



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

El efecto tóxico del Cr(VI) y Cr(III) sobre el metabolismo energético de *Euglena gracilis* heterotrófica.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Rosa Angélica Pacheco Rosales



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Profesor: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SECRETARIO: Profesor: RICARDO JASSO CHÁVEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

2° SUPLENTE: Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ricardo Jasso Chávez

(FIRMA)

SUSTENTANTE (S):

Rosa Angélica Pacheco Rosales

(FIRMA)

AGRADECIMIENTOS

Mi tesis se la dedico a Dios, ya que él es mi motivación para seguir adelante día a día, porque es un poderoso Dios, siempre bueno, fiel, amoroso, que me disciplina y que siempre me permite intentarlo de nuevo, es un amigo, siempre me escucha y siempre está dispuesto e incondicionalmente para mi, porque sé que me ama no por mis acciones sino porque él ya ha mandado a Jesús a pagar por mi, sé que nunca se olvida de mi y que siempre me está buscando. Gracias Dios por todo, nunca te mides.

*...¿Se olvidará la mujer de lo que dio a luz, para dejar de compadecerse del hijo de su vientre? Aunque se olvide ella, yo nunca me olvidaré de ti.**Isaías 49:15...***

*....Mas Dios muestra su amor para con nosotros, en que siendo aún pecadores, Cristo murió por nosotros...**Romanos 5:8....***

*...Porque tú, Señor, eres bueno y perdonador, Y grande en misericordia para con todos los que te invocan...**Salmos 86:5....***

*....Cercano está Jehová a los quebrantados de corazón; Y salva a los contritos de espíritu...**Salmos 34:18...***

*...¡Que el hombre trabaje con sabiduría, y con ciencia y con rectitud, y que haya de dar su hacienda a hombre que nunca trabajó en ello! También es esto vanidad y mal grande...Buena es la ciencia con herencia, y provechosa para los que ven el sol... **Eclesiastés 2:21 y 7:11....***

*...Ciertamente no hay hombre justo en la tierra, que haga el bien y nunca peque...**Eclesiastés 7:20...***

*...Si yo hablase lenguas humanas y angélicas, y no tengo amor, vengo a ser como metal que resuena, o címbalo que retiñe. Y si tuviese profecía, y entendiese todos los misterios y toda ciencia, y si tuviese toda la fe, de tal manera que trasladase los montes, y no tengo amor, nada soy. Y si repartiese todos mis bienes para dar de comer a los pobres, y si entregase mi cuerpo para ser quemado, y no tengo amor, de nada me sirve...**¿CÓMO ES EL VERDADERO AMOR?...El amor es sufrido, es benigno; el amor no tiene envidia, el amor no es jactancioso, no se envanece; no hace nada indebido, no busca lo suyo, no se irrita, no guarda rencor; no se goza de la injusticia, mas se goza de la verdad. Todo lo sufre, todo lo cree, todo lo espera, todo lo soporta. El amor nunca deja de ser; pero las profecías se acabarán, y cesarán las lenguas, y la ciencia acabará... Eclesiastés 13:1-8***

*...El que no ama, no ha conocido a Dios; porque Dios es amor..... En esto consiste el amor: no en que nosotros hayamos amado a Dios, sino en que él nos amó a nosotros, y envió a su Hijo en propiciación por nuestros pecados... Nosotros le amamos a él, porque él nos amó primero.....***1Juan 4:8,13 y 19**

A mi familia le doy gracias por apoyarme todo el tiempo y por ser tan comprensivos conmigo y amarme. Los amo y le agradezco a Dios por sus vidas. (Papas y hermanas (gracias por estar siempre conmigo y ayudarme cada día de mi vida), tí@s, prim@s y en especial le agradezco a *Eufro* por siempre escucharme, acompañarme y aconsejarme.

Le doy gracias a Dios también por los maestros que han marcado mi vida y por mis tutores, porque sin duda alguna Dios los ha usado para guiarme y para aprender en demasía de ellos.

Especialmente quiero agradecer a Ricardo Jasso, porque sin duda alguna siempre confío en mi y me ha enseñado innumerables cosas, tanto de la vida como de la Química y me dio la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, dándome con éste, una mayor seguridad y confianza en mi como Química y persona. Así mismo agradezco a Israel García Cano, por compartir siempre sus conocimientos conmigo y porque siempre me ha dado la confianza, oportunidad y seguridad de saber que puedo hacer las cosas y seguir adelante, no importando las circunstancias, porque es un excelente profesor, amigo y guía. Ambos excelentes personas y ejemplos a seguir!!.....a los cuales ya les puedo decir: Gracias!!.

Al Profesor Agustín Rey y a la Maestra July porque sin conocerme mucho me han apoyado en momentos importantes y de desición, confiaron en mi y me han dado una formación como persona y como Química de Alimentos!!. Gracias!!! Mi experiencia a su lado ha sido muy enriquecedora y agradable.

Le doy gracias a Dios por los amigos que me ha dado a lo largo de mi vida y de la carrera, porque siempre me han regalado su tiempo, amistad y hemos compartido grandes momentos. Agradezco por mis amigos en Cristo porque son de gran bendición y de mucho aliento, porque Dios me ha enseñado por medio de ellos a ser una verdadera amiga, para con los demás, aunque aún me falta bastante.

Todos ellos son: Itzumi (Mejor Amiga de años y siempre incondicional, Amiga te quiero!!), Tanys (mejor amiga de la infancia que quiero mucho), Liliana (una amiga muy fuerte, que me enseñó a no dejarme rendir), Violeta(Violum , una excelente QA, de la cual he aprendido mucho), Carlitos, Jair, Edy, Narda (llamada de tantas formas como se me han ocurrido, jejeje, las más mencionadas por mi: Nanis y Nardanja Mecanica, jejeje, si te pongo tantos nombres es porque te quiero, lo sabes), Areli

(Hareliushka, sin duda alguna una persona que me ha enseñado mucho de las personas), Luz (Bochm notas musicales, jejeje, que te digo sabes que eres una excelente amiga y que te quiero mil8mil, jejeje sabes quien eres para mi, vdd!!), a Noe por acompañarnos siempre y hacernos parte del mejor equipo de fut!! Te quiero!! Joel (Amigo, Jojo, sin duda alguna no tengo palabras para agradecerte por todo y por darme una amistad que espero dure toda mi vida, y que me inviten a su casa de la playa, jajaja), Sujhey (Su y que ha sido un apoyo y excelente amiga incondicional, que siempre me habla fuerte pero sincero y que me cuida, te quiero Su), Noelia y sus novios (Memo, Rodrigo, Giovanni y Gabriel), Davo (sin duda alguna el que peca de), Odín (mi viejito de labtec, jejeje), Issac (el indeseable y amigo sincero), Viri Moreno, Karla Figueroa y Lalo (con los que vivi momento inolvidables, los quiero y siempre los recordaré), May (una excelente QA y jugadora, buena amiga), Pepé (un excelente amigo, aunque diga que mis dedos son obesos, jejeje), Luis (Padrisimísimo, jejeje, gracias), Lula y Mariel (la Chini) (gracias por su apoyo, las quiero), Javier (Javi, Javieru, Javieruchis, que siempre me ha cuidado como aólo lo puede hacer un excelente amigo y que me ha acompañado en mis peores, mejores y vergonzosos momentos, gracias JAVI, sabes que eres el mejor!!). A todos los del Hospi (Lalo, Joel, Luz, Rojo, Luis, Vivi, Dianita Lety, Diana Betza, Hugo, Macedo, Karla, Rodo, Viri Zu, Carlos, Petter, Pibi, Pau, Sam, Adri, Tomas, Maci, Su, Anahí, Diana (maestra) y Sussy que sin duda alguna me recibieron y aceptaron tal como soy, como la gran familia que son, de la cual doy gracias por ser parte de ella.

Agradezco por la vida de Ailed Flores y de Pris Villaseñor porque siempre comparten conmigo lo que Dios le ha enseñado y le ha dejado vivir.

Finalmente ofrezco mis logros y esta tesis a Dios y le agradezco porque me permite estar aquí y me regala esta vida y todo lo que viene con ella.

.....Porque el poder ser Química es un don de Dios.....

¡¡Dios los bendiga!!

Rosa Angélica Pacheco Rosales

NOTA: Los resultados mostrados en este trabajo son parte del artículo: Ricardo Jasso-Chávez, *et al.* Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*. *Aquatic Toxicology*. 100 (2010) 329-338 y que se incluye al final de esta tesis.

ÍNDICE

<u>TEMA</u>	<u>Pág.</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Metales pesados	3
1 A. ¿Qué son? y ¿Quiénes son?	3
1 B. Efecto de los metales pesados sobre la salud.....	5
1 C. Contaminación por metales pesados en agua	7
2. El Cromo	10
2 A. Química del Cromo	10
2 B. El Cromo en el medio ambiente	12
3. Biorremediación	14
4. <i>Euglena gracilis</i>	17
5. La mitocondria	18
6. Metabolismo energético principal de <i>Euglena gracilis</i>	20
6 A. Cadena respiratoria	20
7. Componentes clásicos de la cadena respiratoria	22
8. Componentes alternos	31
9. Radicales libres, estrés oxidativo y lipoperoxidación	33
ANTECEDENTES	36
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	40
METODOLOGÍA	41
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60

RESUMEN

Se entiende por contaminación la introducción o incremento anormal de sustancias que pueden ejercer un efecto dañino sobre los organismos en los ecosistemas. A veces, la contaminación es de origen natural pero en general está relacionada con la actividad del hombre que, en busca de su supervivencia y bienestar, dispersa sustancias agresivas al medio ambiente algunas de las cuales pueden ser transformadas por los organismos vivos (biodegradables) y otras que son persistentes (no biodegradables).

Un problema presente y severo en la actualidad es la contaminación por metales pesados tanto en agua como en aire y tierra siendo este un problema que no sólo afecta al medio ambiente sino también a la salud del propio ser humano. Para contrarrestar la alta contaminación por metales pesados, se han buscado distintos métodos de remediación, entre estos métodos se encuentra la biorremediación que es la utilización de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas para restablecer un medio ambiente alterado. Sin embargo, aún los organismos que se han propuesto como bio-remediadores de aguas contaminadas por metales pesados son propensos a sufrir daños por la intoxicación con éstos metales. Específicamente en este trabajo se determinó el efecto tóxico del Cr(VI) y Cr(III) sobre las principales rutas metabólicas energéticas en el microorganismo *Euglena gracilis* heterotrófica, ya que estudios anteriores indican que éste microorganismo puede ser un posible candidato para la biorremediación pues tiene la capacidad de sobrevivir en presencia de metales pesados como el Cd y Hg, así como la de almacenarlos en mitocondrias y cloroplastos (Cd) y que en presencia de Cr(VI) la fotosíntesis y la cadena respiratoria se ven afectados. Por lo cual es de gran importancia saber de qué forma se ven afectadas las vías productoras de energía en *E. gracilis* heterotrófica por la presencia de cromo.

Por lo anterior, se estudió el efecto tóxico del Cr(VI) y Cr(III), las especies químicas del cromo más estables, sobre los cuatro complejos clásicos de la cadena respiratoria y de los componentes alternos a ésta, la D-lactato deshidrogenasa (D-iLDH), L-lactato deshidrogenasa (L-iLDH), oxidasa alterna (OxA), NADH-deshidrogenasa externa (NADHDH ext).

Los resultados obtenidos indican que las actividades de las enzimas más sensibles de la cadena respiratoria de *E. gracilis* en mitocondrias aisladas fueron el complejo III o bc₁, el

complejo IV o citocromo *c* oxidasa, la L-iLDH, D-iLDH, y la oxidasa alterna (AOX) a Cr(VI) y Cr(III). Por el contrario, las actividades del Complejo I o NADH deshidrogenasa y la NADH deshidrogenasa alterna (iNADHDH) no fueron sensibles a cromo.

Los resultados sugieren que cuando *Euglena gracilis* se cultivó en presencia de cromo, las vías productoras de energía en este caso la cadena respiratoria se vio fuertemente afectada; pese a esto, este protista tiene la plasticidad metabólica para duplicarse y acumular cromo.

INTRODUCCIÓN

Sin duda alguna un problema grave hoy en día es la creciente contaminación del ambiente. Ya sea de suelos, aguas o del aire; la contaminación afecta de formas variadas a todos los seres vivos llegando a producir incluso la muerte sin duda alguna esto la convierte en un tema de gran importancia y de interés, colocándose como objetivo central de muchos estudios en el mundo los cuales intentan de alguna forma dar solución a este problema. La contaminación es un tema tan amplio que no es posible estudiarlo en un sólo proyecto, ni una sola persona, por lo que el presente proyecto sólo se enfoca a una pequeña parte, la cual es la contaminación por metales pesados, específicamente contaminación por cromo en agua y una posible solución para contender contra este problema ambiental, utilizando para ello al microorganismo *Euglena gracilis* el cual es un modelo experimental ya ampliamente estudiado, que tiene la capacidad de almacenar metales pesados en mitocondrias y cloroplastos. En la actualidad los contaminantes del agua son de varios tipos, los metales pesados se encuentran dentro de las sustancias inorgánicas peligrosas que causan contaminación.

1. Metales Pesados

1 A. ¿Qué son? y ¿Quiénes son?

El término “metal pesado”, a pesar de ser ampliamente utilizado entre los profesionales y científicos, no tiene una base científica rigurosa o una definición química. Los metales pesados constituyen un grupo cercano a 40 elementos de la Tabla Periódica, aunque muchos de los elementos que se enlistan en este término tienen una gravedad específica mayor o igual a 5 g/cm^3 , existen diversas excepciones a esta regla. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados es que, aun cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células cuando alcanzan concentraciones demasiado altas, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas.

Estrictamente y desde el punto de vista químico, los metales pesados están constituidos por elementos de transición y post-transición, algunos metaloides como el arsénico y selenio no son metales pesados pero por el efecto que causan en las células se les ha incluido dentro del grupo de metales pesados. Por otro lado, estos elementos se

presentan en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presentan diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua. Una forma opcional de nombrar a este grupo es como “elementos tóxicos”, los cuales, de acuerdo a la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), incluyen a los siguientes elementos: **romo, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio, titanio y plomo.**¹

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza de la tierra. No pueden ser degradados o ser destruidos. Se incorporan a nuestros cuerpos en pequeñas cantidades vía alimentos, agua potable y aire. Como elementos de rastro, algunos metales pesados (e.g. cobre, selenio, zinc) son esenciales para mantener el metabolismo del cuerpo humano. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento. El envenenamiento por metal pesado puede resultar por ejemplo, de la contaminación del agua potable (e.g. tuberías galvanizadas, de plomo o de cobre), las altas concentraciones en el aire cerca de las fuentes de emisión, o producto vía la cadena alimenticia.²

Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de aguas superficiales y subterráneos, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, la recalcitrancia y consiguiente persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser tan elevada que empiece a ser tóxica.³

En la literatura podemos encontrar que los metales pesados se clasifican en dos grupos:

***Oligoelementos o micronutrientes.** Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni y Zn.

***Sin función biológica conocida.** Son altamente tóxicos, e incluyen Hg, Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

Los elementos pertenecientes a estos grupos también varían según autores. Además, cuando se habla de metales pesados tampoco se especifica el estado del elemento, es decir, si se trata del elemento puro, o de algunos o la totalidad de sus diversos estados de oxidación (compuestos), que no presentan las mismas propiedades físicas, químicas, tóxicas o ecotóxicas. Este aspecto complica todavía más su clasificación.⁴

1 B. Efectos de los metales pesados sobre la salud.

La contaminación por metales puede derivar en diversos efectos a la salud, dependiendo del elemento en particular y su concentración entre otros factores.

Como ya se mencionó anteriormente, los elementos que entran en el grupo de los metales pesados son muchos por lo cual no es posible adentrarse en todos ellos, así que sólo se enlistarán los de mayor preocupación para México, según se menciona en el reporte de la OMS/OPS, llamado Estrategia de cooperación con el país México, Noviembre 2005⁵, estos son: Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Cromo (Cr).

Tabla 1. Daños a la salud causados por la exposición a metales pesados⁶.

Elemento	Daños a la salud
Mercurio (Hg)	<p>Es absorbido principalmente por los pulmones a nivel alveolar, por el tracto gastrointestinal y a nivel cutáneo. Una vez en el organismo, el mercurio metálico permanece como tal durante un corto tiempo. En la sangre y los tejidos, el mercurio metálico se oxida rápidamente para formar iones mercurio Hg^{2+}, que se fijan a las proteínas. En la sangre, el mercurio inorgánico se distribuye entre el plasma y los eritrocitos.</p> <p>Tras la exposición a vapores de mercurio metálico, éste se deposita en los riñones y el encéfalo, cuando se produce exposición a sales inorgánicas, se deposita principalmente en los riñones. Se presenta irritación o edema pulmonar y/o una grave inflamación del tracto gastrointestinal (gingivitis). El Sistema nervioso también se ve afectado produciendo parkinsonismo. En mujeres embarazadas produce la muerte del feto (2-5 semanas) o retraso mental en el producto.</p>
Plomo (Pb)	<p>La forma de entrar al cuerpo de este metal es por el aparato respiratorio y tracto gastrointestinal. En el organismo humano, el plomo inorgánico no se metaboliza, sólo se absorbe, se distribuye y se excreta directamente. La velocidad a que se absorbe el plomo depende de su forma química y física y de las características fisiológicas de la persona expuesta (edad y estado nutricional). Una vez en la sangre, el plomo se distribuye en tres compartimentos: la sangre, los tejidos blandos (riñón, médula ósea, hígado y cerebro) y el tejido mineralizado (huesos y dientes). Para que se desarrolle una intoxicación por plomo, no es necesaria una exposición aguda importante.</p>

	<p>El organismo acumula este metal durante toda la vida y lo libera lentamente, por lo que incluso dosis pequeñas pueden producir, con el transcurso del tiempo, una intoxicación. El destino más sensible de intoxicación por plomo es el sistema nervioso, principalmente en adultos, pero también en niños. El plomo inhibe la capacidad del organismo para producir hemoglobina al interferir con varios pasos enzimáticos en la vía metabólica del grupo hemo. La exposición a plomo también podría producir <i>efectos cancerígenos</i> a los humanos según la IARC. (Esto aún no se afirma del todo).</p>
<p>Cadmio (Cd)</p>	<p>La absorción de este metal principalmente es por vía gastrointestinal, pulmonar, digestiva o respiratoria; el cadmio absorbido se transporta al hígado, donde se inicia la producción de una proteína de bajo peso molecular que se une al cadmio, la metalotioneína. Esto evita que los iones de cadmio libres ejerzan su efecto tóxico. Después es desechado en la orina o reabsorbido y pasa a las células digestivas las cuales degradan las proteínas en péptidos de menor tamaño y aminoácidos, los iones de cadmio libres que se liberan tras la degradación de la metalotioneína y se inicia una nueva síntesis de metalotioneína, que se une al cadmio.</p> <p>La eliminación del cadmio es muy lenta, y por ello se acumula en el organismo, aumentando su concentración con la edad y el tiempo de exposición. Este metal causa daños principalmente a los pulmones, riñones y las vías respiratorias. Puede producir la muerte. Se han descrito casos de exposición excesiva al cadmio en la población general por la ingestión de arroz y otros alimentos contaminados y posiblemente también de agua contaminada. Varios estudios epidemiológicos demuestran una relación dosis-respuesta y un aumento en la mortalidad por cáncer pulmonar en los trabajadores expuestos al cadmio (Aún no es del todo clara esta afirmación). Sin embargo, está claro que el cadmio posee propiedades cancerígenas en los experimentos con animales.</p>
<p>Cromo (Cr)</p>	<p>Los compuestos de Cr (III) no se absorben fácilmente en el aparato digestivo y pueden combinarse con proteínas de las capas superficiales de la piel, formando complejos estables. Los compuestos de cromo en estado de oxidación VI se absorben rápidamente después de la ingestión o la inhalación. El Cr(VI) afecta principalmente a la piel y al aparato respiratorio (irritación de la piel o mucosas, dermatitis y acción corrosiva o úlceras). Se ha demostrado que el Cr (VI) penetra en la piel a través de las glándulas sudoríparas, reduciéndose a Cr (III) en el corion. Se ha demostrado que este Cr (III) reacciona con las proteínas formando complejos antígeno-anticuerpo.</p> <p><i>Efectos cancerígenos.</i> Existen un gran número de estudios realizados donde se ha descrito un aumento de la incidencia de cáncer de pulmón entre los trabajadores empleados en la fabricación y el uso de compuestos de Cr (VI). Los cromatos de zinc y calcio parecen ser los más cancerígenos y se cuentan entre los cancerígenos más potentes en humanos. No existe un nivel de exposición "seguro" claramente establecido.</p>

1 C. Contaminación por metales pesados en agua.

En la literatura se encuentran varias definiciones para contaminación, sin duda alguna todas relacionadas con la introducción o incremento anormal de sustancias que pueden ejercer un efecto dañino sobre los organismos en los ecosistemas. Según la Unión Europea, la **contaminación** es la introducción directa o indirecta como consecuencia de la actividad humana de sustancias, vibraciones, calor o ruido en el aire, el agua o el suelo que pueden ser nocivos para la salud humana o la calidad del medio ambiente, causar daños a la propiedad material o perjudicar o entorpecer las actividades recreativas y otros usos legítimos de medio ambiente.⁴

Tabla 2. Concentraciones de metales pesados en aguas residuales de cuerpos de agua e industrias en México (mg/L).^{27 *}

INDUSTRIA/ SISTEMA	Al	As	Cd	Cr total	Cu	Hg	Fe	Ni	Pb	Zn
Textil				300	300		5600			100
Curtidora				260-780						
Vitivinicola							1700-9500			
Río Blanco		2-18		50-400	10.50	2-8		40-120	0-35	20-120
Presa Tuxpango	30			5			6	38		
Metal mecánica		0		280	600		1500		120	
Galvanoplastia	1750		4	73000	6400		12500	74	220	1260
Polímeros sintéticos	30		20	40		89		0	16	0
Petroquímica secundaria		0		120	70	157		0	0	0
Hulera	167	0	2	0	21	0			9	161

*Los valores mostrados se obtuvieron de empresas aisladas y no necesariamente representan el promedio de la industria respectiva.

Como tal, la contaminación por metales pesados la podemos encontrar afectando diversos ecosistemas del medio ambiente; sin embargo, en este trabajo nos enfocaremos sólo a los sistemas acuáticos, ya que el modelo experimental estudiado ha sido encontrado en residuos acuosos contaminados por metales pesados. En México, la NOM-127 SSA1-1994 establece que las concentraciones máximas de metales pesados en agua potable son las siguientes (Tabla 3):

Tabla 3. Concentraciones máximas permisibles de metales en agua potable de México.

Metal Pesado	Límite permisible (mg/L o ppm)*	Límite permisible (µg/L)	Límite permisible (µM)
Zinc	5.00	5000	76.488
Cobre	2.00	2000	31.476
Fierro	0.30	300	5.372
Cromo Total	0.05	50	0.962
Arsénico	0.05	50	0.667
Plomo	0.025	25	0.120
Cadmio	0.005	5	0.044
Mercurio	0.001	1	0.005

* Datos mostrados en la Norma. Tabla complementada.

Ahora haciendo una comparación entre los niveles que en la actualidad se encuentran de metales pesados en aguas residuales y algunos otros cuerpos de agua en México (Tabla 4) y los rangos permitidos (Tabla 3), se puede ver que es real y alarmante la contaminación por metales pesados en agua.

Se encuentra reportado que la concentración media de cromo en el agua dulce es de 1,0 mg/L (rango: 0.1 a 6.0 mg / L), mientras que el promedio de concentración de cromo en agua de mar es de 0,3 mg/ L (intervalo: 0,2 a 50 ug / L). El agua de drenaje de las áreas contaminadas puede tener concentraciones más altas. Las concentraciones acuosas de cromo y su movilidad en diferentes ambientes geológicos dependen de su estado de oxidación.⁸

Tabla 4. Contaminación por metales pesados en las aguas residuales de industrias y algunos cuerpos de agua en México en (µg/L).⁷

Industria / Sistema	(µg/L)							
	Zn	Cu	Fe	Cr _{Total}	As	Pb	Cd	Hg
León, Guanajuato				50000				
Laguna Sn. Andrés, Tamps	5.12	1.82	23.4			1.38	0.33	
Valle Zimapan, Hgo.					400			
Matamoros, Tamps.		50-340				50-400		
Textil	100	300	5600	300				
Curtidora				260-780				
Río Blanco	20-120	10-50		50-400	2-18	35		2-8
Metal mecánica		600	1500	280		120		
Galvanoplastia	1260	6400	12500	73000		220	4	
Polímeros sintéticos				40		16	20	89
Petroquímica sec.		70		120				157

Es importante mencionar que los metales pesados no producen el mismo efecto o la misma alteración o daño en los organismos, la captación y toxicidad de los metales pesados en los organismos acuáticos se ven afectados diversos factores como: factores fisicoquímicos y biológicos, así como el tiempo de exposición y la concentración del metal o metales. Algunos de los factores que intervienen en la toxicidad de los metales pesados se encuentran descritos en la Tabla 5.

Tabla 5. Factores que afectan la especiación química y que influyen en la toxicidad de los metales en el ambiente acuático. ^{9, 12}

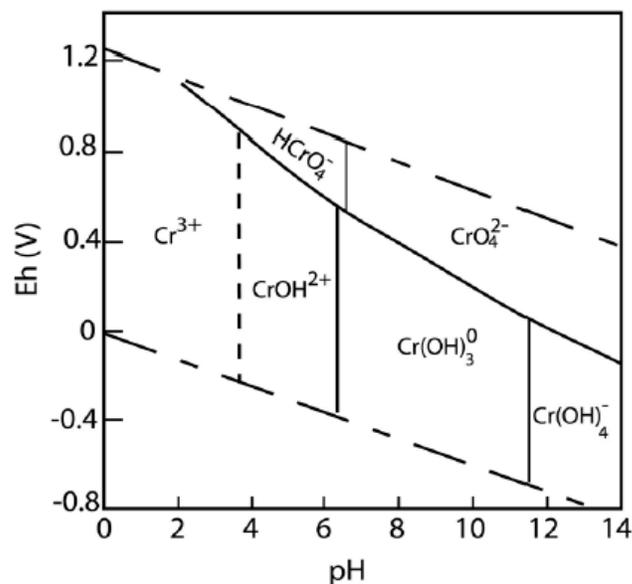
Variables	Comentarios
pH, alcalinidad, ligandos orgánicos e inorgánicos.	Cambio en la distribución de las especies que influyen en a formación de complejos: cambios en la capacidad de adsorción.
Densidad orgánica	Reduce la disponibilidad de metales y cambia la distribución de las especies a causa de la adsorción sobre las superficies celulares y/o acomplejamiento de los exudados de la biota.
Concentración de partículas y coloides	Los metales son secuestrados por partículas de los óxidos de hierro, manganeso y aluminio y de las arcillas,
Potencial Redox	Afecta el estado de oxidación de los metales; la disponibilidad y la movilización de ciertos metales como el manganeso, lo cual frecuentemente ocurre más fácilmente en potenciales redox reductores.
Forma del metal en agua.	Soluble o en partículas y como ion, complejo, quelato en forma coloidal, precipitado o adsorbido.
Presencia de otros metales	Otros cationes (sales de Ca y Mg) afectan la toxicidad de Cu, Zn, Cd y Hg, ya sea por precipitación o por competencia.
Factores que modifican la fisiología del organismo.	Temperatura, pH, oxígeno disuelto, luz, salinidad. También nutrientes como el fosforo.
Otros factores ambientales	El aumento de la densidad de población de protozoarios y microalgas, disminuye la toxicidad del metal.

2. El Cromo

2 A. Química del Cromo

El cromo elemental fue descubierto y caracterizado por el químico francés Nicolas-Louis Vauguenlin en Siberia, como un mineral de plomo rojo (crocoíta) en 1797. Se trata de un elemento que naturalmente se presenta en la corteza terrestre. El cromo es el elemento número 24 en abundancia en la corteza y se encuentra en prácticamente todos los ambientes, en el aire, agua, suelo y biota. El promedio de la concentración de cromo en la corteza continental ha sido registrado entre los rango de 80-200 mg/Kg (NAS, 1974).⁸ El cromo es un elemento de transición, de la familia VIB de la tabla periódica, su número atómico es 24, con una masa atómica de 52.1 g/mol. En su forma elemental, se encuentra como un metal duro, blanco, brillante y frágil con un punto de fusión alto (2000°C). Presenta varias valencias, desde -2 hasta +6; en el suelo sólo se conocen la 0, +2, +3 y +6. El cromo 2^+ es muy inestable y se oxida muy fácilmente con el aire, por su fuerte potencial reductor, esta especie no se encuentra en el material biológico. El cromo 6^+ es un fuerte agente oxidante y generalmente se encuentra unido a moléculas de oxígeno, formando los llamados cromatos y dicromatos, los cuales fácilmente se reducen a Cromo 3^+ en solución ácida. A continuación se presenta los potenciales de equilibrio frente a cambios de pH para el Cromo, como se podrían encontrar en los sistemas acuosos. (Fig.1).

