

## BAÚL DE LA CIENCIA

### El arsénico, ese conocido tan desconocido

Luis Mariano Mateos Delgado

Área de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León.

Una reciente publicación científica en la prestigiosa revista “Science” abogaba por la aparición de otro tipo de forma de vida (“extraterrestre” se ha dicho) basándose en la aparente abundancia de resultados proporcionados por el descubrimiento de una bacteria que aparentemente había sustituido el fósforo, uno de los elementos esenciales para la vida, tal cual la conocemos, por el arsénico (Wolfe-Simon et al., 2010). Dado que este asunto supone un tema complejo, incluso para personas que estamos dentro de este campo de la ciencia, en este “Baúl de la ciencia” se pretende explicar de la forma más sencilla posible cuál es el papel del arsénico en la naturaleza y cómo este elemento interacciona negativamente con los seres vivos. Desde este conocimiento básico tendremos más fundamentos para avalar o refutar la existencia de una forma de vida diferente a la convencional que describen los autores de la publicación.

**Palabras clave:** arsénico, toxicidad, desintoxicación celular, biorremediación, bacteria primitiva.

#### El arsénico y su evolución en la naturaleza

Si preguntáramos a cualquier persona de la calle que nos dijera qué conoce sobre el arsénico, casi todas nos contestarían algo que mayoritariamente tendría que ver con temas morbosos sobre envenenamientos. Incluso en el discurso reciente de la ceremonia de concesión del Nobel de Literatura, Vargas Llosa hizo alguna alusión a este tema. No obstante, en muchos casos desconocemos los fundamentos biológicos que rigen esas manifestaciones tan manidas. En primer lugar, ¿qué es el arsénico y dónde se encuentra? La etimología del nombre arsénico parece proceder del griego *arsenikon*, que significa masculino y con el que se identificaba un sulfuro de arsénico (oropimente). Se trata de un elemento químico cuyo símbolo es As y con número atómico 33. Dentro de la tabla periódica pertenece al grupo 15 (columna), periodo 4 (fila) y bloque p (por el orbital que ocupan los electrones externos) (**Fig. 1**), de forma que los elementos del mismo grupo presentarán configuraciones electrónicas externas equivalentes, y los pertenecientes al mismo periodo presentarán masas atómicas que se incrementan progresivamente, pero no muy dispares. Los elementos químicos de este grupo 15 (nitrógeno, fósforo, arsénico, antimonio y bismuto) tendrán propiedades físico-químicas equivalentes, dado que estas propiedades dependerán de las

interacciones de los electrones de la capa externa (Silver y Phung 2002); éste primer aspecto sería de relevancia para entender que el arsénico pudiera suplantar al fósforo en ciertas formas de vida, dando un cierto sentido al trabajo descrito por Wolfe-Simon et al. (2010).

Grupo →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Periodo ↓																		
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
Lactánidos	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu			
Actinidos	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr			

**Figura 1.** Tabla periódica de los elementos con indicación de la posición del fósforo (P), arsénico (As) y antimonio (Sb).

El arsénico (As a lo largo del texto) es un metal-metaloide, por compartir muchas de las propiedades de éstos y se presenta en la naturaleza en 4 estados de oxidación: +5, +3, 0 y -3. Las tres primeras se corresponden con formas inorgánicas de As que se denominan de forma generalizada arseniato (+5, AsV), arsenito (+3, AsIII) y As elemental (As<sup>0</sup>), dando lugar las dos primeras a los oxiácidos ácido arsénico (H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>) y ácido arsenioso (H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>) o trióxido de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). La forma -3 es la asociada al compuesto volátil arsina (AsH<sub>3</sub>) que es extremadamente tóxico. Como es fácil de imaginar, el As inorgánico formó parte de los constituyentes primigenios de la Tierra durante su génesis hace más de 4.500 millones de años, siendo las formas inorgánicas reducidas As<sup>0</sup> y AsIII las preponderantes en ambientes anoxigénicos primitivos. Con la aparición del oxígeno en la atmósfera, el As de la corteza terrestre experimentó procesos oxidativos, siendo con el tiempo la especie inorgánica AsV la preponderante en zonas en contacto con la atmósfera (Lombi y Holm, 2010). Esta transformación también ha sido relevante para entender la evolución de los mecanismos de desintoxicación de las células frente al As (ver “papel que juegan los seres vivos frente al arsénico”).

## **Origen del arsénico ambiental**

El As se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza siendo el vigésimo elemento en importancia con relación a su presencia en la corteza terrestre [3-5 mg/kg o partes por millón (ppm)]. Esto es principalmente debido a su presencia como constituyente en un enorme número de minerales y rocas de la corteza terrestre; el principal mineral de As en nuestras latitudes es la arsenopirita o mispíquel ( $\text{FeAsS}$ ), mientras que otros arseniuros metálicos como niquelina ( $\text{NiAs}$ ), cobaltina ( $\text{CoAsS}$ ), gersdorffita ( $\text{NiAsS}$ ), esmaltita ( $\text{CoAs}_2$ ), rejalgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) y oropimente ( $\text{As}_4\text{S}_6$ ) suponen ejemplos muy representativos. La arsenolita ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), es la forma mineral del trióxido de As; este último se genera como producto de la alteración de los agentes atmosféricos sobre minerales de As o al calcinar los arseniuros de Fe, Co o Ni con el aire. El As ambiental puede tener origen natural o humano; en el primero de los casos el As procedería de emanaciones volcánicas, lixiviaciones de rocas y liberación de acuíferos subterráneos que afloran al exterior. La intervención humana en la movilización de As se ha manifestado principalmente asociada a labores de minería y posterior procesamiento del mineral (combustión de fósiles, extracción de metales preciosos, etc.), así como al uso de ciertos derivados de As en procesos industriales que en muchos de los casos es difícil poderse imaginar (Mukhopadhyay et al. 2002). Algunas aplicaciones tienen que ver con su uso para aleaciones especiales, elaboración de vidrios, manufacturación de pinturas, elaboración de herbicidas o preparación de algunos agentes quimioterapéuticos para su aplicación en humanos, por citar algunas de las aplicaciones más relevantes.

