que la disminución de clorofila está asociada a la desorganización de los cloroplastos.<sup>8</sup>

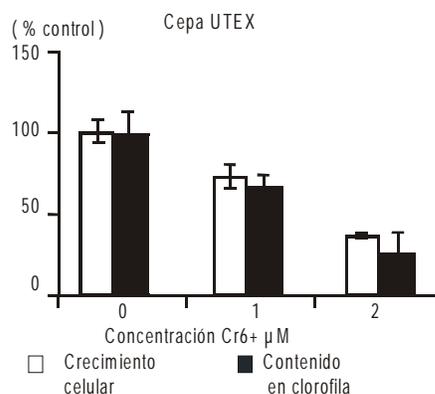


Fig. 1. Crecimiento celular y contenido de clorofila en dependencia de la concentración de cromo.

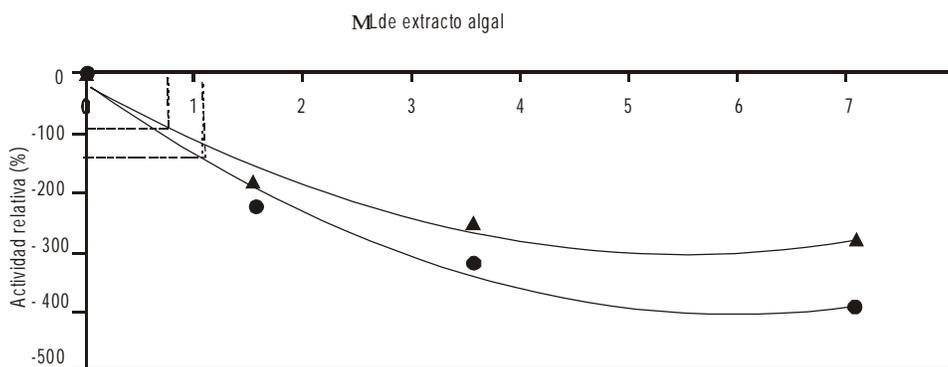


Fig. 2. Evolución de la actividad SOD para la cepa UTEX sometida a 2 concentraciones de cromo.

Respecto del metabolismo lipídico se pudo comprobar, al igual que en un trabajo previo, que la cantidad de lípidos totales disminuye notoriamente en la cepa MAT en función de las concentraciones del metal, no así en la cepa UTEX, la cual no presentó mayores diferencias con respecto al control.

En la figura 2 (círculos unidos por una línea curva) se ve la evolución de la actividad SOD para la cepa UTEX sometida a 2 concentraciones de cromo.

Respecto de la cepa MAT, si bien cualitativamente se pudo comprobar que existe una relación inversa entre la dosis de cromo a la que fue sometido el cultivo y la caída en la velocidad de formación del adrenocromo (fig. 3), no se pudo cuantificar ese descenso, porque no se alcanzó un valor límite. La inducción de la SOD sería la respuesta al estrés oxidativo desencadenado por el metal. Al comparar la respuesta de ambas cepas, se encontró que la cepa proveniente de cepario es más sensible al metal, que la cepa proveniente del río contaminado, lo cual podría estar indicando que esta última posee mayores niveles de SOD, como una respuesta adaptativa a su medio ambiente, altamente contaminado. Ensayos preliminares, realizados en forma separada con la fracción particulada y el sobrenadante de 11.000 x g, indicaron que la SOD mitocondrial sería la especie activada bajo estas condiciones de estrés.

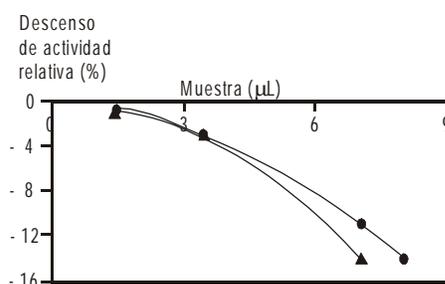


Fig. 3. Velocidad de formación del adrenocromo según la dosis de cromo en la cepa MAT.

Estos resultados, en su conjunto permiten inferir que:

1. Las cepas de *Euglena gracilis* utilizadas son un buen sistema experimental para el estudio de estrés oxidativo, provocado por contaminantes ambientales del tipo de los metales pesados.
2. Es de suma importancia, en la elección de la cepa testigo, conocer su origen, porque estos organismos al vivir en un ambiente contaminado desarrollarían defensas antioxidantes del tipo de la SOD.
3. Este es uno de los primeros reportes acerca de la detección y puesta a punto de la determinación de actividad SOD en *Euglena gracilis*, la cual si bien está un tanto enmascarada por la presencia de compuestos altamente oxidantes, se puede medir, pudiendo llegar a ser un buen biomarcador.

## SUMMARY

Studies of oxidative stress were conducted in 2 strains of *Euglena gracilis* (MAT and UTEX). The cultures were subjected to different concentrations of hexavalent chromium. The superoxide dismutase activity, the amount of total lipids and the concentration of chlorophyll were determined and the respective growth curves were obtained. The results obtained show that chromium besides affecting the production of lipids, chlorophyll and cellular growth, increases the superoxide dismutase activity. Significant differences are observed between both strains.

Subject headings: OXIDATIVE STRESS; EUGLENA GRACILIS; CHROMIUM; CLOROPHYLL

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang S, Leonard SS, Ye J, Ding M, Shi X. The role of hydroxyl radical as a messenger in Cr(VI)-induced p53 activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C868-75.
2. Buetow DE. The biology of *Euglena gracilis*. New York:Academic Press, Vol. 3. 1982:200-1.
3. Venrick EL. How many cells to count? En *Handbook of protoctista*. Boston:Jones and Bartlett 1978:270-87.
4. Devars S, Torres-Marquez ME, González-Halphen D, Moreno-Sánchez R. Cyanide-sensitive and cyanide resistant respiration of dark-grown *Euglena gracilis*. *Plant Sci* 1992;82:37-43.
5. Kates M. Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol 3, . New York:Elsevier, 107.
6. Fridovich I. Biological sources of superoxide. *Methods. Enzymol* 1984;105:59-61.
7. Misra HP, Fridovich Y. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinefrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
8. Fasulo MP, Bassi M, Donni A. Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and ultrastructural studies. *Protoplasma* 1983;114: 35-43.

Recibido: 11 de octubre de 2001. Aprobado: 15 de diciembre de 2002.

Dra. *María del Carmen Ríos de Molina*. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Correo electrónico: \*mcrios@qb.fcen.uba.ar