Fig. 1. Estabilidad del Cromo en agua frente a cambios de potencial químico y pH.



Los metales de transición tienden a formar compuestos de coordinación o complejos con ligandos (moléculas o iones) como los siguientes: tio (S_2^{2-}), mercapto (HS^-), hidroxilo (OH^-), ciano (CN^-), bromo (Br^-), cloro (Cl^-), carbonato (CO_3^{2-}), oxalato ($C_2O_4^{2-}$), oxo (O^{2-}), peroxo (O_2^{2-}), amino (NH_3), agua (H_2O), carbonil (CO), piridina (C_5H_5N), azida (N_3), entre otros. Encontramos que el cromo en su forma trivalente se encuentra mayormente unido al oxígeno, cloro y al azufre como óxidos, cloruro y sulfato, así mismo el cromo en su estado hexavalente se une a oxígeno formando cromatos y óxidos.

El ion trivalente nunca existe libre en solución; solo en forma coordinada ya sea con el agua o con otros ligandos, tiene una alta capacidad de formar enlaces tiocianato, amino y oxo, con moléculas biológicas, como el DNA, proteínas (moléculas que tengan el grupo amino), péptidos, compuestos orgánicos (citrato, malato, oxaloacetato). El cromo 3^+ presenta un lento intercambio de ligandos lo que le hace imposible participar como elemento en sitios activos de enzimas, que necesitan un rápido intercambio. Pero esta característica hace al cromo 3^+ compatible con una función más estructural, en sitios receptores de hormonas y estabilización de estructuras terciarias de proteínas y ácidos nucleicos.

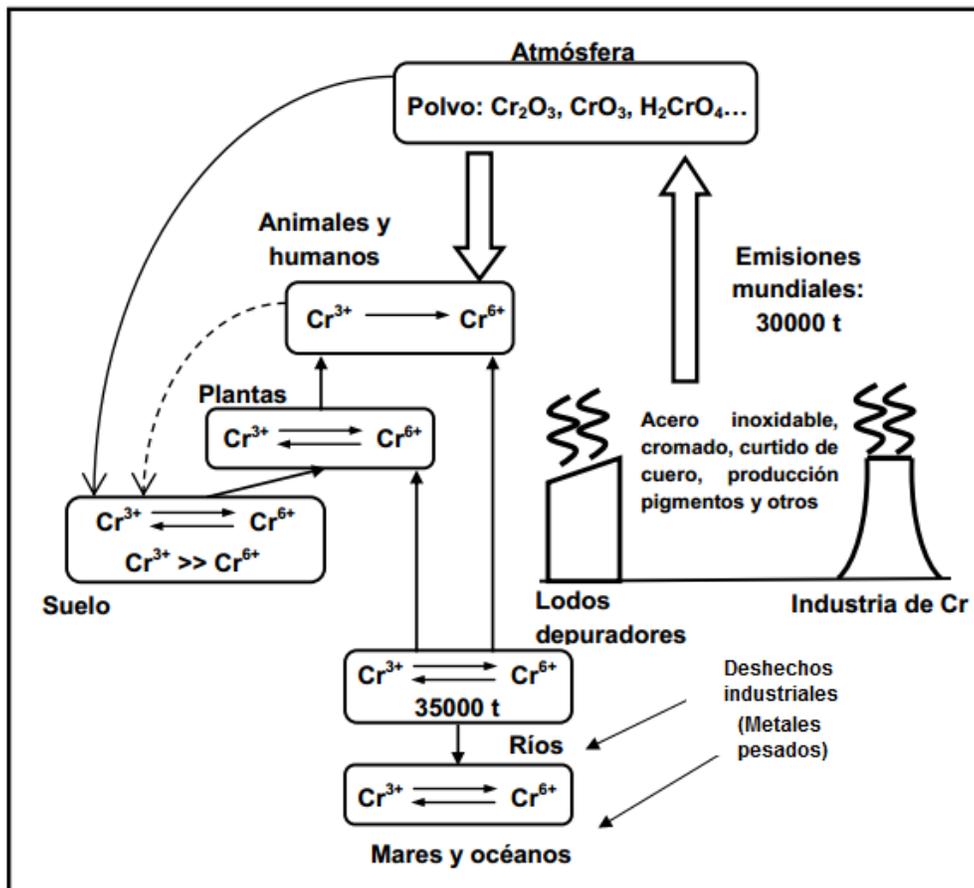
Actualmente la USEPA se encuentra trabajando en una revisión de su norma acerca del contenido de cromo en el agua, especializando su estudio en compuestos que presentan el cromo en su estado de oxidación 6^+ , esto es consecuencia de las publicaciones realizadas en el 2008 por el programa nacional de toxicología de ese país. En este documento es mencionado que para formar especies como los cromatos ($Cr_2O_4^{2-}$) se requieren concentraciones de $Cr(VI) > 10^{-2}M$, estas concentraciones de manera natural no se encuentran en las aguas, se menciona también que los compuestos del cromo hexavalente se liberan al ambiente por fuentes antropogénicas, es decir que es consecuencia de los efectos, procesos o materiales que son resultado de actividades humanas, que pueden persistir en las aguas naturales y suelos que contienen bajas cantidades de materia orgánica por lo cual la reducción del $Cr(VI)$ al $Cr(III)$ no sería promovida.

2 B. El Cromo en el medio ambiente

Es conocido también que el cromo puede pasar de las aguas a los organismos presentes en ellas y causarles daño o alteraciones de distintos tipos (Figura 2). En la literatura se encuentra reportado que en peces y plantas que han sido tratados o expuestos al cromo o aguas que contienen cromo, que éste se acumula y al presentarse una exposición crónica causa daño a los tejidos y sangre de peces así como al metabolismo y genes de los organismos vivos (Tabla 4).

Por la contaminación por metales pesados también se altera la composición de las poblaciones de un ecosistema, y que cada especie responde de diferente manera a las concentraciones de contaminantes y por tanto acumula en mayor o menor medida determinados metales pesados. En general, desaparecen muchas especies, lo que conduce a que predominen especies resistentes a los agentes contaminantes.¹²

Figura 2. Circulación del Cr(III) y Cr(VI) en el medio ambiente contaminado



Virtualmente todos los alimentos contienen cromo en niveles < 0.5 ppm peso húmedo. La estimación diaria de ingreso de cromo en humanos es de 0.03 a 0.1 mg/persona x día.⁹

Si bien el cromo es un elemento importante en los animales para la adecuada utilización de azúcares y otros carbohidratos, también puede ser tóxico si se rebasan ciertas concentraciones. La toxicidad depende principalmente de su estado de valencia y grado de concentración. La forma más oxidante del cromo es la hexavalente que a su vez resulta ser la forma más tóxica y móvil de este metal en condiciones de poca acidez; son muy biodisponibles ya que penetran en la membrana celular con mayor eficiencia que en el estado trivalente.

Recientemente se ha encontrado que en las células de *Euglena gracilis* cultivadas en presencia de 250µM de CrCl₃, se observa un efecto inhibitorio del 15% sobre la densidad celular con respecto a el crecimiento de las células que no fueron expuestas a cromo (células control), demostrando que el Cr(III) también es tóxico, siendo contrario a lo que se puede encontrar la literatura de que el Cr(III) no es tóxico.¹³

Tabla 6. Concentraciones de Cromo normales/naturales encontradas en alimentos.

Alimentos	Concentración de Cromo	Referencia
Mariscos	0-0.44 µg/Kg	31
Cereales	0-0.52 µg/Kg	
Carnes	0.05-0.56 µg/Kg	
Vegetales	0-0.36 µg/Kg	
Frutas	0-0.2 µg/Kg	
Mantequilla	0.01 µg/Kg	
Leche	0.17 µg/Kg	
Mejillones y ostiones (169 sitios)	0.25ppm (promedio) b.p.h.	32
Sorgo (hojas)	1.75mg/Kg peso seco	7
Maíz(hojas)	1.8 mg/Kg peso seco	
Trigo (raíz/hojas)	5.5-7.5 mg/Kg peso seco	

Tabla 7. Efecto sobre organismos vivos expuestos a Cromo.

Organismo Vivo	Exposición a Cromo	Daño o alteración	Ref.
Peces <i>Limanda limanda</i> y <i>Chelon labrosus</i>	Cromo hexavalente	CL ₅₀ 47 ppm (96hr)	9
Plantas	Cromo hexavalente	Concentración: 2500-25000µg/L % de muerte: 50%, 96h.	33
Molusco (caracol, <i>Physa heterostropha</i>)	Cromo hexavalente	* <i>Agua dulce</i> Concentración : 17300µg/L % de muerte: 50%, 96h. (Dureza del agua 45mgCaCO ₃ /L) * <i>Agua de mar</i> Concentración.: 14000-15000µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Crustáceos (Camarón)	Cromo hexavalente	* <i>Agua dulce</i> Concentración : 1840µg/L % de muerte: 50%, 96h. * <i>Agua de mar</i> Concentración: 2000-98000µg/L % de muerte: 50%, 96h	
Pescado (Trucha Arcoiris, Salmón Gairdner). Peso: 25g pH= 7.0 (Agua Dulce)	Cromo hexavalente	Concentración : 65,500µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Moluscos (Caracol) (<i>Agua dulce</i>)	Cromo trivalente	Concentración : 8400µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Pescado(Trucha arcoiris, joven) (<i>Agua dulce</i>)	Cromo trivalente	Concentración : 4400 µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Moluscos (Ostras) (<i>Agua de mar</i>)	Cromo trivalente	Concentración : 10300 µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Pescado (2 ssp.) (<i>Agua de mar</i>)	Cromo trivalente	Concentración : 3300-7500 µg/L % de muerte: 50%, 96h.	
Embriones de Pollo	Cr 3+ y Cr 6+.	DL 50 Cr (III) = 22.9 mg/Kg de peso corporal. DL 50 Cr (VI) = 1.7 mg/Kg de peso corporal	

3. Biorremediación

En la actualidad existen diferentes tecnologías que mediante procesos químicos, físicos o biológicos tienden a reducir la toxicidad, movilidad o concentración de materiales o contaminantes presentes en el ambiente. En general, estas tecnologías buscan alterar la estructura química del contaminante, aprovechando sus propiedades físicas o químicas. Muchas de las técnicas utilizadas son poco rentables, por lo que se requiere el desarrollo de tecnologías capaces de reducir la concentración de metales en cuerpos de agua a

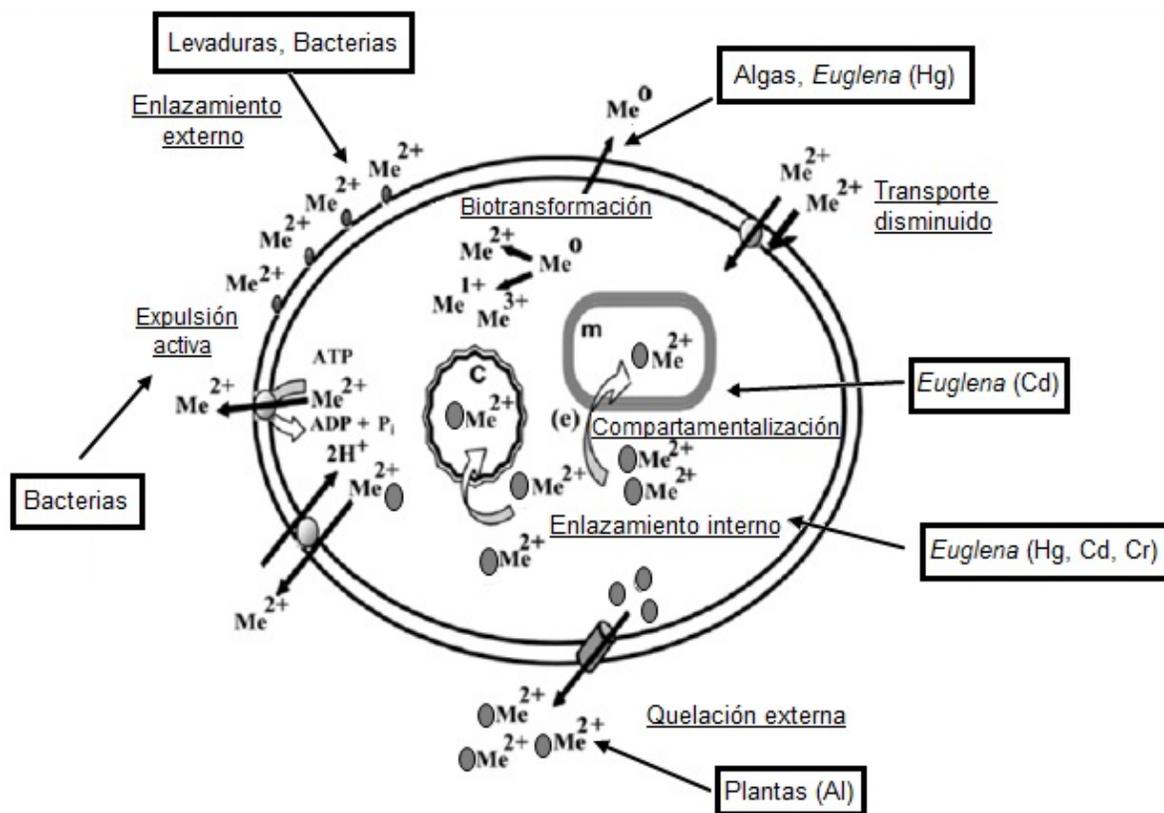
niveles aceptables y a costos accesibles. Por lo que en la actualidad, se ha aprovechado y utilizado el potencial de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias y microalgas) para degradar, transformar o remover los contaminantes ambientales. Si bien la biorremediación se refiere al uso de cualquier organismo biológico, es un término que comúnmente se asocia con el uso de microorganismos para descomponer, degradar y/o mineralizar residuos peligrosos. La definición más aceptada para el este término es: la aplicación ingenieril de los procesos biológicos para la limpieza de suelos, aguas continentales y aire contaminados.¹¹

La biorremediación es una biotecnología con poco más de 30 años de antigüedad. Se han aplicado estrategias generales para la remoción del contaminante: 1) la acumulación del contaminante dentro de los tejidos del organismo empleado, 2) la degradación de los agentes o 3) la oxidación o reducción de las sustancias (ej. metales pesados). La biorremediación se ha colocado como una **técnica viable** para la recuperación de **sitios contaminados**, puesto que: 1) elimina permanentemente contaminantes a través de su transformación o mineralización; 2) evita métodos químicos y físicos severos; 3) se opera *in situ*; 4) tiene un costo reducido comparado con los procesos físicos y químicos y 5) su influencia sobre el ecosistema es despreciable.¹⁰ La biorremediación es una tecnología que está creciendo rápidamente. Como ya fue mencionado, consiste en el uso de organismos vivos o muertos que son capaces de remover compuestos tóxicos (incluyendo los metales pesados) de lugares contaminados y tiene diversas ventajas sobre los métodos tradicionales.¹⁴

Se han utilizado cepas (bacterias, protistas, algas, levaduras) sensibles a metales pesados como bio-sensores para monitorear biológicamente aguas contaminadas. En cambio las cepas resistentes pueden ser útiles en la biorremediación de los metales en aguas contaminadas. En general, estos microorganismos presentan diferentes mecanismos de resistencia, así como de tolerancia hacia los metales tóxicos; se entiende por “resistencia” a la sobrevivencia del organismo a la toxicidad por metales pesados, con base en mecanismos producidos como respuesta directa, según los tipos de especies de metal involucradas. Ejemplo de estos mecanismos son (Figura 3): la reducción del transporte a través de la membrana celular, expulsión activa, por medio de la cual sale mayor cantidad de metal que la que entre; acumulación y compartimentalización, en la cual el metal queda secuestrado en una vacuola en el

interior celular; por acción quelante, ya sea por proteínas o péptidos (síntesis de metalotioninas y fitoquelatina), compuestos orgánicos (citrato, malato, oxalato-acetato) o por compuestos inorgánicos (sulfuro, fosfato, polifosfatos); biotransformación, ya sea por reducción u oxidación del metal o por alquilación; precipitación y atrapamiento por secreción de compuestos en el medio extracelular.¹² Con respecto al termino “tolerancia” se aplica a la sobrevivencia del organismo frente a la toxicidad causada por metales pesados, mediante las propiedades intrínsecas de un organismo o por modificación ambiental de la toxicidad; estas propiedades, que determinan la sobrevivencia, incluyen: la posesión de paredes celulares impermeables, el enlazamiento externo, la unión del metal a la pared celular y a la cara externa de la membrana plasmática, con lo cual se impide el paso del metal hacia el interior celular.²⁷

Figura 3. Mecanismos de resistencia a metales pesados que se han reportado para diferentes organismos. Modificado de Rodríguez- Zavala et al., 2007.¹³



Por otro lado *Euglena gracilis* es un protista de vida libre, es capaz de sobrevivir y proliferar en presencia de metales pesados (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cr(VI))^{48,46,47}. Además, este protista puede cultivarse de manera autótrofa o heterótrofa, utilizando una extensa variedad de fuentes de carbono (glucosa, lactato, glutamato, malato, etanol, acetato) y en un amplio margen de valores de pH (3.0-8.0)^{49,20}. En inventarios de cuerpos de agua que reciben el drenaje ácido de la actividad minera se han detectado de 24 a 76 especies de algas y protozoarios, siendo *Euglena mutabilis* la especie más abundante. En un muestreo de efluentes industriales, la única especie fotosintética detectada fue *E. gracilis*¹⁵. También se sabe que *Euglena gracilis* almacena el cadmio en mitocondrias y cloroplastos y que en presencia de Cr(VI) se ve inhibida la respiración y la fotosíntesis⁷. Todos estos datos convierten a *Euglena gracilis* no sólo en un excelente modelo de estudio, sino también en un posible candidato a un proceso de biorremediación.

Ahora bien, ¿Quién es *Euglena gracilis*?

4. *Euglena gracilis*

El género *Euglena* presenta una distribución muy amplia encontrándose en muy diversos hábitats: agua dulce, salada, ácida, alcalina, en condiciones aeróbicas, anaeróbicas; existen formas solitarias, coloniales y parasitarias. Este género ha sido taxonómicamente problemático ya que presenta características particulares de animales y vegetales, por lo que se le ha ubicado en el reino animal (flagelo y mitocondria) y *plantae* (cloroplastos y mitocondrias, así como un parecido muy grande con las algas).¹⁶ Actualmente *Euglena* pertenece al reino *Protista* de orden *Euglenida*, el cual comprende alrededor de 1000 especies. Este microorganismo forma parte del plancton de aguas dulces y puede ser cultivado de manera eficiente en condiciones controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono. Además presenta propiedades metabólicas y genéticas que le permite desarrollarse en presencia de altas concentraciones de metales esenciales y no esenciales a diferentes valores de pH y bajo un régimen heterotrófico o fotosintético.²⁵

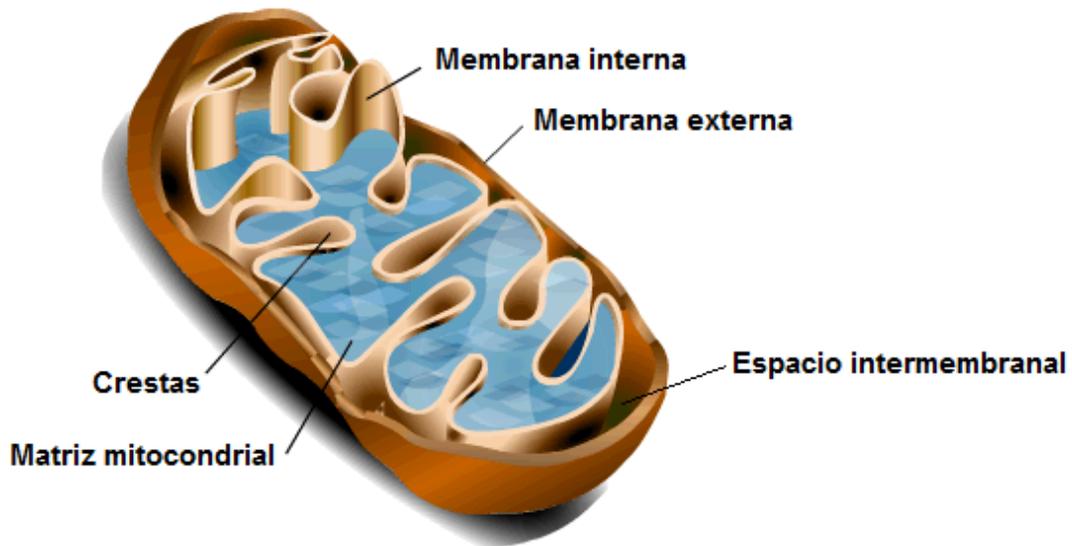
5. La Mitocondria

Las mitocondrias son organelos de las células eucarióticas que se cree han evolucionado de bacterias aeróbicas capaces de realizar la fosforilación oxidativa y que adoptaron una residencia simbiótica dentro de una célula huésped eucariótica primitiva y anaeróbica. Las funciones metabólicas de las mitocondrias son el ciclo del ácido cítrico (Ciclo de Krebs), la fosforilación oxidativa (cadena respiratoria), oxidación de ácidos grasos y la degradación de aminoácidos. Se puede decir que es la central productora de energía. Las mitocondrias varían de manera considerable en tamaño y forma, dependiendo de su origen y de su estado metabólico. Típicamente son elipsoides de $\sim 0.5\mu\text{m}$ de diámetro y $1\mu\text{m}$ de longitud.

La mitocondria (Figura 4) está limitada por una membrana externa lisa y contiene una membrana interna extensamente invaginada. El número de invaginaciones, denominadas crestas, varía con la actividad respiratoria del tipo particular de células. Ello es debido a que las proteínas que median el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están unidas a la membrana mitocondrial interna. El compartimento mitocondrial interno consiste en una sustancia de apariencia gelatinosa con $<50\%$ de agua, denominada **matriz mitocondrial**, que contiene concentraciones notablemente elevadas de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, así como sustratos, cofactores nucleotídico e iones inorgánicos, es el espacio contado por la membrana interna, contiene el complejo de la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y de las rutas de oxidación de los aminoácidos. Las mitocondrias al igual que las bacterias gram-negativas, tienen dos membranas. La **membrana mitocondrial externa**, la cual es fácilmente permeable a pequeñas moléculas ($M_r < 5000\text{Da}$) e iones que se mueven libremente a través de canales transmembranales compuestos por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas.

La **membrana interna** es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón (H^+), las únicas especies que cruzan la membrana interna son aquellas para las que existen proteínas transportadoras específicas, esta membrana aloja los componentes de la cadena respiratoria y el complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP.

Figura 4. Representación general de las partes de una mitocondria.



Cuando *Euglena gracilis* es cultivada en la obscuridad contiene más de 500 mitocondrias por célula. Las mitocondrias de *Euglena* son estructuras pequeñas, circulares o alargadas. En células cultivadas en las obscuridad son ovoides o elongadas y en células cultivadas en la luz forman un complejo interconectado y están ordenadas en condrones que son estructuras parecidas a redes que atraviesan toda la célula, es una estructura plástica y filamentosa que se presenta tanto en células cultivadas en la luz como en la obscuridad.

Las mitocondrias se funden y se ramifican para formar la red. Esta red está en constante movimiento, ya que constantemente se están fragmentando y fusionando (retículo mitocondrial); este retículo es delicado y complejo en células control y más restringido en células con fuente de carbono limitada y su estructura varía con las condiciones de crecimiento. A esta estructura se le conoce como mitocondria gigante. Se cree que este retículo le ayuda a la *Euglena* para proporcionar mayor área para la difusión de oxígeno. Se ha descrito que las mitocondrias de *Euglena gracilis* pueden oxidar sustratos como lactato, succinato, glutamato/Malato, isocitrato, 2-oxoglutarato, acetato, GABA, etanol, succinato-semialdehído y NADH exógeno.

6. Metabolismo energético principal de *Euglena gracilis*.

Desde hace muchos años, el metabolismo de *Euglena gracilis* ha sido muy estudiado debido a la gran capacidad que posee este protista para crecer en muy variadas condiciones nutrimentales. Esta capacidad esta dada probablemente por las características metabólicas que comparte con animales y plantas superiores, además de las que son exclusivas de su grupo, como la de obtener energía por medio de la fermentación de ésteres de cera o por la oxidación de acetato, succinato, succinato-semialdehído, glutamato/malato, glucosa, lactato o etanol. Incluso, las diferentes cepas de *Euglena gracilis* se diferencian entre si, ya que algunas de ellas tienen necesidades diferentes para su crecimiento y su metabolismo en general.¹⁹

El metabolismo energético principal de *Euglena gracilis* consta de la glucólisis, gluconeogénesis y un ciclo de Krebs (con algunas diferencias en comparación con el que se presenta en mamíferos), así como una cadena respiratoria y algunos componentes alternos a ésta última; en este trabajo sólo se estudio a la cadena respiratoria y a algunos de los componentes alternos por lo cual sólo se describirán estos últimos mencionados.

6 A. Cadena Respiratoria

La cadena respiratoria también denominada cadena de transporte electrónico, es el conjunto de complejos enzimáticos embebidos en la membrana mitocondrial interna que oxida el $FADH_2$ o el NADH generando un gradiente de protones. En los organismos aeróbicos es la última etapa del metabolismo productor de energía. Aquí es donde todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos convergen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. (Figura 5).

La organización de la cadena respiratoria de las mitocondrias de *Euglena* es compleja (Figura 6). Aunque existen los cuatro componentes respiratorios clásicos, estas mitocondrias pueden oxidar también NADH externo por una enzima que es sensible a rotenona. Por el efecto de inhibidores como la antimicina y el mixotiazol sobre la reducción de citocromo *c* y el consumo de oxígeno, se ha propuesto que las mitocondrias

de *Euglena* poseen también un complejo bc1-alterno que no bombea protones como el complejo clásico (III). Además, existe una oxidasa alterna resistente a cianuro.

La oxidación de D- y L-lactato acoplada al bombeo de protones para la producción de ATP, es otra de las particularidades que tiene la cadena respiratoria de *Euglena*¹⁷. El lactato es el sustrato oxidable principal en las mitocondrias aisladas de *Euglena*. La oxidación del lactato en *Euglena* se lleva a cabo por dos enzimas mitocondriales acopladas a la cadena respiratoria que lo oxidan para la producción de ATP, estas son la D- y L-iLDH.¹⁹

Figura 5. Cadena Respiratoria clásica

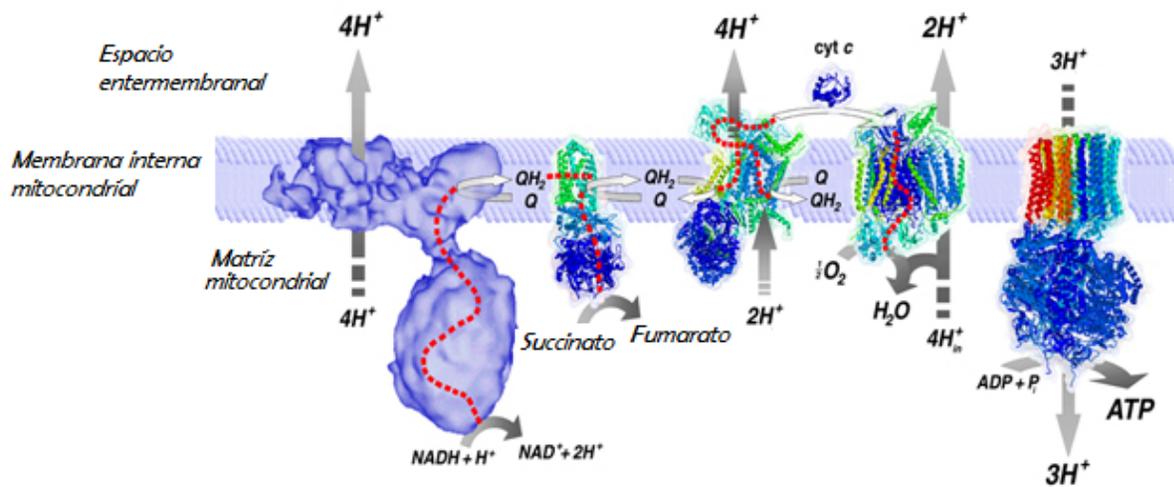
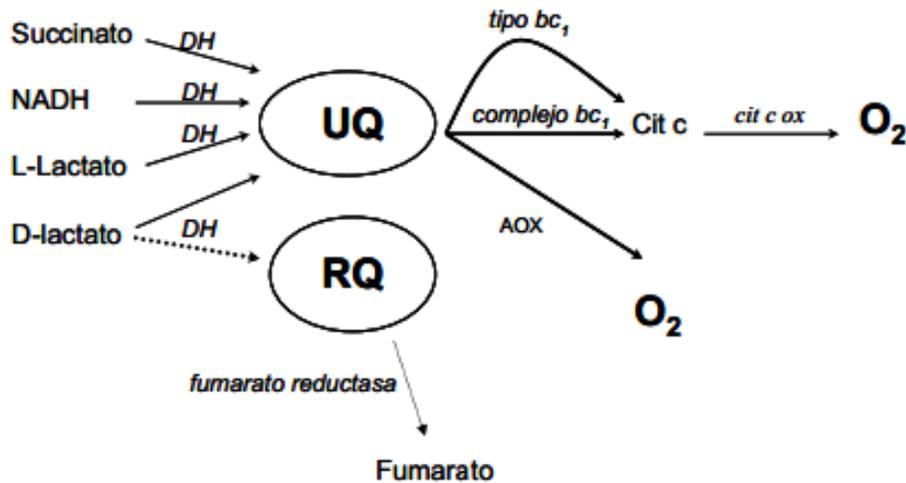


Figura 6. Cadena Respiratoria de *Euglena gracilis*.