## **Efectos del arsénico sobre la salud**

El As ha sido el veneno por excelencia y su historia ha estado ligada durante mucho tiempo a la de la Humanidad, aunque durante siglos ha ido íntimamente ligado a la farmacopea con indicación especial en el tratamiento de ciertas dolencias, como purgante y como agente “elixir de la juventud” (usado a dosis bajas). Incluso actualmente siguen persistiendo ideas benévolas en “medicinas” homeopáticas y remedios tradicionales de China, India, sureste de Asia, etc., en base a observaciones en estos pacientes de efectos rejuvenecedores como un aumento en la turgencia de la piel. Los taxidermistas también lo aplican en los procesos de momificación, aunque en este caso por su toxicidad, impidiendo la degradación acelerada de los tejidos por putrefacción microbiana.

### El As y la muerte de Napoleón

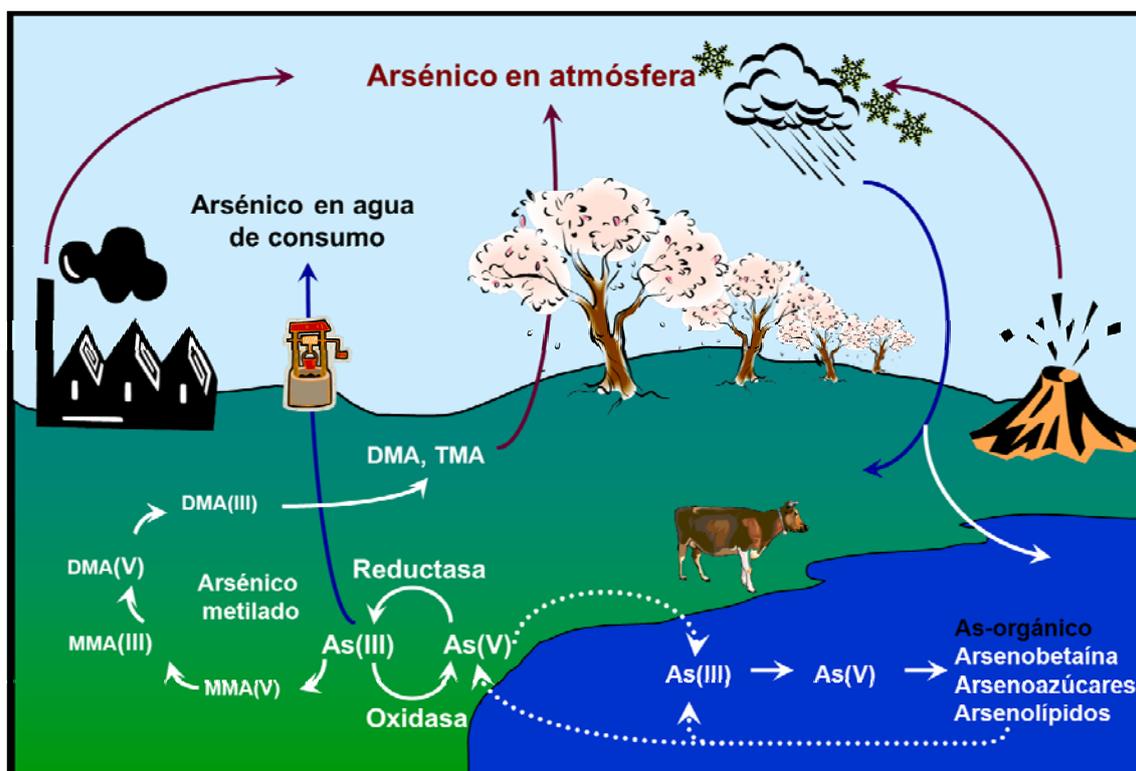
Quizás el mayor tema de debate por envenenamiento con As es el que tiene que ver con la muerte de Napoleón en 1821. Aunque la autopsia de su

cadáver constató la existencia de un cáncer de estómago, se cuestionó su veracidad cuando en el año 1961 se realizó un análisis de cabello del cadáver y se descubrieron grandes cantidades de As en el pelo (100 veces más que lo habitual). Se habló de diferentes teorías que incluían su envenenamiento por adición de As en el vino, y también su muerte por un envenenamiento no inducido y causado por las condiciones de extrema humedad de su última residencia en el destierro (isla de Santa Elena), dado que sus habitaciones se encontraban empapeladas con papel pintado que incluía As. La humedad del papel pintado favorecería el crecimiento de hongos que movilizaban el As a formas volátiles que serían inhaladas por Napoleón. Sin embargo, y aunque estos aspectos pudieran considerarse desencadenantes de procesos tumorales a un plazo más largo, los análisis de cabellos de Napoleón de épocas precedentes a su destierro confirmaron también la presencia de elevados niveles de contaminación de As; este aspecto también ha sido observado en pelos procedentes de individuos control de esa misma época por lo que parece que los niveles de contaminación por As eran elevados de forma generalizada, entre otras cosas quizás por el prestigio de la farmacopea de la época que incluía pócimas con As (Mari et al., 2004).

