



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto sinérgico del platino sobre la
toxicidad del cadmio en la proliferación del
protista fotosintético *Euglena gracilis***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

GRANADOS RIVAS JUAN CARLOS



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ**

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Tutor principal y miembros del comité tumor

Tutor principal: Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Miembros del comité tutor: Dr. Hugo Virgilio Perales Vela, Dr. Ignacio Peñalosa Castro, Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez y Dr. Rafael Moreno Sánchez

A los financiamientos para la realización de este proyecto:

SEP-CONACYT No. 283144 Dra. Sara Rodríguez Enríquez

PAPIIT, DGAPA-UNAM No. IA201823. Dra. Sara Rodríguez Enríquez

Ciencia de Frontera-CONACyT No. 6379 Dr. Rafael Moreno Sánchez

PAPIIT, DGAPA-UNAM No. IA200124 Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Agradecimientos personales

A mis abuelos, por su infinita nobleza. Un caldito de olla, incluso en temporada de harto calor, fue de gran alivio. Ese “¿ya para cuándo te la echas?” por fin tendrá respuesta.

A Pipoy, por tu hermandad y tu constante preocupación por mí. Como dijo Marc Brown: “en ocasiones, ser un hermano es incluso mejor que ser un superhéroe”.

A Hachi, por tu entrañable compañía. No estás, pero en cada uno de mis logros me acompañas.

A un amor perdido. Fuiste mi fortaleza en tiempos de desespero. Y en pasado, porque como dijo la canción: “soy de San José El Vidrio, el pueblo donde nací; donde tuve mis amores, pero luego los perdí”.

A todos los integrantes del Laboratorio de Control Metabólico.

A la Dra. Sara Rodríguez Enríquez, por permitirme entrar a su grupo de investigación y fortalecer mi crecimiento académico.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez, por desarrollar mi pensamiento crítico y transmitir firmemente su pasión por la ciencia.

A mis amigos, especialmente a Roberto y Lalo. La vida universitaria sin ustedes habría sido igual a comer un plato de frijoles sin tortilla, y así hasta yo con hambre los rechazo.

Y finalmente a la música norteña. Este trabajo no podría haber sido escrito sin las fuerzas obtenidas después de escuchar a Ramón Ayala.

Dedicatorias

A mi madre, Margarita Horalia Rivas Fuentes.

Gracias por tu apoyo y cariño incondicional. Eres mi ejemplo a seguir. Después de tantas tortas de salchicha, la vida universitaria ha llegado a su fin.

A mi padre, Juan Carlos Granados Rodríguez.

Aprecio tu coraje y capacidad para no darte por vencido hasta conseguir lo que deseas. Gracias a ti aprendí que no hay nada imposible para aquel que lo intenta, y hoy lo he conseguido.

Yo soy el arriero de mi vida, pero ustedes me abren el camino. Este logro les pertenece.

Índice

Glosario	1
Resumen.....	2
CAPÍTULO 1.....	3
Introducción	3
1.1. Contaminación ambiental por metales pesados	3
1.2. Métodos de remoción de metales pesados.....	5
1.3. Toxicidad celular del cadmio.....	6
1.4. Toxicidad celular del platino.....	8
1.5. Efecto sinérgico de algunos metales pesados sobre la toxicidad del cadmio.....	9
CAPÍTULO 2.....	11
2.1. Justificación	11
2.2. Hipótesis.....	11
2.3. Objetivos.....	11
2.3.1. Objetivo general.....	11
2.3.2. Objetivos particulares	11
CAPÍTULO 3.....	12
Materiales y métodos	12
3.1. Cultivo celular y condiciones de crecimiento.....	12
3.2. Evaluación sinérgica entre metales pesados aplicando el modelo matemático del aditivismo tipo Bliss	12
3.3. Conteo y viabilidad celular	13
3.4. Tasa específica de crecimiento y tiempo generacional	13
3.5. Determinación de clorofila.....	13
3.6. Velocidad de consumo de oxígeno y fotosíntesis.....	14
3.7. Análisis estadístico	14
CAPÍTULO 4.....	15
Resultados.....	15
4.1. Cadmio.....	15
4.1.1. Efecto del cadmio sobre la proliferación celular de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrófica ..	15

4.1.2.	Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila en <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	18
4.1.3.	Efecto del cadmio sobre el metabolismo energético de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	19
4.2.	Platino	21
4.2.1.	Efecto tóxico del platino sobre el crecimiento celular, la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	21
4.2.2.	Efecto del platino sobre el contenido de clorofila en <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	22
4.2.3.	Efecto del platino sobre los flujos de respiración celular y fotosíntesis en <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	23
4.3.	Combinación de platino y cadmio	24
4.3.1.	Determinación del efecto de la combinación de platino y cadmio utilizando la aproximación del aditivismo tipo Bliss	24
4.3.2.	Combinación del cadmio y platino sobre algunos parámetros fisiológicos de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	28
CAPÍTULO 5		30
Discusión		30
5.1.	El cadmio disminuye la proliferación celular, velocidad de crecimiento y contenido de clorofila de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	30
5.2.	El cadmio disminuye la función mitocondrial sin afectar la fotosíntesis de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	32
5.3.	El platino (100 y 500 µM) no afecta la proliferación celular de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	32
5.4.	El platino estimula el metabolismo energético de <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	33
5.5.	El platino disminuye la toxicidad del cadmio en <i>E. gracilis</i> fotoheterotrónica	34
CAPÍTULO 6		36
Sumario		36
CAPÍTULO 7		36
Conclusión		36
CAPÍTULO 8		37
Referencias bibliográficas		37

Glosario

Antagonismo: interacción entre dos o más compuestos que produce efectos contrarios en el organismo.

Infraaditivo: efecto en donde la combinación de compuestos promueve una inhibición menor al obtenido con cada uno de los compuestos aplicados individualmente al modelo de estudio.

Metal pesado: grupo de elementos metálicos con densidades relativamente altas (más de 5 g/cm³), potencial de bioacumulación a lo largo de la cadena alimentaria y, por lo general, alta toxicidad para los organismos.

Sinergia: acción cooperativa entre compuestos, en el que el efecto combinado tiene un mayor impacto fisiológico que cuando se administra individualmente.

Fotoheterótrofo: organismo que utiliza la luz como fuente de energía y moléculas orgánicas (e.g. glutamato) como sustrato para la generación de biomasa, es decir, como fuente de carbono.

IC₅₀: cantidad de una sustancia necesaria para inhibir un proceso biológico (e.g. crecimiento celular) al 50%.

Biodisponibilidad: porción de una sustancia (e.g. metal pesado) que se encuentra completamente disponible en un medio biológico, reflejando accesibilidad al sitio de acción.

Lixiviado: agua residual, generalmente tóxica, que arrastra compuestos químicos del medio por donde circula.

Jale: residuos de material molido que después de que los minerales de interés han sido extraídos de las rocas que los contienen.

Biorremediación: proceso que utiliza sistemas biológicos para la eliminación de contaminantes del medio ambiente.

Desacoplante: son sustancias que disipan el gradiente electroquímico de protones en la cadena transportadora de electrones, y por ende, interrumpen la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP).

Supraaditivo: también denominado sinergismo, y hace referencia a la combinación de compuestos que produce un efecto significativamente mayor que la suma de sus efectos individuales.

Resumen

Los ecosistemas acuáticos representan uno de los principales sitios de descarga y almacenamiento de contaminantes, entre los que se encuentran los metales pesados. La evaluación del efecto tóxico de los metales se realiza principalmente exponiendo individualmente al metal y analizando su efecto sobre el modelo experimental seleccionado. Sin embargo, en los ambientes acuáticos contaminados, los microorganismos se encuentran expuestos a mezclas de metales, con los cuales interactúan activamente. El platino es un metal de fácil accesibilidad como resultado de la síntesis de drogas anticancerígenas y de la fabricación de convertidores catalíticos para automóvil. El manejo inadecuado de los residuos hospitalarios, en conjunto con las escorrentías de lluvias, promueven su depósito en cuerpos de agua superficiales. Por otro lado, el cadmio, por su baja degradabilidad y su actividad como carcinógeno, es considerado uno de los metales pesados más tóxicos. El presente estudio se enfocó en determinar el efecto del platino sobre la toxicidad del cadmio en *E. gracilis* fotoheterotrófica. La IC₅₀ de cadmio sobre el crecimiento celular de *E. gracilis* fue de 7.5 µM. Esta concentración promovió un aumento de 1.5-2 veces en el contenido de clorofila y en la respiración celular vs. células control. Por el contrario, el platino a concentraciones tan altas como 500 µM estimuló únicamente el metabolismo energético (i.e. fotosíntesis y respiración celular) (> 2 veces vs. células control), ya que no tuvo un efecto sobre la proliferación y contenido de clorofila de *Euglena*. Sin embargo, el tratamiento simultáneo de platino (100 y 500 µM) y cadmio (7.5 µM) protegió el crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica de la toxicidad del cadmio (densidad celular máxima ~2-2.5 x 10⁶ cel/mL vs. 1 x 10⁶ cel/mL de cultivo expuesto a 7.5 µM CdCl₂ de forma individual). Los resultados anteriores indicaron que (a) la exposición individual de platino no afecta la fisiología de *E. gracilis* fotoheterotrófica y (b) el platino promueve un efecto protector contra metales altamente tóxicos como el cadmio.

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. Contaminación ambiental por metales pesados

La urbanización y el crecimiento demográfico continuo están vinculados a una masiva contaminación ambiental debido a la explotación incontrolada de recursos naturales [Hardoy et al., 2001]. Por ello, ambos procesos influyen negativamente sobre la dinámica de los ecosistemas biológicos [Yeh y Huang, 2012]. Los metales pesados son algunos de los contaminantes de mayor atención, ya que su bioacumulación intracelular acarrea efectos toxicológicos para los seres vivos, incluido el humano [Nriagu, 1988; Gaur et al., 2013; Saroop y Tamchos, 2021].

Los metales pesados son elementos químicos que se caracterizan por presentar un número atómico mayor a 20 y una densidad superior a 5 g / cm^3 [Ali y Khan, 2018a; Patel et al., 2021]. Entre sus propiedades fisicoquímicas se encuentra su capacidad de disolución en cuerpos de agua ácidos ($\text{pH} < 7$) [Bourg y Loch, 1995]. En ambientes acuáticos ácidos, la concentración soluble del metal aumenta debido a que los iones hidrógeno desplazan al metal de sus sitios de unión a los componentes orgánicos del sedimento. El incremento en la concentración del metal en los cuerpos de agua promueve una mayor biodisponibilidad para los organismos que habitan en dichas zonas [Zahra et al., 2014]. Las proteínas son las macromoléculas a las que los metales pesados se unen con mayor facilidad interaccionando con sus grupos sulfhidrilo [Sharma et al., 2011; Tamás et al., 2014], y desplazan a sus cofactores inorgánicos afectando su eficiencia catalítica. Por ejemplo, el cadmio inhibe las tiol-transferasas (glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa) porque se une a los residuos de cisteína que conforman el sitio catalítico de tales enzimas, formando un complejo metal-proteína [Balali-Mood et al., 2021]. Por tal motivo, los metales pesados y metaloides están clasificados como sustancias tóxicas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos [Rai, 2018].

La presencia de metales pesados en el ambiente es el resultado de distintos procesos como los que se explican a continuación:

1. *Procesos geológicos*. Las fuentes de emisión naturales de metales pesados incluyen la meteorización de rocas, erupciones volcánicas y emisiones atmosféricas (EA) por actividad biológica. De hecho, se ha detectado que del 30-50% de EA corresponden a metales traza de origen biogénico, a partir de los cuales anualmente se libera al ambiente aproximadamente $0.20 \times 10^9 \text{ g}$ de cadmio [Nriagu, 1989].

2. *Actividades antropogénicas.* Los flujos de emisión atmosférica de metales pesados por causas naturales son relativamente bajos en comparación con las emisiones derivadas de las actividades industriales; es decir, la contaminación ambiental por metales pesados es principalmente originada por el hombre, siendo la minería la causa de contaminación más frecuente [He et al., 2009]. El suelo es el principal sitio de depósito de metales pesados [Munzeiwa et al., 2022]. Sin embargo, la contaminación se propaga hacia otras áreas debido a los efluentes industriales, acelerando su ingreso a ecosistemas acuáticos [Ali y Khan, 2018b] acumulándose a concentraciones que superan los límites permisibles [Kapahi y Sachdeva, 2019; Sharma et al., 2021]. Los drenajes mineros fomentan la acidificación de los cuerpos de agua [Jain et al., 2016], favoreciendo un ambiente oxidante, ya que los relaves compuestos por minerales ricos en sulfuros -habitualmente pirita (FeS_2)- originan un lixiviado ácido [Hu et al., 2022] que favorece la solubilidad de una gran variedad de contaminantes inorgánicos, incluyendo los metales pesados [Saria et al., 2006; Pavoni et al., 2018;]. Los drenajes mineros son la principal causa de contaminación acuática en Estados Unidos [Bergerson y Lave, 2004] porque su contaminación prevalece aun después de que las áreas mineras son abandonadas [Ighalo et al., 2022]. Aunque en México existe poca información disponible, es posible que también se favorezca la formación de drenajes ácidos de minas a causa de la presencia de jales mineros a lo largo del territorio nacional. Desafortunadamente, no existen estudios donde se explore el efecto tóxico potencial de dichos residuos mineros sobre el medio ambiente [Ramos-Arroyo y Siebe-Grabach, 2006] ya que, a diferencia de la mayoría de los países latinoamericanos, en México la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) no exige realizar la evaluación de impacto ambiental previo a la autorización de los proyectos mineros [Azamar et al., 2021, Silva-Ontiveros y Sánchez-Salazar, 2021]. La flexibilidad gubernamental en el otorgamiento de concesiones para la extracción de minerales provocó una gran cantidad de accidentes ambientales (> 200) relacionados con las actividades mineras durante la última década en el país. En la mayoría, el escurrimiento de jales y derrames de compuestos tóxicos en ríos y otros cuerpos de agua originó pérdidas ecológicas irreparables [Azamar et al., 2021], pues casi el 50% de la extensión territorial de las Áreas Naturales Protegidas está destinada a la explotación minera [Azamar y Téllez, 2022]. Los organismos acuáticos son el principal blanco de contaminación por drenajes mineros debido a que su pH ácido (pH~2) promueve (a) alteraciones en la cadena trófica [Daraz et al., 2023]; (b) muerte masiva de peces [Jain et al., 2016] y especies planctónicas como *Daphnia magna*

[Chamorro et al., 2018]. Las variaciones en el pH, además, se asocian con el retraso en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) y la modificación de los patrones de expresión de diversos receptores endocrinos en especies acuícolas pertenecientes al género *Tilapia* [Ighalo et al., 2022]. En paralelo, la quema de combustibles fósiles, el uso de biosólidos, el riego con aguas residuales, el empleo exhaustivo de automóviles, la aplicación de pesticidas y fertilizantes fosfatados son fuentes de contaminación inducidas por la acumulación de cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc [Wuana y Okieimen, 2011; Dixit et al., 2015; Ali et al., 2019]. En Norteamérica, la minería junto con el uso de pesticidas y fertilizantes liberan aproximadamente el 90% de metales pesados encontrados en el entorno [Zhou et al., 2020]. En varios poblados de México, como Zacatecas, el estrés hídrico es uno de los impactos más graves que viven las comunidades cercanas a las industrias mineras, pues el consumo de agua de la minería es mayor que el de la población [Azamar et al., 2021]. Resultado de la toxicidad ambiental de tales contaminantes, garantizar la sostenibilidad de las actividades industriales se ha vuelto una necesidad urgente, requiriendo de estrategias efectivas para su remediación [Ai et al., 2020].

