71 Ciencia Nicolaita
XXV aniversario
1992 - 2017

Las proteínas CHR: una estrategia ancestral de las bacterias para tolerar la toxicidad del cromato

Carlos Cervantes

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Resumen

El cromo (Cr) es un metal de transición cuya especie más abundante, el Cr(VI) o cromato, es tóxica para la mayoría de los organismos vivos. El amplio uso de derivados del Cr en procesos industriales los ha convertido en peligrosos contaminantes del ambiente. En respuesta a la continua exposición a dichos agentes tóxicos, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a cromato codificados por genes cromosómicos o plasmídicos. El sistema de tolerancia a cromato más estudiado es el relacionado con la proteína ChrA, que identificamos inicialmente en un plásmido de una bacteria de origen clínico. Posteriormente determinamos que ChrA confiere resistencia porque expulsa al cromato del citoplasma celular. ChrA pertenece a la superfamilia de proteínas transportadoras CHR, codificadas por genes ampliamente distribuidos en diversas especies de procariotes y eucariotes, lo cual evidencia su importancia adaptativa y su origen ancestral.

Palabras clave: Bacterias, Cromato, Transporte membranal

Abstract

"The CHR proteins: an ancestral bacterial strategy to tolerate chromate toxicity"

Chromium (Cr) is a transition metal whose more abundant species, Cr(VI) or chromate, is toxic for most living organisms. The widespread use of Cr derivatives in industrial processes has converted them in dangerous environmental pollutants. In response to a continuous exposure to these toxic agents, bacteria have developed chromate resistance mechanisms encoded by chromosomal or plasmid genes. The most studied chromate tolerance system is that associated with the ChrA protein, which we identified initially in a plasmid from a bacterium from clinical origin. Later, we determined that ChrA confers resistance because it effluxes chromate from the cell cytoplasm. ChrA belongs to the CHR Superfamily of protein transporters, encoded by genes widely distributed among diverse species of procaryotes and eucaryotes, which highlights their adaptive relevance and their ancestral origin.

Key words: Bacteria, Chromate, Membrane transport

1. Introducción

Los organismos vivos se encuentran en el ambiente expuestos a los metales pesados, los cuales ejercen diversos efectos tóxicos sobre ellos. Ante esta exposición, las bacterias han desarrollado eficientes estrategias para tolerar los efectos nocivos de los metales o de sus derivados. Los principales mecanismos incluyen: a) componentes celulares que capturan a los metales, neutralizando su toxicidad; b) sistemas enzimáticos que modifican el estado redox de los metales, convirtiéndolos en formas menos tóxicas; y c) transportadores de membrana que expulsan a las especies nocivas, evitando su acumulación en el citoplasma celular (Silver y Phung, 2005).

Con el advenimiento de las secuencias de genomas bacterianos completos, se cuenta ahora con una gran cantidad de información sobre los transportadores de metales; muchos de ellos se han caracterizado a nivel molecular. Entre estos transportadores se encuentran los sistemas que expulsan derivados de los cationes metálicos cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata y plomo, así como los derivados aniónicos de arsénico y cromo (Nies, 2003). Las familias proteicas que agrupan a estos sistemas de expulsión tienen una amplia distribución en las bacterias, lo que

ha permitido reconocer su importancia adaptativa para los microorganismos. El análisis de las secuencias de estas proteínas y el estudio de su estructura y sus mecanismos de acción, han vertido valiosa información sobre el origen y la evolución de los transportadores bacterianos de metales (Saier, 2003). El objetivo de este escrito es presentar una breve reseña histórica del trabajo de investigación relacionado con los genes y las proteínas involucrados en la resistencia bacteriana a cromato, que se ha desarrollado en el Laboratorio de Microbiología del IIQB-UMSNH en los últimos 30 años.

2. Antecedentes

Una tesis de licenciatura (Córdova-Arredondo, 1986) representa el punto de partida del estudio, pues en ese trabajo se reportó el aislamiento y la caracterización de una cepa de origen nosocomial de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, la cual, lo sabríamos varios años después, contenía el gen que codifica el primer sistema bacteriano de resistencia a cromato descrito a la fecha (Cervantes-Vega et al., 1986; Cervantes y Ohtake, 1988; Cervantes et al. 1990; Cervantes, 1991; Cervantes y Vaca, 1991, 1992; Cervantes, 1992; Cervantes y Silver, 1992).