Imagen tomada de la referencia 43

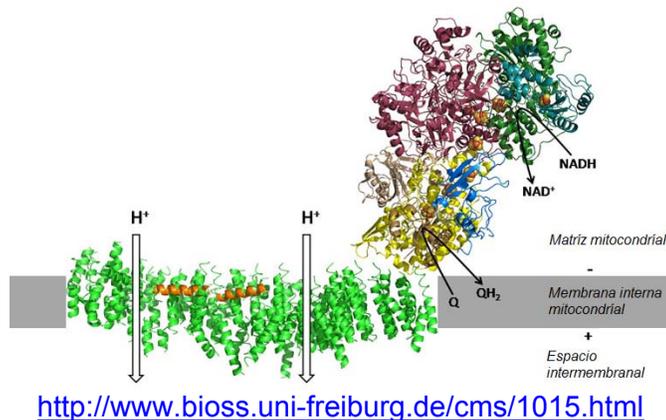


7. Componentes clásicos de la cadena respiratoria¹⁸

a) Complejo I. (NADH deshidrogenada o NADH-ubiquinona oxidorreductasa).

El complejo I, es el primer componente de la cadena respiratoria, transfiere los electrones del NADH a la CoQ (ubiquinona) y es sensible a rotenona, el cual es un inhibidor específico de esta enzima (la rotenona previene la transferencia de electrones de los centros Fe-S a la ubiquinona). Este componente proteico, es un complejo de más de 30 subunidades. Hay estudios de microscopía electrónica de alta resolución donde se muestra que el Complejo I presenta una forma de L, con un brazo de la L hacia la membrana interna mitocondrial y otro prolongándose hacia la matriz mitocondrial (Figura 7).

Figura 7. Complejo I de la cadena respiratoria



La reacción que cataliza el complejo I es la siguiente: ¹⁸



Q es ubiquinona y los hidrógenos marcados con el subíndice P indican la localización de los protones hacia el lado positivo de la membrana interna (espacio intermembranal) y los hidrógenos N hacia el lado negativo (matriz mitocondrial), lo que indica que existe un bombeo de protones.

Como ya se ha mencionado este complejo se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial, con el sitio de enlace del NADH orientado hacia la matriz y así capta a este sustrato.

Las coenzimas del Complejo I

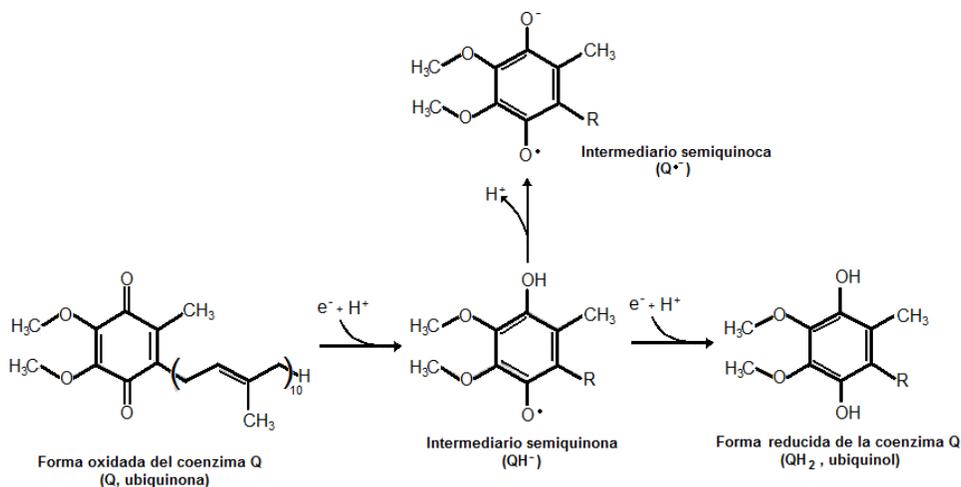
La FMN (flavina) y el CoQ (ubiquinona) son las coenzimas del complejo I, pueden ambos adoptar tres estados de oxidación. A pesar de que el NADH puede participar sólo en la transferencia de electrones, tanto la FMN como el CoQ son capaces de aceptar y dar, ya sea uno o dos electrones, debido a que sus formas semiquinona son estables. La FMN y el CoQ proporcionan por lo tanto un conductor electrónico entre el dador de dos electrones NADH y los aceptores de un electrón (los citocromos). ²⁷

La coenzima Q (ubiquinona), es una benzoquinona liposoluble que contiene una larga cadena lateral isoprenoide. Las quinonas encontradas en mayor cantidad en mitocondrias de este organismo tienen nueve unidades isoprenoide en la posición 6 del anillo: la ubiquinona-9 y la rodoquinona-9, las cuales existen en la poza de quinonas en *E. gracilis*.

La rodoquinona-9 tiene un grupo amino en la posición 2 en lugar del metóxido de las quinonas, aunque también se han encontrado en otras cantidades Q8 y otros homólogos mayores.⁴⁵

La función de las quinonas es transportar electrones en cadenas de transferencia electrónica asociadas a membrana. La ubiquinona (Figura 8) puede aceptar un electrón transformándose en radical semiquinona (QH[•]) o dos electrones formando ubiquinol (QH₂), es capaz de actuar como puente entre un donador de dos electrones y un aceptor de un electrón.

Figura 8. Estados de oxidación de la Ubiquinona o Coenzima Q.



Debido a que la ubiquinona es al mismo tiempo pequeña e hidrofóbica se puede difundir libremente a través de la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial interna y puede hacer la lanzadera de equivalentes de reducción entre otros transportadores electrónicos de la membrana menos móviles. Además debido a que transporta tanto electrones como protones, juega un papel central en el acoplamiento del flujo electrónico al movimiento de protones.

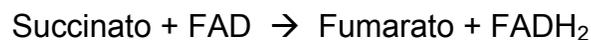
El Complejo I de *Euglena gracilis* contiene flavina (FMN) unida no covalentemente así como 4 centros Fe-Azufre. Al igual que en la mayoría de los organismos las células de *Euglena* contienen las coenzimas NADH y FADH intramitocondriales. La NADH oxidasa en mitocondrias de *Euglena gracilis* es sensible a Rotenona y tienen una eficiencia similar a la NADH deshidrogenasa que oxida el NADH producido en el ciclo de Krebs. Se ha propuesto que en presencia de CN el NADH es oxidado por la ruta insensible a CN. En

presencia de rotenona y antimicina, el CN inhibe el 100% del consumo de oxígeno con NADH como sustrato, la responsable de esta actividad alterna es una NADH deshidrogenasa externa que no transloca protones. ¹⁷

Complejo II .(Succinato-coenzima Q reductasa; Succinato deshidrogenasa).

Es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que está enlazada a la membrana mitocondrial. (Figura 9). Aunque es más pequeña y simple que el complejo I, contiene dos tipos de grupos prostéticos y al menos cuatro diferentes proteínas.

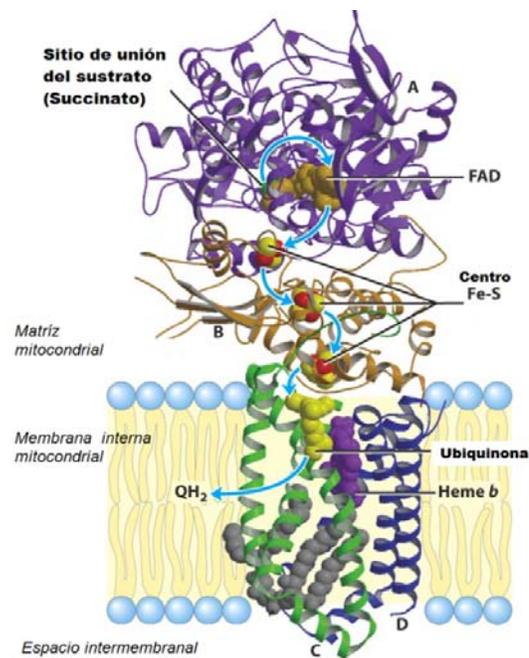
La reacción que lleva a cabo es: ¹⁸



El complejo II no está asociado con la translocación de protones y la conservación de energía. Se cree que los electrones pasan del succinato al FAD, de aquí a los centros Fe-S y finalmente a la ubiquinona.

Para el caso de *Euglena gracilis* se sabe que el complejo II similar al descrito para cadenas respiratorias de mamíferos, que oxida succinato y es sensible a rotenona.

Figura 9. Complejo II de la cadena respiratoria



<http://web.usal.es/~jmcsii/biblioteca/biofisica/unizar/CII.htm>

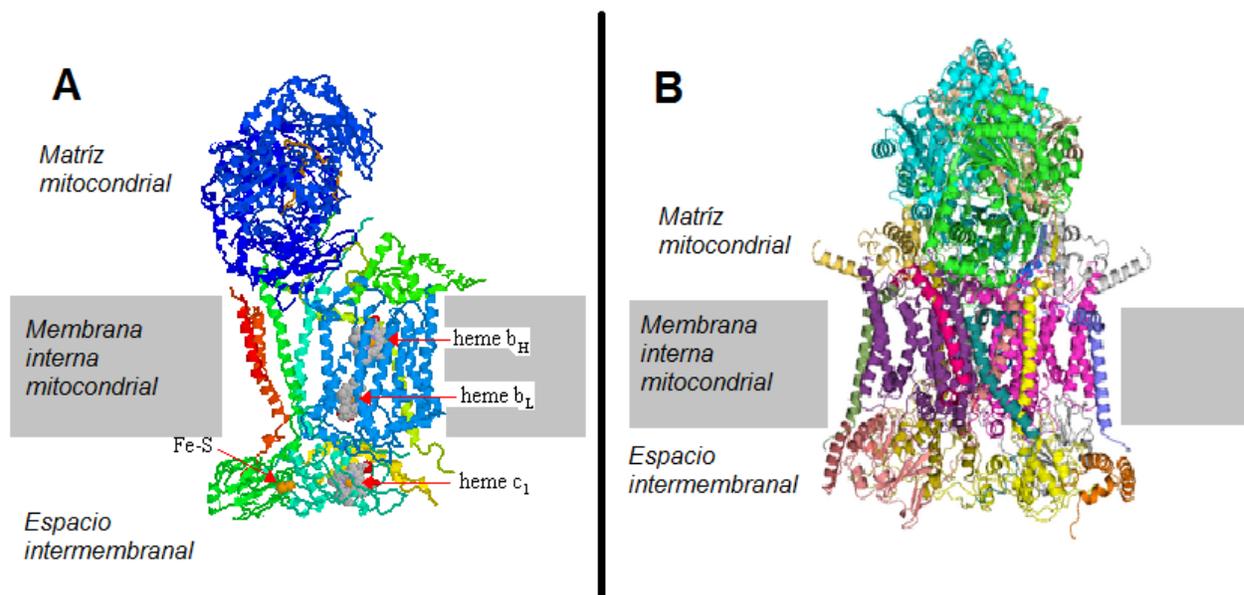
b) Complejo III. (coenzima Q-citocromo C reductasa o complejo bc₁)

Este complejo acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH₂) al citocromo c con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembranal.

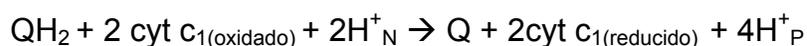
Los citocromos son proteínas con actividad redox que se presentan en todos los organismos excepto un reducido grupo de anaerobios obligados, estas proteínas contienen grupos hemos, que alternan reversiblemente entre sus estados de oxidación Fe(II) y Fe(III) durante el transporte electrónico. Las membranas mitocondriales contienen tres especies de citocromos *a*, *b* y *c*.

El complejo III es dimérico, en cada monómero existen tres subunidades que poseen cuatro centros redox: el hemo b_L y el hemo b_H, ambos localizados dentro de la subunidad del citocromo b, el citocromo c₁ y el centro fierro-azufre (Figura 10). El flujo de electrones entre el acarreador del par electrónico ubiquinona y los acarreadores de un electrón (citocromos) se realiza en una serie de reacciones llamadas **Ciclo**. Aunque el flujo de los electrones de este segmento de la cadena respiratoria es complicado, el efecto neto de la transferencia es simple, el ubiquinol es oxidado a ubiquinona y el citocromo c es reducido.

Figura 10. Complejo III de la cadena respiratoria



El complejo III cataliza la transferencia de dos electrones del ubiquinol a dos moléculas de citocromo c como se ve en la siguiente ecuación:¹⁸



El complejo bc_1 de las mitocondrias de mamífero es sensible a diversos inhibidores como el mixotiazol quien asemeja a una parte estructural de la ubiquinona y se une al citocromo b, la antimicina y el HQNO que bloquean la reducción de la quinona y la estigmatelina que se enlaza a la forma reducida de la proteína fierro-azufre, cambiando su potencial redox. Sin embargo en el protista *E. gracilis*, el complejo bc_1 es parcialmente resistente a mixotiazol en mitocondrias aisladas intactas y totalmente insensible a antimicina y HQNO cuando el complejo está semipurificado.

Se ha reportado que el complejo III de *Euglena gracilis* es un complejo de unos 280 kD, compuesto de 10 subunidades, con una actividad enzimática semejante a la encontrada en mitocondrias. El complejo bc_1 posee tres subunidades de alta masa molecular (proteínas estructurales), tal como ocurren en los complejos aislados de tripanosomátidos y plantas. El citocromo b, es un polipéptido con masa molecular aparente de 21kDa, mucho menor a la de todos los citocromos b mitocondriales estudiados, pero muy semejante a la del citocromo b6 de cloroplastos. La proteína fierro-azufre de este organismo, presenta, una masa molécula aparente de 31.5 kDa, superior a la de mamíferos y plantas.

Ya se vio que el complejo bc_1 es atípico, se dijo que es sensible a la antimicina y a la estigmatelina (como se espera de un complejo III clásico), pero atípicamente es parcialmente resistente a mixotiazol. Otro de los inhibidores clásicos de este complejo en mamíferos.⁴⁵

Citocromo c.

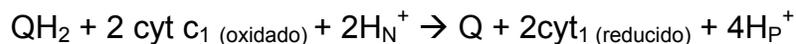
El citocromo c es una proteína de membrana periférica de estructura cristalina conocida que está débilmente unida a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna. Se une alternativamente al citocromo c del complejo III y a la citocromo c oxidasa (Complejo IV), por lo tanto funciona como lanzadera de electrones entre ellos.

Los citocromos tienen una función opuesta a la de las enzimas: más que persuadir a sustratos no reactivos para que reaccionen, deben impedir que sus grupos hemo transfieran electrones de forma no específica a otros componentes celulares. El complejo IV funciona como una bomba de protones que contribuye a la fuerza motriz protónica necesaria para llevar a cabo la síntesis de ATP.

La citocromo c oxidasa de *Euglena* requiere ferrocitocromo c₅₅₈ especialmente como donador natural de electrones. Esta enzima, en *Euglena*, contiene los citocromos a y a₃, como la de mamíferos.

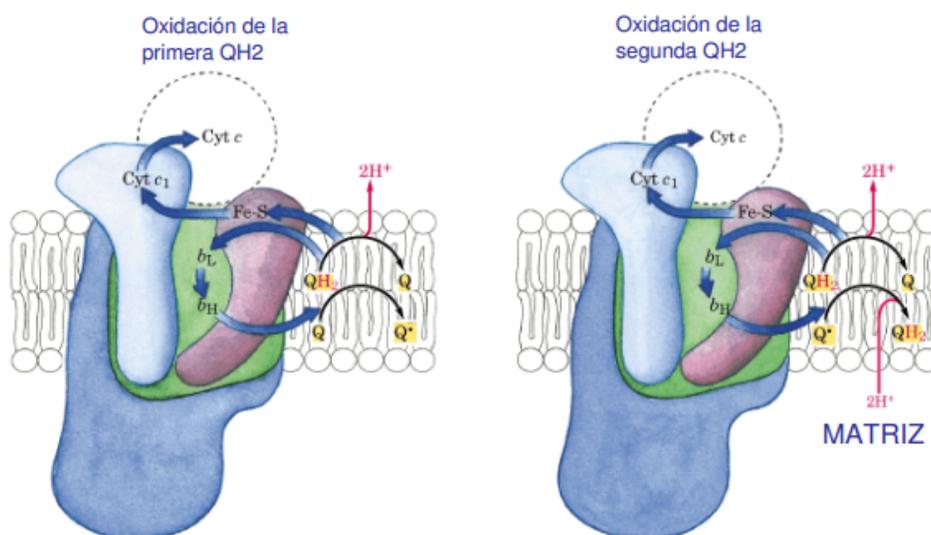
Ciclo Q

Se ha propuesto un modelo razonable para el paso de electrones y protones a través del Complejo III a partir de su estructura y de detallados estudios bioquímicos de las reacciones redox. La ecuación neta de las reacciones redox del este **ciclo Q** (Figura 11) es, como ya se había mencionado para el complejo III:



El ciclo Q adapta el cambio entre el transporte de dos electrones, la ubiquinona y los transportadores de un electrón (los citocromos b₅₆₂ b₅₆₆, c₁ y c) y explica la estequiometría medida de cuatro protones translocados por cada par de electrones que pasan del complejo al citocromo c. Aunque la vía de los electrones por este segmento de la cadena respiratoria es complicada, el efecto neto de la transferencia es simple: QH₂ se oxida a Q y se reduce a Q y se reducen dos moléculas de citocromo c. Vemos que durante el ciclo Q se forman especies con radicales libres, los cuales pueden seguir reaccionando para formar EROS.²²

Figura 11. Ciclo Q en el Complejo III respiratorio.



Como ya se mencionó la transferencia de electrones a través del complejo III tiene su mejor explicación en el mecanismo del ciclo Q en el que se translocan cuatro protones a través de la membrana mitocondrial por cada dos electrones transferidos desde el ubiquinol al citocromo c. Para que continúe la transferencia de electrones según el ciclo Q, se requieren dos sitios de unión ubiquinol o ubiquinona en el complejo bc_1 . Un sitio de oxidación del ubiquinol (Q_o) que implica el hemo b_L está localizado en el lado positivo de la membrana (P), en donde se pueden unir inhibidores tales como el mixotiazol. Un sitio reductor de la ubiquinona (Q_i) que implica el hemo b_H que está localizado en el lado negativo de la membrana (N) donde se unen inhibidores tales como la antimicina. La oxidación del ubiquinol en el sitio Q_o da como resultado la transferencia de un electrón al agrupamiento $2Fe2S$ (centro hierro-azufre) de la proteína ferrosulfurada que a su vez es oxidada por transferencia de un electrón al hemo del citocromo c_1 . El anión ubisemiquinona, fuertemente reductor, formado durante la oxidación del ubiquinol en el sitio Q_o reduce inmediatamente el hemo del citocromo b_L que rápidamente transfiere un electrón al hemo del citocromo b_H en el sitio Q_i . El citocromo b_H reducido se oxida a continuación por transferencia de un electrón a la ubiquinona en el sitio Q_i para formar una ubisemiquinona estable. Para completar el ciclo Q se oxida una segunda molécula de ubiquinol en el sitio Q_o que transfiere un electrón a la proteína ferrosulfurada y un segundo electrón al hemo b con reducción final de la ubisemiquinona en el sitio Q_i para formar ubiquinol. En conjunto el ciclo Q proporciona un mecanismo que explica la observación de que se bombean cuatro protones a través de la membrana interna durante la transferencia de dos electrones desde el ubiquinol al citocromo c. Se captan dos protones en el lado de la matriz de la membrana interna para reducir la ubiquinona en el sitio Q_i , mientras que se liberan cuatro protones en el lado citosólico de la membrana durante la transferencia de dos electrones a la proteína ferrosulfurada y al citocromo c_1 .⁴⁴

c) Complejo IV (Citocromo c oxidasa)

Este complejo es el complejo terminal de la cadena respiratoria de las mitocondrias y de muchas bacterias (Figura 12). La función de esta enzima es catalizar la transferencia de electrones del citocromo c, vía cuatro centros redox (dos hemo tipo a y dos átomos de cobre) al aceptor final, el O_2 . Se sabe que dos inhibidores clásicos de este complejo son CO y el cianuro por unión a un tipo específico de citocromo.

La citocromo c oxidasa cataliza las oxidaciones, con un electrón, de cuatro moléculas de citocromo c reducido, con cuatro electrones de una molécula de O_2 .

Este complejo cataliza la transferencia de electrones del citocromo c_{red} , vía cuatro centros redox (varios polipéptidos, dos citocromos (a y a_3) y dos átomos de cobre) al aceptor final, que es el O_2 ; de acuerdo con la siguiente ecuación:



Figura 12. Complejo IV de la cadena respiratoria

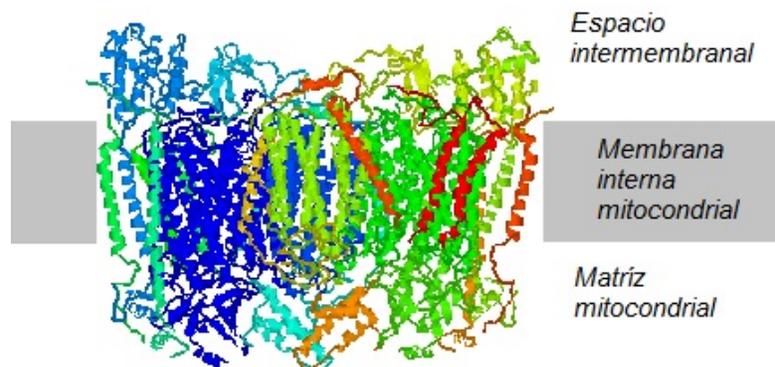
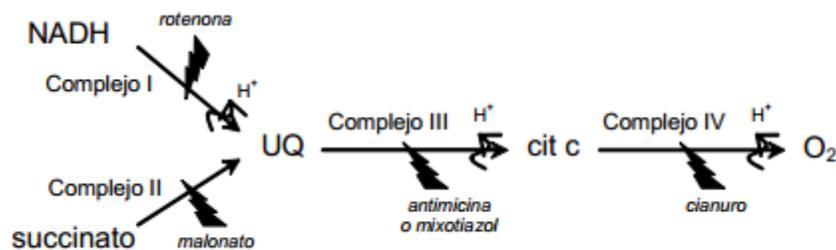


Figura 13. Inhibidores de los componentes respiratorios clásicos de la cadena respiratoria



La cadena respiratoria de *E. gracilis*, presenta una oxidasa alterna resistente a cianuro, una citocromo c reductasa resistente a antimicina y una D- y L-lactato deshidrogenasas independientes de NAD^+ , que ceden los equivalentes reductores directamente a la poza de quinonas.

8. Componentes alternos

La caracterización de la vía clásica (de la cadena respiratoria), como la presente en células de mamíferos, ha mostrado una vía metabólica simple. Sin embargo, en el resto de los organismos como plantas, hongos (levaduras y hongos filamentosos), los protistas, así como en las bacterias, existen cadenas respiratorias complejas, donde se desarrollan ramificaciones que proporcionan la flexibilidad necesaria para sobrevivir en condiciones ambientales extremas ³⁸⁻⁴⁰.

Una de las características esenciales de estas ramificaciones alternas es la resistencia a compuestos que usualmente inhiben a componentes clásicos de la vía. Esto ha permitido que el uso de estos inhibidores sirva para identificar y caracterizar parcialmente los componentes alternativos. Por ejemplo la oxidación del NADH resistente a rotenona en plantas surgió de la presencia de una NADH deshidrogenasa alterna, insensible a este inhibidor.

La diversidad de estos componentes alternativos es amplia. Se han encontrado varios grupos de enzimas en diferentes sitios de la cadena respiratoria: en la oxidación de sustratos (por ejemplo las deshidrogenasas para L-lactato, D-lactato), también se han encontrado oxidasas terminales alternas ⁴⁰⁻⁴² entre otras. Por la información recopilada por Buetow, 1984, se sabe desde hace tiempo que *Euglena gracilis* tiene diferencias importantes en sus mitocondrias con respecto a las de los mamíferos. Con base a diversos análisis bioquímicos, se ha modelado una cadena respiratoria mitocondrial compleja.

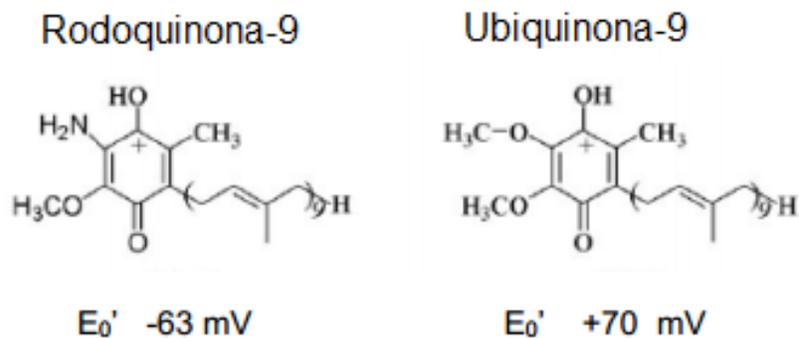
Dentro de los componentes alternos se pueden citar cinco muy importantes: L- y D-lactado deshidrogenasas mitocondriales independientes de piridin nucleótidos, la rodoquinona-9, el componente alterno tipo-complejo III, la oxidasas alterna y la NADH externa.

L-y D- lactado deshidrogenasas (L-y D- iLDH): la mitocondria de *E. gracilis* es capaz de oxidar L- y D- lactato, estas dos enzimas transfieren electrones directamente hacia la poza de quinonas. Este tipo de actividades sólo se han detectado y analizado en este organismo, en levaduras y en bacterias. Trabajando con cepas heterotróficas (no fotosintéticas) de *E. gracilis* ^{49, 19}. Lograron identificar que estos sustratos son oxidables en la mitocondria por enzimas isómero-específicas. Se ha reportado que cuando *Euglena gracilis* es cultivada en glutamato-malato las dos enzimas (D- y L-iLDH) tiene actividad

siendo más eficiente la L-iLDH. La oxidación del D- y L-lactato son completamente bloqueadas por oxalato.

Rodoquinona: Adicionalmente a las ubiquinona-9 (quinona de alto potencial), *E. gracilis* posee rodoquinona-9 una quinona de bajo potencial (Figura 14), presente de forma característica en rodo bacterias y nemátodos. Esta quinona es su estado reducido sirve de donador de electrones para la reducción anaeróbica de fumarato para forma succinato. Si bien se ha considerado a *E. gracilis* como un organismo facultativo anaerobio, debido a que tolera bajas concentraciones de oxígeno, es claro también que este compuesto se encuentra presente en concentraciones importantes en células cultivadas o incubadas en condiciones aeróbicas.

Figura 14. Quinonas presentes en *Euglena gracilis*



Componente alternativo tipo complejo III (by-pass): Atípicamente, el complejo III de *E. gracilis* posee resistencia a mixotiazol, uno de los inhibidores clásicos del complejo III de mamíferos. Las preparaciones purificadas de este complejo mostraron actividades, medidas como reducción de citocromo *c*, totalmente sensible a antimicina y a estigmatelina. Sin embargo, en mitocondrias frescas se detectó que la reducción de citocromo *c* se inhibía por antimicina un 60% aprox., mientras que el resto de la actividad era abatido con mixotiazol. Ambos componentes son inhibidos por estigmatelina, un inhibidor más del complejo III. También es importante mencionar que el quinol alimenta directamente a este complejo alternativo y es capaz de reducir al citocromo *c* y no a otro componente, de manera que el paso sugiere un salto o vía paralela a nivel del complejo III.