1.2. Métodos de remoción de metales pesados

La remoción de metales pesados es una estrategia importante para disminuir la contaminación en áreas terrestres o ambientes acuáticos [Masindi et al., 2021]. Desafortunadamente, la mayoría de las metodologías convencionales utilizadas, presentan diferentes limitaciones como son el alto costo de operación, la mano de obra intensiva, la alteración irreversible de las propiedades de los suelos, además de la perturbación de la microflora nativa [Ali et al., 2013; Munzeiwa et al., 2022]. Por ejemplo, la precipitación química no remueve eficientemente bajas concentraciones metales pesados (<1 ppm); el intercambio iónico es inespecífico y altamente sensible a variaciones en el pH [Gunatilake, 2015; Yin et al., 2019]; mientras que la ósmosis inversa genera lodos residuales altamente contaminantes [Saleh et al., 2022]. Por lo anterior, la biorremediación se ha propuesto como una estrategia alternativa ecológicamente sostenible para remover a los metales pesados de cualquier área contaminada [Ayangbenro y Babalola, 2017].

La biorremediación emplea diversos grupos de microorganismos. Algunas microalgas del género *Euglena* como es *E. gracilis* representa un potencial candidato para remediar cuerpos de agua contaminados [Hernández-Garnica et al., 2021; Lihanová et al., 2023]. *E. gracilis* presenta una alta flexibilidad metabólica que las capacita para sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables,

como son una elevada concentración de sales, baja disponibilidad de nutrientes y temperaturas extremas. Además, está documentado que *E. gracilis* abunda en ecosistemas acuáticos ácidos (pH <3) contaminados con metales pesados provenientes de efluentes mineros [Nancucheo y Johnson, 2012], mostrando una alta capacidad de colonización en áreas expuestas a metales pesados [Leong y Chang, 2020]. Aunque está establecido que la fitorremediación es una práctica útil para la remediación de sitios contaminados con metales pesados por la rápida absorción de compuestos iónicos a través de las raíces [Yan et al., 2020], *E. gracilis* genera mayor biomasa comparado con plantas, ya que produce 3.1 kg_{peso seco}/m³ en 8 días, en comparación con *Thlaspi caerulescens*, una angiosperma hiperacumuladora de metales que produce hasta un 95% menor cantidad de biomasa en un lapso de tiempo mayor (0.05-1.3 kg_{peso seco}/m² en 6 meses) [Wójcik et al., 2005]. En paralelo, *E. gracilis* remueve con mayor eficiencia metales pesados, promoviendo su internalización y acumulación intracelular, a diferencia de diversas especies de macroalgas [García-García et al., 2016].

1.3. Toxicidad celular del cadmio

Algunos efectos del cadmio sobre la fisiología de *E. gracilis* fotoheterotrófica reportados son: (1) disminución de la velocidad de crecimiento ~50% a una concentración de cadmio de 100 µM por 8 días; sin afectar su viabilidad celular (viabilidad > 90%) [Mendoza-Cózatl et al., 2002; Mendoza-Cózatl et al., 2006]; (2) aumento en el tiempo de duplicación (~2.5 veces, de 17 a 42 h) a una concentración de cadmio > 85 µM por nueve días [Albergoni et al., 1980]; (3) disminución de la motilidad celular del 60% a una concentración de cadmio de 0.1-7.5 µM por 24 h [De Filippis et al., 1981; Ahmed y Häder, 2010], debido a una disminución en el suministro de energía para el movimiento del flagelo [De Filippis y Pallaghy, 1976; Satir y Ojakian, 1979]; (4) aumento en la velocidad de respiración celular por su efecto desacoplante [Vallee y Ulmer 1972] a una concentración de 50 µM de cadmio por diez días de exposición [Devars et al., 1998], por lo tanto, la estimulación del consumo de O₂ no se acopla a la producción de ATP [Sánchez-Thomas et al., 2016]; (5) disminución del 50% en las actividades de los complejos III y IV de la cadena transportadora de electrones a una concentración de 50 µM de cadmio por 96 h [Castro-Guerrero et al., 2008], pero sin efecto aparente en el consumo de oxígeno debido a la presencia de una oxidasa alterna (AOX). Al parecer, el cadmio a esta concentración aumenta el contenido y la

actividad (4.5 veces) de la AOX vs. células control para restaurar la respiración celular de *Euglena* [Castro-Guerrero et al., 2008].

En otras especies fotosintéticas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, la toxicidad de cadmio es mayor (IC_{50} Cd = 0.03-6 μ M) [Trevors et al., 1986], lo que demuestra que los euglénidos son altamente tolerantes porque mantienen sistemas intracelulares de defensa activos para contrarrestar los daños celulares generados por el cadmio. En *Euglena*, la fuerte presión de selección que promueven los ambientes metalíferos [Wójcik et al., 2015], favorece la presencia de varios mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados. Con respecto al cadmio, está reportado que uno de los principales mecanismos de resistencia al metal involucra su alta capacidad de acumulación intracelular (9.5-39 μ moles/g_{peso seco}) [Mendoza-Cózatl et al., 2002; Santiago-Martínez et al., 2015], a diferencia de otros microorganismos fotosintéticos, como *Chlamydomonas acidophila*, que acumula aproximadamente 2.5 μ moles/g_{peso seco} [Nishikawa et al., 2006]. El cadmio intracelular es neutralizado por diversos compuestos tiol, como la cisteína (Cys), la gamma-glutamilcisteína (γ EC), el glutatión (GSH) y las fitoquelatinas [Mendoza-Cózatl et al., 2002; García-García et al., 2016; Khatiwada et al., 2020a]. Por ejemplo, cuando *E. gracilis* es expuesta a 25 μ M CdCl₂, la relación (Cys, γ EC, GSH, fitoquelatinas) / cadmio acumulado es >2 , sugiriendo que el cadmio intracelular es totalmente quelado por los metabolitos tiol [Mendoza-Cózatl et al., 2006] una vez es internalizado en los cloroplastos [Mendoza-Cózatl et al., 2002], mitocondria o retenido en el citoplasma [Khatiwada et al., 2020b]. *E. gracilis* expuesta a 100 μ M de CdCl₂ aumenta la biosíntesis de polifosfatos y la excreción de ácidos orgánicos favoreciendo su neutralización intracelular [Moreno-Sánchez et al., 2017]. El cadmio acumulado es internalizado principalmente en los cloroplastos (60%) [Mendoza-Cózatl et al., 2002; Khatiwada et al., 2020c], el cual es activamente transportado por un aumento en el contenido de proteínas transportadoras pertenecientes a la superfamilia MFS (MFS, por sus siglas en inglés *Major Facilitator Superfamily*), a las ATPasas tipo P, y a las proteínas de tolerancia a metales, principalmente la MTP2. La acción coordinada de todas estas proteínas permite el mantenimiento de la homeostasis intracelular del cadmio [Khatiwada et al., 2020a; Khatiwada et al., 2020c], y en consecuencia disminuir su toxicidad. Otro mecanismo secundario de resistencia al cadmio involucra la adsorción de metales [García-García et al., 2018] cuando la célula es expuesta a condiciones de anaerobiosis y a altas concentraciones de cadmio (> 175 μ M por 10-17 días) [Santiago-Martínez et al., 2015]. Sin embargo, cuando la célula es expuesta a aerobiosis y a 100 μ M de cadmio, el mecanismo de

adsorción disminuye y el principal mecanismo de remoción del metal es su acumulación en el citosol y en algunos organelos [Moreno-Sánchez et al., 2017].

1.4. Toxicidad celular del platino

El platino es uno de los elementos con menor abundancia en la naturaleza [Cobelo-García et al., 2007; Bencs et al., 2011]. Sin embargo, su concentración en el medio ambiente aumenta debido al uso habitual de convertidores catalíticos para automóvil y a los efluentes hospitalarios con drogas anticancerígenas base platino (cisplatino, carbaplatino y oxaliplatino), que son los utilizados con mayor frecuencia en el sector salud contra el cáncer [Dubiella-Jackowska et al., 2009; Rottenberg et al., 2021; Zhang et al., 2022]. Los efluentes hospitalarios son desechados hacia ambientes acuáticos [Johnson et al., 2008]; de hecho, se calcula que el 75% de las drogas basadas en platino son el contaminante principal de aguas residuales. Por lo anterior, se ha propuesto al platino como un compuesto citotóxico no selectivo [Dehghanpour et al., 2020] con efecto potencial sobre la biodiversidad [Fonseca et al., 2017].

La toxicidad de platino se estudió en el alga *Chlorella vulgaris* [Krienitz, 2009]. A pesar de que la IC_{50} del cisplatino sobre el crecimiento de *C. vulgaris* se reportó aproximadamente en 0.35 mM, el análisis toxicológico se realizó después de una alta exposición al cisplatino (2 mM por 96 h) donde la síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenos) y el contenido de proteína disminuyó al 50%. Los autores indicaron que el daño celular por cadmio está asociado al estrés oxidativo medido por un aumento substancial de malondialdehído intracelular [Dehghanpour et al., 2020]. En otros microorganismos como *Daphnia magna* el cisplatino a una concentración de 0.03 nM por 24 h de exposición se une y promueve ruptura de la cadena de ADN [Parrella et al., 2015]. Al parecer, la sensibilidad (IC_{50}) a compuestos base platino es diferente hasta por dos órdenes de magnitud entre distintas especies de microalgas [Brezovsek et al., 2014]. Por ejemplo, algunas algas como *Pseudokirchneriella subcapitata* son altamente sensibles al cisplatino, ya que una concentración de 5 μ M por 72 horas disminuyó la proliferación celular al 50%. [Brezovsek et al., 2014]. Interesantemente, se ha observado que la combinación de cisplatino con otros anticancerígenos como 5-fluororacilo promueve un efecto sinérgico sobre el crecimiento de *P. subcapitata*, indicando que la presencia simultánea de varios fármacos base platino en un cuerpo de agua podría intensificar su impacto sobre el fitoplancton [Brezovsek et al., 2014]. Los valores de IC_{50} (IC_{50} 1-10 mg/L) del platino sobre el crecimiento de organismos acuáticos ha permitido que la

Comisión de las Comunidades Europeas (1996), incluyan al cisplatino como un compuesto tóxico para dichos ecosistemas [Brezovsek et al., 2014], pues a pesar de que el cisplatino presenta un riesgo ambiental aparentemente bajo [Martín et al., 2014], se ha concluido que las concentraciones de anticancerígenos en los cuerpos de agua podrían estar subestimadas y alcanzar concentraciones mayores de 2.5 μM [Franquet-Griell et al., 2017; Queirós et al., 2021].

Por otro lado, el Pt (IV) a 2.7 μM induce muerte celular (50%) en ensayos de toxicidad crónicos (21 días de exposición) en *D. magna*, [Biesinger y Christensen, 1972]. Dicha concentración es comparable con los valores reportados en la literatura para otras especies de invertebrados, incluyendo *Asellus aquaticus*, donde el platino presenta una LC_{50} de 0.5 μM (100 $\mu\text{g/L}$) después de 96 h de exposición [Rauch y Morrison, 1999]. De las especies de platino se observó que el Pt (IV) se acumula intracelularmente a mayor velocidad que el Pt (II), indicando que su internalización a la célula y toxicidad depende de la forma química en la que esté presente en el ambiente acuático [Rauch y Morrison, 1999]. Además, se ha observado que el efecto inhibitorio del platino sobre la proliferación celular de organismos fotosintéticos, como *Chlamydomonas reinhardtii*, se hace más evidente en presencia de ácidos húmicos (materia orgánica en descomposición). Se reportó que la IC_{50} de crecimiento de *C. reinhardtii* por platino es una orden de magnitud menor (de 0.6 μM a 0.01 μM) al añadir 20 mg de la materia orgánica al medio de cultivo [Hourtané et al., 2022]. La exposición de la gramínea *Lolium multiflorum* a platino promovió la síntesis de complejos de bajo peso molecular (<10 kDa) como son glutatión y las fitoquelatinas [Klueppel et al., 1998]. De manera similar, Gawronska et al., (2018) demostró que la exposición a concentraciones crecientes de Pt (II) (2.5-25 μM por 14 días) en *Arabidopsis thaliana* correlaciona con un incremento significativo en los contenidos de fitoquelatinas, consideradas como un mecanismo esencial de detoxificación de los metales pesados [Cobbett, 2000; Cobbett y Goldsbrough, 2002].

1.5. Efecto sinérgico de algunos metales pesados sobre la toxicidad del cadmio

La mayoría de los estudios toxicológicos que involucran metales pesados analizan el efecto de un solo metal [Dos Reis et al., 2022; Mera et al., 2016]. En la realidad, los cuerpos de agua están contaminados por mezclas de metales, por lo que el efecto combinado de los metales puede ser mayor al efecto determinado por la exposición individual al metal [Roell et al., 2017], produciendo efectos significativamente tóxicos para los organismos acuáticos [Faust et al., 2001]. Por esa razón, los estudios sinérgicos emergen como una herramienta potencial para dilucidar escenarios

toxicológicos similares a los que ocurren en una situación *in vivo* [Gebara et al., 2020]. La sinergia se define como la combinación de dos compuestos químicos (i.e., metales pesados) cuyo efecto combinado es mayor que la suma de sus efectos individuales [Greco et al., 1996], y se calcula utilizando diferentes modelos matemáticos [Roell et al., 2017]. El modelo de aditivismo tipo Bliss predice la respuesta aditiva C para dos compuestos con efectos A y B, siguiendo la ecuación $C = A + B - (A \times B)$, donde cada efecto se expresa como una inhibición fraccional. El efecto sinérgico de los fármacos combinados A y B se determina a partir de la diferencia entre el efecto determinado experimentalmente producido por la combinación de fármacos y los valores C derivados de la ecuación de aditivismo de tipo Bliss.

Hasta el momento, no existe literatura disponible donde se analice el efecto sinérgico o antagónico del platino sobre el cadmio. Sin embargo, es posible suponer que la adición simultánea de ambos metales afecte la fisiología de *Euglena* debido a que (a) el Pt(II) tiene una constante de afinidad mayor por tioles comparado con otros metales pesados [Wong y Stillman, 2018] y (b) la toxicidad del cadmio aumenta por la presencia de iones libres (Cd^{2+}) en disolución [Bjerregaard et al., 2015].

CAPÍTULO 2

2.1. Justificación

En la mayoría de los estudios reportados, la toxicidad de los metales pesados se ha evaluado de forma individual. Varios grupos de investigación han evaluado la interacción de dos metales pesados y su posible efecto sinérgico. El presente estudio se enfocó en la evaluación de la sinergia entre un metal pesado inocuo como el platino, en combinación con otro metal tóxico, como el cadmio. Los resultados permitirán comprender los mecanismos bioquímicos asociados a la toxicidad de las mezclas de metales contaminantes sobre algunos aspectos fisiológicos (crecimiento celular, contenido de clorofila y flujo del metabolismo energético) de *E. gracilis* como modelo de estudio.