3. Interacciones bacterianas con el cromato

3.1 Generalidades del cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, cuyas especies más estables y abundantes son la trivalente, Cr(III), y la hexavalente, Cr(VI). El Cr(VI) existe en la naturaleza comúnmente en forma del oxianión cromato (CrO_4^{2-}), un fuerte oxidante que es reducido a Cr(III) en el suelo y el agua por la materia orgánica y otros agentes reductores (Shanker et al., 2005). El Cr se encuentra presente en rocas, emisiones volcánicas, suelos, plantas y animales; es el séptimo elemento por su abundancia en la Tierra y el 21o. en la corteza terrestre (McGrath y Smith, 1990). Los derivados del Cr(III) son menos móviles y se encuentran en el ambiente formando complejos estables con ligandos orgánicos e inorgánicos (Cervantes et al., 2001).

El amplio uso del cromo en diversos procesos industriales lo ha convertido en un contaminante del aire, el suelo y el agua. En ciertas regiones de México existen serios problemas de contaminación por derivados del Cr, tanto de fuentes antropogénicas como de origen natural (Robles-Camacho y Armienta, 2000). La

transformación de Cr(VI) a Cr(III) en forma extracelular es un mecanismo de destoxificación y se ha considerado como una estrategia de biorremediación de desechos contaminantes de Cr (Cervantes y Campos-García, 2007)

Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación, siendo el Cr(VI) la forma más tóxica. A nivel extracelular, el Cr(VI) es tóxico para la mayoría de las especies bacterianas, mientras que el Cr(III) es relativamente inocuo dada su insolubilidad y su subsecuente incapacidad de atravesar las membranas celulares. En el citoplasma, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con el proceso de reducción de Cr(VI) a Cr(III), en el cual se generan radicales libres nocivos (Cervantes y Campos-García, 2007). El daño oxidativo al DNA es responsable de los efectos genotóxicos causados por el Cr. En el citoplasma, el Cr(III) puede ejercer efectos dañinos adicionales por su capacidad de unirse a los fosfatos en el DNA, a los grupos carboxilo y sulfhidrilo de las proteínas, así como por competir con el transporte de hierro (Ramírez-Díaz et al., 2008).

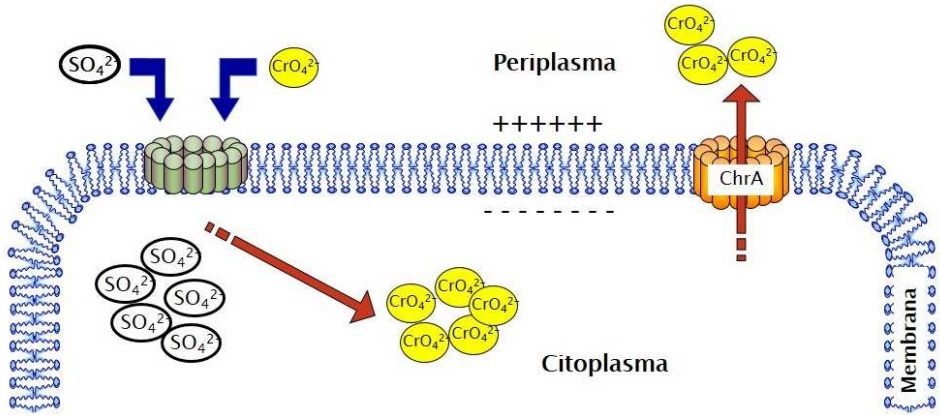

Figura 1. Captación y expulsión de cromato en bacterias. El cromato es transportado al citoplasma bacteriano mediante el sistema de captación de su análogo, el ión esencial sulfato (izquierda). La proteína ChrA expulsa al cromato hacia el periplasma, utilizando el potencial de la membrana celular como fuente de energía (derecha).