Oxidasa alterna (AOx): Inicialmente se identificó como una respiración resistente a cianuro, además este componente es sensible a alquil-galatos, ácidos hidroxámicos, disulfiram, etc. Y es insensible a cianuro. Este tipo de enzimas respiratorias terminales se encuentra presente en mitocondrias de otros organismos eucariontes, como plantas y hongos. En condiciones normales de crecimiento en *Euglena gracilis* la AOx es responsable del 10-15% de la respiración total. Se ha reportado que la función de la AOx en *Euglena gracilis* está asociada como respuesta al estrés oxidativo generando en algunas condiciones adversas a las cuales se suele enfrentar en su ambiente natural. La AOx participa como respuesta celular a la exposición de condiciones estresantes, a través de la modulación en la acumulación de electrones y de una disminución en la reducción de los componentes respiratorios clásicos y por lo tanto, de la generación de especies reactivas de oxígeno.⁴³

NADH externa: Cuando a los tejidos no se les suministra oxígeno suficiente para llevar a cabo la oxidación aeróbica del piruvato y del NADH producido en la glucólisis, el NAD⁺ se regenera a partir del NADH mediante la reducción del piruvato a lactato por la lactato deshidrogenasa. La lactato deshidrogenasa reduce al piruvato transformándolo en el isómero L del ácido láctico, a la vez oxida NADH en NAD⁺ (coenzima), de acuerdo con la reacción siguiente:



En *Euglena gracilis* la NADH externa es fuertemente inhibida por rotenona más flavona, En este microorganismo existen dos isómeros de esta enzima: la enzima que produce el D-lactato y la que produce el isómero L-lactato, siendo más rápida la síntesis del L-lactato.¹⁹

9. Radicales libres, estrés oxidativo y lipoperoxidación

Radicales Libres y estrés oxidativo.

¿Qué es un radical libre?

Un **radical libre** se define como un **átomo o grupo de átomos que contiene un electrón desapareado dentro de su estructura**, es decir, es la existencia de un electrón

que no tiene una pareja con *spin* opuesto dentro de un átomo o grupo de átomos. Los radicales libres se representan colocando un punto sobre el símbolo del átomo que contiene al electrón desapareado. En la mayoría de los casos, estas especies son entidades altamente reactivas que tienen un tiempo de vida media menor de $1\mu\text{s}$ y que se combinan para generar moléculas más estables.³⁶

Formalmente, los radicales libres son especies neutras, lo cual significa que en su estructura electrónica se encuentra el mismo número de electrones que de protones. Esta característica le da a los radicales libres una serie de propiedades químicas únicas. Entre las más importantes que se pueden mencionar están:

Un radical puede reaccionar con otro radical.

1. Un radical no se ve afectado por su ambiente molecular; en otras palabras no le afecta el cambio de polaridad de los disolventes.
2. Los radicales no se solvatan (es decir, no se rodean de moléculas de disolventes cuando están en solución), por lo que son entidades puntuales (más pequeñas).
3. Un radical no reacciona con hidrógenos ácidos no con heteroátomos con pares de electrones no compartidos.
4. Una consecuencia directa de la neutralidad de los radicales libres es que su estabilidad no se ve afectada por la electronegatividad de los grupos funcionales adyacentes al centro radical.
5. Un radical libre sí es afectado en su manera de reaccionar por los grupos a los que está unido, es decir, la electronegatividad de los grupos funcionales vecinos afecta la reactividad de un radical, pero no su estabilidad.

La mayoría de las reacciones de radicales libres proceden o se llevan a cabo a través de un mecanismo en cadena. Un mecanismo en cadena es aquel en el cual se genera más de una molécula de producto por cada evento de inicio. Una reacción en cadena se compone de tres etapas principales; inicio, propagación y terminación.

El radical hidroxilo y los metales de transición

Tanto el $\text{O}_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son compuestos que interaccionan poco con los compuestos celulares. Sin embargo, ambos son tóxicos, en parte, porque generan $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$. Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición

Fe (II) o el Cu (I) entonces se fragmenta y forma el $\cdot\text{OH}$ y el ión hidroxilo OH^- (reacción de Fenton). Este último se protona para formar agua y el $\cdot\text{OH}$ interacciona con cualquier compuesto vecino. La reacción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ con el H_2O_2 catalizada con hierro equivale a la estimulación de la reacción de Fenton con $\text{O}_2^{\cdot-}$, ya que éste puede funcionar para reducir el Fe (III) en Fe (II). Esta reacción posiblemente no ocurren *in vivo*, pues hay otros compuestos reductores en la célula, como el glutatión, que están en mucho mayor concentración que el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y que pueden reducir al Fe (III). El $\cdot\text{OH}$ es uno de los compuestos más reactivos que existen. El $\cdot\text{OH}$ no se puede difundir porque interacciona rápidamente ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) casi con cualquier compuesto celular.³⁰

El $\cdot\text{OH}$ puede oxidar tanto las purinas como las pirimidinas y también la desoxirribosa. Además puede producir ruptura en el DNA. La mayoría de los daños irreversibles en las proteínas son causados por el $\cdot\text{OH}$. El $\cdot\text{OH}$ reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se origina, que generalmente son sitios donde se encuentra un metal de transición.

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. Se ha reportado que 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. Se encuentra reportado también que en *Euglena gracilis* el Cr(VI) produce cambios tanto a nivel morfológico como metabólico, el crecimiento celular y el contenido de clorofila disminuyeron al aumentar la concentración de Cr(VI).

ANTECEDENTES

Euglena gracilis es capaz de sobrevivir en presencia de metales pesados (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} y Cr^{6+}).^{26,50} Se sabe que no sólo es resistente a metales pesados sino que también tiene la capacidad de almacenarlos, en citosol, mitocondrias y cloroplastos^{26,50}.

Se encuentra reportado que, dentro de las células de *Euglena gracilis* el mercurio está preferentemente asociado dentro de la célula en las fracciones membranosas (37-57%), dentro de estas fracciones membranosas, el 32-37% son membranas internas mitocondriales. Se menciona que a juzgar por su distribución en un gradiente de Percoll (en la interfase 40-80%) el enriquecimiento de mercurio se encuentra principalmente en las fracciones mitocondriales y cloroplastos.²⁴

Con respecto al cromo se reporta que el Cr(VI) en forma de CrO_4^{2-} puede usar los transportadores de SO_4^{2-} y entrar a las mitocondrias y en los cloroplastos. La compartimentalización del Cr(VI) se determinó de manera indirecta, es decir, se consideró como biomarcadores de efecto a la respiración y a la fotosíntesis. La interpretación que se usó fue que una alteración en alguna de estas funciones en células expuestas a Cr(VI) evidenciaría la presencia del metal en el organelo respectivo.⁷

Entre los elementos potencialmente tóxicos de interés ecotoxicológico, el cobre tiene gran relevancia por sus efectos fisiológicos en los organismos ya que alteran diversas enzimas esenciales en los procesos metabólicos celulares. En relación al cobre y sus efectos tóxicos sobre *Euglena gracilis* se encuentra reportado que, la producción de clorofila *a*, *b* y carotenoides totales presentaron un comportamiento dosis-dependiente ya que se observó una disminución significativa a mayores dosis del metal, se utilizó el parámetro de la capacidad de producción de pigmentos fotosintéticos para valorar la capacidad de adaptación, los cuales están relacionados con la viabilidad celular ya que se asocian con la capacidad fotosintética del organismos²⁵. La reducción en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos puede ser el resultado del efecto directo de los iones de Cu^{2+} que pueden inhibir la síntesis de la clorofila y carotenoides. Similares resultados han sido observados en *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) donde dosis concentraciones subletales de Cu^{2+} , ocasionaron una rápida inactivación del fotosistema

II, posiblemente como resultado de una disminución de los pigmentos fotosintéticos.³⁴ El posible modo de acción del metal en los pigmentos fotosintéticos podría ser debido al incremento de especies reactivas de oxígeno (vía reacción de Fenton), y la disminución de la capacidad antioxidante de la célula. Así como a la capacidad de los iones de Cu^{2+} de interactuar con los grupos N y S de proteínas y alterar la permeabilidad de la membrana.²⁴ Lo que posiblemente nos podría hablar no solo de un daño en la fotosíntesis si no que el cobre puede entrar a los cloroplastos y afectar el metabolismo del microorganismo, posiblemente dañando directamente a las enzimas dentro de estos organelos o quizá por daño en el ADN ya que también se reporta, que la exposición de *E. gracilis* a dosis altas de Cu^{2+} (0.8 y 1.6 mM) generaron cambios significativos en la integridad del ADN (% de daño del ADN) comparado con el control.²⁴

Con respecto al Cadmio, se encuentra reportado que uno de los mecanismos que *Euglena gracilis* utiliza para tener el fenotipo hiperacumulador es la compartimentación en las mitocondrias y cloroplastos. La cepa heterotrófica acumula hasta 79% de Cd^{2+} en las mitocondrias, y la cepa fotosintética acumula 62% de Cd^{2+} en los cloroplastos; esto indica que la compartimentación es un mecanismo clave de tolerancia en *Euglena gracilis* contra el metal.⁵⁰ Se encuentra reportado también que el Cadmio puede inducir la producción de la lipoperoxidación. También se ha reportado que en mamíferos el Cd^{2+} entra a la mitocondria y esto produce la inhibición de la respiración celular y la fosforilación oxidativa a través de mecanismos mediados por EROS.³⁵

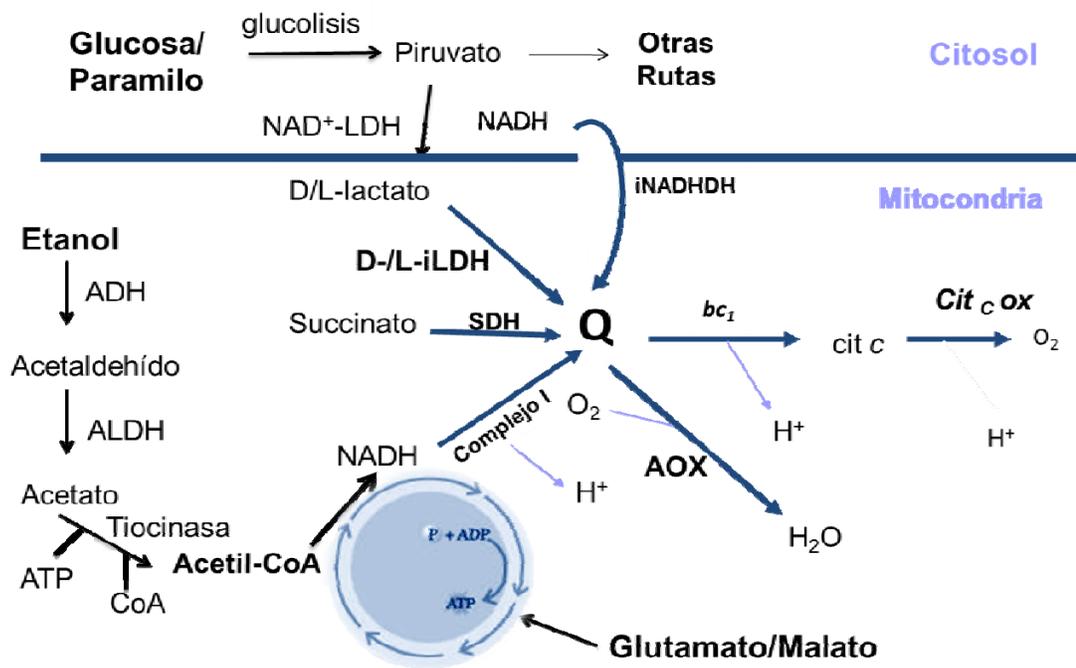
Encontramos reportado en la literatura también que los metales pesados pueden inducir estrés oxidativo a través de mecanismos diferentes, dependiendo de sus propiedades físicas y químicas, los metales pesados pueden ser tóxicos por medio de tres mecanismos moleculares diferentes: (a) la producción de especies de oxígeno reactivas (EROS) por autooxidación y la reacción de Fenton; esta reacción es típica para los metales de transición tales como hierro o cobre, (b) el bloqueo de grupos funcionales esenciales en las biomoléculas (proteínas y glutatión), esta reacción ha sido reportado principalmente para metales pesados no reductores tales como, cadmio y mercurio (c) el desplazamiento de los iones metálicos básicos (zinc o selenio) de las biomoléculas (proteínas); la última reacción se produce con diferentes tipos de metales pesados.³⁵

Euglena gracilis es un protista de vida libre que tolera altas concentraciones de metales pesados diferentes^{48,46,26}. El aumento de la producción de EROS y el daño al ADN mitocondrial, inducido por la exposición a Cd^{2+} se han descrito en cepas de *E. gracilis* fotosintéticas y en cepas crecida en la oscuridad, lo que sugiere que las mitocondrias son el objetivo principal de Cd^{2+} en este microorganismo, en estos reporte la función mitocondrial no fue evaluada. Así mismo anteriormente se menciona que se encuentra reportado que este metal es acumulado en cloroplastos y en mitocondrias para *E. gracilis* fotosintética²⁶ y para células de *E. gracilis* cultivadas en la oscuridad (heterótrofas), respectivamente. Lo que implica un efecto tóxico directo sobre estos orgánulos y su metabolismo energético. *E. gracilis* tiene una cadena respiratoria, la cual está constituida por cuatro complejos respiratorios clásicos y por diferentes componentes alternos, en donde la oxidasa alterna (AOX) parece ser esencial cuando las células son sometidas a estrés oxidativo, inducido, ya sea por frío o inhibidores de las vías respiratorias³⁵.

En un trabajo más reciente en el cual se trabajó con *Euglena gracilis* y el efecto de Cd^{2+} , se reporta un IC_{50} de $30 \pm 3 \mu M$ ($n=3$, al 4to. día), también se dan a conocer el efecto de este metal sobre las funciones mitocondriales, se reporta que las actividades de los complejos respiratorios III y IV se redujo, en un 50-60%, resultado de la exposición Cd^{2+} .³⁵ En contraste, el estrés causado por el Cd^{2+} no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la L-iLDH, mientras que las actividades de SDH y D-iLDH disminuyó un 50 y un 40%, respectivamente. Así mismo se concluye que la AOX tiene una participación muy importante en la resistencia y sobrevivencia contra el efecto del Cd^{2+} , ya que frente al estrés oxidativo esta enzima en lugar de que su actividad sea inhibida, sucede lo contrario, es decir que es incrementada por la presencia de este metal.³⁵

El metabolismo de *Euglena gracilis* ha sido estudiado desde hace mucho tiempo y así como parte de él se ha caracterizado muy bien, si bien aún no se conoce en su totalidad todo su metabolismo, hoy en día lo relacionados al metabolismo energético principal si lo es bien conocido así como ha sido bien caracterizados (Figura 1), esto hace que *Euglena gracilis* pueda ser utilizado como un modelo de estudio para ver la respuesta que hay cuando este microorganismo es expuesto a metales pesados. Otro factor que hace que *Euglena gracilis* pueda ser utilizado como modelo de estudio es que este microorganismo tiene la capacidad de crecer en distintas condiciones de medio, y tener un buen rendimiento celular cuando este microorganismo es sometido a algún tipo de estrés.

Figura 1. Metabolismo energético principal de *Euglena gracilis* heterotrófica.



Por todo lo anterior, en este trabajo de tesis se estudia el efecto del cromo sobre el metabolismo energético principal (para éste caso sólo las enzimas participantes de la cadena respiratoria y algunas de las enzimas alternas a esta), producto de la presencia de cromo (Cr (VI) y Cr(III) en el medio de crecimiento de *Euglena gracilis*, así como por la posible compartimentalización en la mitocondria dichas especies del metal.

HIPÓTESIS

Si *Euglena gracilis* heterotrófica es expuesta a Cr(VI) ó Cr(III) se verán afectadas las enzimas mitocondriales involucradas en la cadena respiratoria

OBJETIVOS

- **Objetivo General.**
 - Determinar el efecto del Cr(VI) y Cr(III) sobre las enzimas mitocondriales involucradas en el metabolismo energético (cadena respiratoria y enzimas alternas) de *Euglena gracilis* heterotrófica.

- **Objetivos Particulares.**
 - Evaluar la toxicidad del Cr(VI) sobre el crecimiento celular.
 - Identificar el IC₅₀ del Cr(VI) de las enzimas de la cadena respiratoria (tiempo, concentración).
 - Cuantificar la actividad enzimática control de los Complejos I, II, III y IV en células expuestas a Cr(VI) y Cr(III) después de 6 días en el medio cultivo.
 - Cuantificar el efecto tóxico del Cr(VI) y Cr(III) sobre la actividad de las enzimas de la cadena respiratoria directamente de las mitocondrias sin y con exposición previa de las células a las distintas especies de cromo.
 - Cuantificar el efecto del Cr(VI) y Cr(III) sobre la actividad de las enzimas alternas a la cadena respiratoria de *Euglena gracilis*, en específico la AOX y la NADH externa.

METODOLOGÍA

- **Reactivos**

D-lactato, L-lactato, succinato, n-propilgalato y n-dodecil- β -D-maltosido fueron de ICN (Ohio, USA). Decilbenzoubiquinona (DBQ), citocromo c de corazón de caballo, succinato semialdehído, fenil-metil fluoruro de sulfato (PMSF), rotenona, flavona, ácido ascórbico, TMPD (clorhidrato de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenil enediamina), Triton X-100, Tween-20, NADH y estigmatelina fueron de Sigma (St. Louis Mo, USA).

- **Medio de cultivo**

Para cultivar a las células se usó Medio Hutner modificado, el cual está constituido por:

***Fuente de Carbono:** 34 mM glutamato, 15mM malato y 177mM etanol.

***Otros componentes del medio (para 1L de medio):** 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0.17g MgSO_4 ; 0.4g KH_2PO_4 ; 0.04g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.04 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.01g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.0008g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.004g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.003g H_3BO_3 .

La fuente de Carbono (exceptuando el Etanol) y los otros componentes se mezclaron y disolvieron perfectamente en el medio, estos fueron esterilizados por autoclave durante 45 min a una presión de 20 lb/in². Posteriormente fue adicionado al medio el Etanol, el calcio como CaCl_2 (0,043 g / L) y la solución de vitaminas (mg / L medio: tiamina, 0.1; FeCl_3 , 0.5; y cianocobalamina (B_{12}), 2×10^{-5}), esterilizados previamente por filtración. La concentración total de sulfato en el medio fue de 1,5 mM. El pH final del medio fue 7.0.

- **Condiciones de crecimiento**

Para determinar el efecto del cromo sobre la duplicación celular, se realizaron curvas de crecimiento en 100 mL de medio contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL, el cultivo se inició a una densidad de $0,06 \cdot 10^6$ céls/mL en la condición control (sin cromo) o en presencia de 250 μM Cr(III) o en presencia de 5, 10, 25, 50, 100 y 250 μM Cr(VI). Las soluciones stock utilizadas para agregar el Cr(VI) y Cr(III) al medio fueron de 100 mM K_2CrO_4 y 100 mM CrCl_3 , ambas esterilizadas por filtración. Las células fueron cultivadas a 25 °C en agitación continua a 125 rpm en la oscuridad; esta última condición hace que las células cultivadas pierdan irreversiblemente su capacidad de regeneración de clorofila

y cloroplastos, por lo tanto, estas células depende únicamente del metabolismo mitocondrial y de la glucólisis para el suministro de ATP.⁴⁹

- **Aislamiento de Mitocondrias**

Para el aislamiento de mitocondrias se utilizaron cultivos de 1L del medio y se utilizaron 3 condiciones: **control** (células cultivadas sin cromo), **Células Cr(VI)** (células cultivadas con 25 μM K_2CrO_4) y **Células Cr(III)** (células cultivadas con 250 μM CrCl_3). Después de 6 días de cultivo las células fueron cosechadas por centrifugación a 3500 rpm por 10 min y se lavaron dos veces con un buffer que contiene 250 mM sacarosa, 10 mM Hepes y 1 mM EGTA a pH 7.2 (Buffer SHE) y se re-suspendieron en 50 mL del mismo buffer + 0.1% (p/V) de BSA deslipidada. Posteriormente, en porciones de 25 mL las células se rompieron por sonicación en un sonicador (Branson 450, USA) al 75 % de su potencia máxima con una punta de 1cm de diámetro y dando 3 pulsos de 12 s dejando 1 minuto de separación entre cada pulso, esto se hace con un sonicador Branson Sonifier 450, al 75% de intensidad máxima. El sonicado se centrifugó a 2000 rpm por 10 min en una centrifuga de piso. El pellet (células enteras) se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10min; el pellet (la fracción mitocondrial) se re-suspendió en 3 mL de SHE + 1 mM de ADP por 10 min, se resuspendió en 20 mL y se centrifugó otra vez a 10, 000rpm finalmente se resuspendió el pellet (mitocondrias) en 1mL de SHE.

- **Cuantificación de la proteína**

La cantidad de proteína se cuantificó por el método de Biuret, utilizando una curva patrón (0—2 mg proteína), realizada con una solución patrón de albúmina sérica bovina al 10 % (p/V) y midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

- **Respiración celular**

El consumo de oxígeno se determinó con un electrodo de O_2 tipo Clark. Las células cultivadas en ausencia o presencia de cromo fueron cosechadas y lavadas dos veces con buffer SHE. 5×10^6 de células fueron incubadas en medio de cultivo puro saturado con aire y fue determinada la respiración celular basal (aprox. 1mg proteína), fueron incubadas en buffer KME saturado con aire o en buffer KM (no adicionado con EGTA) para medir el efecto del Cr(III). Los datos fueron estimados utilizando la constante de solubilidad del

oxígeno de 420 nanoátomos gramo de oxígeno por mL ($210\mu\text{M O}_2$) a una altitud de 2240m a 25°C .⁴⁹ Se utilizaron los sustratos endógenos de las células de *Euglena gracilis* +TMPD (1mM) y + el inhibidor Azida (10mM).

- **Medición de la respiración celular (actividades enzimáticas)**

Para las actividades de la L-iLDH, D-iLDH, complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV, Oxidasa Alterna y NADH alterna, se utilizó un método polarográfico midiendo el consumo de oxígeno con un electrodo para O_2 tipo Clark, usando una celda de 1.7 mL bajo agitación constante a una temperatura de 25°C en una solución que contenía 120mM KCl, 20mM MOPS y 2mM EGTA a pH 7.2 (Buffer KME). Todas las actividades se cuantificaron para 1mg de proteína de mitocondrias aisladas de células cultivadas en ausencia o presencia de K_2CrO_4 ó CrCl_3 , las células cultivadas se cosecharon y se lavaron dos veces con Buffer SHE.

Las mitocondrias aisladas (1mg de proteína) se incubaron en buffer KME saturado con aire o en buffer KM (si adición de EGTA) cuando se determinó el efecto por el Cr(III).

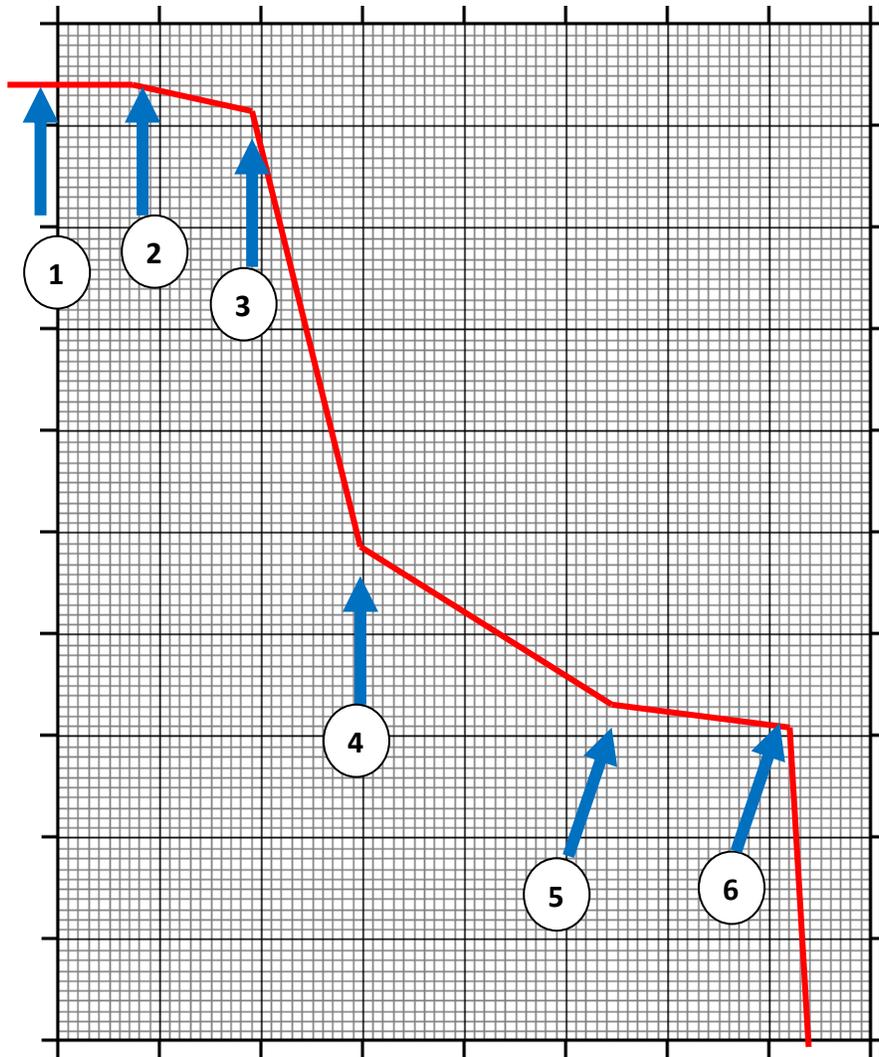
Los valores de la tasa respiratoria o velocidad de respiración se calcularon considerando que la solubilidad del oxígeno es de 420 nanoátomos gramo de oxígeno por mL ($210\mu\text{M O}_2$) a una altitud de 2240m a 25°C .

Los sustratos oxidables utilizados para cada caso fueron:

Tabla 1. Sustratos e inhibidores para medir actividades enzimáticas.

Actividad enzimática de:	Sustrato	Concentración	Inhibidor
L-iLDH	L-lactato	30mM	Azida
D-iLDH	D-lactato	30mM	Azida
Complejo I	NADH	0.5mM	Rotenona
Complejo II	Succinato	30mM	Azida
Complejo IV	TMPD/ascorbato de sodio	2mM/ 10mM	Azida
Oxidasa Alterna	D-lactato + Azida	30mM/10mM	n-propilgalato
NADH alterna	NADH + Rotenona + Flavona	10mM/2 μM + 0.2 mM	Estigmatelina
Glutamato+Malato	Glutamato + Malato	10mM/10mM	Azida

Figura 1. Representación de un trazo de la actividad enzimática en el oxímetro.



Los ensayos enzimáticos con el electrodo tipo Clark para O_2 , se realizaron adicionando Buffer KME (2mL) (Figura 1, número 1) dejando que se marcara la línea basal, posteriormente se agregaban las mitocondria (1mg proteína) (Figura 1, número 2), una vez dejando estabilizar el trazo, se inicia la reacción mediante la adición del sustrato (Figura 1, número 3), las concentraciones de los sustratos oxidables utilizados se encuentran en la Tabla 1, la tasa de consumo de oxígeno se registró entre los 2-3min. y para ver el efecto del cromo directo, se adicionó el cromo (según la especie de cromo que se estuviera trabajando $100\mu M$ $CrCl_3$ ó distintas concentraciones de K_2CrO_4) (Figura 1, número 4) y se dejó correr el trazo, de igual forma se midió la tasa de consumo de oxígeno entre los 2-3min, finalmente se adicionó el inhibidor mencionado en la Tabla 1 para cada caso (Figura 1, número 5) y al final de cada trazo se adicionó un exceso de

ditionita (Figura 1, número 6) para completar el trazo hasta llegar a una concentración cero de oxígeno. Esta adición de ditionita sirve para corregir el cero químico con respecto al cero del graficador y de ser necesario hacer la corrección.

En paralelo, se realizaron los experimentos, en los cuales las mitocondrias se pre-incubaron en presencia de 10 μ M Cr(VI) ó Cr(III) durante 10min. La reacción se realizó de igual forma que en lo descrito anteriormente, con la indicación de que a los 10min se comenzó la reacción añadiendo el sustrato oxidable y de igual forma la tasa respiratoria fue registrada.

Para la actividad de la AOX, las mitocondrias (2-3mg proteína) se incubaron con 30mM de D-lactato y 10 mM de Azida, el consumo de oxígeno restante se atribuyó a la actividad de la AOX que fue totalmente inhibida por 10 mM n-propil galato⁵¹, la actividad de la iNADHDH externa se determinó mediante la adición de 0.5 mM NADH en presencia de 1.5 μ M Rotenona. Esta actividad fue inhibida completamente por la adición de 0.25 mM de flavona, un inhibidor de las iNADHDH de levadura y *Euglena*.