2.2. Hipótesis

El platino potenciará el efecto tóxico del cadmio sobre la proliferación de *Euglena gracilis* fotoheterotrófica.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto sinérgico del platino sobre la toxicidad del cadmio en la proliferación del protista fotosintética *E. gracilis* cultivada en mixotrofia.

2.3.2. Objetivos particulares

Determinar el efecto de cadmio y platino y su combinación sobre:

1. La proliferación, viabilidad celular y el contenido de clorofila de *E. gracilis* fotoheterotrófica.
2. El consumo de oxígeno y la velocidad de fotosíntesis de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

3.1. Cultivo celular y condiciones de crecimiento

E. gracilis (0.05×10^6 cel/mL) se cultivó en medio Hutner estéril que contiene glutamato 34 mM, malato 15 mM, CaCO_3 2 mM, CoCl_2 8 μM , CuSO_4 3 μM , MgSO_4 2 mM, MnSO_4 10 μM , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 3 mM, KH_2PO_4 3 mM, ZnSO_4 20 μM , NaMoO_4 0.1 mM, H_3BO_3 10 μM , Na_3VO_4 0.2 μM y $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30 μM , pH 3.5 a 25 °C por 6 días hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento [Devars et al., 1998]. Previo a realizar la siembra celular se agregó 1 mL de vitaminas (tiamina 3 μM , cianocobalamina 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (0.15 nM), FeCl_2 20 μM , esterilizadas por filtración) por cada 100 mL de medio Hutner. Los cultivos se expusieron a ciclos de luz ($55 \pm 10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y oscuridad por 12 horas a 24-25°C.

Para la exposición del metal, concentraciones crecientes de cadmio (2.5-20 $\mu\text{M CdCl}_2$) y platino (100 y 500 $\mu\text{M PtCl}_2$) se añadieron a los cultivos celulares previo al inóculo celular y el crecimiento celular se registró por seis días más.

La solución stock de cadmio (Productos Químicos Monterrey, Mty., Mex.) se preparó en agua bidestilada a una concentración final de 100 mM. La solución stock de platino (Sigma-Aldrich, MO, USA) se preparó en agua regia (3HCl:HNO₃) a una concentración final de 100 mM.

3.2. Evaluación sinérgica entre metales pesados aplicando el modelo matemático del aditivismo tipo Bliss

El efecto de la combinación de los metales cadmio y platino sobre el crecimiento celular de *E. gracilis* se determinó utilizando la aproximación del aditivismo tipo Bliss [Berenbaum, 1981; Borisy et al., 2003] aplicando la siguiente ecuación matemática:

$$C = A + B (A \times B)$$

donde C es el efecto sinérgico de los fármacos sobre el crecimiento de *E. gracilis*; A y B representan la inhibición del crecimiento de cada metal cuando se aplica individualmente.

El efecto sinérgico de los metales combinados se determinó a partir de la diferencia entre el efecto inhibitorio observado experimentalmente y los valores de C derivados de la ecuación del aditivismo tipo Bliss [Robledo-Cadena et al., 2020].

3.3. Conteo y viabilidad celular

El conteo celular se realizó diariamente por seis días de cultivo con una cámara de Neubauer.

Para el conteo celular se tomaron 0.05-0.5 mL de cultivo al cual se añadió HCl al 0.05% para inmovilizar las células y se aforó a un volumen final de 1 mL con agua destilada. Las células totales vivas se contaron en los cuatro cuadrantes del hematocitómetro. La concentración total de células de cada cultivo se determinó aplicando la siguiente fórmula reportada por Green y Sambrook (2019):

$$\text{cel / mL} = (\text{número de células contadas}) \times (1 \times 10^4) \times F$$

donde F representa el factor de dilución de la muestra correspondiente y el número de células contadas representa el promedio de los 4 cuadrantes analizados.

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión con azul tripano [Louis y Siegel, 2011].

En 0.05-0.5 mL de cultivo celular se añadió una mezcla de azul tripano / ácido clorhídrico 0.05% (p/v) y se aforó un volumen final de 1 mL con agua destilada. La mezcla se incubó por dos minutos a temperatura ambiente. La viabilidad celular se expresó en forma porcentual considerando como el 100% el total de células contadas (vivas + muertas). El número de células muertas se calculó contando las células teñidas con respecto a las células vivas que no se tiñeron por azul de tripano.

3.4. Tasa específica de crecimiento y tiempo generacional

La densidad celular en cada día de crecimiento se obtuvo a partir del número total de células vivas cuantificadas en cada condición experimental.

La tasa de crecimiento específica (μ/d) -donde μ representa el número de generaciones y d la unidad de tiempo (día)- se calculó a partir de la pendiente de una gráfica de densidades celulares obtenidas en forma semilogarítmica en la fase de crecimiento exponencial con respecto al tiempo.

El tiempo generacional (T_g) expresado en horas se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$T_g = 1 / (3.32 (\log N_f - \log N_i) / (T_f - T_i))$$

donde N_i representa el número de células al tiempo inicial (T_i) y

N_f al tiempo final (T_f) de la curva de crecimiento.

3.5. Determinación de clorofila

La cuantificación del contenido de clorofila en cada condición experimental se llevó a cabo por métodos espectrofotométricos [Porra et al., 1989]. Los cultivos de *E. gracilis* se cosecharon al quinto

día de crecimiento. Posteriormente, se centrifugaron a 3500 rpm por cinco minutos. La suspensión celular ($1-5 \times 10^6$ cel/mL) se mezcló con 2.5 mL de acetona al 80% (v/v), se agitó vigorosamente por un minuto, se centrifugó a 3500 rpm por cinco minutos y el sobrenadante fue recolectado en una celda de cuarzo. La clorofila ($\mu\text{g/mL}$) se cuantificó en el sobrenadante a $\lambda_{\text{abs}}=646.6$ y 663.6 nm.

El contenido de clorofila se calculó con la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Chls (a+b)} = 17.76 A^{646.6} + 7.34 A^{663.6}$$

3.6. Velocidad de consumo de oxígeno y fotosíntesis

La velocidad de consumo de oxígeno celular se determinó polarográficamente utilizando un electrodo tipo Clark [Sánchez-Thomas et al., 2016]. En una cámara de reacción de 1.3 mL, se añadió buffer KME (KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1 mM, pH 7.2) a 25°C . Después de 10 segundos, se añadió una alícuota de $1-3 \times 10^6$ cel/mL de *Euglena* y se registró la respiración celular por 2-3 minutos más hasta que se alcanzara el 30% de oxígeno registrado. Posteriormente, se determinó la velocidad de fotosíntesis (producción de oxígeno celular) estimulada por luz azul ($1000 \mu\text{M}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este procedimiento experimental se repitió una vez más para obtener duplicados de los experimentos iniciales. Las velocidades de consumo de oxígeno y fotosíntesis se expresaron en $\text{nmol O}_2 (\text{min} \times 10^7 \text{ células})^{-1}$.

3.7. Análisis estadístico

Los datos mostrados representan el promedio \pm la desviación estándar (D.S) de al menos tres experimentos independientes (n). El análisis estadístico ANOVA/*post hoc* Scheffé se realizó utilizando el programa OriginPro 8 considerando un valor de $p < 0.05$ para establecer diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1. Cadmio

4.1.1. Efecto del cadmio sobre la proliferación celular de *E. gracilis* fotoheterotrófica

En condiciones control (ausencia de metal), la densidad celular máxima de *Euglena* fue de $2 \times 10^6 \pm 0.3$ células /mL y se alcanzó a los 5 días de cultivo (Figura 1). La velocidad específica de crecimiento fue de $0.95 \pm 0.02 \mu^{-d}$ y el tiempo de duplicación de 17 ± 0.3 h (Tabla 1).

El cadmio se añadió al inicio del cultivo (día 0) y se registró su efecto tóxico al quinto día de cultivo. La adición de 5 a 20 μM de cadmio provocó una disminución significativa del 21-85% en la densidad celular de *Euglena*, así como en la velocidad específica de crecimiento y en el tiempo de duplicación. Al sexto día de cultivo, la densidad celular disminuyó significativamente (~65% vs. células control) en la concentración de 20 μM de cadmio (Figura 1).

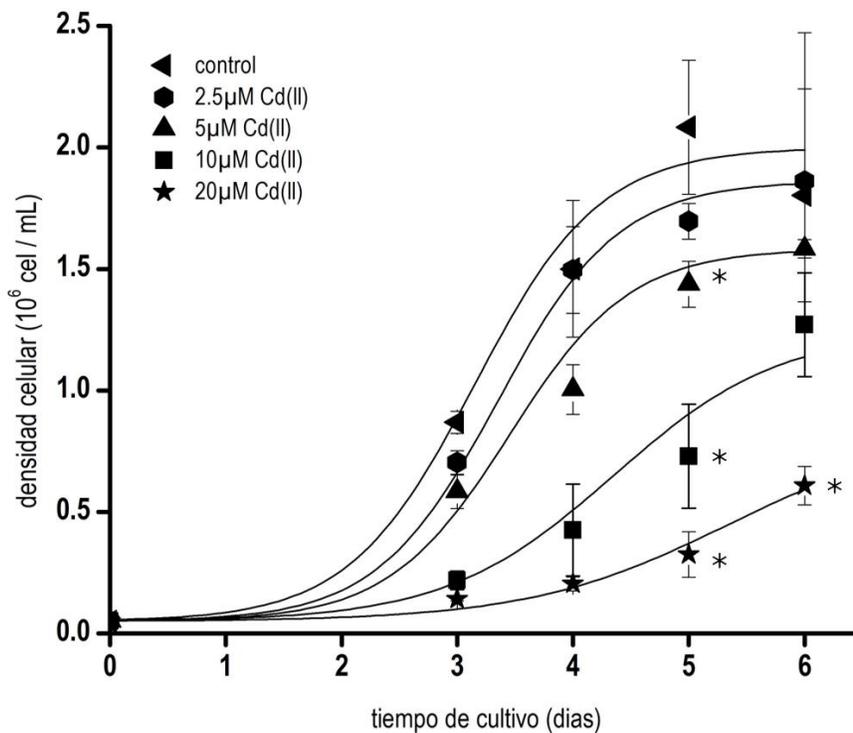


Figura 1. Curvas de crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a concentraciones crecientes de cadmio. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ versus control (ANOVA/post hoc Scheffé). Las curvas de crecimiento se ajustaron a una ecuación matemática sigmoideal de tipo dosis-respuesta a través del programa OriginPro 8.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento (μ^{-d}) y tiempos de duplicación (h) de *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a concentraciones crecientes de cadmio.

	Velocidad específica de crecimiento (μ^{-d})	Tiempo de duplicación (h)
control	0.95 \pm 0.02	17 \pm 0.3
2.5 μM Cd(II)	0.9 \pm 0.02	19 \pm 0.5
5 μM Cd(II)	0.8 \pm 0.04*	20 \pm 0.95
10 μM Cd(II)	0.5 \pm 0.06*	34 \pm 4*
20 μM Cd(II)	0.35 \pm 0.02*	48 \pm 2*

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

*P<0.05 *versus* control (ANOVA/*post hoc* Scheffé). Los parámetros se determinaron durante la fase exponencial de crecimiento.

A partir de los datos de la Figura 1 y Tabla 1, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que se define como la concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular (Figura 2). La IC₅₀ de cadmio fue de 7.5 \pm 0.07 μ M. Este valor se calculó de los gráficos de la concentración de cadmio vs. densidad celular al quinto día de cultivo, utilizando la ecuación matemática para decaimiento exponencial del programa OriginPro 8.

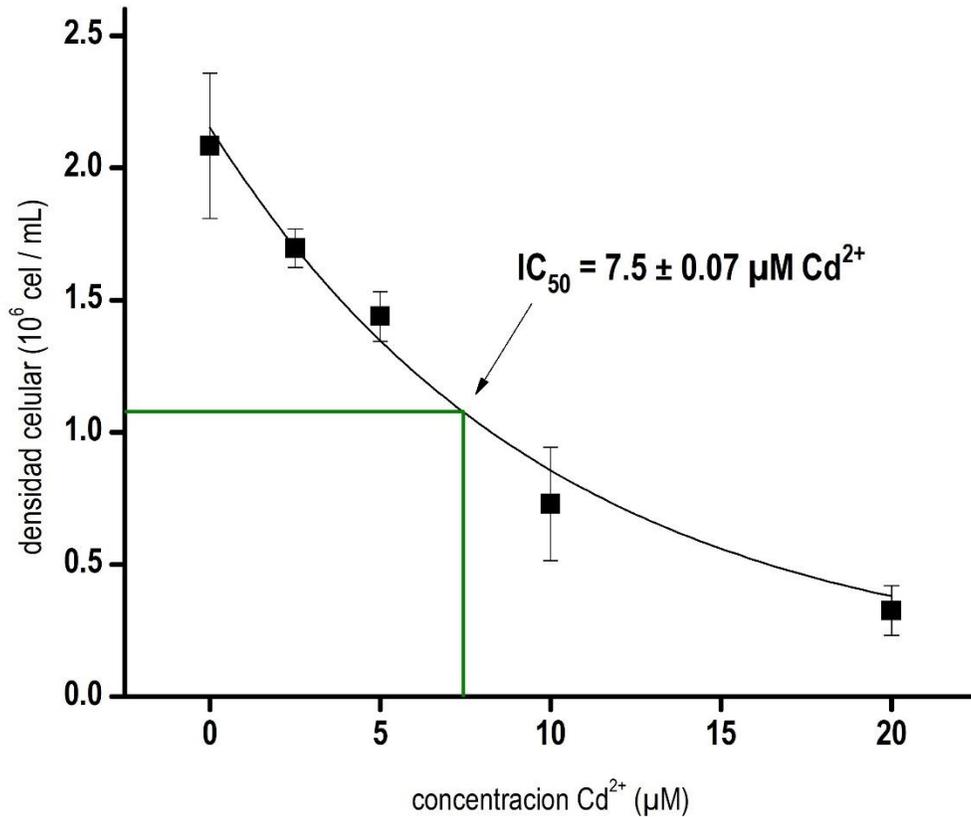


Figura 2. Efecto de concentraciones crecientes de Cd²⁺ sobre la densidad celular de *E. gracilis* al quinto día de cultivo. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Está reportado que la concentración del inóculo inicial modifica la sensibilidad a diferentes metales pesados [Brook, 1989]. Para demostrar lo anterior, se determinó la resistencia al cadmio en presencia de un inóculo mayor (0.4×10^6 cel/mL) al utilizado inicialmente (0.05×10^6 ce/mL). La Figura 3 muestra que el uso de un inóculo mayor aumenta la tolerancia de *E. gracilis* fotoheterotrófica al metal. En consecuencia, la IC₅₀ al cadmio aumentó dos veces de $7.5 \mu\text{M}$ a $15.2 \mu\text{M}$.