### El ciclo del As y su toxicidad

El As es uno de los elementos más tóxicos que existen en la Naturaleza y de hecho desde hace una década constituye el compuesto más tóxico y con mayor riesgo en humanos, según describe la agencia para el registro de agentes tóxicos causante de enfermedades (ATSDR; <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>). Sin embargo esta toxicidad depende de su combinación (orgánico o inorgánico), y de su estado de oxidación, siendo mucho más tóxicas las formas inorgánicas reducidas, frente a las oxidadas. El papel que los seres vivos juegan en estas biotransformaciones es muy relevante, pudiendo favorecerse la volatilización del As mediante reducciones o metilaciones sucesivas o la acumulación de formas orgánicas de As que resultan menos tóxicas (arsenobetaina, arsenoazúcares, etc.), aunque como ocurre con todos los elementos químicos, el As como tal no desaparecerá de la naturaleza (**Fig. 2**).

La exposición a As puede ocurrir a través de inhalaciones, contacto con la piel o por ingestión (aguas y alimentos). Los niveles de As en alimentos de origen animal son habitualmente bajos al no estar permitido el uso de As y sus derivados en terapia animal; una excepción la constituye el uso de un derivado del ácido fenil-arsénico (comercialmente roxarsona) en procesos de alimentación de aves, pero con poca relevancia en cuanto a su presencia en carne dado que se excreta casi completamente. Sin embargo los niveles de As en



**Figura 2.** Ciclo del As (modificado de Mukhopadhyay et al. 2002). MMA, DMA y TMA: formas mono- di- y trimetiladas de arsénico.

peces y mariscos pueden ser elevados, dado que los peces absorben As del ambiente en el que se encuentran; este problema es más acuciante en peces de gran envergadura y con elevada longevidad, donde la bioacumulación de As (y también otros metales pesados) es notable (Lièvremon et al. 2009).

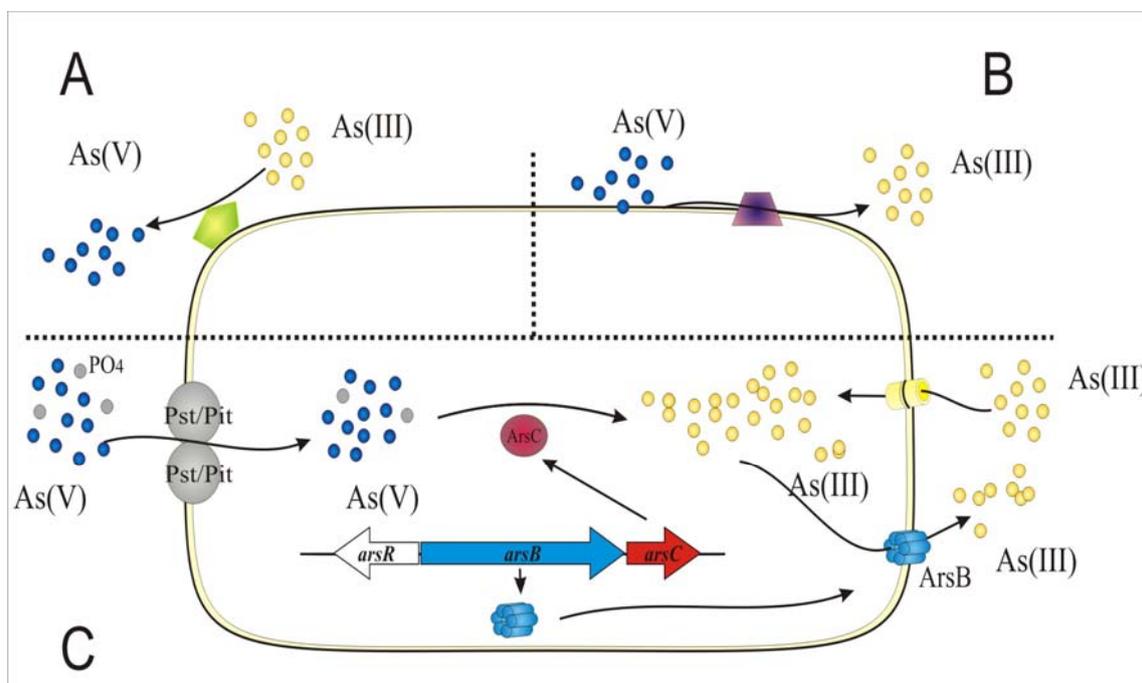
### Exposición a As y toxicidad en humanos

En humanos la exposición a As es más elevada para aquellos que (i) trabajan en empresas donde utilizan As en sus procesos industriales, (ii) para gente que vive en casas que contienen conservantes de la madera (CCA) y gente que vive en granjas donde han sido aplicados con profusión pesticidas y herbicidas con As, (iii) para personas que usan acuíferos para el suministro de agua que contienen cantidades elevadas de As, como ocurre casi de forma generalizada en algunos países del sur de Asia (India, Tailandia, Bangladesh, etc.). En nuestro país la existencia de áreas con elevadas concentraciones de As en acuíferos no es muy relevante, excepto en zonas muy concretas (alrededores del lago de Sanabria, Zamora); sin embargo algunos acontecimientos como la disminución por parte de la Organización Mundial de la Salud del límite de permisividad de presencia de As en agua, de 50 partes por billón (ppb)

americano a 10 ppb (10 microgramo/litro) han promovido la realización de análisis químicos generalizados de aguas por parte de las administraciones, saltando las alarmas cada cierto tiempo en algunos municipios (en León ha habido recientemente algunos ejemplos).

### Papel que juegan los seres vivos frente al arsénico

Es bien conocida la versatilidad metabólica que ofrecen de forma global las bacterias, por lo que no es de extrañar que a determinados grupos bacterianos bajo ciertas condiciones “les venga bien” la presencia de As en el ambiente. Esto último es mucho decir, porque lo más probable es que a esas bacterias les vendría mejor la presencia de otros compuestos para ser metabolizados, pero “a falta de pan buenas son tortas”. Me refiero a ciertos grupos bacterianos (¡ojo! y solo a algunas bacterias) que se comportan como quimiolitótrofos y/o a aquéllas que realizan un metabolismo respiratorio anaeróbico (quimiolitótrofos o quimiorganotrofos) donde el As inorgánico juega un papel relevante (**Fig. 3**). Estos procesos constituirán excepciones en relación con la toxicidad que provoca el As en los seres vivos, por lo que muchos de los organismos desarrollan mecanismos de defensa o resistencia frente al As que se describen adelante (Rosen, 2002).