3.2 Resistencia bacteriana al cromato

El transporte del cromato a través de las membranas, utilizando la vía de captación del ión esencial sulfato (SO_4^{2-}), se ha demostrado en varias especies bacterianas (Figura 1). Debido a la analogía química de estos oxianiones, el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en bacterias (Ramírez-Díaz et al., 2008). Una vez dentro de las células, el Cr(VI) es reducido en forma no enzimática,

o por la acción de varios tipos de enzimas, a Cr(III), el cual puede ejercer en el citoplasma los diversos efectos tóxicos arriba mencionados.

Los mecanismos bacterianos de resistencia a cromato pueden ser codificados por genes cromosómicos o por genes contenidos en plásmidos o transposones. Los genes plasmídicos codifican transportadores que expulsan al cromato del citoplasma celular (ver más adelante), mientras que los sistemas cromosómicos comúnmente se relacionan con la reducción enzimática del Cr(VI) o con actividades reparadoras de los daños provocados por la exposición al Cr (Ramírez-Díaz et al., 2008).

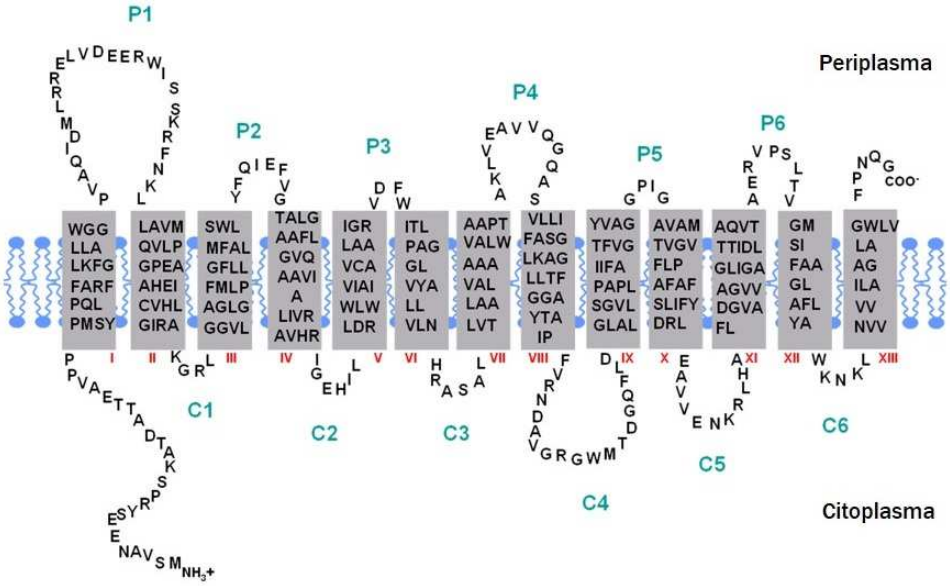

Figura 2. Topología membranal de la proteína ChrA. Se muestra la estructura secundaria de ChrA y sus interacciones con la membrana bacteriana. Se indican las abreviaturas de los residuos de aminoácidos de la proteína y, en cuadros sombreados, los 13 segmentos transmembranales (numerados I-XIII). También se señalan las asas citoplásmicas (C1-C6) y periplásmicas (P1-P6). Adaptada de Jiménez-Mejía et al. (2006).

3.3 La proteína ChrA

El primer sistema bacteriano de tolerancia a cromato descrito fue el contenido en el plásmido pUM505 de una cepa nosocomial de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes-Vega et al., 1986; Cervantes y Ohtake, 1988). Un análisis molecular mostró que pUM505 codifica a la proteína de membrana ChrA, de 416 aminoácidos (aa) (Figura 2), la cual es responsable de la resistencia a cromato (Cervantes et al.,

1990). Más adelante, otro determinante de resistencia similar se identificó en el plásmido pMOL28 de la bacteria ambiental multirresistente a metales, *Cupriavidus metallidurans* (Nies et al., 1990); pMOL28 codifica un homólogo de ChrA de 401 aa. La presencia del determinante *chrA* en bacterias de distinto género y origen permitió avizorar, antes del conocimiento de las secuencias de múltiples genomas, una amplia distribución del gen en otros microorganismos.