La actividad del Complejo I se determinó espectrofotométricamente a 25°C, siguiendo la oxidación del 0.8 mM NADH ($\epsilon = 6.22\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ a 340nm). Las mitocondrias aisladas (10-20 μ g proteína) fueron incubadas en 2mL de Buffer KME a un pH de 7.2 más 0.01% (p/v) del detergente Tween-20 y 0.25 mM Flavona. Después de 10 minutos de pre-incubación, la reacción se inició mediante la adición de 90 μ M DBQ (decilbenzoquinona). La tasa se corrigió con la estimación de la actividad inhibida por la adición de 1.5 μ M de rotenona.

La actividad del complejo bc_1 se determinó por espectrofotometría de doble haz a 25°C, siguiendo la reducción de 30 μ M de citocromo *c* de corazón de caballo ($\epsilon = 19.1\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ de 550- 540 nm), usando 10-20 μ g proteína mitocondrial incubada en 2mL de 10 mM Hepes 50 mM MgCl a pH 7.0 y 0.01% (p/v) de Tween-20. La mezcla de reacción se pre-incubó 10 min en ausencia o en presencia de 10 μ M de Cr(VI) ó Cr(III). La reacción se inició con la adición de 80 μ M de decilbenzoquinol. La reacción fue inhibida completamente por la adición de 1 μ M estigmatelina

- **Actividades enzimáticas específicas.(L-y D-iLDH y SDH).** ²⁸

La actividad de iLDH fueron determinadas a 30°C en 1mL de 120mM KCl, 20mM Mops, 0.5mM EGTA, pH 7.6 (KME buffer), 0.2mM PMS, 0.2mM DCPIP y 0.03-0.05mg proteína mitocondria. La reacción fue iniciada con la adición de L-lactato o D-lactato y la velocidad fue medida por el cambio en la absorbancia obtenida por la reducción del DCPIP, esto fue medido a 600nm; usando un coeficiente de extinción de $21.3\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH 7.6. La actividad de la succinato deshidrogenasa fue también determinada usando DCPIP y 10mM succinato, como aceptor de electrones y donador, respectivamente.

➤ **Metodologías complementarias:**

- **Determinación de Cromo (VI).**

Esta es una determinación colorimétrica, en la cual se utiliza una reacción colorida con DFC (Difenilcarbazida). Este reactivo se prepara disolviendo 100mg de difenilcarbazida en 50 mL de etanol 95% (Solución A), por otro lado se mezcla 20 mL de H_2SO_4 en 180mL de agua destilada (Solución B). Finalmente se mezcla la solución A y B). Se tomaron alícuotas de 0.5 mL del sobrenadante de los cultivos de las diversas condiciones al día 7 de cultivo y se mezclaron con 0.5 mL del reactivo de difenilcarbazida, se homogenizó y se midió la absorbancia de la mezcla a 540 nm. Para la calibración se utilizó un estándar comercial de 0,1% Cr(VI) (Sigma México). Se determinó que la reacción es lineal hasta 50 nmol Cr(VI).

- **Cuantificación del Cromo total acumulado.**

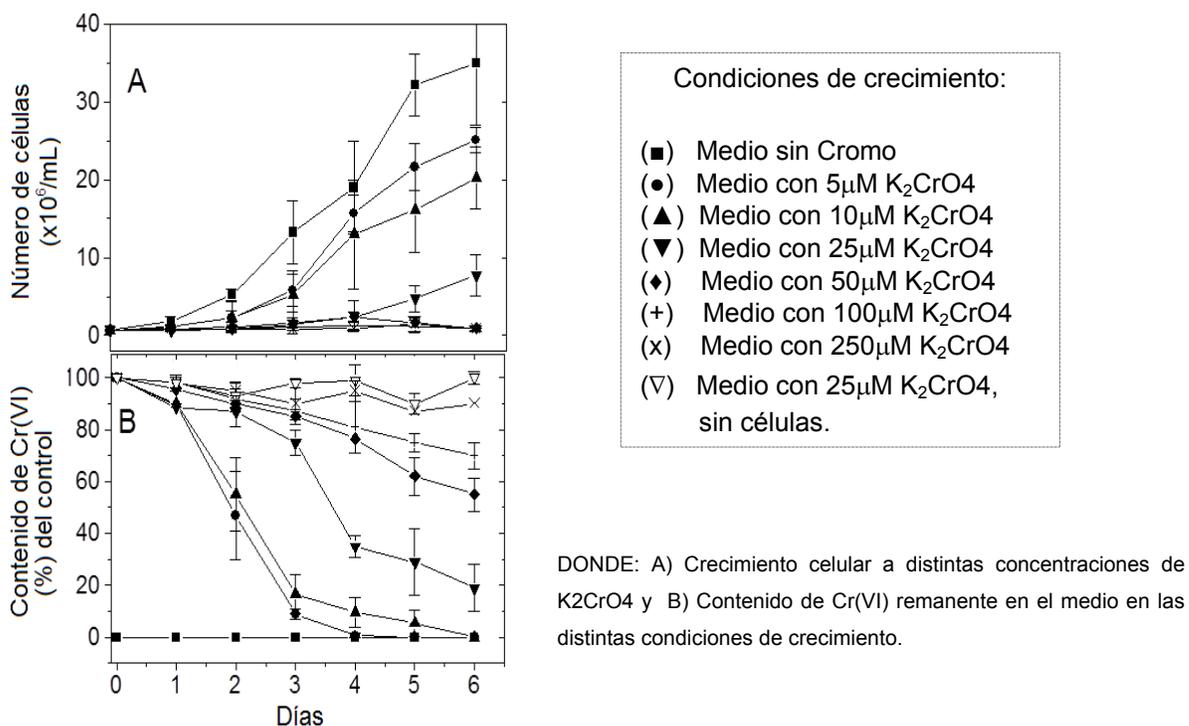
Se hizo la determinación para 5×10^7 células cosechadas por centrifugación, para cada condición, fueron lavadas previamente las células cultivadas en $25 \mu\text{M}$ Cr(VI) así como en $250 \mu\text{M}$ Cr(III) con buffer KME y se lavó 3 veces. Para el caso del contenido de cromo en las mitocondrias, se utilizó 30-40mg proteína de la fracción mitocondrial de cada condición.

RESULTADOS

❖ TOXICIDAD DEL CROMO EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Para mejorar la producción de biomasa de *Euglena gracilis* a pH 7, se adicionó etanol como fuente de carbono además del glutamato-malato.²⁰ En efecto, se alcanzó una densidad celular de hasta 35×10^6 células/mL en la fase estacionaria de la curva de crecimiento (Fig. 1A). Bajo estas condiciones, se determinó que $12 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 inhibe el crecimiento celular 50% (Fig. 1A), mientras que $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 tan sólo afecta el crecimiento celular el 15% (Dato no mostrado).

Figura 1. Crecimiento celular y contenido de Cr(VI) en el medio de cultivo.



❖ ACUMULACIÓN DE CROMO

Observamos también que en cultivos que contenían 5 y $10 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 , el Cr(VI) desapareció completamente del medio después de 6 días, mientras que con $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 , el Cr(VI) desapareció en un 80%. (Fig. 1B). En células cultivadas con $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 (Células cultivadas-Cr(VI)) o con $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 (Células cultivadas-Cr(III)), cosechadas y lavadas dos veces con un buffer que contenía un agente quelante de metales pesados (EGTA), se detectó una acumulación baja y muy similar para ambos

casos (Tabla1). Se determinó que una fracción del cromo desaparecido del medio fue acumulado y que de éste último una parte fue compartimentalizado en mitocondrias; se encontró que en las mitocondrias aisladas de células cultivadas en presencia de 25 μM K_2CrO_4 ó 250 μM CrCl_3 el contenido de cromo era similar (Tabla 1).

Ahora, considerando que el volumen intra-mitocondrial de *E. gracilis* es de $\sim 0,9 \mu\text{L}$ de agua /mg de proteína⁵⁰, la concentración de cromo total dentro de las mitocondrias podría alcanzar concentraciones de milimolar, lo que muy probablemente podría perturbar las funciones mitocondriales, tales como el Ciclo de Krebs, la respiración y la fosforilación oxidativa.

Tabla 1. Consumo de oxígeno y acumulación de cromo en las células en general y en mitocondrias aisladas de *Euglena gracilis*.

	Células			Mitocondrias		
	Control	+ 25 μM Cr(VI)	+ 250 μM Cr(III)	Control	+ 25 μM Cr(VI)	+ 250 μM Cr(III)
Consumo de oxígeno	(nat g O/10 ⁷ células)	(nat g O/10 ⁷ células)	(nat g O/10 ⁷ células)			
Sustratos endógenos	170 \pm 17	40 \pm 4	150 \pm 8	-----	-----	-----
+1mM TMPD	467 \pm 40	134 \pm 27	483 \pm 52	-----	-----	-----
+10mM azida	54 \pm 3(11%)	41 \pm 8	87 \pm 6	-----	-----	-----
Cromo acumulado	nmol/10 ⁷ céls.	nmol/10 ⁷ céls.	nmol/ 10 ⁷ céls.	nmol/mg mitocondrial proteína	nmol/ mg proteína mitocondrial	nmol/ mg proteína mitocondrial
	-----	8.1 \pm 0.3	6.5 \pm 2	-----	2.3 \pm 0.7	1.5 \pm 0.2

Los valores son la media de >4 diferentes preparaciones \pm desviación estándar.

Se observó que la respiración celular fue afectada con mayor intensidad por el Cr(VI) que por el Cr(III), con éste último siendo mayor la actividad cuando se adicionó azida en comparación con las células control, lo cual habla de un incremento en la actividad de la AOX, o un consumo de O₂ no mitocondrial. Se vio que con la adición de TMPD, la respiración celular se inhibió fuertemente (hasta 5 veces con respecto a las células control), lo que sugiere que el complejo IV en las células cultivadas en Cr(VI) está siendo fuertemente afectado con respecto a su actividad.

❖ EL EFECTO DEL CROMO EN LAS MITOCONDRIAS AISLADAS Y EN LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS MITOCONDRIALES.

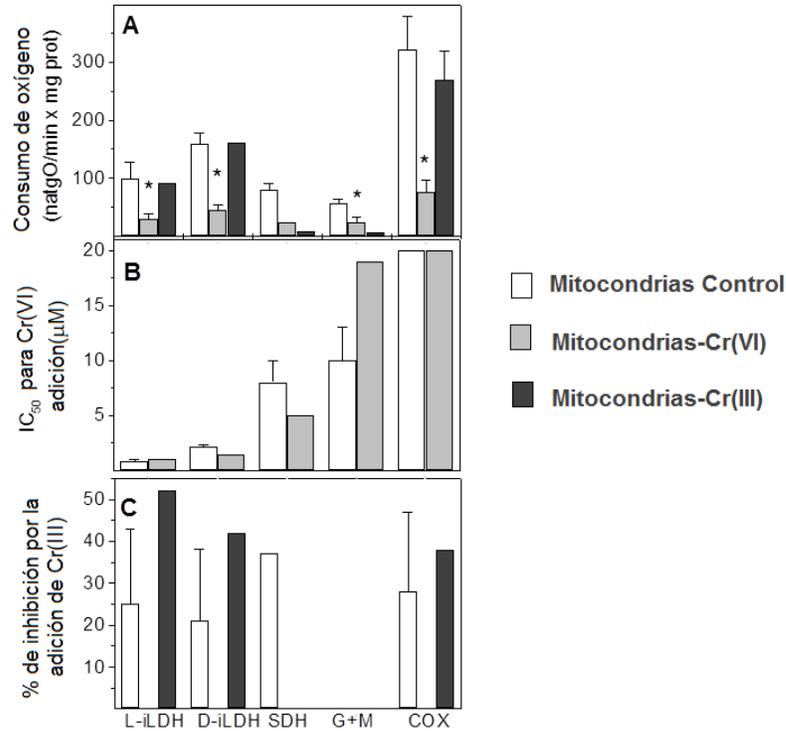
Los resultados muestran que para el caso de mitocondrias aisladas de células cultivadas en presencia de Cr(VI) (a las que llamaremos mitocondrias-Cr(VI)) la tasa o velocidad respiratoria fue significativamente más baja para los sustratos **L-y D- lactato, succinato y malato-glutamato** con respecto a la mitocondrias control de células cultivadas en ausencia de cromo. De igual forma, en las mitocondrias aisladas de células cultivadas en presencia de Cr(III) (mitocondrias-Cr(III)), la velocidad respiratoria fue menor con **succinato y glutamato-malato** (Figura 1A). La actividad del **complejo IV** también fue severamente deprimida en las mitocondrias-Cr(VI), pero sólo ligeramente afectada en las mitocondrias-Cr(III). Con respecto a la **adición directa** del cromo en las mitocondrias aisladas se ve que, **la adición de Cr(VI)** sobre las mitocondrias control inhibe fuertemente la tasa respiratoria, esto sucede para los sustratos, **L-lactato y D-lactato**, no así para succinato o glutamato-malato, mientras que la actividad del **complejo IV (TMPD oxidasa)** fue relativamente **insensible** a la adición de Cr(VI) (Figura 1B). Por el contrario, se muestra que la adición de **100 µM CrCl₃** disminuye la actividad respiratoria en **menos del 50%** para los sustratos L-lactato, D-lactato, Succinato, glutamato-malato y TMPD (Figura 1C).

Con respecto a los experimentos con las preincubaciones con cromo, se observó que la preincubación durante 10 min con 10µM Cr(VI) en la mitocondrias control, indujo una fuerte inhibición en las actividades respiratorias con L-lactato, D-lactato, succinato y glutamato-malato como sustratos, vemos que sucede al contrario para el Complejo IV (Figura 2A), donde esta preincubación afectó ligeramente la actividad del complejo.

Sorprendentemente y al igual que con las incubaciones de Cr(VI) se determinó que las mitocondrias que fueron preincubadas durante 10min en 10µM Cr(III) mostraron una fuerte inhibición respiratoria con todos los sustratos incluyendo TMPD/ascorbato (Complejo IV) (Figura 2A).

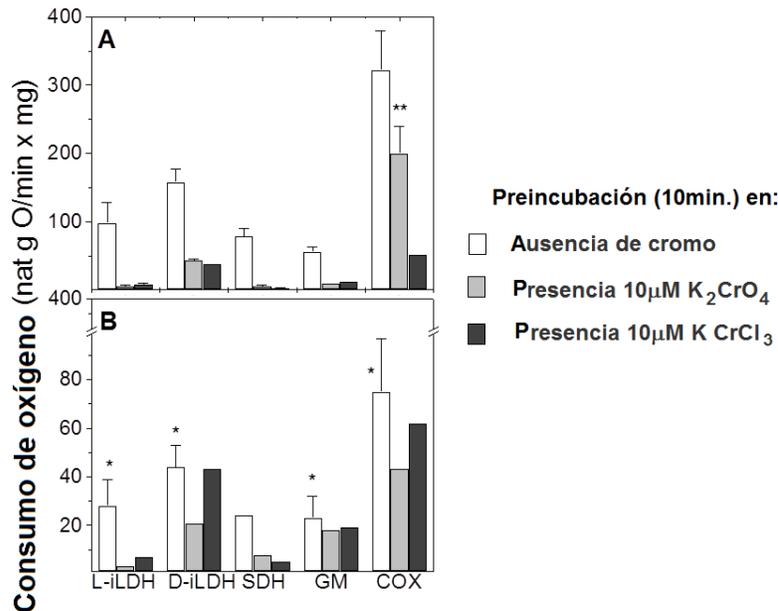
Las pre-incubaciones de las mitocondrias-Cr(VI) en 10µM Cr(VI) ó 10µM Cr(III) (durante 10min en cualquier caso) también indujeron la inhibición respiratoria con L-lactato y succinato pero no con D-lactato, glutamato-malato o TMPD/ascorbato(Figura 2B).

Figura 1. Inhibición de la respiración por cromo en mitocondrias aisladas.



Donde: A) Consumo de oxígeno, B) IC₅₀ evaluada para Cr(VI) y C) el porcentaje de inhibición por 100µM Cr(III). Los datos son la media ± desviación estándar de >3 preparaciones independientes. Media ± SD. El * corresponde a: P <0,05 de consumo de oxígeno en las mitocondria-Cr(VI) vs el consumo de oxígeno de las mitocondrias control.

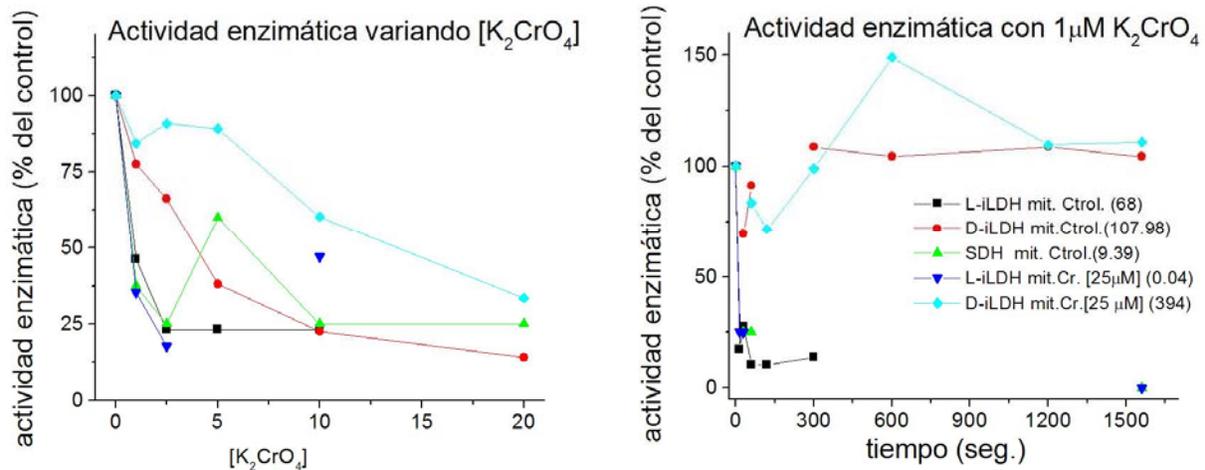
Figura 2. Efecto del Cr (VI) y Cr (III) en la cadena respiratoria de Euglena gracilis.



Donde A) Corresponde a las mitocondrias de las células control aisladas y B) a las mitocondrias aisladas de células crecidas en cromato de potasio. A partir de las incubaciones, fue adicionado el sustrato correspondiente y se determinó la tasa de consumo de oxígeno. Los valores son la media de >3 diferentes preparaciones media ± SD. El * corresponde a : P <0,05 de consumo de oxígeno en las mitocondria-Cr(VI) vs el consumo de oxígeno de las mitocondrias control; ** p <0,05 consumo de oxígeno en las mitocondrias control sin incubación vs el consumo de oxígeno de las mitocondrias Cr(VI) con incubaron 10 minutos con Cr (VI).

En cuanto a la actividad específica de la D-, L-iLDH y SDH se determinó espectrofotométricamente con DCPIP como aceptor de electrones y se vio que éstas también fueron afectadas por la adición de Cr(VI):

Figura 3. Actividades enzimáticas D-, L-iLDH y SDH



La actividad que se inhibió mayormente es la de las D- y L-iLDH, con una fuerte sensibilidad en las enzimas aisladas de células (mitocondrias) expuestas a Cr(VI). Esto se vio de hecho con la simple adición (exposición directa) de 1 μM K₂CrO₄. Se demostró también que en el caso de enzimas que nunca fueron expuestas a Cromo, la adición de Cr(VI) también causó una fuerte inhibición a medida que la concentración de cromo aumentaba. Hablando acerca de la actividad del Complejo I, se mostró que éste no fue afectado por la presencia del cromo en el medio, ni por la adición directa del cromo a la enzima (pese que en este último caso se incubo durante 10min previos a la cuantificación de la actividad). (Figura 4, y Figura 5); de igual forma sucedió para la iNADHDH, la cual tampoco fue afectada por cromo (Fig. 5), para estas enzimas se utilizó como sustrato NADH para la identificación de las actividades de estas enzimas y como inhibidores específicos la flavona (como inhibidor de la iNADHDH) y la estigmatelina (como inhibidor del Complejo I).

Figura 4. Trazos de la actividad del Complejo I

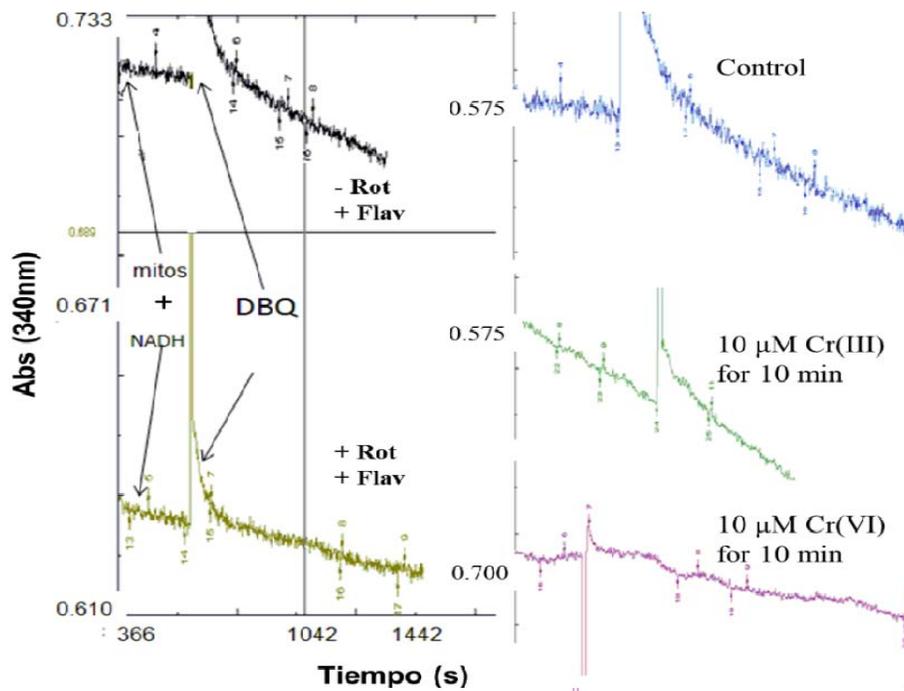
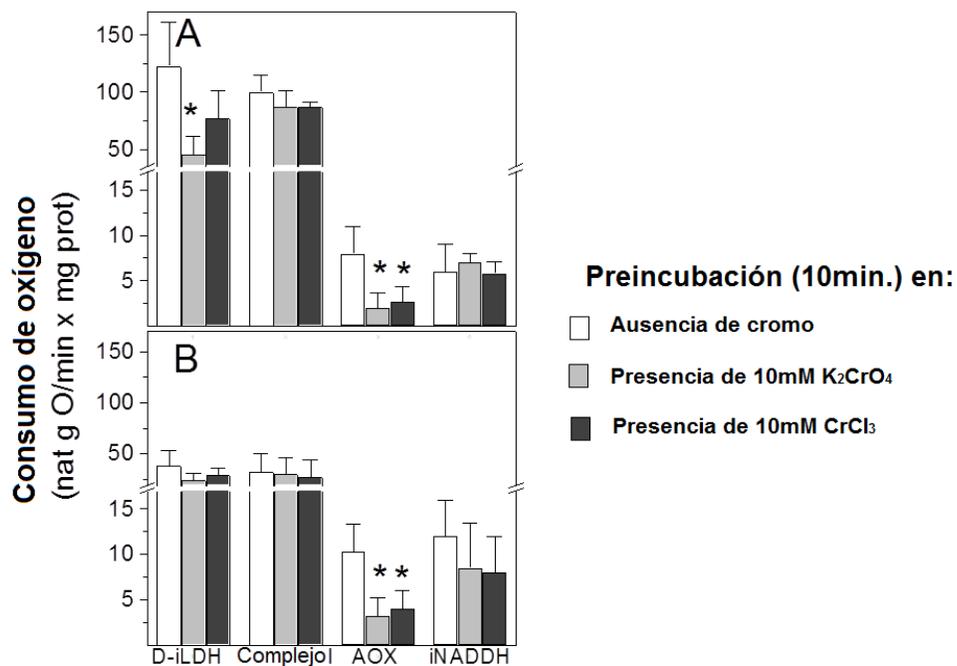


Figura 5. Actividades del Complejo I y componentes alternos de la cadena respiratoria.

Las actividades se determinaron en A) mitocondrias células control y B) mitocondrias-Cr(VI).



Los datos son la media ± desviación estándar cuatro preparaciones diferentes. *P < 0,05 la actividad enzimática de las mitocondrias que se incubaron con Cr (VI) o Cr (III) vs la actividad enzimática de las mitocondrias incubadas sin cromo (control).

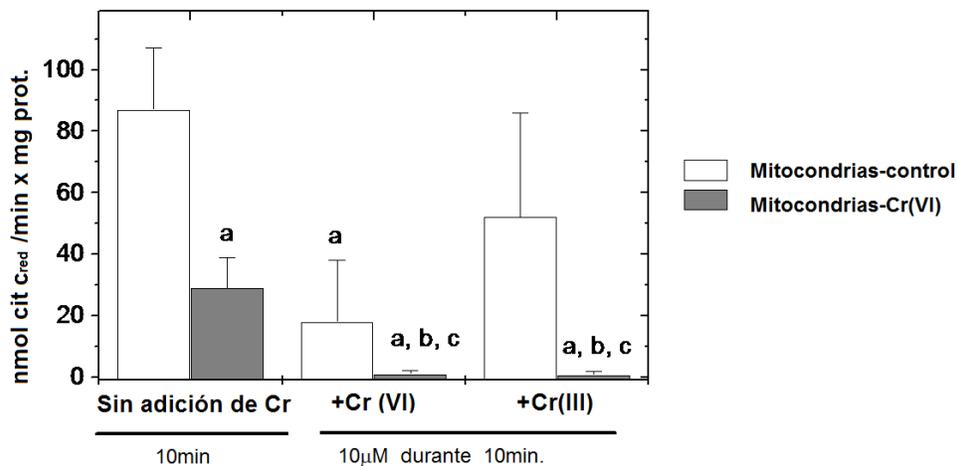
Ahora con respecto a las enzimas alternas del metabolismo energético de *Euglena gracilis*, los resultados mostraron que las actividades de los AOX (usando D-Lactato como sustrato) e iNADHDH corresponden a un 6-11% de la tasa total de consumo del oxígeno en las mitocondrias control, esto coincide con lo reportado previamente.^{51, 49}

Se observó también que la adición del Cr (VI) ó Cr (III) inhibió entre 70 -75 % la actividad de AOX (usando D-lactato como sustrato oxidable y rotenona como inhibidor de la cadena clásica de transporte de electrones, mostrando así solamente la actividad de la AOX).

Por el contrario, se demostró que, en las mitocondrias-Cr (VI) las actividades de la AOX y iNADHDH correspondieron al 26-30 % del total de la respiración (las velocidades de respiración absoluta fueron similares), lo que sugirió un importante papel de estas enzimas para contender contra el estrés oxidativo inducido por metales pesados⁴³.

Respecto al daño que el cromo causó a los complejos respiratorios, los resultados (Figura 6) mostraron que uno de los complejos más afectados por el cromo fue el Complejo III, se vio que en mitocondrias control incubadas por 10 min con 10 μ M de Cr(III) ó de Cr(VI) la actividad de este complejo fue inhibida en un 40% y 79% respectivamente; para el caso de las mitocondrias-Cr(VI) que fueron incubadas con las especie de cromo, en ambos casos vemos que la actividad del complejo III fue completamente inhibida. (Figura 6, barras grises).

Figura 6. Inhibición del Cr(III) en mitocondrias de *Euglena gracilis*.



Se hicieron incubaciones de 10 minutos en ausencia o en presencia de 10mM Cr(VI) o Cr(III). Los valores muestran la media \pm desviación estándar de cuatro diferentes preparaciones.

En la última figura (Figura 4) vemos que la actividad del Complejo I fue menor en un 70% para las mitocondrias -Cr (VI) (Fig. 5A) y para las mitocondrias-Cr(III) un 20% (Trazos: Figura 6), comparado con respecto a la actividad de las mitocondrias control.

Finalmente se determinó que el Complejo I y la iNADHDH no se afectaron de manera significativa cuando las mitocondrias se incubaron en presencia de cualquiera de las especies de cromo (Fig. 5B). En las mitocondrias que se incubaron durante 10 min con 10µM Cr(III) ó Cr(VI), la actividad del complejo III fue inhibida entre un 40-79%, mientras que las incubaciones en las mitocondria-Cr(VI), las incubaciones causaron una completa inhibición del Complejo III (Figura 6)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

❖ EL EFECTO TÓXICO DEL CROMO EN EL CRECIMIENTO DE *Euclena gracilis*

Recientemente se ha reportado²⁰ una densidad celular de 30×10^6 células/mL con la combinación de glutamato más malato más etanol, como fuente de carbono. Siguiendo este resultado, se utilizó en el presente trabajo la misma combinación de fuentes de carbono y como resultado se obtuvieron densidades muy parecidas, confirmando así que esta combinación de estas fuentes de carbono a pH 7 es adecuada para una producción de biomasa considerable para trabajar el protocolo de este trabajo. Todo esto puede apoyarse debido a que el etanol puede difundirse libremente a través de las membranas biológicas, ya que no requiere de un transportador específico y una vez dentro de las células es metabolizado por las células con mayor rapidez. En consecuencia, se esperaría que una variación del pH en el medio no deba afectar la disponibilidad de etanol. En efecto, para el cultivo de células control cultivadas a pH 7, se alcanzó un crecimiento celular de más de 30×10^6 células/mL y que para los cultivos con un contenido bajo de cromo también se lograron rendimientos altos en el crecimiento celular (Figura 1).