**Figura 3.** Metabolismo y sistemas desintoxicantes ligados al arsénico. (A) Quimiolitotrofia asociada a bacterias del arsénico; (B) respiraciones anaeróbicas del arseniato; (C) resistencia/desintoxicación de arsénico en bacterias.

### Quimiolitótrofos que usan arsenito (AsIII)

Se trata de bacterias que presentan unas enzimas capaces de oxidar arsenito (AsIII) a arseniato (AsV), liberando dos electrones en el proceso que son utilizados para procesos generadores de energía. Las enzimas capaces de realizar este proceso son arsenito oxidasas localizadas en el periplasma celular o asociadas a su membrana citoplasmática (**Fig. 3 panel A**) y presentes en algunos microorganismos Gram-negativos aerobios que se suelen comportar como quimiolitótrofos facultativos. Estos microorganismos a la vez que obtienen energía en la oxidación del arsenito, realizan un proceso de desintoxicación de una forma más tóxica (arsenito) a otra forma menos tóxica (arseniató), por lo que juegan un papel importante en el ciclo de As en la naturaleza.

### Respiración anaeróbica del arseniato

Se trata de un proceso metabólico descubierto hace poco más de una década y donde algunos microorganismos utilizan una fuente de As oxidada (en ausencia de oxígeno) como aceptor final de electrones. La enzima implicada en este proceso concreto se denomina arseniato reductasa, y como ocurría en el proceso metabólico descrito previamente, la enzima está situada en el periplasma del microorganismo o asociada a su membrana citoplasmática (**Fig. 3, panel B**). En este proceso metabólico se produce una transformación de una forma de As menos tóxica (arseniató) a otra más tóxica (arsenito), pero hay que tener en cuenta que el proceso se realiza sin contactar con el citoplasma celular.

### Mecanismos de resistencia celular a As (desintoxicación celular)

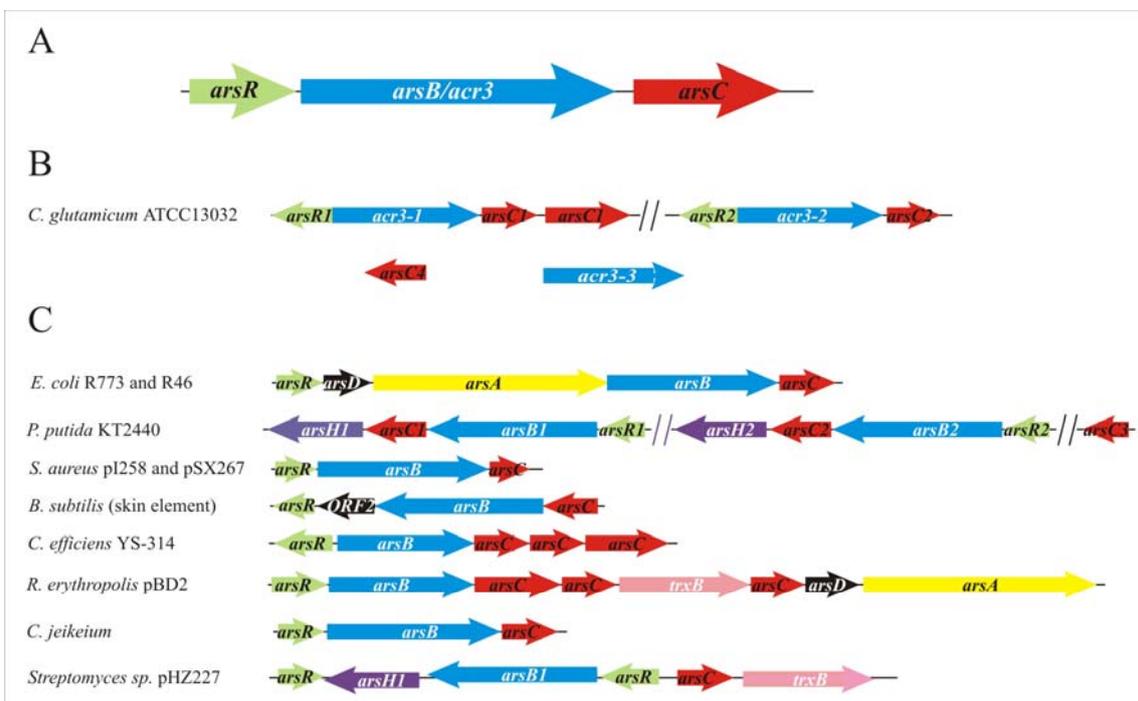
Para la mayoría de los seres vivos el As en cualquiera de sus formas solo ejerce un papel negativo para su viabilidad, y solo en los dos casos anteriores se puede hablar de cierto “beneficio” con su presencia. Sin embargo y dado que el As es casi omnipresente y ligado a muchos ambientes donde hay todo tipo de formas de vida, a estas estructuras celulares no les ha quedado más remedio que “adaptarse” a su presencia. En la mayoría de los casos esa adaptación ha consistido en adquirir una dotación genética que permita a esos organismos tener acceso a los nutrientes esenciales para la vida, pero excluir adecuadamente aquellos que le sean tóxicos. La presencia de genes u operones de resistencia a As ha sido descrita en la mayoría de los microorganismos con genomas secuenciados y que superen las 2.000 kilopares de bases, siendo estos operones incluso más frecuentes que algunas vías de biosíntesis de aminoácidos (Silver y Phung 2005); sólo en algunos microorganismos que ocupan hábitats donde el As está ausente (p.e. patógenos estrictos de animales), estos sistemas pueden estar ausentes o no ser funcionales.