Utilizando vesículas membranales invertidas, demostramos que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa al cromato del citoplasma hacia el espacio periplásmico, impulsada por la fuerza protón motriz (Figura 1) (Alvarez et al., 1999). El transporte de cromato por ChrA es inhibido por el ión análogo sulfato, tanto *in vitro* como en células intactas (Alvarez et al., 1999; Pimentel et al., 2002), sugiriendo que ChrA posee sitios de unión para el sulfato y que es probable que la proteína sea capaz de transportar, además del cromato, a ese ión esencial. En apoyo de esta hipótesis, se había reportado que el homólogo del gen *chrA* de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* se localiza en un operón cuya expresión es regulada por sulfato (Nicholson y Laudenbach, 1995).

Mediante el aislamiento de mutantes generadas al azar y seleccionadas por su sensibilidad a cromato, se identificaron residuos de aa de ChrA que participan en el proceso de expulsión (Aguilera et al., 2004). Este estudio sugirió que las mitades amino y carboxilo de ChrA juegan papeles distintos en la función de esta proteína. Esta hipótesis fue apoyada posteriormente por el análisis filogenético (ver más adelante). La proteína ChrA de *P. aeruginosa* presenta 13 segmentos transmembranales (STM) y sus mitades amino y carboxilo tienen homología entre sí (Figura 2) (Jiménez-Mejía et al., 2006). Estos datos sugieren que las proteínas ChrA han evolucionado tanto modificando su orientación en la membrana bacteriana como alterando la dirección del transporte de sus sustratos; una situación similar se ha reportado para otros transportadores de membrana (Rapp et al., 2006).

4. La superfamilia de proteínas CHR

4.1 Análisis filogenético de las proteínas CHR

Mediante una búsqueda de homólogos de ChrA presentes en las bases de datos de genomas, inicialmente identificamos un grupo de 135 secuencias proteicas que fue denominado la superfamilia de transportadores de cromato CHR (Figura 3) (Díaz-Pérez et al., 2007). Esta familia, descrita por primera vez por Nies et al. (1998), está constituida por un grupo de proteínas procarióticas involucradas en el transporte de