Consecuentemente se observó que en condiciones de alta densidad celular a pH 7 el Cr (VI) fue totalmente estable, se vio que el Cr(VI) tiene una toxicidad alta en el crecimiento celular, obteniendo una IC_{50} de $12 \mu\text{M}$, esto es acorde con lo que se encuentra reportado³⁷ en otros trabajos. Así tanto se vio que con $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 tan sólo se afecta el crecimiento celular un 15%, mostrando ser más dañino el Cr(VI) que el Cr(III) para la duplicación celular.

❖ LA ACUMULACIÓN DE CROMO Y LA COMPARTIMENTACIÓN

La eliminación de Cr (VI) del medio por los microorganismos puede derivarse tanto de la unión a la capa externa celular y la acumulación interna. La reducción espontánea del Cr(VI) a Cr(III) producida por el medio de cultivo a pH 7 es insignificante.⁷ Se mostró que las células de *E. gracilis* fueron capaces de acumular tanto Cr(VI) como Cr(III), independientemente de que para el Cr (III) se requirió de una concentración mucho más alta. Las concentraciones fueron de 8.1 ± 0.3 y 6.5 ± 2 $\text{nmol}/10^7$ células para los cultivos con $25 \mu\text{M}$ de Cr(VI) y $250 \mu\text{M}$ de Cr(III), respectivamente.

Así mismo, *Euglena gracilis* heterotrófica fue capaz de compartimentalizar Cr(VI) ó Cr(III) en la mitocondria (Tabla 1) , en un aprox. del 38% Cr(VI) y 23%Cr(III), en comparación al total acumulado dentro de las células. Esto es de gran importancia ya que con certeza se puede decir que los componentes de la cadena respiratoria, así como lo componentes alternos a ella están expuestos al cromo directamente y esto podría afectar las funciones de estas enzimas.

❖ **EFEECTO DE CROMO EN EL METABOLISMO MITOCONDRIAL Y GENERACIÓN DE EROS**

Se ha reportado que la cadena respiratoria mitocondrial es capaz de reducir y al mismo tiempo ser inhibida por el **Cr (VI)**, dependiendo del sustrato utilizado. El NAD⁺ vinculado como sustrato, es mejor sustrato para la reducción del Cr (VI) que el succinato (Arillo et al, 1987; Cobo y Castiñeira, 1997), con una generación mayor concomitante de la reacción del Cr(VI) cuando el glutamato se utiliza más que el succinato (Rossi et al., 1988).

El Cr (VI) añadido ejerció inmediatamente un potente efecto inhibitorio en las enzimas mitocondriales, la lentitud en la reducción de la capacidad mitocondrial sugiere que el Cr(VI) se une directamente a las enzimas específicas (Figura 2).

Por otro lado, se sabe que el Cr (III) también es capaz de afectar a la respiración mitocondrial e inducir estrés oxidativo, lo que sucede mayoritariamente con glutamato + malato que con succinato (Cobo y Castiñeira, 1997). Cuando las mitocondrias aisladas fueron incubadas directamente con 10 μ M CrCl₃ ocurrió una fuerte inhibición de las deshidrogenasas respiratorias ramificadas (L-iLDH, AOX), así como de la SDH y del Complejo III fue evidente, mientras que el Complejo I y la iNADHDH no se vieron afectados. Sin embargo, la respiración basal y la actividad del Complejo IV (TMPD oxidasa), se vieron afectadas en todo el conjunto de células de *E. gracilis* cultivadas en Cr(VI), no sucediendo así en las cultivadas en Cr (III) (ver Tabla 2).

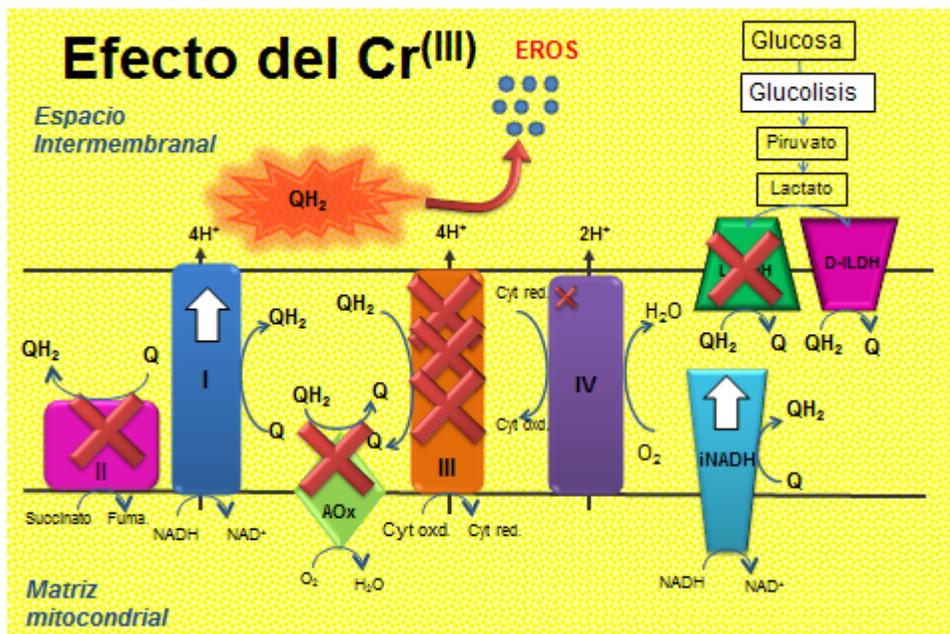
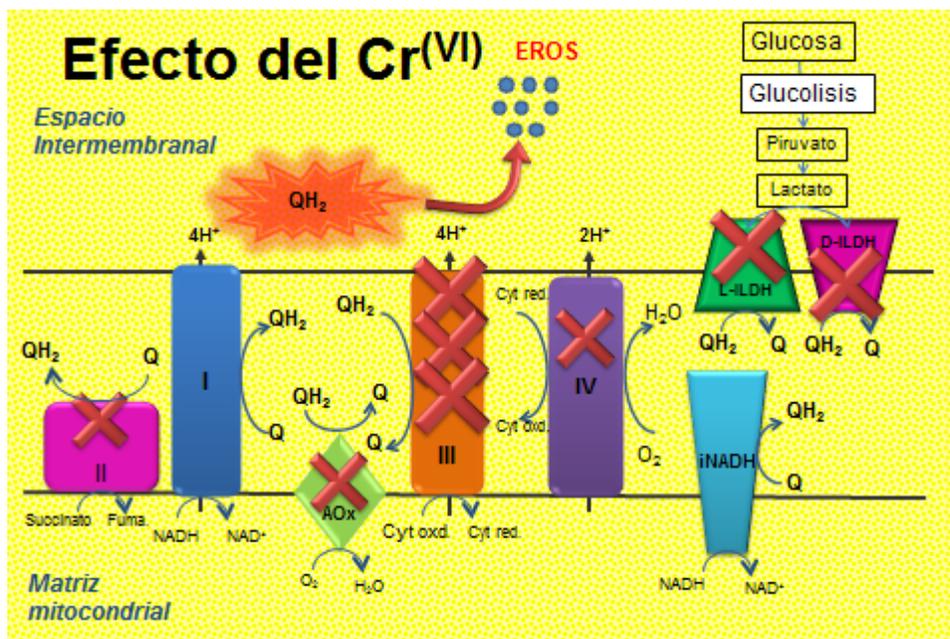
Por lo tanto, el Cr (VI) fue más citotóxico que el Cr (III), a pesar de los niveles de acumulación similares (véase el cuadro 1), mediante la inducción de estrés oxidativo y la inhibición directa de las enzimas metabólicas (Fig. 2-5).

Por otro lado, la actividad de la iNADHDH mostró un incremento, mientras que la de la AOX no fue alteración es su actividad, esto en mitocondrias de células cultivadas en

Cr(VI) (Fig. 4), lo que sugiere que estas enzimas están involucradas en la respuesta celular de protección contra el estrés oxidativo inducido por cromo.

La fuerte inhibición del complejo III a causa del cromo y el efecto despreciable sobre el Complejo I puede conducir a la acumulación de quinol y por lo tanto, a la generación de EROS.

Figura 1 y 2. Efecto tóxico del Cr(VI) y Cr(III) sobre los componentes clásicos y alternos de la cadena respiratoria de *Euglena gracilis*



CONCLUSIONES

Los metales pesados actúan en distintos blancos sobre el metabolismo energético de *Euglena gracilis*. Para el caso del cromo, se concluye que las enzimas mitocondriales involucradas en el metabolismo energético principal de *Euglena gracilis* heterotrófica son afectadas por la exposición a Cr(VI) y Cr(III) directa y a largo plazo, en esta última debido a la acumulación del metal en las mitocondrias.

La fuerte inhibición del complejo III y el efecto despreciable sobre el complejo I causado por el Cr(VI), sugiere que el daño provocado por este metal a largo plazo es causado por el estrés oxidativo, así mismo ocurre con el Cr(III), esto consecuencia de la inhibición directa por ambos cromos sobre el complejo III y el Complejo IV de la cadena transportadora de electrones.

Las enzimas alternas al metabolismo energético principal de *E. gracilis* (iNADHDH y AOX) fueron aumentadas o bien no modificadas, respectivamente, por la presencia de las distintas especies de cromo, ayudando así a mantener una homeostasis en el estado redox, así a la sobrevivencia y resistencia de dicho microorganismo a la presencia de cromo en el medio.

REFERENCIAS

1. SEMARNAT. Instituto Nacional de Ecología. Metales Pesados. ¿Qué son los metales pesados? Última actualización: Lunes, 17 Agosto de 2009 18:03. México D.F. Consultado: 24/08/ 2011. [<http://www.ine.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>]
2. Metales Pesados. Lennteh Water Treatment Solutions. Delf, Países Bajos-Holanda. Consultado: 28/08/2011. [<http://www.lenntech.es/metales-pesados.htm>]
3. Villanueva R. O.,2000.Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 131-143.
4. Navarro-Aviño J.P, Aguilar A. J.R, López-Moya., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de meales pesados en plantas. Ecosistemas (Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente). 16(2): 10-25.. AEET (Asociación Española de Ecología Terrestre). [<http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/488.pdf>]
5. Organización Panamericana de la Salud Oficina Regional de la OMS. Noviembre 2005. Estrategia de cooperación con el país México Consultado: 28/08/2011. [http://www.who.int/countryfocus/cooperation_strategy/ccs_mex_es.pdf]
6. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo. Tomo 2. Capítulo 63. Metales: Propiedades Químicas y Toxicidad. Productos Químicos. Director del capítulo. Gunnar Nordberg. España. Consultado: 06/09/2011.

[<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf>].
7. García García, Jorge Donato. 2008. Mecanismos de resistencia y acumulación de cromo en el protista Euglena gracilis. Tutor de tesis: Dr. Rafael Moreno Sánchez. UNAM Facultad de Química. México D.F. Pp. 8.
8. EPA (IRIS). Revisión Toxicológica del Cromo hexavalente. (CAS No. 18540-29-9). Septiembre 2010.

9. Botello, A.V., Rendón, J.,Gold, B.G.,Agraz, H. C., Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental. Diagnóstico y tendencias. 2da. Edición. México. Capítulo 20.
10. Felipe de Jesús Eslava Silva. 2009. *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn especie hiperacumuladora de cromo hexavalente. Directoras de tesis: Dra. María Isabel Saad Villegas y M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León. Facultad de Ciencias-Biología. UNAM. México D.F. Pp. 13 y 16.
11. Gómez Bemejo, Roberto Javier. 2010. Uso de plantas silvestres para fitorremediación de sitios contaminados con cromo. Director: Dr. Manuel Jiménez Estrada. Facultad de Ciencias-Biología. UNAM. México D.F. Pp. 21.
12. Devars Ramos, Silvia. 2008. Mecanismos de tolerancia a metales pesados en *Euglena gracilis*. Director de tesis: Dr. Rafael Moreno Sánchez. UNAM, Facultad de Ciencias-Biología. Obtener el título de Doctora en ciencias (Biología) México D.F.
13. Lira Silva, Elizabeth. 2011. Mecanismos de resistencia a Cromo en *Euglena gracilis* heterotrófica. Director de tesis: Ricardo Jasso Chávez. UNAM, Facultad de Química (Químico en Alimentos). México D.F.
14. Ruiz Vivar, Jessica. 2010. Mecanismos de resistencia a metales pesados en bacterias, hongos y plantas y algas y sus posibles aplicaciones como estrategias para biorremediación. Director de tesis: Fernando Montiel Aguirre. UNAM, Facultad de Química. México, D.F.
15. Cervantes, C. et al.2006. Interacciones microbianas con metales pesados.-Mecanismos de resistencia y acumulación de metales pesados en el protista *Euglena gracilis*. Revista latinoamericana de Microbiología. Vol. 48. Pp. 203-201.
16. Guzmán Can, Pedro Ángel. 1996. La oxidasa alterna de mitocondrias de *Euglena gracilis*. Director de tesis: Rafael Moreno Sánchez. UNAM, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. México,
17. Uribe Medina, Aida. 1992. Oxidación de sustratos y fosforilación oxidativa en mitocondrias de *Euglena gracilis*. Director de tesis: Silvia Devars Ramos y Rafael Moreno Sánchez. UNAM- Facultad de Ciencias. México D.F.

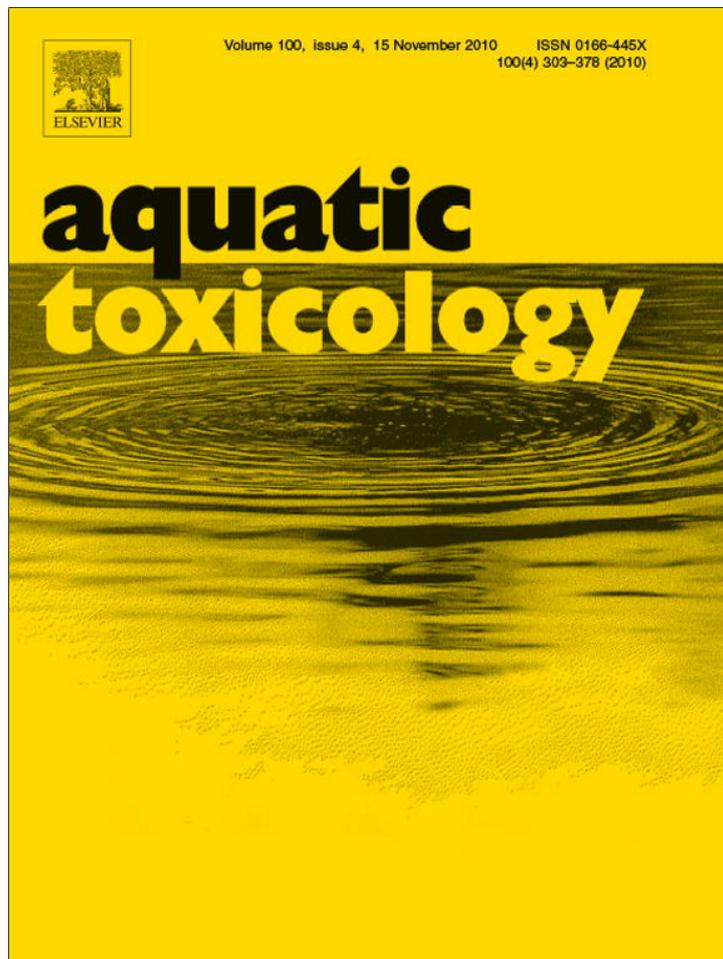
18. García Cano, Israel. 2005. Purificación y caracterización cinética de las deshidrogenasas lácticas mitocondriales de *Euglena gracilis*. Director de tesis: Ricardo Jasso Chávez. UNAM- Facultad de Química. México D.F.
19. Jasso Chávez, Ricardo. 2004. Participación de las deshidrogenasas lácticas mitocondriales de *Euglena gracilis* en el metabolismo energético. Director de tesis: Rafael Moreno Sánchez. UNAM-Facultad de Química (Doctorado en ciencias bioquímicas). México D.F.
20. Rodríguez-Zavala, J.S., Cruz-Ortíz, M.A., Moreno-Sánchez, R., 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 36–42.
21. Lehninger A.L., Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S. A., 2da. Edición. Barcelona 1995. Pp.519-522.
22. Nelson, D.L; Cox M.M., Cuchillo, C.M., Lehninger Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. 3ra. Edición. Barcelona, 2001. Pp. 660-673 y cap. 19.
23. Mendoza-Cózatl, D., Rangel-González, E., Moreno-Sánchez, R., 2006a. Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 521–528.
24. Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R., 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 174, 175–180.
25. Cervantes G. D., et al, 2011. Respuesta fisiológica de *Euglena gracilis* al estrés por cobre. *Quím.Nova*, Vol. 34, No. 7. 1211-1214.
26. Mendoza-Cózatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., Moreno-Sánchez, R., 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115, 276–283.
27. Cervantes C.; Moreno-Sánchez, R. 1999. Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. 1ra. Edición. México D.F. pp.8.
28. Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R., 2001. The membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 295–303.

29. Jasso-Chávez, Ricardo. 2000. Caracterización cinética y termodinámica de la L- y D-lactato deshidrogenasa mitocondriales de *Euglena gracilis*. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. México D.F.
30. Königsberg- Fainstein, Mina. 2008. Radicales Libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual moderno. 1ra. Edición. México. Pp. 3, 10, 39.
31. Alvarado, G.A., Blancos, R, Mora,M.E.. 2002. El Cromo como elemento esencial en los humanos. Revista Costarricense De Ciencias Médicas V.23 n.1-2 San José. SCIELO. 06/10/2011.http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S025329482002000100006&script=sci_arttext
32. NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration de Estados Unidos (Proyecto Mussel Watch, 1989).
33. Eisler, Ronal. 1986. Chromium Hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review Patuxent Wildlife Research Center. U.S. Fish and Wildlife Service. Laurel, MD 20708. Biological Report 85(1.6). Consultada el: 06/10/2011, 5:31pm. [http://www.pwrc.usgs.gov/infobase/eisler/chr_6_chromium.pdf].
34. Perales-Vela, H. V.; Gonzalez-Moreno, S.; Montes-Horcasitas, C.; Canizares-Villanueva, R. O.; 2007. *Chemosphere* 67, 2274.
35. Castro-Guerrero, N.A., Rodríguez-Zavala, J.S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*. *J. Bioenergy Biomembr.* 40,227–240.
36. Temas selectos de Biofísica. Quinta Lectura-Química de los radicales libres. Mayo 2010(15:24).Consulta:19/04/2012. [http://biofisica2010.blogspot.mx/2010_05_01_archive.html]
37. Rocchetta, I., Ruiz, L.B., Magaz, G., Conforti, V.T.D., 2003. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1045–1051. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002003000200005&script=sci_arttext ó http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_2_03/ibi05203.pdf].
38. Gier, JW, Lübben, M., Rijnders, WNM, Tipker CA, DJ Slotboom, RJM van Spanning, AH Stouthamer and Jvas der Oost (1994) The terminal oxidases *Paracoccus denitrificans*, *Mol Microbiol* 13:183.196.
39. EJ Helmerhortst, MP Murphy, RF Troxler and FG Oppenheim (2002) Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*, *Biochim Biophys Acta* 1556:73-80.

40. RK Poole and GM Cook (2000) Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation, *Adv Microbiol Physiol* 43: 165-224.
41. T Joseph-Horne, DW Hollomond and PM Wood (2001) Dungal respiration: a fusion of standard and alternative components, *Biochim Biophys Acta*, 1504: 179-195.
42. A McDonald and G Vanlerberghe (2004) Branched mitochondrial electron transport in the Animalia: presence of alternative oxidase in several animal phyla, *IUBMB Life* 56:333-341.
43. Castro Guerrero, Norma Angélica. 2008. Caracterización bioquímica y papel fisiológico de la oxidasa alterna en *Euglena gracilis*. Director de tesis: Rafael Moreno Sánchez . UNAM-Facultad de Química. México D.F.
44. Devlin, Thomas M.; BIOQUÍMICA: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas, Vol. 1. 5ta. Edición. Editorial Reverté S.A.Barcelona-España 2004. Pp. 572. [<http://books.google.com.mx/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA572&dq=ciclo+Q&hl=es&sa=X&ei=CwSeT8bbEYSA2gWCwNWTDw&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q=ciclo%20Q&f=false>]. (Visita: 14/03/2012).
45. Covian-García, Raúl Miguel. 1999. Purificación y caracterización del complejo bc₁ de mitocondrias de *Euglena gracilis*. Director de tesis: Rafael Moreno Sánchez. UNAM-Facultad de Ciencias. México D.F.
46. Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R., 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 174, 175–180.
47. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347
48. Navarro L, Torres-M_riquez ME, Gonz_lez-Moreno S, Devars S, Hern_andez R, Moreno-S_nchez R (1997). Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp Biochem Physiol C* 116:265–272.
49. Jasso-Chávez, R., Moreno-Sánchez, R., 2003. Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *Eur. Biochem.* 270,4942–4951.

50. Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., Moreno-Sánchez, R., 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 180, 1–10.
51. Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., Torres-Márquez, M.E., 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 200–210.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic *Euglena gracilis*

Ricardo Jasso-Chávez*, Angélica Pacheco-Rosales, Elizabeth Lira-Silva, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Noemí García, Rafael Moreno-Sánchez

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano # 1 Col, Sección XVI, Tlalpan, México D.F. 14080, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 May 2010

Received in revised form 10 August 2010

Accepted 17 August 2010

Keywords:

Oxidative phosphorylation

Chromium accumulation

Reactive oxygen species

Enzyme inhibition

Alternative oxidase

External NADH dehydrogenase

ABSTRACT

To assess the toxic effect of Cr on energy metabolism, heterotrophic *Euglena gracilis* was grown in a medium that prompts high yield biomass and in the presence of different Cr(VI) or Cr(III) concentrations. The cell growth IC₅₀ value was 12 and >250 μM for Cr(VI) and Cr(III), respectively; in these cells chromium was accumulated and a fraction compartmentalized into mitochondria, and synthesis of cysteine and glutathione was induced. Respiration of control isolated mitochondria was strongly inhibited by added Cr(VI) or Cr(III) with L-lactate or succinate as substrates. In turn, cellular and mitochondrial respiration, respiratory Complexes I, III and IV, glycolysis and cytosolic NAD⁺-alcohol and -lactate dehydrogenases from cells cultured with Cr(VI) were significantly lower than control, whereas AOX and external NADH dehydrogenase activities were unaltered or increased, respectively. Addition of Cr(VI) or Cr(III) to isolated mitochondria or cytosol from control- or Cr(VI)-grown cells induced inhibition of respiration, respiratory Complexes III, IV and AOX, and glycolytic pyruvate kinase; whereas Complex I, external NADH dehydrogenase, and other glycolytic enzymes were unaffected. Protein contents of mitochondrial Complexes I, III, IV and V, and ANT were diminished in Cr(VI)-grown cells. Decreased respiration and glycolysis induced by Cr(VI) resulted in lower cellular ATP content. Results suggested that Cr(VI) cytotoxicity altered gene expression (as widely documented) and hence enzyme content, and induced oxidative stress, but it was also related with direct enzyme inhibition; Cr(III) was also cytotoxic although at higher concentrations. These findings establish new paradigms for chromium toxicity: Cr(VI) direct enzyme inhibition and non-innocuous external Cr(III) toxicity.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Due to its widespread use, chromium is a pollutant of soils and aquatic systems (Cervantes et al., 2001). Mine and tannery activities in Mexico generate large amounts of waste chromium polluting ground water at levels of 115 μM Cr(VI) (Gutiérrez-Ruiz et al., 1990) or 960 μM total chromium (Armienta et al., 1993), which are values far higher than permissible. When metal exposure is severe (i.e., high concentrations, lengthy exposure), the cellular mechanisms

developed to contend against heavy metals may not suffice to avoid toxic effects (Cervantes et al., 2001). Cr(III) and Cr(VI) are the most stable and abundant chromium species that are used and produced by industrial activities; hence, they represent the main chromium environmental pollutants (Barnhart, 1997).

It is commonly thought that Cr(VI) is more toxic than Cr(III) due to its higher solubility in water; Cr(VI) is also a structural analogue of sulfate and phosphate and can therefore use their transport systems to enter into cells (Banerjee et al., 2008), thus becoming toxic and mutagenic to most organisms. Once inside, Cr(VI) may be reduced to Cr(III) through the generation of Cr(V) and Cr(IV), which rapidly react with reduced molecules to produce oxidative stress (Cervantes et al., 2001; Rocchetta et al., 2006). It is known that on acidic and moderately reducing conditions Cr(VI) is spontaneously reduced to Cr(III) decreasing its toxicity in photosynthetic *Euglena gracilis* (García-García et al., 2009).

On the other hand, Cr(III) is considered a weak toxic species because its low solubility at neutral pH values and the lack of transporters able to take it inside the cell. However, in the presence of hydroxyl, sulfate, ammonium, organic acids or others molecules able to donate an electron-pair, Cr(III) readily form complexes with

Abbreviations: ANT, adenine nucleotide antiporter; A-PFK, ATP-dependent phosphofructokinase I; Complex I, NADH quinone oxidoreductase; Complex III, ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase; COX, cytochrome *c* oxidase or Complex IV; Complex V, ATP synthase; D-iLDH, NAD⁺-independent membrane-bound D-lactate dehydrogenase; G+M, glutamate plus malate; iNADHDH, rotenone-insensitive external NADH dehydrogenase; L-iLDH, NAD⁺-independent membrane-bound L-lactate dehydrogenase; NAD⁺-ADH, NAD⁺-dependent alcohol dehydrogenase; NAD⁺-LDH, NAD⁺-dependent lactate dehydrogenase; P-PFK, PPI-dependent phosphofructokinase I; PYK, pyruvate kinase; SDH, succinate dehydrogenase.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5573 2911x1517; fax: +52 55 5573 0994.

E-mail address: rjass.cardiol@yahoo.com.mx (R. Jasso-Chávez).

them, increasing its solubility at neutral pH values (Remoundaki et al., 2007). There is evidence that Cr(III) might also be transported inside the cells. For instance, in germinating kiwifruit pollen, the uptake of Cr(III) is much higher than that of Cr(VI) and depends on the exogenous calcium concentration in the medium (Scoccianti et al., 2008). Mung bean roots show similar low accumulation of Cr(III) and Cr(VI) (5% of total chromium accumulated) at concentrations of 50 mg/kg sand. Concentrations of 110 mg/kg sand of both Cr(VI) and Cr(III) are lethal for plants (Banerjee et al., 2008). Cr(III) also induces changes in the level of the secondary metabolite scopolamine in *Datura innoxia* leaves (Vernay et al., 2008). In tumbleweed (*Salsola kali*) Cr(III) shows higher toxicity than Cr(VI) (Gardea-Torresdey et al., 2005), although the accumulation of Cr(VI) is 10–20 times higher than that of Cr(III) in roots, stems and leaves. *D. innoxia* is also sensitive to both, Cr(VI) and Cr(III) as judged by biomass and photosynthesis inhibition. Thus, both Cr(VI) and Cr(III) species may exert significant toxic effects, depending on the growth medium (solid or liquid, different composition, pH).

In general, microorganisms have different strategies of resistance to contend against heavy metal toxicity such as diminished metal uptake, internal binding, biotransformation, compartmentalization, and external chelation, among others (Rodríguez-Zavala et al., 2007). Studies regarding effects of heavy metals on energy metabolism in microalgae are scarce. The free-living protist *E. gracilis* is a cosmopolitan algae-like microorganism able to resist and accumulate heavy metals through the increased synthesis of molecules with thiol groups and their sub-cellular compartmentalization (Devars et al., 1998, 2000; Avilés et al., 2003, 2005; Mendoza-Cózatl and Moreno-Sánchez, 2005; Mendoza-Cózatl et al., 2002, 2006a,b; Rodríguez-Zavala et al., 2007). However, the growth rate and other cellular functions are affected by the accumulated metal. Specifically, light-grown *E. gracilis* cells are more sensitive to Cr(VI) than dark-grown cells (Cervantes et al., 2001). A lengthening in the lag growth phase induced by Cr(VI) and a decreased growth rate caused by Cr(III) have also been reported (Brochiero et al., 1984). Inhibition of growth in *E. gracilis* by Cr(VI) correlates with the arrest of cells in the G2 phase of the cell cycle (Fasulo et al., 1983) and inhibition of respiration and photosynthesis (Fasulo et al., 1983; García-García et al., 2009). Cr(VI) also induces oxidative stress (Rocchetta et al., 2003; Rocchetta and Küpper, 2009) and alterations in the cytoskeleton which might be involved in the loss of motility (Bassi and Donini, 1984).