Visto este tema con la perspectiva de las primeras formas de vida en la Tierra hace más de 3.500 millones de años, el ambiente existente en el planeta era totalmente anóxico, con presencia de elevadas concentraciones de As reducido (AsIII) en forma de ácido arsenioso ( $H_3AsO_3$ ) que en condiciones fisiológicas (el valor del pKa a pH 7) se puede presentar como hidróxido de arsenito [ $As(OH)_3$ ]. El hidróxido de arsenito se asemeja estructuralmente al glicerol, por lo que la vía de entrada celular más aceptada para el arsenito son las porinas de agua y glicerol (aquaglicerol porinas). Dada la toxicidad del arsenito, estas bacterias se desintoxicaron del arsenito mediante la adquisición de una permeasa para la salida de arsenito (ArsB; arsenito permeasa), de forma que el arsenito que entraba en la célula era sacado a través de la permeasa (**Fig. 3, panel C**). A lo largo del proceso evolutivo la atmósfera se convirtió en oxigénica y empezaron a aparecer formas oxidadas de As (arseniato) en grandes cantidades, por lo que la célula tuvo que desarrollar mecanismos para desintoxicarse del arseniato. Al hilo de la historia que estamos comentando podríamos pensar en la adquisición de una permeasa para la salida del arseniato, pero de este hecho no tenemos pruebas. Quizás sí que apareció en algún momento de la evolución, pero las células que presentaron la permeasa de arseniato fueron evolutivamente perjudicadas por un detalle que entenderemos a continuación.

Los sistemas de entrada de arseniato en todos los seres vivos conocidos están relacionados con los sistemas de entrada del oxianión fosfato (sistemas específicos e inespecíficos de entrada; Pit y Pst). Dado que las propiedades químicas de los oxianiones fosfato y arseniato son equivalentes (mismo grupo de la tabla periódica), y que varía en el tamaño del compuesto al ser el fosfato menos voluminoso, la entrada de fosfato está claramente favorecida sobre el arseniato. El fósforo es un elemento esencial, y por lo tanto las células suelen hacer acopio de él en estructuras denominadas volutina; si la evolución hubiera favorecido la presencia de arseniato permeasas para eliminar el tóxico, ocurriría lo mismo que en la entrada y por lo tanto la salida de fosfato estaría favorecida sobre la salida de arseniato. Es por este motivo que las células adoptaron una estrategia de mayor recorrido pero más segura, aunque inicialmente pudiera parecer contraproducente. La estrategia ha consistido en utilizar las enzimas arseniato reductasas citoplasmáticas (ArsC; distintas a las reductasas de los procesos respiratorios anaeróbicos) para reducir el arseniato incorporado a arsenito; este arsenito es muy tóxico para la célula, pero es retirado inmediatamente de la célula mediante la enzima arsenito permeasa (**Fig. 3, panel C**).

De esta forma las células evitan la pérdida del fosfato citoplasmático y se garantizan una adecuada eliminación del As en sus formas inorgánicas más

representativas. Originalmente estos genes se estarían expresando constitutivamente en los diferentes microorganismos (a lo largo de todo el ciclo celular), pero un paso más evolucionado consistió en la aparición de una proteína reguladora (ArsR; represor transcripcional) que permitiera la expresión coordinada de los genes que hemos descrito previamente. Esto daría lugar a un operón de resistencia a arsénico (*ars*) de tres componentes: *5'arsR-arsB-arsC3'* que constituye la base de los procesos de desintoxicación celular (**Fig. 3, panel C; Fig. 4, panel A**). En ausencia de arsenito (inductor), la proteína represora ArsR está unida a la región operadora impidiendo la expresión de los genes *arsR*, *arsB* y *arsC*. En presencia de arsenito la proteína represora se separa del operador y permite la expresión de los tres genes y por lo tanto la desintoxicación del contaminante. Existen ejemplos de microorganismos en los cuales no aparecen todos los genes indicados (quizás por ocupar ambientes carentes de As), y otros en los que el operón de resistencia *ars* está conformado por 5 genes (*5'arsR-arsD-arsA-arsB-arsC3'*) como es el caso de *Escherichia coli*. En otros microorganismos aparecen varios operones de resistencia a As en diferentes posiciones del cromosoma bacteriano, como ocurre en algunas bacterias como *Pseudomonas putida* y *Corynebacterium glutamicum* (**Fig. 4, paneles B y C**).



**Figura 4.** (A) Estructura básica de un operón de resistencia a arsénico de tres componentes; (B) operones de resistencia a As, *ars1* y *ars2*, en *C. glutamicum*; (C) operones *ars* descritos para otros microorganismos con estructuras génicas diferentes.