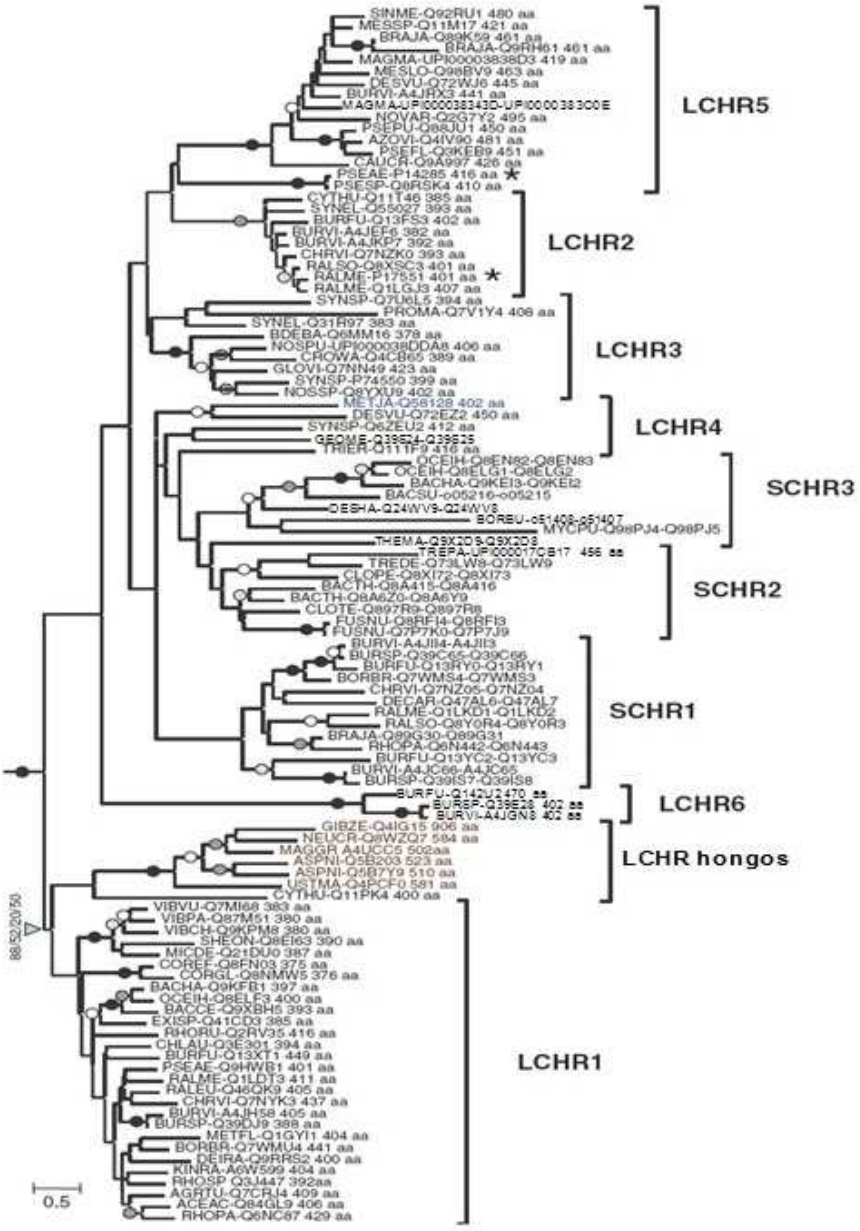

Figura 3. Filogenia de las proteínas de la Superfamilia CHR. El árbol filogenético presenta la distribución de las secuencias homólogas de ChrA presentes en los genomas de distintos organismos. En el esquema se muestran las abreviaturas de los nombres de las especies bacterianas y fúngicas. A la derecha se indican los nombres de las subfamilias derivadas de las familias LCHR y SCHR. Adaptada de Cervantes y Campos-García (2007).

cromato o sulfato. La familia CHR se había clasificado en el catálogo de proteínas de membrana como TC no. 2.A.51 (Saier, 2003) y comprende secuencias codificadas en cromosomas y en plásmidos. Las bases de datos actualmente contienen cientos de homólogos CHR, incluyendo proteínas de eucariotes (Henne et al., 2009; León-Márquez et al., 2011).

La superfamilia CHR consta de dos tipos de proteínas, de acuerdo con su tamaño: la familia de proteínas monodominio (SCHR), de alrededor de 200 aa, y la familia de proteínas bidominio (LCHR), de alrededor de 400 aa (Figura 3). Las proteínas bacterianas LCHR se agruparon en seis subfamilias (LCHR1 a LCHR6); la subfamilia CHR4 incluye a la única proteína de una arquea (*Methanococcus jannaschii*) (Figura 3). Además, se identificó una subfamilia LCHR de hongos que constituye un subgrupo de secuencias relacionado con la subfamilia bacteriana LCHR1, la cual a su vez comprende los homólogos de bacterias Gram positivas (Figura 3).