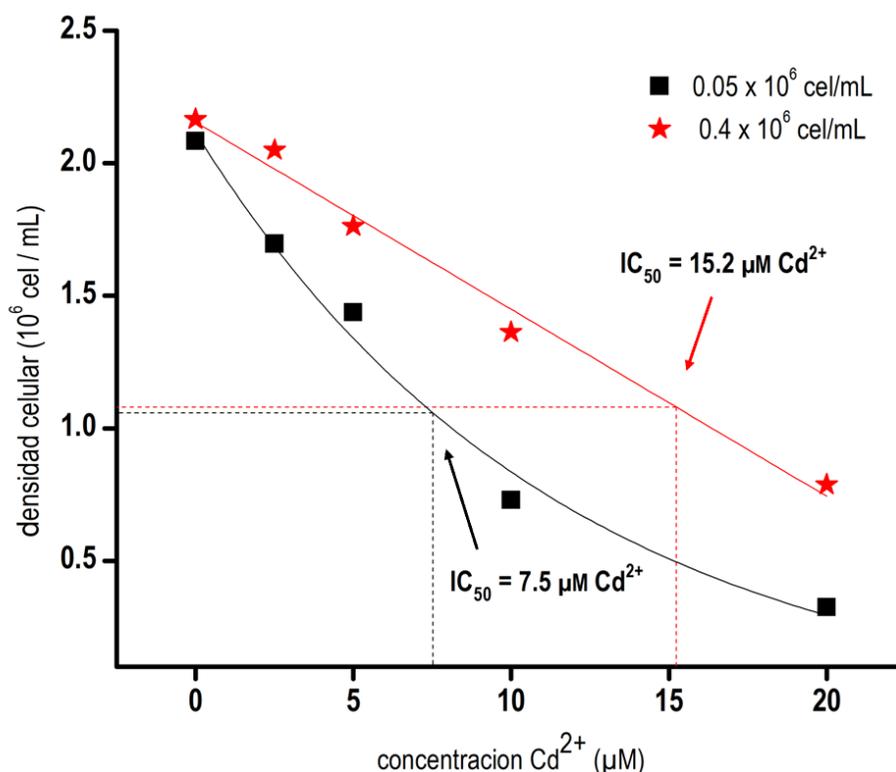


Figura 3. Efecto de concentraciones crecientes de cadmio sobre el crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica cultivada a 0.05×10^6 cel/mL y 0.4×10^6 cel/mL.

4.1.2. Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila en *E. gracilis* fotoheterotrófica

El contenido de clorofila es un parámetro fisiológico que permite la detección del efecto tóxico de algunos compuestos químicos [Xiao et al., 2023]. Por ello, se evaluó el contenido de clorofila como un indicativo de toxicidad del cadmio sobre la fisiología de *E. gracilis*. Como se observa en la Tabla 2, el cadmio a concentraciones de 2.5 a 10 μ M no alteró el contenido de clorofila. Por el contrario, la exposición a 20 μ M de cadmio incrementó significativamente (64%) la síntesis de clorofila vs. células no cultivadas en presencia del metal (células control) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

	Contenido de clorofila (μ g / 10^7 cel)
control	64 ± 5
2.5 μ M Cd(II)	79 ± 17

5 μM Cd(II)	87 \pm 12
10 μM Cd(II)	75 \pm 5
20 μM Cd(II)	105.5 \pm 9*

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

* $P < 0.05$ vs. tratamiento control (ANOVA/*post hoc* Scheffé).

4.1.3. Efecto del cadmio sobre el metabolismo energético de *E. gracilis* fotoheterotrófica

En paralelo a la determinación del contenido de clorofila, se analizaron otros parámetros metabólicos como la respiración celular y la fotosíntesis, que son altamente sensibles a la exposición de metales [Houry et al., 2020]. La respiración celular medida como consumo de oxígeno en *E. gracilis* expuesta individualmente a 7.5 μM de cadmio, que corresponde a la IC_{50} , aumentó 65 a 120% vs. células control (Tabla 3). Debido a que el cadmio estimuló la respiración celular, los experimentos de los flujos de respiración de *E. gracilis* se realizaron con una concentración celular menor (3×10^6 cel) en comparación con el cultivo control (5×10^6 cel) (Figura 4). Por el contrario, la velocidad de fotosíntesis no se modificó por la exposición crónica a cadmio (Tabla 3).

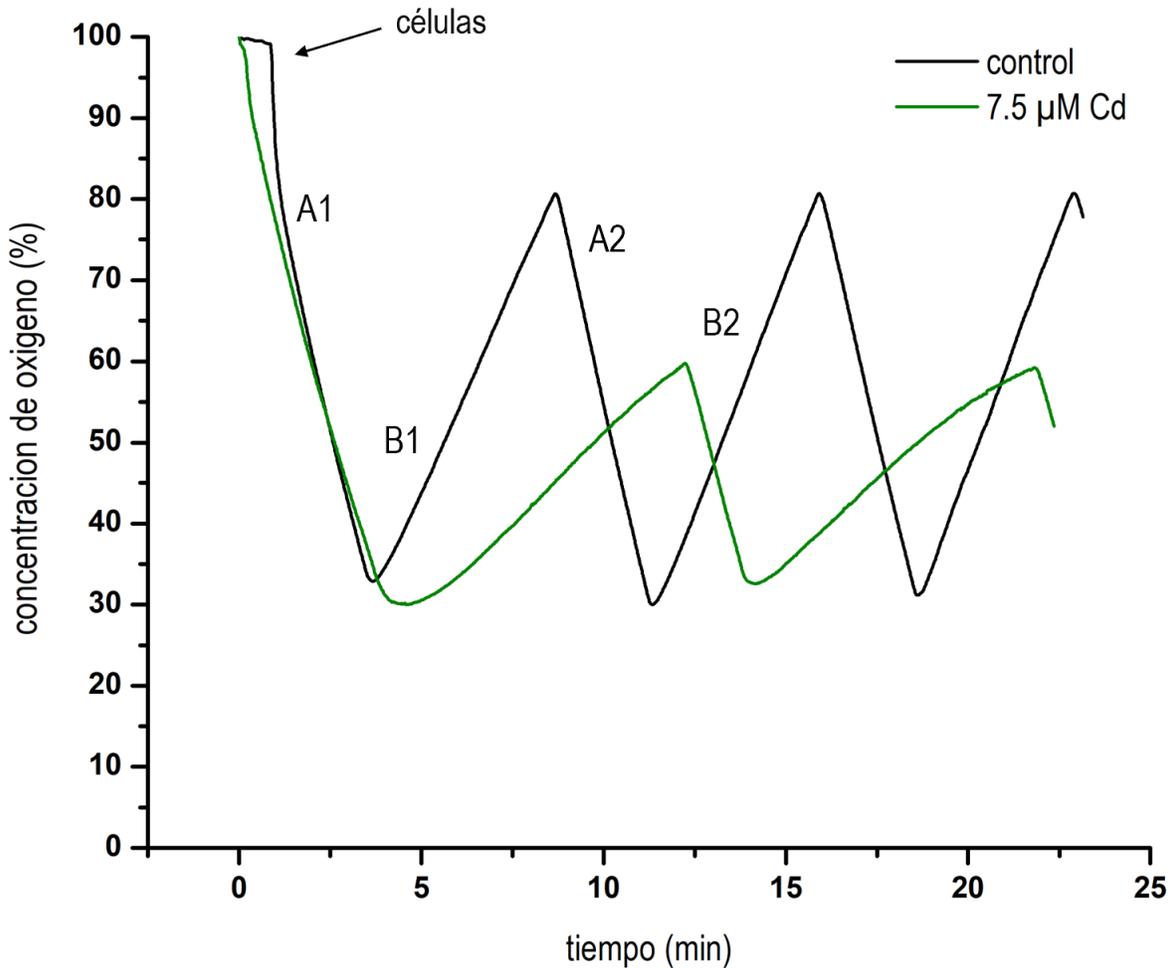


Figura 4. Efecto del cadmio sobre el consumo de oxígeno y fotosíntesis de *E. gracilis* fotoheterotrófica. Las células se añadieron después de 30 segundos de obtenida la línea basal experimental. La figura muestra un ensayo representativo de al menos dos experimentos independientes. Los trazos “A” corresponden al consumo de oxígeno y los trazos “B” corresponden a la producción de oxígeno. La estimulación de la producción de oxígeno celular (fotosíntesis) se realizó exponiendo a las células a una fuente de luz azul ($1000 \mu\text{M fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) después de que la concentración de oxígeno disuelto disminuyera hasta 30-35%.

Tabla 3. Efecto del cadmio sobre los flujos de respiración celular y fotosíntesis de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

	Trazo A1	Trazo A2	Trazo B1	Trazo B2
--	----------	----------	----------	----------

	respiración (nmol O ₂ /min/10 ⁷ cel)		producción de oxígeno (nmol O ₂ /min/10 ⁷ cel)	
control	166	158.5	87	84
7.5 μM Cd(II)	276	351	112	75

Los datos muestran la media de dos experimentos independientes (n = 2).

4.2. Platino

4.2.1. Efecto tóxico del platino sobre el crecimiento celular, la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de *E. gracilis* fotoheterotrófica

El platino a 100 μM por seis días no tuvo efecto aparente sobre el crecimiento celular, la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de *E. gracilis* (Figura 5). Concentraciones mayores de platino (500 μM) disminuyeron el crecimiento celular y la velocidad específica de crecimiento (25 % vs. control) y aumentaron el tiempo de duplicación a partir de los primeros tres días de cultivo (Tabla 4) aunque no significativamente ($P > 0.05$ ANOVA/*post hoc* Scheffé). Como control positivo, se analizó el efecto del solvente (agua regia que contiene una mezcla de HCl + HNO₃ en proporción 3:1) utilizado para disolver el platino. No se encontró efecto alguno sobre los parámetros analizados.

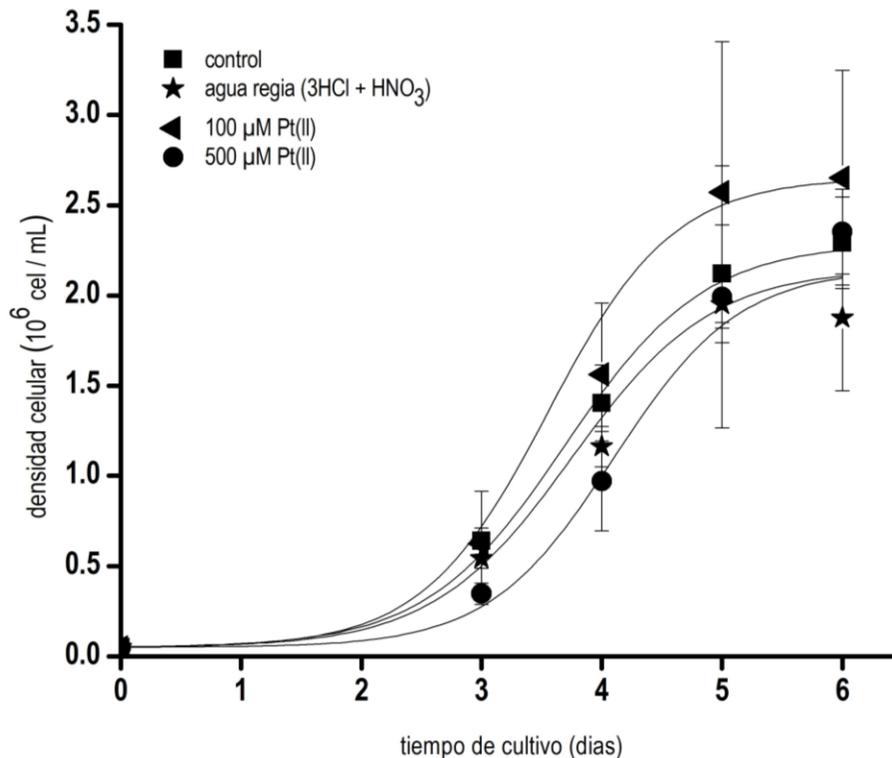


Figura 5. Curvas de crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a diferentes concentraciones de platino. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis por ANOVA/*post hoc* Scheffé con un criterio de significancia de $P < 0.05$ mostró no diferencia significativa.

Tabla 4. Velocidad de crecimiento (μ^d) y tiempos de duplicación (h) de *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a platino.

	Velocidad específica de crecimiento (μ^d)	Tiempo de duplicación (h)
control	0.85 \pm 0.04	20 \pm 1
agua regia (HCl + HNO ₃)	0.8 \pm 0.03	21 \pm 0.9
100 μ M Pt(II)	0.8 \pm 0.2	21 \pm 4
500 μ M Pt(II)	0.6 \pm 0.06	26 \pm 2.5

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. El agua regia (HCl + HNO₃) se utilizó a una proporción 3:1. Análisis estadístico por ANOVA/*post hoc* Scheffé con un criterio de significancia de $P < 0.05$ mostró no diferencia significativa.

4.2.2. Efecto del platino sobre el contenido de clorofila en *E. gracilis* fotoheterotrófica

El platino a concentraciones de 100 y 500 μ M, así como la mezcla regia no afectaron el contenido de clorofila con respecto al control (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del platino sobre el contenido de clorofila de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

	Contenido de clorofila (μ g / 10 ⁷ cel)
control	64 \pm 5
agua regia (HCl + HNO ₃)	51 \pm 18.5
100 μ M Pt(II)	57 \pm 23
500 μ M Pt(II)	58 \pm 21

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA/*post hoc* Scheffé con un criterio de significancia de $P < 0.05$ mostró no diferencia significativa.

4.2.3. Efecto del platino sobre los flujos de respiración celular y fotosíntesis en *E. gracilis* fotoheterotrófica

Como se observa en la Tabla 6, la exposición a platino 100 y 500 μM por seis días aumentó las velocidades de los flujos de respiración celular (55-120%) y fotosíntesis (85-200%) en comparación con la condición en ausencia de metal (Figura 6).