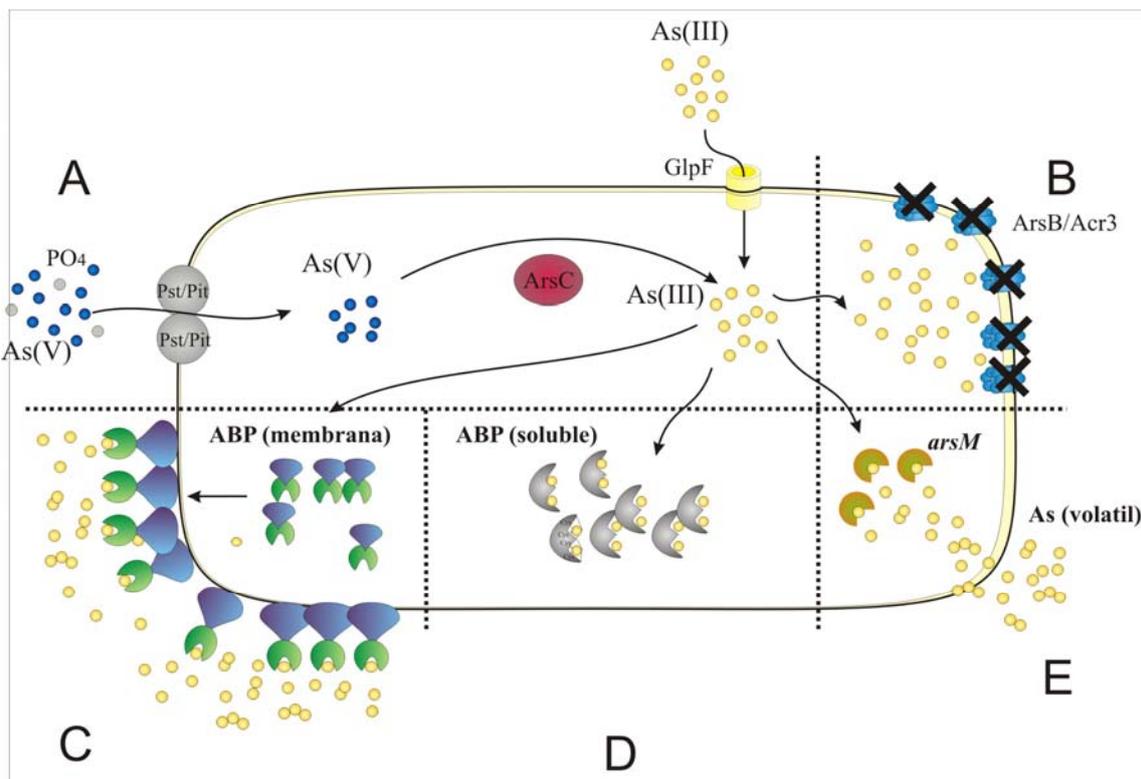
## **Estudios de los mecanismos de resistencia a arsénico en *C. glutamicum***

Lo que empezó como unos estudios preliminares de resistencia a metales con la corinebacteria *C. glutamicum* (Gram-positivo perteneciente al grupo de las actinobacterias), ha permitido a nuestro grupo de trabajo realizar análisis moleculares detallados de los dos operones de resistencia a As ligados al cromosoma bacteriano, así como la obtención de mutantes bloqueados en algunos procesos metabólicos o desintoxicantes con el objetivo de ser utilizados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con As (Ordoñez et al., 2005).

Algunos de los estudios han resultado de relevancia en nuestro campo de la ciencia; por una parte hemos estudiado los genes implicados en los reguladores transcripcionales (represores) que controlan la expresión del resto de los genes del operón. Estos represores (CgArsR1 y R2; **Fig. 4, panel B**) funcionan como homodímeros en la interacción del centro activo con la región operadora, así como una región reguladora para interacción con arsenito; en presencia del inductor (arsenito), el represor se “suelta” del operador y permite expresar los genes estructurales (Ordoñez et al., 2008). También han sido objeto de estudio los genes que codifican para los sistemas de salida del arsenito, las arsenito permeasas CgAcr3-1 y 2 (**Fig. 4, panel B**). Estas enzimas se comportan como canales de salida específicos para arsenito, pero no de antimonito; un elevado porcentaje de arsenito permeasas (ArsB o Acr3 dependiendo de sus características) son capaces de eliminar también antimonito debido a que su naturaleza físico-química es equivalente (Rosen y Tamas, 2010; ver la posición del antimonito en Fig. 1). Las enzimas CgAcr3 utilizan un sistema electroquímico para la salida de arsenito acoplada a la entrada de protones (antiporter) (Fu et al., 2009). El tercero de los componentes analizados han sido las enzimas arseniato reductasas (CgArsC1 y C2; **Fig. 4, panel B**) capaces de convertir arseniato en arsenito; el mecanismo de acción que utilizan estas enzimas es totalmente inédito, dado que utiliza un sistema redox basado en la presencia de micotiol (MSH) que realiza una función equivalente al del glutatión (GSH) en bacterias y en células eucariotas. En las enzimas CgArsCs el MSH está acoplado a un nuevo tipo de enzimas llamadas micorreductinas que se acoplan al MSH para realizar la reducción del arseniato; las micorreductinas han sido descritas por primera vez por nuestro grupo de trabajo (Ordoñez et al., 2009) y al igual que el MSH son específicas de las actinobacterias (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, etc.).

### **Procesos de biorremediación bacteriana ligada a arsénico**

La aplicación de bacterias para procesos de biorremediación de As (biosorción o biocontención) supone un sistema sencillo y económico para solventar problemas reales de contaminación de suelos y aguas; estos sistemas serían igualmente extrapolables para la biorremediación de cualquier otro metal pesado. Para ello se puede recurrir a procesos naturales donde se utilicen bacterias nativas (no modificadas) capaces de resistir en la medida de lo posible elevados niveles del metal/oide; en muchas ocasiones esta elevada resistencia natural no está ligada a una mayor capacidad de retención-acumulación del elemento. En relación con procesos de biosorción bacteriana, es decir unión o atrapamiento del elemento en la superficie externa de la bacteria sin interiorización celular, en la mayor parte de los casos descritos iría ligada a la presencia de capas S de naturaleza proteica en el exterior de la bacteria (Velásquez y Dussan, 2009). Sin embargo los casos más abundantes y efectivos serían los basados en la biocontención del elemento en estructuras celulares que no sufrirían procesos de lisis. Para la biocontención bacteriana del As existen determinados procesos celulares que se consideran determinantes para su mejora y que se representan en la **Figura 5**: (i) potenciación de las vías de entrada de arseniato (bajos niveles de fosfato) o incrementando la dosis de los genes *glpF* para permeasas de arsenito (**panel A**); (ii) obtención de mutantes modificados donde las vías de salida de arsenito (ArsB/Acr3) han sido eliminadas (**panel B**); (iii) mediante la expresión de genes que generen proteínas (ABP) con alto contenido en residuos cisteína para su interacción con arsenito (el más tóxico); las proteínas pueden tener un destino extracelular (**panel C**) o intracelular (**panel D**). Las proteínas más conocidas que cumplen estos requisitos son las fitoquelatinas y las metalotioneínas; (iv) mediante la volatilización de las formas de arsénico por clonación de genes implicados en procesos reductivos (*arsM*), generando arsinas volátiles (**panel E**).