It is noted that most of the work that have been published so far on chromium toxicity is related to physiological changes. Few works about specific cellular targets of chromium have been described. In *Chlorella pyrenoidosa* (Hörcsik et al., 2007) and *E. gracilis* (Rocchetta and Küpper, 2009), photosystem II activity is inhibited by Cr(VI). A decrease in the ATP content induced by chromium was also determined in *Scenedesmus actus* (Corradi and Gorbi, 1993), suggesting that energy metabolism is affected by this toxic metal.

The energy metabolism of *E. gracilis* is well documented (Buetow, 1989). Under heterotrophic conditions, *E. gracilis* is able to grow under a wide variety of oxidizable substrates such as glucose, ethanol, peptone, glutamate, malate, DL-lactate, and acetate (Smillie, 1968). Under stress conditions, *E. gracilis* strongly depends on lactate metabolism (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003); when external carbon source is exhausted, degradation of paramylon (the energy storage) produces D- and L-lactate. In turn, the oxidation of both lactate isomers is catalyzed by mitochondrial membrane-bound dehydrogenases which are part of the respiratory chain (Jasso-Chávez et al., 2001, 2005). In addition to the classical respiratory components, the respiratory chain in *E. gracilis* has alternative respiratory complexes such as a rotenone-insensitive external NADH dehydrogenase (Uribe

and Moreno-Sánchez, 1992) and a cyanide-resistant alternative oxidase (Moreno-Sánchez et al., 2000; Castro-Guerrero et al., 2005) that presumably contend against oxidative stress (Castro-Guerrero et al., 2008). The Krebs cycle, glycolytic and ethanol metabolism are also well described in *E. gracilis*. Both, alcohol (Ono et al., 1995; Rodríguez-Zavala et al., 2006; Palma-Gutiérrez et al., 2008) and aldehyde dehydrogenases located in the cytosol and mitochondria have been reported (Rodríguez-Zavala et al., 2006).

The aim of the present work was to determine the toxicity and the main targets of chromium on the energy metabolism of *E. gracilis*. Due to the Cr(VI) affects on DNA, a change in enzyme content may be expected, but also a direct interaction between Cr(III) and enzyme thiol groups may occur. Hence, cells were cultured under heterotrophic and high biomass yield conditions, e.g., at pH 7 and with ethanol as additional carbon source. The respiratory rate in cells and mitochondria, the activities of the respiratory chain components and several mitochondrial matrix and cytosolic enzymes as well as the glycolytic rate, and paramylon content were evaluated in cells cultured with Cr(VI) or Cr(III) and also after direct addition of either chromium species. The generation of ROS and the variation in the contents of ATP, cysteine and glutathione induced by Cr(VI) or Cr(III) was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

D-lactate, L-lactate, succinate, *n*-propylgallate and *n*-dodecyl- β -D-maltoside were from ICN (Ohio, USA) Decyl-ubiquinone (DBQ), horse heart cytochrome *c*, succinate semi-aldehyde, phenyl-methyl sulfonate fluoride (PMSF), rotenone, flavone, ascorbic acid, TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl *p*-phenyl enediamine di-hydrochloride), Triton X-100, Tween-20, pyruvate, NAD⁺, NADH and tetraetoxipropene were from Sigma (St. Louis Mo, USA) Stigmatellin and diphenylcarbazide were from Fluka (St. Louis Mo, USA). Enzymes for metabolites determination were purchased from Roche (Mannheim, Germany).

2.2. Culture medium and growth conditions

The composition of the culture medium was modified from the original recipe described by Greenblatt and Schiff (1959) by lowering the concentration of trace heavy metals as follows, in g/L: (NH₄)₂HPO₄, 0.1; MgSO₄, 0.17; KH₂PO₄, 0.4; ZnSO₄·7H₂O, 0.04; MnSO₄·4H₂O, 0.04; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.01; CoCl₂·6H₂O, 0.0008; CuSO₄·5H₂O, 0.004 and H₃BO₃, 0.003. Calcium was added as CaCl₂ (0.043 g/L) and sterilized by filtration. Vitamin solution was also sterilized by filtration and was added to the medium, in mg/L: thiamine, 0.1; FeCl₃, 0.5; and cyanocobalamin (B₁₂), 2 × 10⁻⁵. Final concentration of sulfate was 1.5 mM. In turn, 34 mM glutamate, 15 mM malate and 177 mM ethanol were used as carbon sources as reported by Rodríguez-Zavala et al. (2006). Final pH was 7.0. Stock 100 mM K₂CrO₄ or 100 mM CrCl₃ solutions were sterilized by filtration. Cultures of *E. gracilis* Klebs Z were reactivated as previously described (Avilés et al., 2003). Cells were cultured in darkness at 25 °C under continuous shaking at 125 rpm. These dark-adapted cultures of *E. gracilis* have irreversibly lost their capacity to regenerate chlorophyll and chloroplasts. Therefore, these cells solely depend on mitochondrial metabolism and glycolysis for ATP supply (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003).

All experiments were carried out with cells harvested after 6 days of culture and washed twice by centrifugation with a buffer containing 250 mM Sucrose, 10 mM Hepes and 1 mM EGTA at pH 7.2 (SHE buffer).

2.3. Determination of chromium(VI) and total chromium accumulation

Growth media aliquots (0.5 mL) were mixed with diphenylcarbazide (1 volume of 100 mg DFC in 95% ethanol and 1 volume of 10% H₂SO₄) (Taras et al., 1971) and the absorbance of the mixture was measured at 540 nm. For calibration, a commercial 0.1% (w/v) Cr(VI) stock solution (Sigma, Mexico) was used as standard. The reaction was linear up to 50 nmol Cr(VI) (García-García et al., 2009). For determination of total chromium accumulation, 25 μ M Cr(VI)-grown and 250 μ M Cr(III)-grown cells (5×10^7 cells) washed previously with 120 mM KCl, 20 mM Mops and 0.5 mM EGTA (KME buffer) for three times, or isolated mitochondria (30–40 mg protein) from cells cultured in the absence (control) and in the presence of Cr(VI) or Cr(III), were digested with 0.5 mL H₂SO₄ + 2.5 mL HNO₃ for 2 h at 100 °C to determine total chromium by atomic absorption spectrophotometry (Varian Spectra AA 640).

2.4. Isolation of mitochondria and cytosolic fraction

Cells cultured in the absence or in the presence of 25 μ M K₂CrO₄ or 250 μ M CrCl₃ were harvested and washed. Mitochondrial and cytosolic fractions were isolated as described previously (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). Mitochondrial yield from 1 L culture was 200–250, 45–60 and 100–120 mg protein for control, Cr(VI)-grown cells and Cr(III)-grown cells, respectively. The cytosolic fraction (in 1 mM EGTA plus 1 mM PMSF) was diluted 1:2 with glycerol and kept at –70 °C until use.

2.5. Cellular and mitochondrial respiration and enzyme assays

Oxygen uptake was determined with a Clark-type O₂ electrode. Cells cultured in absence or presence of chromium were harvested and washed twice with SHE buffer. 5×10^6 cells were incubated in fresh culture media saturated with air and basal cellular respiration and TMPD (Complex IV) oxidase were determined. Isolated mitochondria (~1 mg protein) were incubated in air-saturated KME buffer, or in KM buffer (no EGTA added) when the effect of Cr(III) was tested. Rate values were estimated by using an oxygen solubility of 420 nanoatoms gram oxygen per mL (210 μ M O₂) at 2240 m altitude and 25 °C (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). Oxidizable substrates were used at the indicated concentrations: 30 mM each of D-lactate, L-lactate or succinate, 0.5 mM NADH, 10 mM glutamate plus 10 mM malate, or 2 mM TMPD plus 10 mM sodium ascorbate. The reaction was started by adding the substrate and the rate of oxygen uptake was recorded for 2–3 min; then, different concentrations of K₂CrO₄ or 100 μ M CrCl₃ were added. In a parallel set of experiments, mitochondria were incubated in the presence of 10 μ M Cr(VI) or Cr(III) for 10 min and then, oxidizable substrate was added and the rate of respiration determined.

For AOX activity, mitochondria (2–3 mg protein) were incubated with 30 mM D-lactate and 10 mM azide; the remaining oxygen consumption was attributed to AOX activity which was fully inhibited by 10 mM *n*-propyl gallate (Moreno-Sánchez et al., 2000). External iNADHDH was determined by adding 0.5 mM NADH in presence of 1.5 μ M rotenone.

Complex I activity was determined spectrophotometrically at 25 °C by following the oxidation of 0.8 mM NADH ($\epsilon = 6.22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ at 340 nm). Isolated mitochondria (10–20 μ g protein) were incubated in 2 mL KME buffer at pH 7.2 plus 0.01% (w/v) Tween-20 and 0.25 mM flavone (specific inhibitor of the external iNADHDH; Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). After 10 min pre-incubation, the reaction was started by adding 90 μ M decylbenzoquinone (DBQ). The rate was corrected for by estimating the activity inhibited by 1.5 μ M rotenone (Fig. S1).

Complex bc₁ activity was determined by dual-beam spectrophotometry at 25 °C by following the reduction of 30 μ M horse heart cytochrome *c* ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 550 minus 540 nm) and using 10–20 μ g of mitochondrial protein incubated in 2 mL of 50 mM Hepes, 10 mM MgCl₂ at pH 7.0 and 0.01% (w/v) Tween-20. Reaction mix was incubated for 10 min in absence or in presence of 10 μ M Cr(VI) or Cr(III). The reaction was started with 80 μ M decylbenzoquinol (DBH) and completely inhibited by 1 μ M stigmatellin.

Activities of cytosolic NAD⁺-LDH, PYK and NAD⁺-ADH were determined by following the consumption of NADH and using ~250 μ g of cytosolic protein in 1 mL of 50 mM Hepes, 10 mM MgCl₂ at pH 8.0. For LDH, 0.5 mM NADH and 10 mM pyruvate were used as substrates; for PYK, 2 mM PEP and 3 mM ADP were used as substrates and the reaction was coupled to commercial LDH (3 IU) by adding 0.5 mM NADH in the presence of 1 mM fructose-1,6-bisphosphate. For ADH, the forward reaction was determined by using 0.5 mM NAD⁺ plus 30 mM ethanol; reverse reaction was measured by using 2 mM propionaldehyde and 0.5 mM NADH. ATP-PFK1 and P_i-PFK1 activities were determined following the protocol reported by Marín-Hernández et al. (2006). For all activities assays, Cr(VI) and Cr(III) were added just before NADH addition to avoid spurious reduction of Cr(VI).

2.6. Cell breakdown and metabolite determination

Control and chromium-exposed cells were harvested and washed with SHE buffer and then re-suspended in 3% (v/v) perchloric acid (PCA). Lysates were separated by centrifugation and the supernatant neutralized as reported by Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez (2003). Neutralized supernatants (cellular extracts) were kept at –72 °C until use. ATP, G6P, L-lactate and D-lactate were determined as previously described (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). In turn, the cellular pellet derived from the PCA treatment was used for determination of paramylon content (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). For glycolytic flux determination, cells were cultured with different chromate concentrations (see Section 3) or 250 μ M of CrCl₃ and harvested, washed and re-incubated at 25 °C. Then, at the indicated times, cellular samples (1×10^7 cells) were withdrawn and mixed with PCA; after neutralization, lactate production was determined. The rate of lactate production (glycolytic flux) tested in control, Cr(VI)- and Cr(III)-grown cells, was fully blocked by 10 mM oxalate (data not shown). Culture medium aliquots were withdrawn at the beginning and after 6 days culture and frozen until use for determination of ethanol, glutamate and malate (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003; Rodríguez-Zavala et al., 2006).

2.7. Determination of malondialdehyde (MDA) and thiol-group molecules

MDA production was followed by determining the reaction with thiobarbituric acid (TBARS) (Ohkawa et al., 1979). One mg of mitochondrial protein previously exposed to Cr(VI) or Cr(III) was incubated in 1 mL 0.15 M phosphate buffer, pH 7.0 at 37 °C for 20 min. Then, mitochondrial suspension was further incubated with 0.8% (w/v) thiobarbituric acid and 20% (v/v) acetic acid; reaction was allowed to develop at 100 °C for 1 h. The reaction was stopped by adding 2% (w/v) KCl at 4 °C. Finally, TBARS were extracted with one volume of *n*-butanol and determined at 532 nm. A standard curve was made with tetraetoxipropene; the reaction was linear up to 3 nmol TBARS.

For thiol-molecules determination, a sample of 5×10^7 cells or 3–5 mg of mitochondrial protein in 0.1% (w/v) Triton X-100 was incubated with 0.5 mM dithiotreitol and an excess of NaBH₄ for 10 min. The reaction was stopped with ice-cold 3% (w/v) PCA.

Lysates were centrifuged at $20,000 \times g$ at 4°C for 5 min. A sample of $50 \mu\text{L}$ supernatant was injected to the HPLC apparatus equipped with a reverse-phase C18 column ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, Alltech Deerfield, IL, USA). The column was equilibrated with a buffer composed of 99% (v/v) trifluoroacetic acid and 1% (v/v) acetonitrile. The thiol-compounds were post-column derivated by using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and detected at 412 nm.

2.8. Western blot assays and native blue gels

For total protein extraction from cells and isolated mitochondria, the protocol reported by Gallardo-Pérez et al. (2009) was followed. Proteins were resolved in 12.5% polyacrylamide gels. Electrophoretic transfer to PVDF membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) was followed by immunoblotting with anti-COX-IV, adenine nucleotide translocase (ANT) and α -tubulin (Santa Cruz, CA, USA). These antibodies are specific for human, rat and mouse proteins. For this reason, prolonged times of exposition (15–30 min) were necessary to develop a signal. For the native blue gels, the protocol reported by Schägger and von Jagow (1991) was followed: 1 mg of mitochondrial protein was solubilized with *n*-dodecyl- β -D-maltoside in a 1.6 detergent/protein ratio for 30 min at 4°C in a medium that contained 0.75 M aminocaproic acid, 10 mM Bis-Tris pH 7.0 and 1 mM PMSF. Samples were centrifuged at $18,000 \times g$ for 1 h. Solubilized protein was mixed with 0.5% (w/v) Coomassie blue in 0.5 M aminocaproic acid at pH 7.0 and $150 \mu\text{g}$ of protein were poured into 5% linear or 5–12% (w/v) gradient acrylamide native gels and resolved at 30 V for approximately 16 h. For comparison, mitochondria from rat liver (RLM) or kidney (RKM) were also analyzed. Complex V was identified by in gel activity by adding 10 mM ATP and 30 mM CaCl_2 in a buffer containing 50 mM Hepes and 10 mM MgCl_2 pH 8.0 until a white band developed (a calcium phosphate precipitate). The in gel Complex I activity was determined in 5% acrylamide gels by adding 5 mM NADH and 1 mg NBT/mL in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Both in gel reactions were stopped by adding 50% methanol/10% acetic acid.

The protein content in mitochondria and cytosolic fractions were determined by using the Biuret method with bovine serum albumin as standard, as previously described (Jasso-Chávez et al., 2001).

Unless other method is indicated, the Student's *t*-test for non-paired samples was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Toxicity of chromium on cell growth

To improve *E. gracilis* biomass yield medium with glutamate-malate of pH 7 was supplemented with ethanol. Indeed, a cellular density as high as 35×10^6 cells/mL was reached at the stationary growth phase (Fig. 1A). Under these conditions, it was determined that $12 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 inhibited cell growth by 50% (Fig. 1A), whereas $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 affected growth by only 15% (data not shown).

3.2. Effect of chromium on the carbon source utilization

In control cells, 90 ± 11 , 60 ± 10 and $40 \pm 3\%$ (mean \pm S.D.; $n = 5$) of added ethanol, glutamate and malate, respectively, were consumed after 6 days of culture. In cells exposed to 100 and $250 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 , where duplication was negligible (see Fig. 1A), 20 ± 12 and $5 \pm 4\%$ of ethanol, and 25 ± 6 and $10 \pm 11\%$ ($n = 5$) of glutamate, respectively, were consumed. Unexpectedly, malate was not utilized by cells exposed to $50 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 or higher concentrations (data not shown). For comparison, in cells cultured with $250 \mu\text{M}$

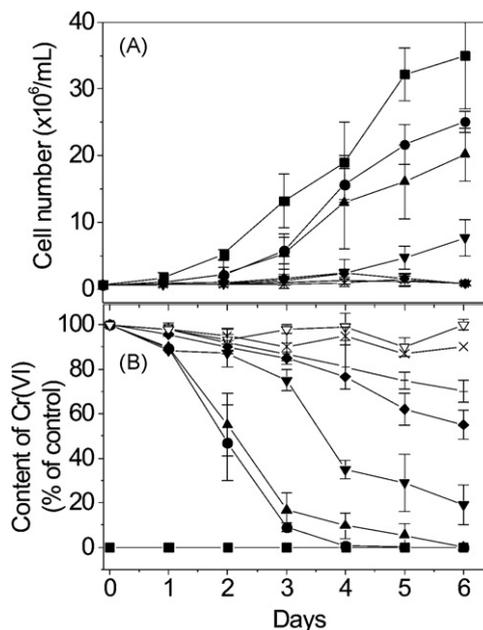


Fig. 1. Growth and remaining Cr(VI) content in the culture medium. Cell number (A) and the medium-Cr(VI) content were determined (B). Growth conditions were: medium without chromium (■); or with $5 \mu\text{M}$ (●), $10 \mu\text{M}$ (▲), $25 \mu\text{M}$ (▼), $50 \mu\text{M}$ (◆), $100 \mu\text{M}$ (+) or $250 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 (×). In (B), culture medium plus $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 but with no cells added is shown (▽). See Section 2 for more details.

CrCl_3 , 84 ± 9 , 19 ± 7 and $9 \pm 12\%$ ($n = 3$) of ethanol, glutamate and malate, respectively, were consumed after 6 days of culture.

3.3. Chromium uptake, accumulation and thiol-molecules synthesis

In cultures with 5 and $10 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 , Cr(VI) disappeared completely from medium after 6 days, while with $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 , Cr(VI) disappeared by 80% (Fig. 1B). In cells cultured with $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 (Cr(VI)-grown cells) or with $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 (Cr(III)-grown cells), harvested and washed twice with a buffer containing a heavy metal chelating agent (EGTA), a similar low chromium accumulation was detected (Table 1). A fraction of the chromium accumulated was compartmentalized into mitochondria. Indeed, mitochondria isolated from cells grown in the presence of $25 \mu\text{M}$ Cr(VI) or $250 \mu\text{M}$ CrCl_3 also showed similar chromium content (Table 1). With an intra-mitochondrial volume of $\sim 0.9 \mu\text{L}$ water/mg protein (Avilés et al., 2003), the chromium concentration would reach millimolar concentrations, which can most likely perturb the mitochondrial functions such as Krebs cycle flux, respiration and oxidative phosphorylation.

As response against chromium uptake, Cr(VI)-grown cells increased cysteine (10 times) and γ -glutamylcysteine plus glutathione ($\gamma\text{EC} + \text{GSH}$; 2 times) contents, whereas Cr(III)-grown cells showed similar thiol-molecule contents to those attained in control cells (Table 1); induction of phytochelatin synthesis by chromium species was not apparent, in agreement with a previous report (García-García et al., 2009). In turn, mitochondria isolated from Cr(VI)-grown cells showed a significant increase of approximately 3 times in both, cysteine and $\gamma\text{EC} + \text{GSH}$ contents respect to mitochondria from control and Cr(III)-grown cells (Table 1).

3.4. Effect of chromium on respiration in whole cells and isolated mitochondria, and on mitochondrial enzyme activities

In incubations on fresh culture media Cr(VI)- but not Cr(III)-grown cells showed lower respiration rates than control cells

Table 1
Thiol-group molecule contents and chromium accumulated in whole cells and in isolated mitochondria from *E. gracilis*.

	Cells			Mitochondria		
	Control (nmol/10 ⁷ cells)	+ 25 μM Cr(VI) (nmol/10 ⁷ cells)	+ 250 μM Cr(III) (nmol/10 ⁷ cells)	Control (nmol/mg mitochondrial protein)	+ 25 μM Cr(VI) (nmol/mg mitochondrial protein)	+ 250 μM Cr(III) (nmol/mg mitochondrial protein)
Cysteine	12.5 ± 5	118 ± 50 ^a	17 ± 4	0.23 ± 0.1	0.62 ± 0.3 ^b	0.4 ± 0.2
γEC + GSH	3.8 ± 1.1	7.8 ± 4.1	5.7 ± 2.6	0.18 ± 0.15	0.56 ± 0.1 ^c	0.24 ± 0.1
Chromium accumulated	–	8.1 ± 0.3	6.5 ± 2	–	2.3 ± 0.7	1.5 ± 0.2

Data are the mean ± S.D. of >4 independent preparations.

^a P < 0.05 vs control and Cr(III)-grown cells.

^b P < 0.05 vs control mitochondria

^c P < 0.05 vs control or Cr(III)-mitochondria.

Table 2
Oxygen-uptake by whole *E. gracilis* cells cultured in absence or presence of chromium.

	Cells incubated in fresh culture media		
	Control cells	25 μM Cr(VI)-grown cells	+ 250 μM Cr(III)-grown cells
Endogenous substrates	170 ± 17	40 ± 4 [*]	150 ± 8
+ 1 mM TMPD	467 ± 40	134 ± 27 [*]	483 ± 52
+ 10 mM azide	54 ± 3 (11%)	41 ± 8 (31%)	87 ± 6 (18%)

Values are the mean of 3 different cultures ± S.D. Values in parenthesis show the % of oxygen consumed by alternative oxidase.

^{*} P < 0.01 vs control or Cr(III) cells.

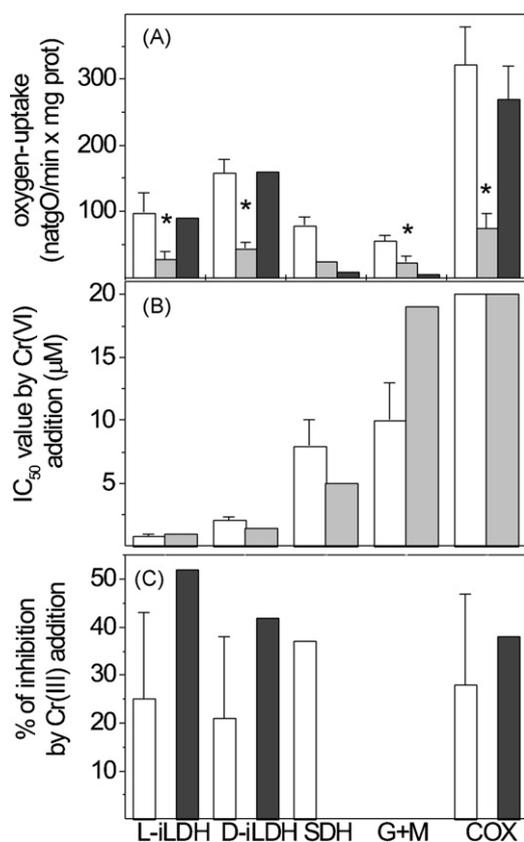


Fig. 2. Inhibition of respiration by chromium in isolated mitochondria. Oxygen uptake (A), the IC₅₀ value for Cr(VI) (B) and the percentage of inhibition by 100 μM Cr(III) (C) were determined in mitochondria isolated from control (white columns), Cr(VI)-grown (light grey columns) and Cr(III)-grown cells (dark grey columns). Data are the mean ± S.D. of >3 independent preparations. *P < 0.05 oxygen uptake in Cr(VI)-mitochondria vs oxygen uptake in control mitochondria.

(Table 2); similarly, Complex IV (TMPD) activity in Cr(VI)-grown cells was 5-fold lower. Moreover, Cr(VI)-grown cells showed higher azide-resistance respiration than control cells, indicating an increased AOX activity or a non-mitochondrial O₂ consumption.

Mitochondria isolated from Cr(VI)-grown cells showed significantly lower respiratory rates with the oxidizable substrates L- and D-lactate, succinate and glutamate-malate, as well as mitochondria from Cr(III)-grown cells with succinate and glutamate-malate, than control mitochondria (Fig. 2A). Complex IV activity was also severely depressed in Cr(VI)-mitochondria, but only slightly affected in Cr(III)-mitochondria. Furthermore, the respiratory rate in control mitochondria was more potently inhibited by directly adding Cr(VI) with L-lactate or D-lactate than with succinate or glutamate-malate, whereas Complex IV activity was relatively insensitive to added Cr(VI) (Fig. 2B). In contrast, addition of 100 μM CrCl₃ diminished respiratory activity by less than 50% with all substrates tested (Fig. 2C).

Pre-incubation of control mitochondria with Cr(VI) induced a stronger inhibition of the respiratory activity, except for Complex IV (Fig. 3A). Surprisingly, a similar strong respiratory inhibition was attained with Cr(III) with all substrates, including TMPD/ascorbate (Fig. 3A). Pre-incubation of Cr(VI)-mitochondria with Cr(VI) or Cr(III) also induced respiratory inhibition with L-lactate and succinate, but not with D-lactate, glutamate-malate or TMPD/ascorbate (Fig. 3B). Activities of SDH, D- and L-ILDH determined spectrophotometrically using DCPIP as electron acceptor, were also inhibited by added Cr(VI) (data not shown).

Complex I activity was 70 and 20% lower in mitochondria isolated from Cr(VI)-grown (Fig. 4A) and Cr(III)-grown cells (not shown), respectively, than in control mitochondria. The activities of the AOX and iNADHDH were 6–11% of the total rate of oxygen consumption in control mitochondria, as previously reported (Moreno-Sánchez et al., 2000; Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). Addition of Cr(VI) or Cr(III) inhibited 70–75% the AOX activity, whereas Complex I and iNADHDH were not affected (Fig. 4A). In contrast, in mitochondria from Cr(VI)-grown cells, the AOX and iNADHDH activities represented 26–30% of total respiration (but similar absolute respiration rates), suggesting an important role of these enzymes in contending against oxidative stress induced

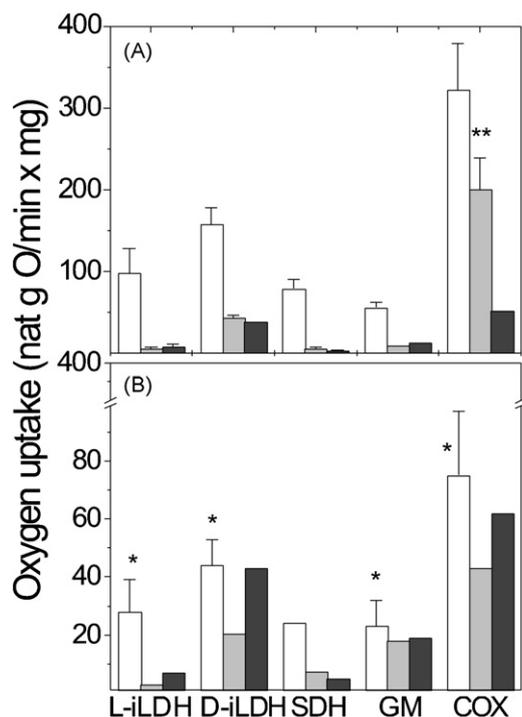


Fig. 3. Effect of Cr(VI) and Cr(III) on the respiratory chain of *Euglena gracilis*. Mitochondria isolated from control (A) and chromate-grown cells (B) were incubated for 10 min in the absence (white columns) or in the presence of 10 μ M K_2CrO_4 (light grey columns) or $CrCl_3$ (dark grey columns). Thereafter, the respective substrate was added and the rate of oxygen uptake was determined. Values are the mean of >3 different preparations \pm S.D. * P < 0.05 oxygen uptake in Cr(VI)-mitochondria vs oxygen uptake in control mitochondria; ** P < 0.05 oxygen uptake in control mitochondria incubated without chromium vs oxygen uptake in control mitochondria incubated 10 min with Cr(VI).