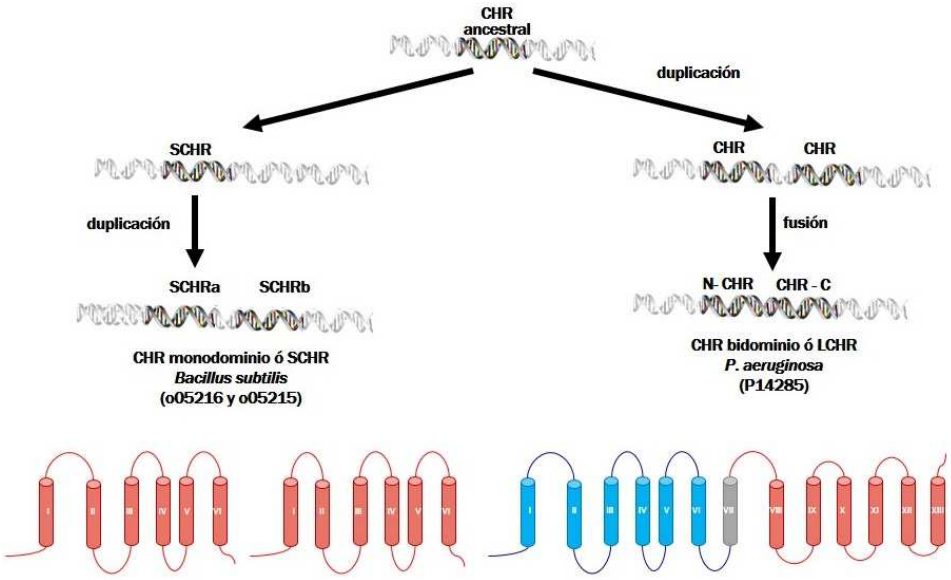

Figura 4. Origen y evolución de las proteínas de la superfamilia CHR. El esquema muestra un gen chr ancestral como la fuente de las proteínas monodominio, SCHR, originadas por un evento de duplicación génica (izquierda), y bidominio CHR generadas por eventos de duplicación y fusión génicas (derecha). En la parte inferior se esquematizan las distintas topologías de los dos tipos de proteínas, resaltando en ambos casos la homología de las mitades amino y carboxilo y la orientación opuesta de los dominios transmembranales. Adaptada de Díaz-Pérez et al. (2005).

Los genes *chrA* que originan a las proteínas monodominio, SCHR, comúnmente se encuentran en los genomas como pares de genes en tándem (Figura 4). Esto sugiere que las proteínas SCHR no son funcionales como monómeros y que la subsecuente fusión génica de un par monodominio *chrA* originó a las proteínas bidominio LCHR (Figura 4). Del análisis filogenético de los dominios individuales de las proteínas CHR se obtuvieron tres grupos: uno que comprende a los dominios amino de las proteínas LCHR; otro que abarca a los dominios carboxilo de las proteínas LCHR; y un tercer grupo que incluye a las proteínas SCHR. Este patrón sugiere que las proteínas LCHR conforman un grupo monofilético y es acorde con la propuesta de que su origen es una duplicación génica antigua seguida de una fusión de dos SCHR ancestrales (Figura 4). Aunque en transportadores de otras familias se ha encontrado un origen similar, esto es, existen ejemplos de secuencias generadas a partir de fusiones de genes que forman proteínas más complejas, sólo en la superfamilia CHR se han identificado simultáneamente miembros simples y complejos, incluso en genomas de una misma especie bacteriana (Díaz-Pérez et al., 2007). La filogenia de la superfamilia CHR la resalta como un grupo ancestral de proteínas que posiblemente se originó a partir de transportadores con una función distinta a la de expulsar al cromato, probablemente el transporte de su análogo, el esencial y abundante ión sulfato.

4.2 Proteínas CHR caracterizadas funcionalmente

Aunque las bases de datos revelan cientos de secuencias con homología con las proteínas CHR, sólo un pequeño grupo de ellas se ha caracterizado a nivel funcional. Este grupo incluye proteínas CHR codificadas en cromosomas o en plásmidos de diversas especies bacterianas; todas confieren resistencia a cromato (Ramírez-Díaz et al., 2008). Las subfamilias LCHR2 y LCHR5 comprenden principalmente proteínas de proteobacterias, entre ellas las proteínas ChrA mencionadas de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans* (Figura 3), con una función demostrada en la expulsión del cromato.

Con el fin de ampliar el espectro de proteínas CHR funcionales, caracterizamos el homólogo CHR de *S. elongatus* (Aguilar-Barajas et al., 2012), siendo éste el primer reporte de un sistema de resistencia a cromato de una cianobacteria. Un aspecto interesante del gen *chrA* de *S. elongatus*, el cual está contenido en un plásmido, es que, como se mencionó previamente, está flanqueado por genes regulados por sulfato. Debido a la analogía estructural entre cromato y sulfato, parece existir una relación en aspectos de transporte y de regulación entre ambos oxianiones; esto nos ha llevado a hipotetizar que las proteínas ChrA son transportadores ancestrales

de sulfato que han evolucionado para reconocer al cromato como un sustrato alternativo (Aguilar-Barajas et al., 2011).