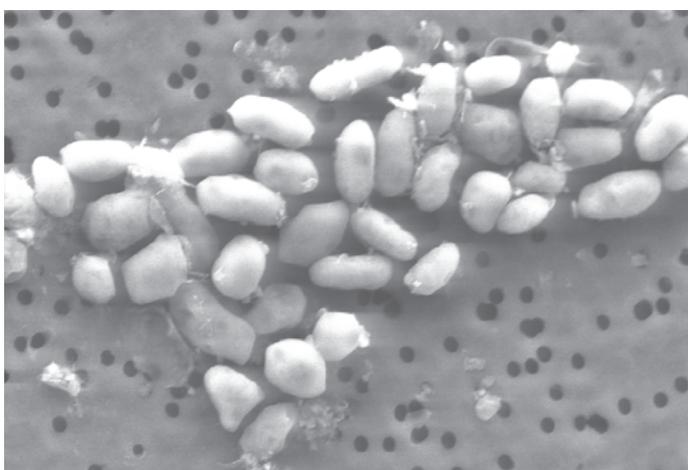
**Figura 5.** Utilización de bacterias en procesos de biorremediación, potenciando vías de entrada (A), impidiendo la salida de arsenito (B), generando péptido-proteínas que interaccionen con As (C y D) o fomentando los procesos de volatilización (E). (Modificado de Mateos et al., 2006).

En nuestro grupo de trabajo se han optimizado algunos de los procedimientos descritos anteriormente para la bacteria *C. glutamicum*, consiguiendo cepas mutantes de *C. glutamicum* capaces de retener/acumular hasta 50/100 veces más cantidad de As que lo acumulado por la cepa original, dependiendo de la especie de arsénico acumulado; para la acumulación de As(V) se han utilizado medios de cultivo bajos en fosfato y mutantes carentes de las actividades arseniato reductasa (Villadangos et al., 2010), mientras que los estudios de acumulación de arsenito han sido realizados con mutantes cuyas permeasas de arsenito han sido eliminadas (Feo et al. 2007). Otros abordajes como la clonación de genes que potencien la entrada de arsenito (*glpF*) o que generen proteínas recombinantes con elevado número de cisteínas están igualmente siendo desarrollados en nuestro laboratorio.

### A vueltas con una vida “extraterrestre” basada en arsénico

Concluimos este artículo con una aproximación a lo descrito en el trabajo de Wolfe-Simon et al. (2010). Estos autores describen que una bacteria de la

familia *Halomonadaceae* (GFAJ-1) aislada del fango del lago Mono (California, USA) que presenta elevadas concentraciones de metales, entre ellos el As (esa es la emulación de ambiente extraterrestre) ha sido capaz de ser crecida en medios de cultivo de laboratorio donde el fosfato (ácido ortofosfórico) ha sido reemplazado por el ácido arsénico (arseniato), ambos oxianiones del grupo 15. Mediante diferentes análisis físico-químicos intentan demostrar que realmente existe una sustitución del fosfato por el arseniato. Esta disertación se basa en el mimetismo estructural entre los dos compuestos, y que tendría un significado equivalente a la posible aparición de compuestos “orgánicos” ligados al silicio en vez de los que conocemos asociados al carbono.



**Figura 7.** Imagen al microscopio electrónico de barrido de células de la cepa GFAJ-1 crecidas en medio con As y carente de fosfato. (Tomada de Wolfe-Simon et al. 2010).

Hay que poner en primer lugar de manifiesto que el fosfato es un compuesto esencial para la vida y que participa con sus enlaces de tipo éster o fosfo-anhidro en moléculas estructurales (fosfolípidos, ácidos nucleicos), intermediarios del metabolismo (azúcares-fosfato, fosfoenol-pirúvico) y sobre todo en moléculas implicadas en metabolismos bioenergéticos (ATP/ADP, NADP/NADPH, GTP/GDP, etc.). De los análisis físico-químicos de las estructuras celulares de GFAJ-1, que se corresponden a fracciones donde se localizarían macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc.) y moléculas de otra naturaleza, parece evidenciarse la presencia de elevadas cantidades de As. Sin embargo existe un claro convencimiento entre los científicos de que al no estar algunos de los ensayos claramente explicados, pudiera tratarse de procesos de acumulación y resistencia a As en vez de tratarse de un intercambio de elementos. Uno de los aspectos más relevantes viene determinado por el crecimiento de las bacterias en medios donde supuestamente no hay fósforo. Según los datos de Wolfe-Simon et al. (2010) hay un incremento poblacional equivalente a 8 duplicaciones, aunque parece tratarse de un error y que el incremento sea el equivalente a dos duplicaciones

(Barry P. Rosen, comunicación personal). En este último caso la explicación del incremento poblacional en “ausencia de fosfato” se debería a la propia contaminación de la solución de arseniato donde siempre existen cantidades residuales de otros elementos, o bien en la degradación parcial del RNA (con corta vida media) que sería utilizado como fuente de fosfato en condiciones de necesidad.