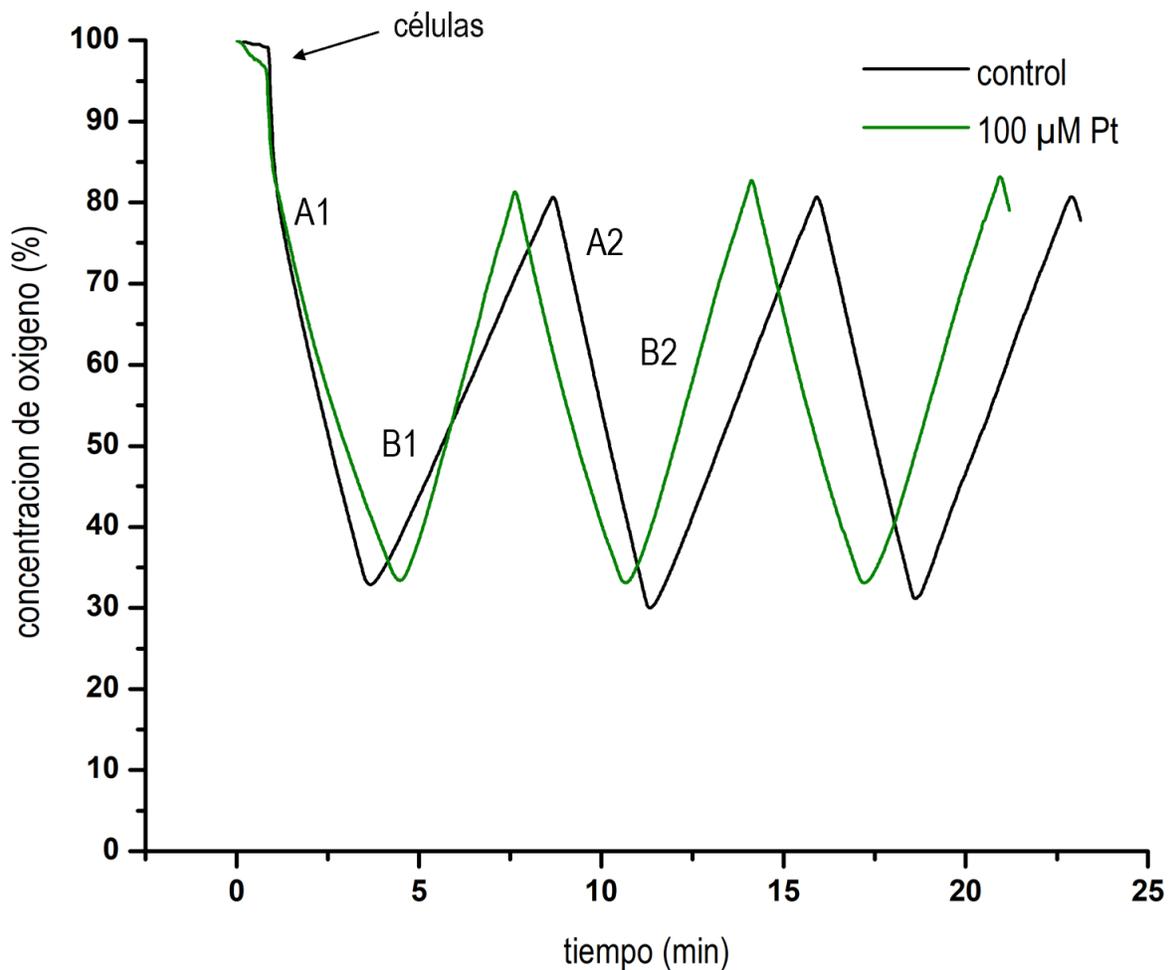


Figura 6. Efecto del platino sobre el metabolismo energético de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

Las células se añadieron después de 30 segundos de obtenida la línea basal experimental. La figura muestra un trazo representativo de al menos dos experimentos independientes. Los trazos "A" corresponden al consumo de oxígeno y los trazos "B" corresponden a la fotosíntesis. La estimulación de la producción de oxígeno celular (fotosíntesis) se realizó exponiendo a las células

a una fuente de luz azul ($1000 \mu\text{M}$ fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) después de que la concentración de oxígeno disuelto disminuyera hasta 30-35%.

Tabla 6. Efecto del platino sobre los flujos de respiración celular y fotosíntesis de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

	Trazo A1	Trazo A2	Trazo B1	Trazo B2
	respiración (nmol $\text{O}_2/\text{min}/10^7$ cel)		producción de oxígeno (nmol $\text{O}_2/\text{min}/10^7$ cel)	
control	166	158.5	87	84
100 μM Pt	261.5	251	170	155
500 μM Pt	296	346	259	228

Los datos muestran la media de dos experimentos independientes ($n = 2$).

4.3. Combinación de platino y cadmio

4.3.1. Determinación del efecto de la combinación de platino y cadmio utilizando la aproximación del aditivismo tipo Bliss

En este estudio se evaluó el efecto de la combinación de cadmio y platino, con la intención de observar un potencial efecto sinérgico entre ambos metales en *E. gracilis*. Para ello se utilizó la aproximación del aditivismo tipo Bliss (ATB). El ATB identifica tres tipos de aditivismo diferentes dependiendo de la respuesta observada en los compuestos a evaluar: (1) el infra-aditivo, donde la respuesta de la combinación de dos compuestos es menor que la suma de sus efectos individuales, lo cual implica que uno de los compuestos disminuye el efecto del otro (2) el aditivo, en el que la respuesta de la combinación de dos compuestos es igual a la suma algebraica de sus efectos individuales y (3) el tipo supra-aditivo, donde la respuesta de la combinación de dos compuestos es mayor a la suma de sus efectos individuales implicando un efecto potenciador o sinérgico.

Con el objetivo de evaluar si la combinación de cadmio y platino presentan un efecto sinérgico sobre la proliferación de *E. gracilis*, las células fueron expuestas a dichos metales a sus respectivos valores de IC_{50} (7.5 μM cadmio) y subIC_{50} (100 y 500 μM de platino) individualmente y en combinación [Robledo-Cadena et al., 2020].

En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de inhibición sobre el crecimiento celular de *E. gracilis* en presencia de cada metal aplicado al cultivo de manera individual y en combinación.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica en presencia de cada metal empleado individualmente y en combinación.

	Platino (μM)		
Cadmio (μM)	0	100	500
0	0	0	7 ± 7
7.5	49 ± 6	9 ± 8	0
75	91 ± 4	97 ± 1	93 ± 1

Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes (n=3)

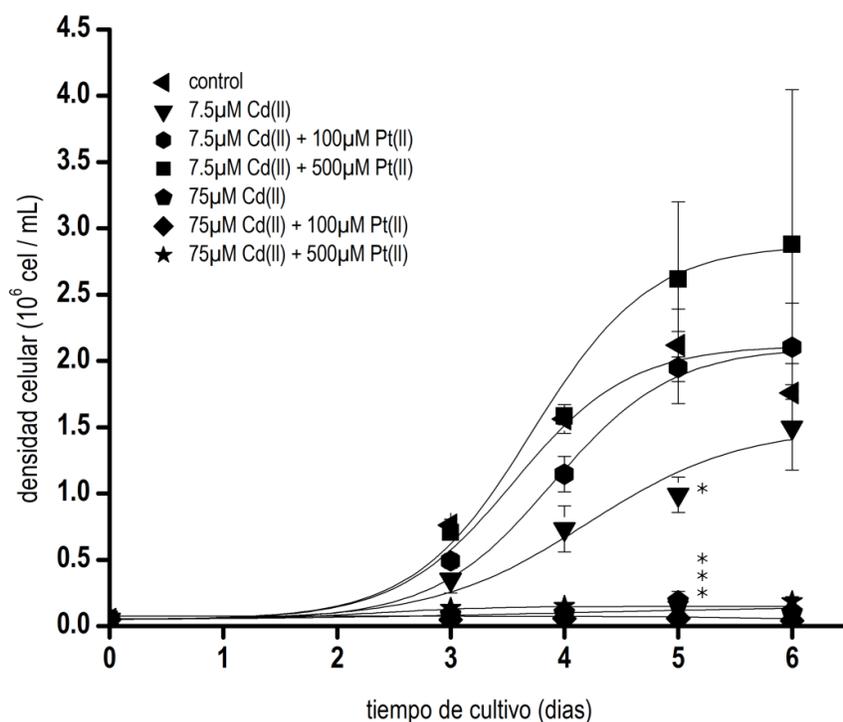


Figura 7. Curvas crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a la combinación de cadmio y platino. Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. *P<0.05 versus control (ANOVA/post hoc Scheffé).

Como se observa, 7.5 μM de cadmio inhibe el 50% del crecimiento de *E. gracilis*, tal como se describió en los apartados 4.1 de la sección de resultados.

La aplicación conjunta de cadmio 7.5 μM y platino 100 o 500 μM disminuyó el efecto tóxico del cadmio promoviendo el crecimiento de *E. gracilis* más del 90%, indicando un efecto protector. Por el contrario, el platino 100 o 500 μM no fue capaz de revertir el efecto tóxico del cadmio 75 μM (Figura 7).

Para dilucidar el tipo de sinergia encontrada en la combinación de cadmio y platino se construyeron matrices de concentración como las que se ilustran en la Tabla 8 y se aplicó la aproximación matemática para el cálculo del aditivismo tipo Bliss.

Tabla 8. Determinación de la respuesta aditiva “C” para los dos metales ensayados en combinación.

	Platino (μM)		
Cadmio (μM)	0	100	500
0	0	0	0
7.5	0	0.49	0.53
75	0	0	0

Para el cálculo de C, se aplicó la ecuación matemática $C = A + B - (A \times B)$ tal como se describe en la sección 3.2 de Material y Métodos. El valor C es un valor fraccional que representa el porcentaje de inhibición esperado a partir de los efectos observados en monoterapia.

Por ejemplo, para el cálculo de la respuesta aditiva “C” de la combinación de cadmio 7.5 μM y platino 100 μM se consideró lo siguiente. El valor A es el valor fraccional de la inhibición de cadmio sin combinación que corresponde a 0.49. El valor B es el valor fraccional de la inhibición de platino sin combinación que corresponde 0. la fórmula para el cálculo de C o respuesta aditiva se tiene: $C = 0.49 + 0 - (0.49 \times 0)$, esto da un valor de 0.49 Aplicando, tal como se indica en la Tabla 8. Este procedimiento matemático se realizó para las otras combinaciones de cadmio y platino.

Con el cálculo de la respuesta aditiva “C” es posible calcular el aditivismo tipo Bliss que matemáticamente es el valor resultante de la resta del valor de inhibición del crecimiento experimentalmente determinado menos el valor “C” calculado de la Tabla 8 [Berenbaum, 1981; Borisy et al., 2003].

Como se observa en la Tabla 9 la combinación de cadmio 7.5 μM + platino 100 o 500 μM resultó en valores con un signo negativo de ATB. Estos valores negativos predicen un comportamiento infra-aditivo [Robledo-Cadena et al., 2020] sugiriendo que el platino interviene en la interacción del cadmio en *E. gracilis* disminuyendo su efecto tóxico, tal como se observó en la Figura 7.

Tabla 9. Valores del aditivismo tipo Bliss para la identificación de sinergia entre cadmio y platino en *E. gracilis*.

	ATB		
	platino (μM)		
cadmio (μM)	0	100	500
0	0	0	0
7.5	0	-0.40	-0.53

El valor del Aditivismo tipo Bliss (ATB) se calculó como $\text{ATB} = \text{valor de inhibición del crecimiento experimentalmente determinado en combinación} - \text{el valor "C" obtenido de la Tabla 8}$.

Para confirmar el efecto infra-aditivo encontrado en la combinación de los metales a las concentraciones ensayadas por el método de aditivismo tipo Bliss se realizó un análisis de calorimetría utilizando un mapa de calor el cual revela por color el tipo de sinergia encontrada [Ianevski et al., 2022] (Figura 8).

Según Gidari et al. (2022) los valores en verde claramente resaltan los valores negativos indicando un efecto infra-aditivo, en el que la presencia de platino atenúa la toxicidad del cadmio. Por el contrario, el color rojo (valores positivos) muestran un comportamiento de tipo supra-aditivo, en el cual el platino incrementa el efecto tóxico del cadmio.

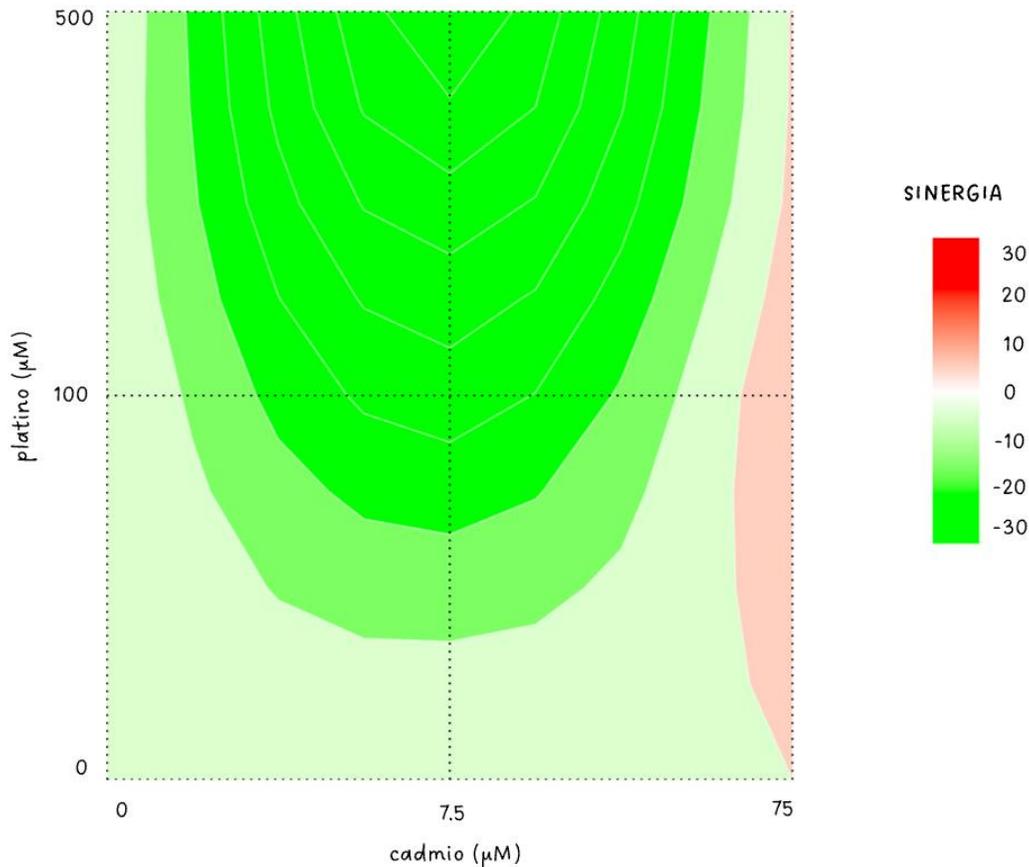


Figura 8. Mapa de calor que ilustra el efecto infra-aditivo del platino sobre la toxicidad del cadmio en la proliferación de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

4.3.2. Combinación del cadmio y platino sobre algunos parámetros fisiológicos de *E. gracilis* fotoheterotrófica

Una vez que se identificó el efecto antagónico del platino sobre el cadmio, se analizó la combinación de ambos metales sobre otros parámetros fisiológicos en *E. gracilis* como son la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y el contenido de clorofila. Tal como se muestra en las Tablas 10 y 11, la combinación de cadmio (7.5 μM) y platino (100 μM) no modificó ninguno de los parámetros evaluados. La combinación de cadmio y platino (500 μM) promovió un aumento significativo del 50% en la velocidad de crecimiento, y a su vez, una ligera disminución no significativa ($p > 0.05$ ANOVA/*post hoc* Scheffé) del 17% en los niveles de clorofila, en comparación con el cultivo de *E. gracilis* expuesto a cadmio individualmente (Tabla 10, 11).

Tabla 10. Efecto de la combinación de cadmio y platino sobre la velocidad de crecimiento (μ^{-d}) y tiempos de duplicación (h) de *E. gracilis*.

	Velocidad específica de crecimiento (μ^{-d})	Tiempo de duplicación (horas)
control	0.9 \pm 0.02*	18 \pm 0.4*
7.5 μ M Cd(II)	0.6 \pm 0.09	26 \pm 4
7.5 μ M Cd(II) + 100 μ M Pt(II)	0.8 \pm 0.04*	22 \pm 1
7.5 μ M Cd(II) + 500 μ M Pt(II)	0.9 \pm 0.01*	19 \pm 0.3*

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA/*post hoc* Scheffé con un criterio de significancia de *P<0.05 versus cultivo expuesto a 7.5 μ M de cadmio.