Otros estudios demostraron que el plásmido 1 de *Shewanella* sp. ANA-3 (Aguilar-Barajas et al., 2008) y el transposón Tn*OtChr* de *Ochobactrum tritici* 5bv11 (Branco et al., 2008) codifican homólogos de ChrA que confieren resistencia a cromato. El mecanismo de resistencia (expulsión de cromato) parece ser el mismo para estas proteínas de proteobacterias, ya que ambas causaron una baja acumulación de iones de cromato.

También identificamos genes *chrA* en plásmidos de enterobacterias de origen nosocomial (Caballero-Flores et al., 2012); éste representó el primer ejemplo de genes de resistencia a cromato identificados en este tipo de microorganismos, de gran importancia en aspectos clínicos. Debido a que habíamos reportado que secuencias similares a las de los genes *chrA* estaban presentes en hongos (Díaz-Pérez et al., 2007), el homólogo CHR del hongo *Neurospora crassa*, un importante modelo biológico, se clonó y caracterizó a nivel funcional. En este trabajo, el gen *chrA* de *N. crassa* se catalogó como un transportador de cromato (Flores-Alvarez et al., 2012) y constituyó el primer reporte de la caracterización de un sistema de transporte de cromato en un organismo eucariótico.

Los únicos homólogos de proteínas monodominio (SCHR) estudiados a la fecha son el par de genes *schrN-schrC* contenidos en el cromosoma de la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*, otro reconocido modelo biológico. Demostramos que los genes que codifican a dichas proteínas en *B. subtilis* confieren resistencia a cromato cuando se expresan en pareja, pero no cuando se expresan en forma individual (Díaz-Magaña et al., 2009). Mediante ensayos de transporte de cromato radioactivo, encontramos que las proteínas SCHR, al igual que sus contrapartes bidominio LCHR, confieren resistencia a cromato por un mecanismo de expulsión (Díaz-Magaña et al., 2009). Empleando análisis *in silico* y ensayos de tipo funcional, determinamos la topología membranal de dichas proteínas. Este enfoque nos permitió demostrar que la pareja de proteínas SCHR de *B. subtilis* presentan seis STM cada una, aunque con una orientación opuesta en la membrana (Martínez-Valencia et al., 2012), como habíamos encontrado para las mitades amino y carboxilo de las proteínas LCHR (Figura 4).

4.3 Bacterias con múltiples genes para proteínas CHR

Un escrutinio de las bases de datos nos permitió determinar que existen organismos con múltiples genes para proteínas CHR. Entre ellos, *C. metallidurans*, que posee

tres LCHRs y un par de SCHRs; *Burkholderia xenovorans* LB400, que contiene cuatro LCHRs y dos pares de SCHRs; y *Burkholderia vietnamiensis* G4, con cinco LCHRs y dos pares de SCHRs (Díaz-Pérez et al., 2007). Resulta por demás interesante que un microorganismo posea en su genoma múltiples genes que codifican proteínas que aparentemente tienen la misma función: en este caso, conferir resistencia a cromato. Con el fin de estudiar los múltiples genes de resistencia de uno de tales organismos, elegimos a *B. xenovorans* LB400 como modelo. LB400 es una β-Proteobacteria aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados en Nueva York, EEUU; esta cepa fue donada por el Dr. Jesús Caballero-Mellado (†) del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM (Caballero-Mellado et al., 2007). LB400 tiene un genoma relativamente grande, con alrededor de 9,000 secuencias codificantes distribuidas en dos cromosomas y un megaplásmido (Figura 5) (Chain et al., 2006). Un poco más del 17% de los genes de *B. xenovorans* LB400 son redundantes, siendo éste el porcentaje más alto que se ha encontrado entre las bacterias analizadas. Dentro de este grupo de genes repetidos de LB400 se encuentran los que codifican a las proteínas CHR (Figura 5).