De las muchas explicaciones que entrarían en controversia con los resultados de Wolfe-Simon et al. (2010), hay algunas que detallo a continuación y que nos pueden hacer reflexionar. (i) Por una parte la forma de fósforo que se encuentra en estructuras inorgánicas y orgánicas (celulares) es la misma (ácido ortofosfórico), y no entra en procesos de oxidación reducción dentro de las células. En el caso del As, el arseniato puede ser fácilmente reducido a arsenito, con lo que la toxicidad que se generaría sería elevada. (ii) El arseniato puede ser incorporado en los intermediarios del metabolismo (en vez de fosfato), pero se paralizarían las reacciones metabólicas, fundamentalmente por la inestabilidad de los enlaces As-O. Cuando se comparan las distancias atómicas en P-O con As-O, este último sale claramente desfavorecido (1,5 Å frente a 2 Å) y por lo tanto se necesita mucha menos energía para disociar As-O (Tawfik y Viola, 2011); también las enzimas implicadas en los procesos donde interviene As deberían ser “diferentes” a las convencionales. (iii) Igualmente, ¿cómo es posible imaginarse estructuras de ácidos nucleicos donde el fosfato sea sustituido por el arseniato con la inestabilidad de los teóricos enlaces di-ésteres arseniato?; algo equivalente ocurriría con derivados arsenicales del ATP para su uso como molécula de cambio energético.

Para entender todas estas novedades de forma coherente, se necesitaría todo un arsenal de nuevas enzimas con nuevas especificidades de las cuales hasta el momento no se tienen noticias. Parecería más lógico haber descubierto de forma secuencial bacterias con adaptaciones intermedias de incorporación o intercambio de un elemento por otro en diferentes estructuras/intermediarios, que no una bacteria donde toda esta evolución haya ocurrido de sopetón. La teoría de Wolfe-Simon et al. (2010) es que GFAJ-1 sería una bacteria muy arcaica con un ciclo vital muy primitivo basado en el As y que, durante los miles de millones de años transcurridos y favorecida por evoluciones y adaptaciones, se haya orientado la vida hacia el fósforo en la forma que lo conocemos hoy; no obstante nos siguen faltando eslabones. En todo caso nos mantendremos a la espera de que los análisis por realizar a la bacteria GFAJ-1 corroboren que el As presente sea realmente estructural y no forme parte de un proceso acumulativo, aspecto este último del cual soy totalmente partidario. En todo caso siempre nos quedará Marte.

## Bibliografía

- Fu H.L., Meng Y., Ordoñez E., Villadangos A.F., Bhattacharjee H., Gil J.A., Mateos L.M., Rosen B.P. 2009. Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 284:19887-19895
- Feo J.C., Ordóñez E., Letek M., Castro M.A., Muñoz M.I., Gil J.A., Mateos L.M., Aller A.J. 2007. Retention of inorganic arsenic by coryneform mutant strains. *Water Res.* 41:531-542.
- Lièremont D, Bertin P.N., Lett MC. 2009. Arsenic in contaminated waters: biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment processes. *Biochimie.* 91:1229-1237.
- Lombi E., Holm P.E. 2010. Metalloids, soil chemistry and the environment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 679:33-44.
- Mari F., Bertol E., Fineschi V., Karch S.B. 2004. Channelling the Emperor: what really killed Napoleon? *J. R. Soc. Med.* 97:397-399.
- Mateos L.M., Ordóñez E., Letek M., Gil J.A. 2006. *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. *Int. Microbiol.* 9:207-215.
- Mukhopadhyay R., Rosen B.P., Phung L.T., Silver S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:311-325.
- Ordóñez E., Van B.K., Roos G. De G.S., Letek M., Gil J.A., Wyns L., Mateos L.M., Messens J. 2009. Arsenate reductase, mycothiol, and mycoredoxin concert thiol/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 284:15107-15116.
- Ordóñez E., Thiyagarajan L., Cook J.D., Stemmler T.L., Gil, J.A., Mateos L.M., Rosen B.P. 2008. Evolution of metal(loid) binding sites in transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* 283:25706-25714.
- Ordóñez E., Letek M., Valbuena N., Gil J.A., Mateos L.M. 2005. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6206-6215.
- Rosen B.P. 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* 529:86-92.
- Rosen B.P, Tamás M.J. 2010. Arsenic transport in prokaryotes and eukaryotic microbes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 679:47-55.
- Silver S., Phung L.T. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.
- Tawfik D.S., Viola R.E. 2011. Arsenate replacing phosphate: alternative life chemistries and ion promiscuity. *Biochemistry.* 50:1128-1134.
- Velásquez L., Dussan J. 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J. Hazard Mater.* 167:713-716.

Villadangos A.F., Ordóñez E., Muñoz M.I., Pastrana I.M., Fiuza M., Gil J.A., Mateos L.M., Aller A.J. 2010. Retention of arsenate using genetically modified coryneform bacteria and determination of arsenic in solid samples by ICP-MS. *Talanta*. 80:1421-1427.

Wolfe-Simon F, et al. 2010. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*. doi: 10.1126/science.1197258



El Dr. **Luis M. Mateos** es Profesor Titular del Area de Microbiología de la Universidad de León y lleva dedicado a la docencia e investigación más de 25 años. Imparte docencia en Licenciaturas y Grados de Ciencias Biológicas, Ambientales y Biotecnología de la Universidad de León, así como en el Master “Metodología de investigación en biología fundamental y biomedicina” y en el correspondiente programa de Doctorado asociado al Departamento de Biología Molecular. Su labor investigadora siempre ha estado vinculada al campo de la biotecnología y concretamente al uso de las corinebacterias (bacterias Gram-positivas) como telón de fondo

en sus estudios de carácter básico y aplicado. Fruto de esta labor investigadora ha publicado más de 40 artículos científicos en revistas y libros de relevancia internacional en su ámbito de trabajo.