Tabla 11. Efecto de la combinación de cadmio y platino sobre el contenido de clorofila de *E. gracilis* fotoheterotrófica.

	contenido de clorofila (μ g / 10^7 cel)
control	64 \pm 5
7.5 μ M Cd(II)	90 \pm 26
7.5 μ M Cd(II) + 100 μ M Pt	97 \pm 25
7.5 μ M Cd(II) + 500 μ M Pt	75 \pm 12

Los datos muestran la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA/*post hoc* Scheffé con un criterio de significancia de *P<0.05 versus cultivo expuesto a 7.5 μ M de cadmio.

CAPÍTULO 5

Discusión

5.1. El cadmio disminuye la proliferación celular, velocidad de crecimiento y contenido de clorofila de *E. gracilis* fotoheterotrófica

Diversas publicaciones científicas, incluyendo las de mi grupo de investigación han documentado el efecto tóxico del cadmio sobre la fisiología de *E. gracilis* [Devars et al., 1998; Mendoza-Cózatl et al., 2002; 2006; Ahmed y Häder, 2010; Sánchez-Thomas et al., 2016; Cao et al., 2022]. En el presente estudio se confirmó que el cadmio (5-20 μM por cinco días) afecta significativamente la proliferación de *E. gracilis* tal como se ha reportado en la misma línea celular [García-García et al., 2012]. Sin embargo, en este estudio se encontró que las concentraciones a las que se observó mayor efecto tóxico del cadmio sobre la proliferación son menores (~ 2 veces) a lo reportado por el mismo grupo de trabajo [García-García et al., 2012; Sánchez-Thomas et al., 2016]; por ejemplo, la IC_{50} de cadmio se reportó de 13-16 μM sobre el crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica al término de la fase exponencial (\sim día 5) comparado con la IC_{50} de cadmio = 7.5 μM a los cinco días de cultivo determinada en este estudio. La explicación de estas discrepancias se debe a los cambios en las condiciones experimentales ensayadas que se realizaron en mi estudio. Por ejemplo, los experimentos de García-García (2012) y Sánchez-Thomas (2016) se realizaron con un inóculo celular inicial de 200×10^3 cel/mL mientras que los experimentos del presente estudio se realizaron con un inóculo inicial 4 veces menor. Lo anterior porque experimentalmente se observó un acortamiento de la fase exponencial de crecimiento, posiblemente por la baja disponibilidad lumínica presente en el cuarto de cultivo (55 ± 10 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La luz es un factor abiótico que determina la cantidad de biomasa producida por organismos fotosintéticos. La exposición a una mayor intensidad lumínica promueve un incremento en la proliferación celular [Campos Guedes et al., 2023]. En el grupo de trabajo, la exposición de *E. gracilis* fotoheterotrófica a ~ 80 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ permitió alcanzar densidades celulares de hasta 5×10^6 cel/mL después de ocho días de cultivo [Devars et al., 1998].

De hecho, está documentado que, a mayor concentración del inóculo inicial, la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de cualquier compuesto evaluado es mayor [Brook, 1989; Moreno-Garrido et al., 2000]. Otra diferencia que realizamos en la parte experimental fue la disminución en la concentración de zinc, un metal traza esencial para el crecimiento de las microalgas, el cual actúa como cofactor y activador de una gran cantidad de reacciones enzimáticas [Fox y Zimba, 2018].

Comparado con la concentración de zinc de 300 μM utilizada por Devars et al., (1998), la disminución de la concentración extracelular de zinc hasta 20 μM se realizó porque está descrito que cantidades de zinc $>75 \mu\text{M}$ disminuyen la tasa de crecimiento de organismos fotosintéticos [Monteiro et al., 2011]. Además, está reportado que la presencia de altas concentraciones de zinc disminuye la toxicidad de cadmio debido a su comportamiento antagónico [Gingrich et al., 1984]. En el trabajo de Devars et al., (1998) la presencia de 300 μM de zinc aumentó la IC_{50} de cadmio hasta 100 μM después de ocho días de cultivo [Devars et al., 1998]. Entre los mecanismos moleculares involucrados destacan (a) la baja internalización de cadmio por la acumulación intracelular masiva de zinc [Sánchez-Thomas et al., 2016; Wah Chu y Chow, 2002; Lavoie et al., 2012] y (b) la síntesis mediada por zinc de la ascorbato peroxidasa, glutatión S-transferasa y glutatión peroxidasa, quienes modulan los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno generadas de forma indirecta por la acumulación intracelular de cadmio [Aravind y Prasad, 2005]. El efecto tóxico del cadmio también se ha reportado en otros tipos de microalgas como *Chlorella vulgaris* donde se encontró que el cadmio (2 μM) por 48 h, disminuyó la síntesis de clorofila y promovió un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno [Qian et al., 2009]. Por otro lado, la exposición a 250 μM de cadmio durante 40 h en *Chlorella sorokiniana*, afectó negativamente diferentes vías metabólicas, como la fotosíntesis, fosforilación oxidativa, glicólisis, el ciclo de Krebs, además de la biosíntesis de proteínas ribosomales, resultando en una disminución del crecimiento [León-Vaz et al., 2021]. El efecto antiproliferativo del cadmio también se ha descrito en la especie *Chlamydomonas moewusii*, donde se observó una IC_{50} de 36.5 μM después de 96 h de exposición, y simultáneamente, un incremento significativo en el contenido intracelular de compuestos tiol (e.g. cisteína y fitoquelatinas) [Suárez et al., 2020].

Entre los mecanismos moleculares reportados para explicar el efecto del cadmio sobre la proliferación celular se encuentran:

(1) La alta afinidad del metal por los grupos sulfhidrilo del complejo de la DNA polimerasa [Bonaly et al., 1980], retrasando la fase S del ciclo celular [Misra et al., 2003]. Sin embargo, algunos estudios en *E. gracilis* reportan que altas concentraciones de cadmio (44-500 μM) incrementan el contenido de ácidos nucleicos [Bonaly et al., 1980; Nakano et al., 1978] (2) el cadmio afecta el ensamblaje de los microtúbulos del citoesqueleto [Xu et al., 2009], alterando la división celular [Nakano et al., 1978] y promoviendo que *E. gracilis* esté detenida en la fase S/G₂ [Bonaly et al., 1980] y (3) la disminución

de la producción de energía por el efecto desacoplante del cadmio [Devars et al., 1998; Sánchez-Thomas et al., 2016] (el cual se explicará en secciones posteriores).

Con respecto a la clorofila, el cadmio (7.5 μM por 6 días) promovió un aumento significativo del 64% vs. células control, similar al reportado por Navarro et al., (1997) en *E. gracilis* mixotrófica expuesta a concentraciones superiores de 500 μM después de 6-7 días de exposición. Sin embargo, en otros estudios se demostró que altas concentraciones de cadmio (500 μM) disminuye el contenido de clorofila en *E. gracilis*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella pyrenoidosa* [Chandrashekharaiah et al., 2020; He et al., 2021].

5.2. El cadmio disminuye la función mitocondrial sin afectar la fotosíntesis de *E. gracilis* fotoheterotrófica

La exposición a cadmio estimuló la respiración celular de *E. gracilis*, concordando con lo reportado por Devars et al., (1998). Lo anterior se explica por el efecto desacoplante del cadmio sobre la cadena respiratoria [Vallee y Ulmer, 1972; Sánchez-Thomas et al., 2016; Finger-Teixeira et al., 2021]. Un desacoplante clásico aumenta el transporte electrónico de la cadena respiratoria (*i.e.*, aumenta el consumo de oxígeno celular) y promueve el transporte de protones del espacio intermembrana a la matriz, disipando su gradiente químico. La actividad de la ATP sintetasa disminuye porque los protones no son suficientes para impulsar la síntesis de ATP [Nicholls, 2002] promoviendo la disfunción mitocondrial.

Contrario a lo observado en el consumo de oxígeno, el cadmio no modificó el flujo de fotosíntesis tal como se ha reportado por Devars et al., (1998) y Sánchez-Thomas et al., (2016) en *E. gracilis* fotoheterotrófica expuesta a 200 μM de cadmio. Al respecto, está reportado que el cadmio (200 μM por ocho días) aumenta el contenido de tioles (cisteína, glutatión y fitoquelatinas) en el cloroplasto hasta 30 veces, lo que promueve que el cadmio sea secuestrado e inactivado y en consecuencia no afecte el proceso fotosintético [Mendoza-Cózatl et al., 2006; Mendoza-Cózatl y Moreno-Sánchez, 2005].

5.3. El platino (100 y 500 μM) no afecta la proliferación celular de *E. gracilis* fotoheterotrófica

El ion cloruro (Cl^-) comúnmente encontrado en el ambiente, favorece la especiación del platino hacia complejos solubles, los cuales pueden transportarse con facilidad a lo largo de los sistemas biológicos [Balaram, 2020]. La exposición de *E. gracilis* fotoheterotrófica a platino (PtCl_2) 100 y 500 μM no modificó ninguno de los parámetros fisiológicos evaluados (velocidad de proliferación,

tiempo generacional, o contenido de clorofila). Dichos resultados concuerdan con lo reportado por Gawronska et al., (2018), donde se concluye que el platino en forma de $PtCl_2$ es un metal inocuo (no tóxico) ($< 2.5 \mu M$ / 15 días de incubación) en *A. thaliana*. Otros derivados del platino como el ácido hexacloroplatínico (H_2PtCl_6) a dosis bajas ($0.6-1.8 \mu M$ por 32 días) disminuye significativamente la tasa de proliferación de *E. gracilis* expuesta a un severo estrés nutricional [Barnes y Talbert, 1984]. Sin embargo, los autores no reportan si el H_2PtCl_6 es tóxico en condiciones óptimas de crecimiento [Barnes y Talbert, 1984], por lo que no es claro si la toxicidad del platino aumentó por el estrés nutricional. En la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, la exposición a $PtCl_4$ ($0.25-1 \mu M$) disminuyó la densidad celular al 50% en 3 días de crecimiento [Bednarova et al., 2012]. Los resultados previos sugieren que la toxicidad de platino está relacionada con la especie química del mismo [Bednarova et al., 2012].

5.4. El platino estimula el metabolismo energético de *E. gracilis* fotoheterotrófica

En *E. gracilis* fotoheterotrófica, el platino estimuló el flujo de respiración celular. Lo anterior, puede explicarse por (a) un posible efecto desacoplante del platino o (b) que la exposición al metal promueva la sobreexpresión, y en consecuencia la actividad, de enzimas consumidoras de oxígeno. Al respecto, está publicado que en *C. reinhardtii*, la exposición a mercurio ($4 \mu M$ por siete días) aumenta la expresión de la hemo oxigenasa-1 [Wei et al., 2011], cuya función es consumir oxígeno y producir monóxido de carbono [Kikuchi et al., 2005]. El monóxido de carbono es una molécula señalizadora que favorece la resistencia a metales pesados al reducir la acumulación intracelular, además de inducir la respuesta antioxidante, permitiendo el restablecimiento del crecimiento celular [Wei et al., 2011]. Hasta la fecha, no se ha reportado que el platino tenga un efecto desacoplante en ningún microorganismo. Sin embargo, el hecho de que la proliferación celular no se altere por platino sugiere que el efecto desacoplante no es el mecanismo asociado al aumento en el consumo de oxígeno celular de *Euglena*. Con respecto al proceso de producción de oxígeno (la fotosíntesis), es probable que la fotólisis del agua se encuentre desacoplada por la presencia del metal, ya que en la microalga *Scenedesmus incrassatulus* se observó un efecto similar. La exposición a bajas concentraciones de cobre ($0.629-1.887 \mu M$ durante seis días) incrementó la velocidad de producción de oxígeno, y en paralelo, disminuyó el crecimiento celular [Perales-Vela et al., 2007]. Si este es el mecanismo molecular implicado, entonces cabría suponer que la respiración celular o bien, el consumo de oxígeno aumenta como un mecanismo compensatorio para estimular la producción de energía requerida para la proliferación celular. Para

dilucidar el mecanismo que impulsa el consumo (respiración) y la producción (fotosíntesis) de oxígeno celular en *E. gracilis*, sería necesario realizar ensayos con inhibidores respiratorios (antimicina, azida o cianuro) y desacoplantes clásicos (CCCP, DNP) para demostrar el posible efecto del metal sobre dichas vías metabólicas. Este desarrollo experimental está en proceso de ser realizado en mi grupo de investigación.

5.5. El platino disminuye la toxicidad del cadmio en *E. gracilis* fotoheterotrófica

La mayoría de los estudios de toxicidad con metales se realiza en microorganismos expuestos a un solo metal [Wah Chu y Chow, 2022]. Desafortunadamente, el estudio de los efectos toxicológicos producidos por la combinación de diferentes metales sobre parámetros fisiológicos de diversos microorganismos es un campo poco explorado, pero con un alto potencial de investigación [Mera et al., 2016]. Uno de los metales pesados comúnmente encontrados en cuerpos de aguas contaminados es el cadmio [León-Vaz et al., 2021]. Sin embargo, pocos estudios se enfocan a analizar su efecto en presencia de otros metales. Por ejemplo, se ha demostrado que el mercurio, el plomo y el cobalto afectan la respuesta tóxica del cadmio. Avilés et al., (2003) demostró que el mercurio (1.5 μM HgCl_2) aumentó la resistencia a cadmio en células de *E. gracilis* heterotróficas cultivadas con L-lactato como fuente de carbono. Al parecer, el mercurio promueve (a) la síntesis de glutatión, cisteína y ácidos dicarboxílicos como malato, que forman complejos con el cadmio disminuyendo su efecto tóxico y (b) la compartimentalización del cadmio en la mitocondria reduciendo su concentración en el citosol y en consecuencia su toxicidad [Avilés et al., 2003]. Por el contrario, el plomo (100-200 μM) disminuye la capacidad de remoción del cadmio extracelular porque es un inductor débil de la síntesis de fitoquelatinas en *E. gracilis* fotoheterotrófica [Mendoza-Cózatl et al., 2006]. La exposición simultánea de cobalto (>1.7 μM) y cadmio (<0.3 μM) produce un efecto sinérgico sobre el crecimiento en *Raphidocelis subcapitata* [Dos Reis et al., 2022] probablemente por un incremento en la permeabilidad de la membrana celular y como consecuencia un aumento en la acumulación intracelular de los metales aumentando su toxicidad [Starodub et al., 1987]. Por el contrario, en la microalga *Chlorella vulgaris*, la exposición de 9.5 μM de cobalto y 0.89 μM de cadmio por 96 h promueve un aumento en la proliferación celular (~15%) respecto a lo esperado por el valor teórico calculado de aditivismo [Rachlin y Grosso, 1993]. Lo anterior es de importancia porque está reportado que la toxicidad de un metal expuesto individualmente a un microorganismo tiene una respuesta diferente a la observada en una mezcla de dicho metal con otros [Koppel et al., 2018].