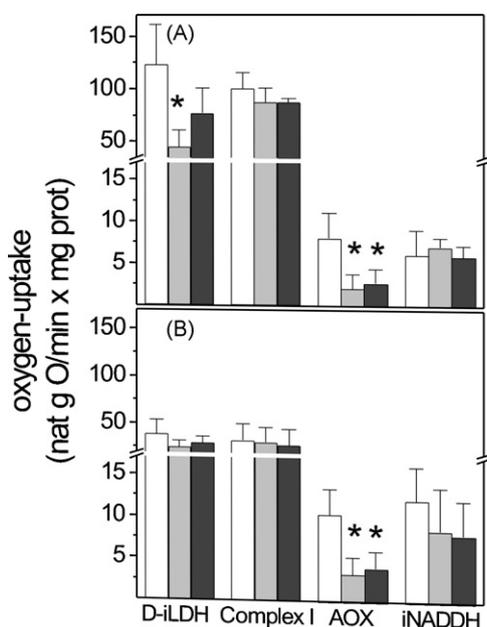


Fig. 4. Activities of Complex I and alternative respiratory components. The activities were determined in mitochondria from control cells (A) or Cr(VI)-grown cells (B) and further incubated for 10 min in the absence (white columns) or in the presence of 10 μ M K_2CrO_4 (light grey columns) or $CrCl_3$ (dark grey columns). Data are the mean \pm S.D. of four independent preparations. * P < 0.05 enzyme activity from mitochondria incubated with Cr(VI) or Cr(III) vs enzyme activity from mitochondria incubated without chromium (control).

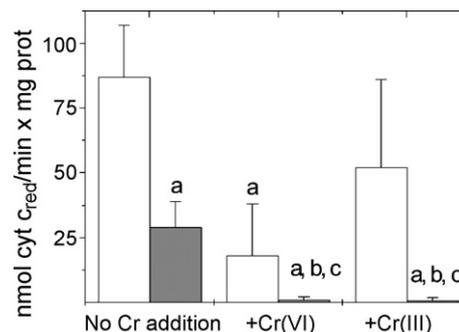


Fig. 5. Complex III inhibition by chromium in *E. gracilis* mitochondria. The activity of Complex III was determined in mitochondria isolated from control-grown cells (white columns) or Cr(VI)-grown cells (grey columns), and further incubated for 10 min in absence (No Cr addition) or in presence of 10 μ M Cr(VI) (+Cr(VI)) or Cr(III) (+Cr(III)). Values show the mean \pm S.D. of four different preparations. ^a P < 0.05 vs mitochondria from control-grown cells; ^b P < 0.05 vs mitochondria from Cr(VI)-grown cells; ^c P < 0.01 mitochondria incubated with chromium vs mitochondria incubated in absence of chromium (no Cr addition).

by heavy metals (Castro-Guerrero et al., 2008). Complex I and iNADHDH were not significantly affected when mitochondria was further incubated in presence of either chromium species (Fig. 4B). In control mitochondria incubated for 10 min with 10 μ M Cr(III) or Cr(VI), Complex III activity was 40 and 79% inhibited, whereas incubations in mitochondria from Cr(VI)-grown cells, led to complete Complex III inhibition (Fig. 5).

Regarding Krebs cycle enzymes, the NADP⁺-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH) activity was 486 \pm 333 (n = 3) in control mitochondria and 225 nmol NADH_{ox} (min mg protein)⁻¹ (n = 2) in mitochondria from Cr(VI)-grown cells, respectively. In control and Cr(VI)-mitochondria incubated for 10 min with 10 μ M Cr(VI) or Cr(III), SSADH activity was 27 and 32%, or 50 and 1% inhibited, respectively.

3.5. Mitochondrial enzyme levels

Western blot analysis revealed that COX-IV and the adenine nucleotide transporter levels were lower in mitochondria from both Cr(VI)-grown cells and Cr(III)-grown cells than those attained in control mitochondria (see Fig. S2 in supplementary material). The blue native gels with solubilized mitochondria showed that Complex III and IV content was lower in mitochondria from Cr(VI)-grown cells, but not in mitochondria from Cr(III)-grown cells, than in control mitochondria (Fig. 6A). Also, a slower migration level of ATP synthase (Complex V) in the dimer and monomer forms, as judged by in-gel activity, was determined; activity of Complex V monomer in mitochondria from both, Cr(VI)- and Cr(III)-grown cells was also lower respect to control mitochondria (Fig. 6B). Complex I activity was also detected on top of the gel. To distinguish between Complex V dimer and Complex I aggregates (Fig. 6A), in gel Complex I activity was determined in 5% acrylamide in blue native gels (Fig. 6C). Complex I activity was severely diminished in mitochondria from Cr(VI)-grown cells, and slightly affected in mitochondria from Cr(III)-grown cells in comparison with control mitochondria (control activities using rat liver or kidney mitochondria are shown in Figs. S3 and S4).

3.6. Effect of chromium on malondialdehyde (MDA) production

In freshly isolated mitochondria from control cells, MDA level was 0.35 \pm 0.04 nmol/mg protein (n = 4). Incubation of mitochondria with 25 μ M chromium for 30 min induced slight MDA increases of 15 \pm 13% with Cr(VI), and 25 \pm 16% with Cr(III). In comparison with control mitochondria, those isolated from Cr(III)-

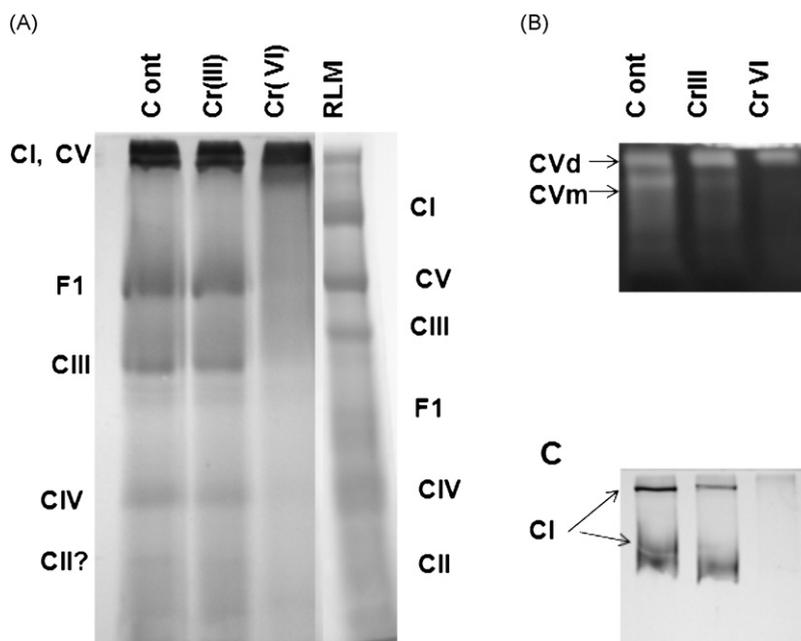


Fig. 6. Blue native gels for respiratory complexes of mitochondria from *E. gracilis*. (A) Mitochondria isolated from control (Cont), Cr(III)- and Cr(VI)-grown cells were solubilized and respiratory complexes were resolved by blue gel electrophoresis as described in Section 2. RLM: rat liver mitochondria; Vd: dimer of Complex V; Vm: monomer of Complex V; F1: soluble fraction of Complex V; CI, II, III and IV: Complexes I; II, III and IV. (B) Complex V in gel activity. (C) Complex I in gel activity. *Euglena* Complex I migrated less in comparison with RLM Complex I (see Fig. S4, supplementary material). Inset; * $P < 0.05$ metabolite content from chromate-grown cells vs control-grown cells.

grown cells showed a significant $53 \pm 28\%$ higher MDA level; and the incubation of these mitochondria with Cr(III) induced a $12 \pm 7\%$ further MDA increase. In contrast, mitochondria isolated from Cr(VI)-grown cells showed a decreased MDA level of $35 \pm 17\%$ vs control.

3.7. Effect of chromium on glycolytic flux, paramylon synthesis and cytosolic enzymes activities

In control cells, the lactate production (i.e., glycolytic flux) was linear for at least 10 min with a rate of 16 ± 8 nmol L-lactate $(\text{min } 10^7 \text{ cells})^{-1}$ ($n=5$). Cells cultured with $5 \mu\text{M}$ Cr(VI) showed 60% decreased glycolytic flux, but negligible effect ($<20\%$) was attained in $250 \mu\text{M}$ Cr(III)-grown cells (Fig. 7A). In contrast, synthesis of paramylon, as a reflect of gluconeogenic activity, increased in the presence of Cr(VI) or Cr(III) (Fig. 7B).

To identify possible chromium targets in the glycolytic pathway, the activities of several enzymes were evaluated. There are two types of PFK-1 expressed in *E. gracilis*, the ATP-PFK-1 that catalyzes an irreversible reaction under physiological conditions, and the PPI-PFK-1 that catalyzes a fully reversible reaction. The activity of PPI-PFK-1 was 10 times higher than that of ATP-PFK-1, as previously reported (Buetow, 1989). Both activities were not significantly affected by $10 \mu\text{M}$ Cr(VI) ($<10\%$ inhibition) or Cr(III) (17–22% inhibition). In turn, PYK was 40 and 65% inhibited by Cr(III) and Cr(VI), respectively (Fig. 8). In control cells, the cytosolic NAD^+ -DL-LDH activity was two-fold higher than in Cr(VI)-grown cells; however, in control and Cr(VI)-grown cells activity was not affected by adding $10 \mu\text{M}$ Cr(VI) or Cr(III). Likewise, the activity of the cytosolic NAD^+ -ADH in the forward reaction was 43% lower in Cr(VI)-grown cells (Fig. 8, insert). In turn, the ADH reverse reaction was 50% the activity of the forward reaction and it was not affected by incubations with Cr(VI) nor Cr(III) (data not shown). The contents of the glycolytic metabolites glucose-6P, D- and L-lactate increased in cells cultured with $25 \mu\text{M}$ K_2CrO_4 (Fig. 7A, inset), respect to control cells, whereas the ATP content markedly decreased.

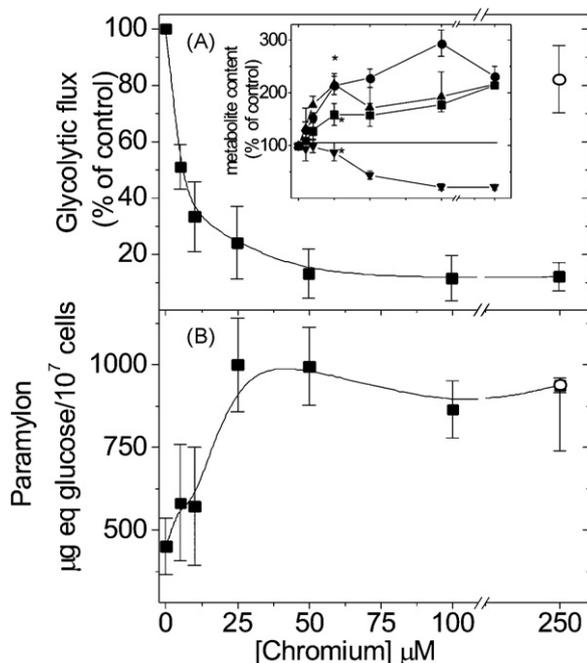


Fig. 7. Effect of chromium on glycolytic flux and paramylon synthesis in *E. gracilis*. Cells were cultured at the indicated chromate concentrations (■) or $250 \mu\text{M}$ of CrCl_3 (○) and lactate production (A) and paramylon content (B) were determined (see Section 2). Data are the mean of three experiments \pm S.D. Inset: metabolite determination. Metabolite contents in control cells were in $\text{nmol} \times (10^7 \text{ cells})^{-1}$: L-lactate = 30 ± 1.7 (■); D-lactate = 15 ± 2 (●); G6P = 3.9 ± 0.9 (▲); and ATP = 2.1 ± 0.7 (▼). Data are the mean \pm S.D. of four different preparations. * $P < 0.05$ vs control cells.

4. Discussion

4.1. Toxic effect of chromium on growth and carbon availability

At pH 3.5, *E. gracilis* maximal cellular yield is about 7×10^6 cells/mL with glutamate plus malate as carbon source (Cook, 1968; Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003), whereas with 33 mM

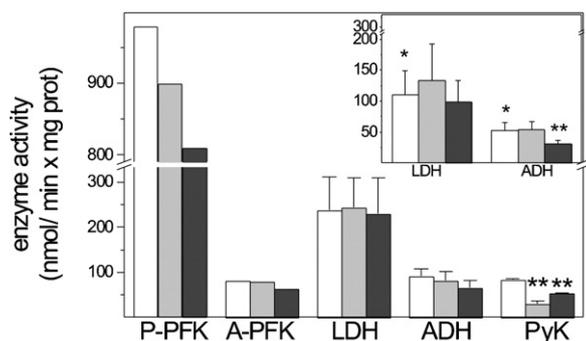


Fig. 8. Specific effects of chromium species on cytosolic enzymes. The activities were determined in cytosolic fractions isolated from control or Cr(VI)-grown cells (inset) and further incubated for 10 min in the absence (white columns) or in the presence of $10 \mu\text{M K}_2\text{CrO}_4$ (light grey columns) or CrCl_3 (dark grey columns). Activity units were $\text{nmol NADH oxidized (min mg protein)}^{-1}$. Data shown are the mean \pm S.D. Values are the mean of >3 different preparations. * $P < 0.05$, control cells vs chromate-grown cells; *** $P < 0.05$, cytosolic fraction incubated in chromium vs cytosolic fraction incubated in absence of chromium.

lactate or 75 mM glucose, the maximal yield is $3\text{--}4 \times 10^6$ cells/ml and $6\text{--}7 \times 10^6$ cells/ml, respectively (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). Recently, Rodríguez-Zavala et al. (2006) reported a cellular yield of 30×10^6 cells/ml with the combination of glutamate plus malate plus ethanol. In contrast, at pH 7, the *E. gracilis* growth is negligible with many carbon sources (Kempner, 1982; Rocchetta et al., 2006). For instance, densities of 3.4×10^6 cells/ml and 0.13×10^6 cells/ml are attained with glucose and acetate, respectively (Cook, 1968).

Because ethanol may freely diffuse through the biological membranes, no specific transporter is required. In consequence, pH variation should not be expected to affect ethanol availability. Thus, ethanol might be able to support *E. gracilis* growth at neutral pH. Indeed, in both control and Cr(VI)-grown cells at pH 7 ethanol was preferentially consumed over glutamate or malate (see Section 3). In cultures at pH 3.5, malate is the preferred carbon source consumed over glutamate (Jasso-Chávez and Moreno-Sánchez, 2003). Under these conditions of high cellular density at pH 7, in which Cr(VI) is fully stable, a high chromium toxicity was determined, with IC_{50} of $12 \mu\text{M}$, a value similar to that reported by Rocchetta et al. (2003) of $3.5 \mu\text{M}$, and in contrast with the IC_{50} value of $\sim 400 \mu\text{M}$ obtained at pH 3.5 (García-García et al., 2009).

4.2. Chromium accumulation, compartmentalization and protective response against chromium

Removal of Cr(VI) from medium by microorganisms may derived from both, binding to the outer cellular layer and internal accumulation; at pH 7, Cr(VI) spontaneous reduction to Cr(III) by the culture medium is negligible (García-García et al., 2009). *E. gracilis* cells were able to accumulate both, Cr(VI) and Cr(III), although Cr(III) was required to be used at a much higher concentration. The accumulation percentages were 25 and 8% for $25 \mu\text{M}$ Cr(VI) and $250 \mu\text{M}$ Cr(III), respectively. These values are comparable with those determined for mung bean (Banerjee et al., 2008) but lower than those reported for *Aspergillus* cultured on 25 ppm ($\sim 500 \mu\text{M}$) Cr(VI) (Vala et al., 2004).

Heterotrophic *E. gracilis* was able to compartmentalize Cr(VI) or Cr(III) into mitochondria. In turn, chromium accumulation led to an increase in the intracellular and intra mitochondrial levels of thiol-molecules (Table 1). Both, subcellular compartmentalization and enhanced production of thiol-molecules have been previously described as part of the resistance mechanisms developed by *E. gracilis* (Avilés et al., 2003; Mendoza-Cózatl et al., 2002, 2006a,b; García-García et al., 2009) and *Scenedesmus acutus* (Torricelli et al.,

2004) towards Cd^{2+} and other heavy metals (Mendoza-Cózatl et al., 2006a).

4.3. Effect of chromium on mitochondrial metabolism and ROS generation

It has been reported that the mitochondrial respiratory chain is able to reduce and, at the same time, be inhibited by Cr(VI), depending on the substrate used. NAD^+ -linked substrates are better substrates for Cr(VI) reduction than succinate (Arlillo et al., 1987; Cobo and Castineira, 1997), with a higher concomitant generation of reactive Cr(V) when glutamate is used over succinate (Rossi et al., 1988). Isolated mitochondria from *E. gracilis* were able to reduce after 10 min of incubation, 10% of added Cr(VI), in the absence of oxidizable substrate, and <20% in the presence of D-lactate (data not shown). The concomitant inhibition of mitochondrial enzyme activities induced by the 10-min preincubation with Cr(VI) was not prevented by EGTA (data not shown), suggesting that Cr(VI) but not Cr(III) was the inhibitory species. As added Cr(VI) exerted an immediate potent inhibitory effect on mitochondrial enzymes, the slow reducing mitochondrial capacity suggested that Cr(VI) directly binds to specific enzymes (cf. Fig. 2). However, control mitochondria incubated with superoxide dismutase were partially protected against direct addition of $10 \mu\text{M}$ Cr(VI) (data not shown), suggesting that ROS produced by Cr(VI) reduction were also involved in enzyme inhibition.

Cr(III) is also able to affect mitochondrial respiration and induce oxidative stress, which is higher with glutamate plus malate than with succinate (Cobo and Castineira, 1997). When isolated mitochondria were incubated directly with $10 \mu\text{M}$ CrCl_3 , a strong inhibition of the branched respiratory dehydrogenases (L-iLDH, AOX,) as well as SDH and Complex III was apparent, whereas Complex I and iNADHDH were not affected. However, basal respiration and Complex IV (TMPD oxidase) activity in whole *E. gracilis* cells were only affected in cultures with Cr(VI) but not with Cr(III) (see Table 2). Thus, Cr(VI) was more cytotoxic than Cr(III), despite similar accumulation levels (cf. Table 1), by inducing oxidative stress and directly inhibiting metabolic enzymes (Figs. 2–5).

On the other hand, iNADHDH and AOX showed increased and unaltered activities, respectively, in mitochondria from Cr(VI)-grown cells (Fig. 4), suggesting that these enzymes are involved in the cellular protective response against the oxidative stress induced by chromium. The strong inhibition by chromium of Complex III and negligible effect on Complex I may lead to quinol accumulation and hence, to the generation of ROS. On this regard, increased oxidative stress, as reflected by higher MDA and thiol-molecules, was determined in Cr(III)- and Cr(VI)-grown cells, respectively.

It is well documented that Cr(VI) induces oxidative stress, DNA damage, apoptosis and altered gene expression (Bagchi et al., 2002). Thus, the lower enzyme activities in *E. gracilis* grown with Cr(VI) may be the consequence of an altered gene expression and/or post-transcriptional changes. Indeed, the content of several proteins (respiratory Complexes I, III and IV, Complex V or ATP synthase, and ANT) determined by blue native gels, in gel activity and western blotting, was lower in Cr(VI)-grown cells than in control and Cr(III)-grown cells, which correlated well with the activities determined in isolated mitochondria for Complexes I, III and IV (cf. Figs. 2, 4–6). Therefore, lower expression of energy metabolism enzymes also contributed to decreased ATP levels and proliferation rate in cells cultured in Cr(VI) (Figs. 1 and 7A, inset).

4.4. Effect of chromium on glycolysis, paramylon and cytosolic enzymes

The glycolytic flux was inhibited whereas the paramylon content was increased in cells cultured with either Cr(VI) or Cr(III)

(Fig. 7B), indicating that the gluconeogenic pathway was active (Ono et al., 1995). NAD⁺-dependent ADH and LDH were unaffected by Cr(VI) or Cr(III), whereas ATP- and PPI-PFK1 activities were only slightly inhibited. In contrast, PYK was highly sensitive to both chromium species, which explains why glycolysis, but not paramylon synthesis, was inhibited. Therefore, the negligible Cr(III) effect on cell duplication, glycolysis and mitochondrial metabolism indicated that the *E. gracilis* outer layers, the pellicle and plasma membrane, are indeed efficient protective barriers against Cr(III) stress in cultures at pH 7 with glutamate, malate and ethanol as carbon sources.

Acknowledgements

This work was partially supported by grants no. 90619, 89412, 102260 and 123636 from CONACyT, Mexico and no. PICS08-5 from ICyTDF, Mexico.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.006.

References

- Arillo, A., Melodia, F., Frache, R., 1987. Reduction of hexavalent chromium by mitochondria: methodological implications and possible mechanisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 14, 164–177.
- Armienta, M.A., Rodríguez, R., Queré, A., Juárez, F., Cenicerros, N., Aguayo, A., 1993. Ground water pollution with chromium in Leon Valley, Mexico. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 54, 1–13.
- Avilés, C., Loza-Tavera, H., Terry, N., Moreno-Sánchez, R., 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 180, 1–10.
- Avilés, C., Torres-Márquez, M.E., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., 2005. Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 184, 83–92.
- Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H.G., 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180, 5–22.
- Banerjee, A., Nayak, D., Chakraborty, D., Lahiri, S., 2008. Uptake studies of environmentally hazardous ⁵¹Cr in mung beans. *Environ. Pollut.* 151, 423–427.
- Barnhart, J., 1997. Occurrences, uses and properties of chromium. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26, S3–S7.
- Bassi, M., Donini, A., 1984. Phallotoxin visualization of F-actin in normal and chromium-poisoned *Euglena* cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 8, 867–871.
- Brochiero, E., Bonaly, J., Mestre, J.C., 1984. Toxic action of hexavalent chromium on *Euglena gracilis* cells strain Z grown under heterotrophic conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 603–608.
- Buetow, D.E., 1989. The mitochondrion. In: Buetow, D.E. (Ed.), *The Biology of Euglena*, vol. IV. Academic Press, New York, pp. 247–314.
- Castro-Guerrero, N.A., Jasso-Chávez, R., Moreno-Sánchez, R., 2005. Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1710, 113–121.
- Castro-Guerrero, N.A., Rodríguez-Zavala, J.S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R., 2008. Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*. *J. Bioenergy Biomembr.* 40, 227–240.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C., Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335–347.
- Cobo, J.M., Castineira, M., 1997. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and glyemic control: clues from chronic supplementation with Cr³⁺ or As³⁺ to male Wistar rats. *Nutrition* 13, 965–970.
- Cook, J.R., 1968. The cultivation and growth of *Euglena*. In: Buetow, D.E. (Ed.), *The Biology of Euglena*, vol. I. Academic Press, New York, pp. 244–309.
- Corradi, M.G., Gorbi, G., 1993. Chromium toxicity on two linked trophic levels II. Morphophysiological effects on *Scenedesmus acutus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 72–78.
- Devars, S., Hernández, R., Moreno-Sánchez, R., 1998. Enhanced heavy metal tolerance in *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 128–135.
- Devars, S., Avilés, C., Cervantes, C., Moreno-Sánchez, R., 2000. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 174, 175–180.
- Fasulo, M.P., Bassi, M., Donini, A., 1983. Cytotoxic effects of hexavalent chromium in *Euglena gracilis*. II. Physiological and ultrastructural studies. *Protoplasma* 114, 35–43.
- Gallardo-Pérez, J.C., Espinosa, M., Ceballos-Cancino, G., Daniel, A., Rodríguez-Enríquez, S., Aviles, A., Moreno-Sánchez, R., Melendez-Zajgla, J., Maldonado, V., 2009. NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids. *J. Cell Biochem.* 108, 169–180.
- García-García, J.D., Rodríguez-Zavala, J.S., Jasso-Chávez, R., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., 2009. Chromium uptake, retention and reduction in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 191, 431–440.
- Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G., Cano-Aguilera, I., 2005. Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 225–232.
- Greenblatt, C.L., Schiff, J.A., 1959. A pheophytin-like pigment in dark-adapted *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 6, 23–28.
- Gutiérrez-Ruiz, M.E., Villalobos-Peñaloza, M., Miranda, J.A., 1990. Chromium pollution in groundwaters in north of Mexico City. *Rev. Int. Contam. Amb.* 6, 5–18, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=37060101>.
- Hörcsik, Z.T., Kovács, L., Láposi, R., Mészáros, I., Észáros, G., Lakatos, G., Garab, G., 2007. Effect of chromium on photosystem II in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Photosynthetica* 45, 65–69.
- Jasso-Chávez, R., Torres-Márquez, M.E., Moreno-Sánchez, R., 2001. The membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities in mitochondria from *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 390, 295–303.
- Jasso-Chávez, R., Moreno-Sánchez, R., 2003. Cytosol-mitochondria transfer of reducing equivalents by a lactate shuttle in heterotrophic *Euglena*. *Eur. Biochem.* 270, 4942–4951.
- Jasso-Chávez, R., García-Cano, I., Marín-Hernández, A., Mendoza-Cózatl, D., Rendón, J.L., Moreno-Sánchez, R., 2005. The bacterial-like lactate shuttle components from heterotrophic *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1709, 181–190.
- Kempner, E.S., 1982. Stimulation and inhibition of the metabolism and growth of *Euglena gracilis*. In: Buetow, D.E. (Ed.), *The Biology of Euglena*, vol. III. Academic Press, New York, pp. 197–252.
- Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P., Flores-Rodríguez, F.L., Macías-Silva, M., Sosa-Garrocho, M., Moreno-Sánchez, R., 2006. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 273, 1975–1988.
- Mendoza-Cózatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., Moreno-Sánchez, R., 2002. Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 115, 276–283.
- Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., 2005. Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 88–97.
- Mendoza-Cózatl, D., Rangel-González, E., Moreno-Sánchez, R., 2006a. Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 521–528.
- Mendoza-Cózatl, D.G., Rodríguez-Zavala, J.S., Rodríguez-Enríquez, S., Mendoza-Hernández, G., Briones-Gallardo, R., Moreno-Sánchez, R., 2006b. Phytochelatin-cadmium-sulfide high-molecular-mass complex of *Euglena gracilis*. *FEBS J.* 273, 5703–5713.
- Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F., Torres-Márquez, M.E., 2000. Oxidative phosphorylation supported by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 200–210.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Ono, K., Kawanaka, Y., Izumi, Y., Inui, H., Miyatake, K., Kitaoka, S., Nakano, Y., 1995. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis*. *J. Biochem.* 117, 1178–1182.
- Palma-Gutiérrez, H.N., Rodríguez-Zavala, J.S., Jasso-Chávez, R., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., 2008. Gene cloning and biochemical characterization of an alcohol dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 554–561.
- Remoundaki, E., Hatzikiioseyan, A., Tsezos, M., 2007. A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for treatment of chromium-containing waste water. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 802–808.
- Rocchetta, I., Ruiz, L.B., Magaz, G., Conforti, V.T.D., 2003. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 1045–1051.
- Rocchetta, I., Mazzuca, M., Conforti, V., Ruiz, L., Balzaretto, V., Rios de Molina, M.C., 2006. Effect of chromium on the fatty acid composition of two strains of *Euglena gracilis*. *Environ. Pollut.* 141, 353–358.
- Rocchetta, I., Küpper, H., 2009. Chromium- and copper-induced inhibition of photosynthesis in *Euglena gracilis* analysed on the single-cell level by fluorescence kinetic microscopy. *New Phytol.* 182, 405–420.
- Rodríguez-Zavala, J.S., Cruz-Ortiz, M.A., Moreno-Sánchez, R., 2006. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53, 36–42.
- Rodríguez-Zavala, J.S., García-García, J.D., Ortiz-Cruz, M.A., Moreno-Sánchez, R., 2007. Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subs. Environ. Eng.* 42, 1365–1378.
- Rossi, S.C., Gorman, N., Wetterhahn, K.E., 1988. Mitochondrial reduction of the carcinogen chromate: formation of chromium(V). *Chem. Res. Toxicol.* 1, 101–107.
- Schägger, H., von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223–231.
- Scocianti, V., Iacobucci, M., Paoletti, M.F., Fraternala, A., Speranza, A., 2008. Species-dependent chromium accumulation, lipid peroxidation, and glutathione levels in germinating kiwifruit pollen under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Chemosphere* 73, 1042–1048.

- Smillie, R.M., 1968. Enzymology of *Euglena*. In: Buetow, D.E. (Ed.), The Biology of *Euglena*, vol. II. Academic Press, New York, pp. 2–54.
- Taras, M.J., Greenberg, A.E., Hoak, R.D., Rand, M.C., 1971. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 13th ed. American Public Health Association, New York, pp. 155–159.
- Torricelli, E., Gorbi, G., Pawlik-Skowronska, B., di Toppi, L.S., Corradi, M.G., 2004. Cadmium tolerance, cysteine and thiol peptide levels in wild type and chromium-tolerant strains of *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *Aquat. Toxicol.* 68, 315–326.
- Uribe, A., Moreno-Sánchez, R., 1992. Energy-dependent reactions supported by several substrates in coupled *Euglena gracilis* mitochondria. *Plant Sci.* 86, 21–32.
- Vala, A.K., Anand, N., Bhatt, P.N., Joshi, H.V., 2004. Tolerance and accumulation of hexavalent chromium by two seaweed associated aspergilla. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 983–985.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A., 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere* 72, 763–771.