Hasta la fecha no existen estudios donde el cadmio se haya combinado con el platino. Lo anterior toma relevancia porque recientemente se ha calculado que la concentración de platino en el ambiente y en los cuerpos de agua se ha incrementado hasta 25 veces, derivado de la fabricación de convertidores catalíticos para automóvil y la síntesis de drogas anticancerígenas [Ruchter et al., 2014; Hourtané et al., 2022].

Por lo tanto, el presente estudio resulta de interés biotecnológico porque se propone por primera vez que el platino tiene efecto antagónico sobre la toxicidad del cadmio, disminuyendo su efecto nocivo sobre la fisiología de *E. gracilis* fotoheterotrófica. Desde el punto de vista químico no es posible detectar si el platino interactúa con el cadmio. Sin embargo, está documentado que varios metales como el zinc y cobalto son antagónicos con el cadmio, porque compiten por los sitios de unión a proteínas, sobre todo aquellas involucradas en los sistemas de transporte [Bremner y Beattie, 1995; Franklin et al., 2002; Monteiro et al., 2011; Dos Reis et al., 2022]. La exposición de diferentes especies de microalgas, como *E. gracilis* y *C. vulgaris*, a metales pesados, principalmente cadmio, aumenta el contenido de metalotioneínas (e.g. fitoquelatinas), proteínas compuestas por más de 30% de residuos de cisteína [Mendoza-Cózatl et al., 2002, 2006; Zhang et al., 2014]. De igual manera, la exposición a platino incrementa los niveles de glutatión, metalotioneínas, y de proteínas pertenecientes a la familia de transportadores ABC (por sus siglas en inglés *ATP-binding-cassette*) [Huang et al., 2021]. Estos transportadores promueven la salida de metales pesados (e.g. cadmio) del citosol al espacio extracelular disminuyendo su toxicidad en organismos fotosintéticos como *Synechocystis* sp. y *Auxenochlorella protothecoides* [Lu et al., 2019; Tian et al., 2022]. Por lo anterior, es posible que la exposición de *E. gracilis* fotoheterotrófica a la combinación de cadmio y platino promueva que el platino (100 o 500 μM) favorezca la salida de metales como el cadmio permitiendo que la fisiología de *Euglena* no se altere.

CAPÍTULO 6

Sumario

1. El cadmio disminuyó el crecimiento de *E. gracilis* fotoheterotrófica al 50% con un valor de IC₅₀ de 7.5 µM.
2. El cadmio (IC₅₀) promovió un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa sin efecto aparente sobre la fotosíntesis.
3. El platino (100 y 500 µM) no afectó la proliferación de *E. gracilis*, pero se observó un efecto estimulador sobre la fosforilación oxidativa y fotosíntesis.
4. El platino (100 y 500 µM) en combinación con cadmio (7.5 µM) ejerció un efecto infra-aditivo sobre la proliferación celular, disminuyendo el efecto tóxico del cadmio.

CAPÍTULO 7

Conclusión

El platino promueve un efecto infra-aditivo sobre la toxicidad del cadmio evitando que éste mantenga su toxicidad sobre *Euglena gracilis* fotoheterotrófica.

CAPÍTULO 8

Referencias bibliográficas

Ahmed HA y Häder D. (2010). Rapid ecotoxicological bioassay of nickel and cadmium using motility and photosynthetic parameters of *Euglena gracilis*. *Environ Exp Bot.* 69: 68-75.

Ai C, Hou S, Yan Z, Zheng X, Amanze C, Chai L, Qiu G y Zeng W. (2020). Recovery of metals from acid mine drainage by bioelectrochemical system inoculated with a novel exoelectrogen, *Pseudomonas* sp. E8. *Microorganisms.* 8: 41.

Albergoni V, Piccinni E y Coppellotti O. (1980). Response to heavy metals in organisms. Excretion and accumulation of physiological and non-physiological metals in *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol.* 67: 121-127.

Ali H y Khan E. (2018a). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term 'heavy metals' – proposal of a comprehensive definition. *Toxicol Environ Chem.* 100: 6-19.

Ali H y Khan E. (2018b). Bioaccumulation of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in freshwater fish. Risk to human health. *Environ Chem Lett.* 16: 903–917.

Ali H, Khan E y Ilahi I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity and bioaccumulation. *J Chem.* 2019: 6730305.

Ali H, Khan E y Sajad MA. (2013). Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere.* 91: 869–881.

Aravind P y Prasad MN. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiol Biochem.* 43: 107-116.

Avilés C, Loza-Tavera H, Terry N y Moreno-Sánchez R. (2003). Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol.* 180: 1-10.

Ayangbenro AS y Babalola OO. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *Int J Environ Res Public Health.* 14: 94.

Azamar A y Téllez I. (2022). El resurgimiento de la minería en México. En Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. *Minería en México: panorama social, ambiental y económico.* Universidad Autónoma Metropolitana. p. 13-23

Azamar A, Merino L, Navarro C y Peláez J. (2021). *Así se ve la minería en México*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Balali-Mood M, Naseri K, Tahergorabi Z, Khazdair MR y Sadeghi M. (2021). Toxic mechanisms of five heavy metals: Mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Front Pharmacol.* 12: 643972.

Balaram V. (2020). Environmental impact of platinum, palladium, and rhodium emissions from autocatalytic converters – A brief review of the latest developments. En C Hussain (Ed). *Handbook of environmental materials management*. Springer: Cham. p. 1-37.

Barnes GD y Talbert LD. (1984). The effect of platinum on population and absorbance of *Euglena gracilis*, Klebs utilizing a method with atomic absorption and coulter counter analysis *J Miss Acad Sci.* 29: 143-150.

Bednarova I, Haasova V, Mikulaskova H, Nemcova B, Strakova L y Beklova M. (2012). Comparison of the effect of platinum on producers in aquatic environment. *Neuroendocrinol Lett.* 33: 107–112.

Bencs L, Ravindra K y Van Grieken R. (2011). Platinum: Environmental pollution and health effects. En JO Nriagu (Ed). *Encyclopedia of environmental health*. Elsevier: Amsterdam. p. 580-595.

Berenbaum MC. (1981). Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res.* 35: 269-335.

Bergerson J y Lave L. (2004). Life cycle analysis of power generation systems. En CJ Cleveland (Ed). *Encyclopedia of Energy*. Springer: Amsterdam. p. 635-645.

Biesinger KE y Christensen GM. (1972). Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J Fish Res Bd Can.* 2912: 1691-1700.

Bjerregaard P, Andersen CB y Andersen O. (2015) Ecotoxicology of metals—sources, transport, and effects on the ecosystem. En GF Nordberg, BA Fowler y M Nordberg (Eds.) *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier: Amsterdam. p. 425–459

Bonaly J, Bariaud AR, Duret S y Mestre JC. (1980). Cadmium cytotoxicity and variation in nuclear content of DNA in *Euglena gracilis*. *Physiol Plant.* 49: 286-290.

Borisy AA, Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR y Keith CT. (2003). Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 7977-82.

Bourg ACM y Loch JPG. (1995). Mobilization of heavy metals as affected by pH and redox conditions. En W Salomons y WM Stigliani (Eds). *Biogeochemistry of pollutants in soils and sediments*. Springer: Berlin. p. 87-102

Bremner I y Beattie JH. (1995). Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc Nutr Soc*. 54: 489-99.

Brezovšek P, Eleršek T y Filipic M. (2014). Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Res*. 52: 168-77.

Brook I. (1989). Inoculum effect. *Rev Infect Dis*. 11: 361-8.

Cao J, Liao Y, Yang W, Jiang X y Li M. (2022). Enhanced microalgal toxicity due to polystyrene nanoplastics and cadmium co-exposure: From the perspective of physiological and metabolomic profiles. *J Hazard Mater*. 427: 127937.

Castro-Guerrero NA, Rodríguez-Zavala JS, Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S y Moreno-Sánchez R. (2008). Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*. *J Bioenerg Biomembr*. 40: 227-35.

Chamorro S, Barata C, Piña B, Casado M, Schwarz A, Sáez K y Vidal G. (2018). Toxicological analysis of acid mine drainage by water quality and land use bioassays. *Mine Water Environ*. 37: 88–97.

Chandrashekharaiah PS, Sanyal D, Dasgupta S y Banik A. (2021). Cadmium biosorption and biomass production by two freshwater microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa*: an integrated approach. *Chemosphere*. 269: 128755.

Cobbett C y Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*. 53: 159-82.

Cobbett CS. (2000). Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*. 123: 825–33.

Cobelo-García A, Turner A, Millward GE y Couceiro F. (2007). Behaviour of palladium(II), platinum(IV), and rhodium(III) in artificial and natural waters: influence of reactor surface and geochemistry on metal recovery. *Anal Chim Acta*. 585: 202-10.

Daraz U, Li Y, Ahmad I, Iqbal R y Ditta A. (2023). Remediation technologies for acid mine drainage: Recent trends and future perspectives. *Chemosphere*. 311: 137089.

De Filippis LF y Pallaghy CK. (1976). The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*: II. Photosynthesis and pigment composition. *Z Pflanzenphysiol.* 78: 314-322.

De Filippis LF, Hampf R y Ziegler H. (1981). The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Growth and pigments. *Z Pflanzenphysiol.* 101: 37-47.

Dehghanpour S, Pourzamani HR, Amin MM y Ebrahimpour K. (2020). Evaluation of toxic effects of platinum-based antineoplastic drugs (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin) on green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquat Toxicol.* 223: 105495.

Devars S, Hernández R y Moreno-Sánchez R. (1998). Enhanced heavy metal tolerance in two strains of photosynthetic *Euglena gracilis* by preexposure to mercury or cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol.* 34: 128-135.

Dixit R, Wasiullah, Malaviya D, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, Singh BP, Rai JP, Sharma PK, Lade H y Paul D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability.* 7: 2189-2212.

Dos Reis LL, Alho LOG, de Abreu CB, Gebara RC, Mansano ADS y Melão MDGG. (2022). Effects of cadmium and cobalt mixtures on growth and photosynthesis of *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae). *Aquat Toxicol.* 244: 106077.

Dubiella-Jackowska A, Polkowska Z y Namiesnik J. (2008). Platinum group elements in the environment: Emissions and exposure. En DM Whitacre (Ed). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer: New York. p. 111-135

Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M y Grimme LH. (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat Toxicol.* 56: 13-32.

Finger-Teixeira A, Ishii-Iwamoto EL, Marchiosi R, Coelho ÉMP, Constantin RP, Dos Santos WD, Soares AR, Ferrarese-Filho O. (2021). Cadmium uncouples mitochondrial oxidative phosphorylation and induces oxidative cellular stress in soybean roots. *Environ Sci Pollut Res Int.* 28: 67711-67723.

Fonseca TG, Morais MB, Rocha T, Abessa DMS, Aureliano M y Bebianno MJ. (2017). Ecotoxicological assessment of the anticancer drug cisplatin in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Sci Total Environ.* 575: 162-172.

Fox JM y Zimba PV. (2018). Minerals and trace elements in microalgae. En IA Levine y J Fleurence (Eds). *Microalgae in health and disease prevention*. Elsevier: Amsterdam. p. 177- 193.

Franklin NM, Stauber JL, Lim RP y Petocz P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environ Toxicol Chem*. 21: 2412-22.

Franquet-Griell H, Pueyo V, Silva J, Orera VM y Lacorte S. (2018). Development of a macroporous ceramic passive sampler for the monitoring of cytostatic drugs in water. *Chemosphere*. 182: 681-690.

García-García JD, Olin-Sandoval V, Saavedra E, Girard L, Hernández G y Moreno-Sánchez R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1820: 1567–1575.

García-García JD, Peña-Sanabria KA, Sánchez-Thomas R y Moreno-Sánchez R. (2018). Nickel accumulation by the green algae-like *Euglena gracilis*. *J Hazard Mater*. 5: 10-18

García-García JD, Sánchez-Thomas R y Moreno-Sánchez R. (2016). Biorecovery of non-essential heavy metals by intra and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnol Adv*. 34: 859-873.

Gaur N, Flora G, Yadav M y Tiwari A. (2013). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environ Sci Process Impacts*. 16: 180-93.

Gawronska H, Przybysz A, Szalacha E, Pawlak K, Brama K, Miszczak A, Stankiewicz-Kosyl M y Gawronski SW. (2018). Platinum uptake, distribution and toxicity in *Arabidopsis thaliana* L. plants. *Ecotoxicol Environ Saf*. 147: 982-989.

Gebara RC, Alho LOG, Rocha GS, Mansano ADS y Melão MDGG. (2020). Zinc and aluminum mixtures have synergic effects to the algae *Raphidocelis subcapitata* at environmental concentrations. *Chemosphere*. 242: 125231.

Gidari A, Sabbatini S, Schiaroli E, Bastianelli S, Pierucci S, Busti C, Comez L, Libera V, Macchiarulo A, Paciaroni A, Vicenti I, Zazzi M y Francisci D. (2022). The combination of molnupiravir with nirmatrelvir or GC376 has a synergic role in the inhibition of SARS-CoV-2 replication in vitro. *Microorganisms*. 10: 1475.

Gingrich DJ, Petering DH y Shaw FC. (1984). Zinc and cadmium metabolism in *Euglena gracilis*: metal distribution in normal and zinc-deficient cells. *Mar Environ Res*. 14: 89–102.

Goldoni M y Johansson C. (2007). A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol In Vitro*. 21: 759-69.

Greco WR, Faessel H y Levasseur L. (1996). The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers? *J Natl Cancer Inst*. 88: 699-700.

Green MR y Sambrook J. (2019). Estimation of cell number by hemocytometry counting. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019.

Guedes VC, Palma GM y Horta ACL. (2023). An evaluation of light wavelengths, intensity and control for the production of microalgae in photobioreactors: a review. *Braz J Chem Eng*.

Gunatilake SK. (2015). Methods of removing heavy metals from industrial wastewater. *J Multidiscip Eng Sci Technol*. 1: 12-18

Hardoy JE, Mitlin D y Satterthwaite D. (2001). *Environmental problems in an urbanizing world: Finding solutions in cities in Africa, Asia and Latin America*. Routledge: London.

He J, Liu C, Du M, Zhou X, Hu Z, Lei A y Wang J. (2021). Metabolic responses of a model green microalga *Euglena gracilis* to different environmental stresses. *Front Bioeng Biotechnol*. 9: 662655.

He Z, Song J, Zhang N, Zhang P y Xu Y. (2009). Variation characteristics and ecological risk of heavy metals in the south Yellow Sea surface sediments. *Environ Monit Assess*. 157: 515–528.

Hernández-Garnica M, García-García J, Moreno-Sánchez R y Sánchez-Thomas R. (2021). Lead accumulation in photosynthetic *Euglena gracilis* depends on polyphosphates and calcium. *Environ Pollut*. 272: 116007.

Houri T, Khairallah Y, Zahab AA, Osta B, Romanos D y Haddad G. (2020). Heavy metals accumulation effects on the photosynthetic performance of geophytes in Mediterranean Reserve. *J King Saud Univ Sci*. 32: 874-880.

Hourtané O, Rioux G, Campbell PG y Fortin C. (2022). Algal bioaccumulation and toxicity of platinum are increased in the presence of humic acids. *Environ Chem*. 9: 144–155.

Hu XY, Peng M, Sheng X, Shi H, Zhang J, Liu J, Yang L, Shao P, Luo X, Hong M y Liu T. (2022). Continuous and effective treatment of heavy metal in acid mine drainage based on reducing barrier system: A case study in North China. *J Hazard Mater Adv*. 8: 100152.

Huang D, Savage SR, Calinawan AP, Lin C, Zhang B, Wang P, Starr TK, Birrer MJ y Paulovich AG. (2021). A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene*. 40: 6395-6405.

lanevski A, Giri AK y Aittokallio T. (2022). SynergyFinder 3.0: an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples. *Nucleic Acids Res*. 50: W739-W743.

Ighalo JO, Kurniawan SB, Iwuozor KO, Aniagor CO, Ajala OJ, Oba SN, Iwuchukwu FU, Ahmadi S y Igwegbe CA. (2022). A review of treatment technologies for the mitigation of the toxic environmental effects of acid mine drainage (AMD). *Process Saf Environ Prot*. 157: 37-58.

Jain RK, Cui Z y Domen JK. (2016). *Environmental impact of mining and mineral processing: Management, monitoring, and auditing strategies*. Elsevier: Oxford.

Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Kümmerer K, Kortenkamp A y Sumpter JP. (2008). Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *J Hydrol*. 348: 167–175.

Kapahi M y Sachdeva S. (2019). Bioremediation options for heavy metal pollution. *J Health Pollut*. 9: 191203.

Khatiwada B, Hasan MT, Sun A, Kamath KS, Mirzaei M, Sunna A y Nevalainen H. (2020c). Probing the role of the chloroplasts in heavy metal tolerance and accumulation in *Euglena gracilis*. *Microorganisms*. 8: 115.

Khatiwada B, Hasan MT, Sun A, Kamath KS, Mirzaei M, Sunna A y Nevalainen H. (2020a). Proteomic response of *Euglena gracilis* to heavy metal exposure. Identification of key proteins involved in heavy metal tolerance and accumulation. *Algal Res*. 45: 101764.

Khatiwada B, Sunna A y Nevalainen H. (2020b). Molecular tools and applications of *Euglena gracilis*: From biorefineries to bioremediation. *Biotechnol Bioeng*. 117: 3952-3967.

Kikuchi G, Yoshida T y Noguchi M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*. 338: 558–567.

Clueppel D, Jakubowski N, Messerschmidt J, Stuewer D y Klockow D. (1998). Speciation of platinum metabolites in plants by size-exclusion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 13: 255-262.

Koppel DJ, Adams MS, King CK y Jolley DF. (2018). Chronic toxicity of an environmentally relevant and equitoxic ratio of five metals to two Antarctic marine microalgae shows complex mixture interactivity. *Environ Pollut.* 242: 1319-1330.

Krienitz L. (2009). Algae. En GE Likens (Ed). *Encyclopedia of inland waters*. Elsevier: Amsterdam. p. 103-113.

Lavoie M, Fortin C y Campbell PG. (2012). Influence of essential elements on cadmium uptake and toxicity in a unicellular green alga: the protective effect of trace zinc and cobalt concentrations. *Environ Toxicol Chem.* 31: 1445-52.

Leong YK y Chang JS. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresour Technol.* 303: 122886.

León-Vaz A, Romero LC, Gotor C, León R y Vígara J. (2021). Effect of cadmium in the microalga *Chlorella sorokiniana*: A proteomic study. *Ecotoxicol Environ Saf.* 207: 111301.

Lihanová D, Lukáčová A, Beck T, Jedlicka A, Vešelényiová D, Krajcovic J y Vesteg M. (2023). Versatile biotechnological applications of *Euglena gracilis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 39: 133.

Louis KS y Siegel AC. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: Manual and automated methods. En MJ Stoddart (Ed.) *Mammalian cell viability: Methods in molecular biology*. Humana Press: New York. p. 7–12

Lu J, Ma Y, Xing G, Li W, Kong X, Li J, Wang L, Yuan H y Yang J. (2019). Revelation of microalgae's lipid production and resistance mechanism to ultra-high Cd stress by integrated transcriptome and physiochemical analyses. *Environ Pollut.* 250: 186-195.

Martín J, Camacho-Muñoz D, Santos JL, Aparicio I y Alonso E. (2014). Occurrence and ecotoxicological risk assessment of 14 cytostatic drugs in wastewater. *Water Air Soil Pollut.* 225: 1896.

Masindi V, Mkhonza P y Tekere M. (2021). Sources of heavy metals pollution. En Inamuddin, MI Ahamed, E Lichtfouse y T Altalhi (Eds). *Remediation of heavy metals*. Springer: Cham. p. 419-454

Mendoza-Cózatl D, Devars S, Loza-Tavera H y Moreno-Sánchez R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol Plant.* 115: 276–283.

Mendoza-Cózatl D, Rangel-González E y Moreno-Sánchez R. (2006). Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺, and Pb²⁺ uptake and accumulation by photosynthetic *Euglena gracilis*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 51: 521–528.

Mera R, Torres E y Abalde J. (2016). Isobolographic analysis of the interaction between cadmium (II) and sodium sulphate: toxicological consequences. *Environ Sci Pollut Res Int*. 23: 2264-78.

Misra UK, Gawdi G y Pizzo SV. (2003). Induction of mitogenic signalling in the 1LN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium+. *Cell Signal*. 15: 1059-70.

Monteiro CM, Fonseca SC, Castro PML y Malcata FX. (2011). Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J Appl Phycol*. 23: 97–103.

Moreno-Garrido I, Lubián LM y Soares AM. (2000). Influence of cellular density on determination of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol Environ Saf*. 47: 112-6.

Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Jasso-Chávez R, Saavedra E y García-García JD. (2017). Biochemistry and physiology of heavy metal resistance and accumulation in *Euglena*. En S Schwartzbach y S Shigeoka (Eds.) *Euglena: Biochemistry, cell and molecular biology*. Springer: Cham. p. 91-121

Munzeiwa WA, Ruziwa DT y Chaukura N. (2022). Environmental pollutants: Metal(loid)s and radionuclides. En R Selvasembian, ED Van Hullebusch y J Mal (Eds). *Biotechnology for environmental protection*. Springer: Singapore. p. 1-23.

Nakano Y, Okamoto K, Toda S y Fuwa K. (1978). Toxic effects of cadmium on *Euglena gracilis* grown in zinc deficient and zinc sufficient media. *Agric Biol Chem*. 42: 901-907.

Nancucheo I y Johnson B. (2012). Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. *Front Microbiol*. 3: 325.

Navarro L, Torres-Márquez ME, González-Moreno S, Devars S, Hernández R y Moreno-Sánchez R. (1997). Comparison of physiological changes in *Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 116: 265–272.

Nicholls DG. (2002). Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. Reverté: Barcelona.

Nishikawa K, Onodera A y Tominaga N. (2006). Phytochelatinos do not correlate with the level of Cd accumulation in *Chlamydomonas* spp. *Chemosphere*. 63: 1553-9.

Nriagu JO. (1988). A silent epidemic of environmental metal poisoning? *Environ Pollut*. 50: 139-161.

Nriagu JO. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*. 338: 47-49.

Parrella A, Lavorogna M, Criscuolo E, Russo C y Isidori M. (2015). Eco-genotoxicity of six anticancer drugs using comet assay in daphnids. *J Hazard Mater*. 286: 573-80.

Patel N, Chauhan D, Shahane S, Rai D, Khan MZA, Mishra U y Chaudhary VK. (2021). Contamination and health impact of heavy metals. En Inamuddin, MI Ahamed y E Lichtfouse (Eds). *Water Pollution and Remediation: Heavy Metals*. Springer: Cham. p. 259–280

Pavoni E, Covelli S, Adami G, Baracchini E, Cattelan R, Crosera M, Higuera PL, Lenaz D y Petranich E. (2018). Mobility and fate of Thallium and other potentially harmful elements in drainage waters from a decommissioned Zn-Pb mine (North-Eastern Italian Alps). *J Geochem Explor*. 188: 1-10.

Perales-Vela HV, González-Moreno S, Montes-Horcasitas C y Cañizares-Villanueva RO. (2007). Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*. 67: 2274-81.

Porra RJ, Thompson WA y Kriedemann PE. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 975: 384-394.

Qian H, Li J, Sun L, Chen W, Sheng GD, Liu W y Fu Z. (2009). Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat Toxicol*. 94: 56-61.

Queirós V, Azeiteiro UM, Soares AM, y Freitas R. (2021). The antineoplastic drugs cyclophosphamide and cisplatin in the aquatic environment - Review. *J Hazard Mater*. 412: 125028.

Rachlin JW y Grosso A. (1993). The growth response of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 24: 16–20

Rai PJ. (2018). *Phytoremediation of emerging contaminants in wetlands*. CRC Press: Boca Raton, FL

Rauch S y Morrison GM. (1999). Platinum uptake by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* in urban rivers. *Sci Total Environ.* 235: 261-8.

Robledo-Cadena DX, Gallardo-Pérez JC, Dávila-Borja V, Pacheco-Velázquez SC, Belmont-Díaz JA, Ralph SJ, Blanco-Carpintero BA, Moreno-Sánchez R y Rodríguez-Enríquez S. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase cisplatin, paclitaxel, and doxorubicin efficacy against human cervix cancer cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 13: 463.

Roell KR, Reif DM y Motsinger-Reif AA. (2017). An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Front Pharmacol.* 8: 158.

Rottenberg S, Disler C y Perego P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 21: 37-50.

Saleh TA, Mustaqeem M y Khaled M. (2022). Water treatment technologies in removing heavy metal ions from wastewater: A review. *Environ Nanotechnol Monit Manag.* 17: 100617.

Sánchez-Thomas R, Moreno-Sánchez R y García-García JD. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. *Environ Exp Bot.* 131: 19–31.

Santiago-Martínez MG, Lira-Silva E, Encalada R, Pineda E, Gallardo-Pérez JC, Zepeda-Rodríguez A, Moreno-Sánchez R, Saavedra E y Jasso-Chávez R. (2015). Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *J Hazard Mater.* 288: 104–112.

Saria L, Shimaoka T y Miyawaki K. (2006). Leaching of heavy metals in acid mine drainage. *Waste Manag Res.* 24: 134-40.

Saroop S y Tamchos S (2021). Monitoring and impact assessment approaches for heavy metals. En V Kumar, A Sharma y A Cerdá (Eds.) *Heavy metals in the environment: Impact, assessment, and remediation*. Springer: Amsterdam. p. 57-86

Satir P y Ojakian GK (1979). Plant cilia. En W Haupt y ME Feinleib (Eds.) *Physiology of movements: Encyclopedia of plant physiology*. Springer: Berlin. p. 224-249

Sharma C, Kumar S, Bhardwaj N, Mandotra SK y Ahluwalia AS. (2021). Mitigation of heavy metals utilizing algae and its subsequent utilization for sustainable fuels. En SK Mandotra, AK Upadhyay y AS Ahluwalia (Eds). *Algae: Multifarious applications for a sustainable world*. Springer: Singapore. p. 41-62

Sharma SK, Goloubinoff P y Christen P. (2011). Non-native proteins as newly-identified targets of heavy metals and metalloids. En G Banfalvi (Ed.) *Cellular effects of heavy metals*. Springer: Dordrecht. p. 263–274

Silva-Ontiveros LO y Sánchez-Salazar MT. (2021). Cierre de minas y abandono de sitios mineros en México: ¿un proceso “normal”? Referencias al norte de México. *Invest Geog.* (106): e60426.

Starodub M, Wong P y Mayfield C. (1987). Short term and long term studies on individual and combined toxicities of copper, zinc and lead to *Scenedesmus quadricauda*. *Sci Total Environ.* 63: 101–110.

Suárez C, Torres E, Pérez-Rama M, Herrero C y Abalde J. (2010). Cadmium toxicity on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff: Biosynthesis of thiol compounds. *Environ Toxicol Chem.* 29: 2009-15.

Tamás MJ, Sharma SK, Ibstedt S, Jacobson T y Christen P. (2014). Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules.* 4: 252-67.

Tian Q, Wang J, Cui L, Zeng W, Qiu G, Hu Q, Peng A, Zhang D y Shen L. (2022). Longitudinal physiological and transcriptomic analyses reveal the short term and long term response of *Synechocystis* sp. PCC6803 to cadmium stress. *Chemosphere.* 303: 134727.

Trevors JT, Stratton GW y Gadd GM. (1986). Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can J Microbiol.* 32: 447-64.

Vallee BL y Ulmer DD. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu Rev Biochem.* 41: 91-128.

Vannini C, Domingo G, Marsoni M, Fumagalli A, Terzaghi R, Labra M, De Mattia F, Onelli E y Bracale M. (2011). Physiological and molecular effects associated with palladium treatment in *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Aquat Toxicol.* 102: 104-13.

Wah Chu K y Chow KL. (2002). Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat Toxicol.* 61: 53-64.

Watanabe M y Suzuki T. (2002). Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 131: 491-500.

Wei YY, Zheng Q, Liu ZP y Yang ZM. (2011). Regulation of tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide. *Plant Cell Physiol.* 52: 1665-75.

Wójcik M, Dresler S y Tukiendorf A. (2015). Physiological mechanisms of adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. to growth on a Zn-Pb waste deposit - the case of chronic multi-metal and acute Zn stress. *Plant Soil.* 390: 237-250.

Wójcik M, Vangronsveld J y Tukiendorf A. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environ Exp Bot.* 53: 151–161.

Wong DL y Stillman MJ. (2018). Metallothionein: An aggressive scavenger—the metabolism of rhodium(II) tetraacetate ($\text{Rh}_2(\text{CH}_3\text{CO}_2)_4$). *ACS Omega.* 3: 16314-16327.

Wuana RA, y Okieimen FE. (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Int Sch Res Notices.* 2011: 1-20.

Xiao X, Li W, Jin M, Zhang L, Qin L y Geng W. (2023). Responses and tolerance mechanisms of microalgae to heavy metal stress: A review. *Mar Environ Res.* 183: 105805.

Xu P, Liu D y Jiang W. (2009). Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. *Biol Plant.* 53: 387–390

Yan A, Wang Y, Tan SN, Mohd Yusof ML, Ghosh S y Chen Z. (2020). Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Front Plant Sci.* 11: 359.

Yeh CT y Huang SL. (2012). Global urbanization and demand for natural resources. En R Lal y B Augustin (Eds). *Carbon sequestration in urban ecosystems.* Springer: Dordrecht. p. 355–371

Yin K, Wang Q, Lv M y Chen L. (2019). Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chem Eng J.* 360: 1553–1563.

Zahra A, Hashmi MZ, Malik RN y Ahmed Z. (2014). Enrichment and geo-accumulation of heavy metals and risk assessment of sediments of the Kurang Nallah—Feeding tributary of the Rawal Lake Reservoir, Pakistan. *Sci Total Environ.* 470-471: 925-933.

Zhang C, Xu C, Gao X y Yao Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics.* 12: 2115-2132.

Zhang W, Tan NG y Li SF. (2014). NMR-based metabolomics and LC-MS/MS quantification reveal metal-specific tolerance and redox homeostasis in *Chlorella vulgaris*. *Mol Biosyst.* 10: 149-60.

Zhou Q, Yang N, Li Y, Ren B, Ding X, Bian H y Yao X. (2020). Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. *Glob Ecol Conserv.* 22: e00925.