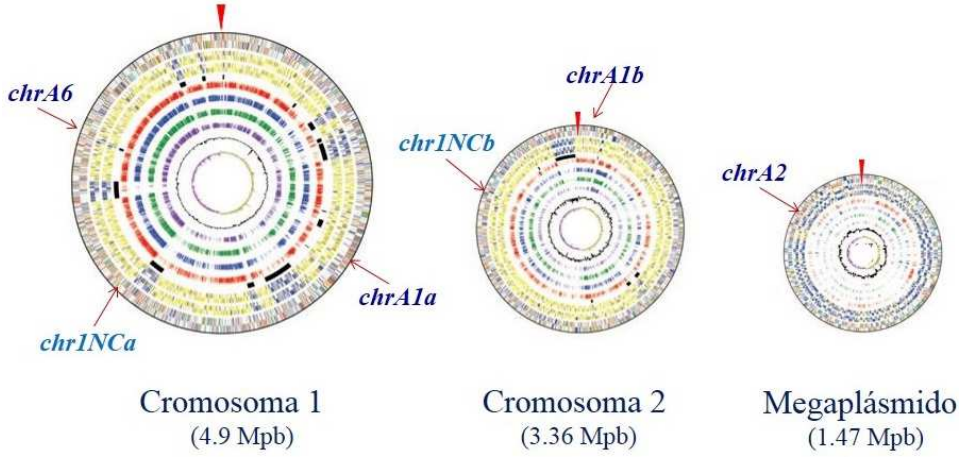

Figura 5. Múltiples genes *chr* en el genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400. Se esquematiza el genoma de LB400, formado de dos cromosomas y un megaplásmido, indicando el tamaño y el número de genes de cada replicón. Con flechas, se señala la localización de los cuatro genes que codifican proteínas LCHR (*chrA1a*, *chrA1b, chrA2* y *chrA6*) y las dos parejas de genes que codifican proteínas SCHR (*chr1NCa* y *chr1NCb*). Adaptada de León-Márquez et al. (2011).

Ensayos de susceptibilidad mostraron que LB400 es más resistente a cromato que cepas de *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* (cuyos genomas contienen al menos un homólogo CHR); más aún, la exposición de *B. xenovorans* a concentraciones

subinhibitorias de cromato protegió a las células de su efecto tóxico, indicando que la expresión del (los) determinante(s) de resistencia presentes en la bacteria es inducida por el oxianión (Acosta-Navarrete et al., 2014). Con el fin de asignar la resistencia a cromato a alguno(s) de los seis determinantes *chr* de LB400, éstos se clonaron de manera individual en un vector de expresión y se transfirieron a una cepa de *E. coli*. Los genes *chr* confirieron resistencia al cromato a las transformantes, aunque el nivel de resistencia varió en función de las concentraciones de sulfato en el medio de cultivo. Estos resultados vislumbraron la idea de que la expresión de los genes *chr* de LB400 es regulada por las condiciones del crecimiento bacteriano. Sin embargo, cuando se determinó la expresión de los genes *chr* directamente en *B. xenovorans*, no encontramos efecto alguno del sulfato; sólo el gen *chrA2*, codificado en el megaplásmido (Figura 5), mostró una expresión inducida por cromato (Acosta-Navarrete et al., 2014). Es importante mencionar que *chrA2* es el único gen *chr* de LB400 que forma parte de un operón.

En un trabajo posterior, donde los múltiples genes *chr* de LB400 se clonaron de manera individual y se transfirieron a cepas de *B. xenovorans* sensibles a cromato, encontramos que el mencionado gen *chrA2* es el principal responsable del fenotipo de resistencia (Reyes-Gallegos et al., 2016). El posible papel del resto de los homólogos *chr* de *B. xenovorans* LB400, sin embargo, no se conoce aún. El hecho de que *B. xenovorans* habita ambientes perturbados implica su exposición a diversos compuestos tóxicos; esta situación probablemente conduce a que la bacteria se encuentre sometida a una presión selectiva que promueve la duplicación génica y favorece la transferencia horizontal de genes. Por otra parte, *B. xenovorans* debe poseer estrictos mecanismos de control para regular la expresión de los genes redundantes relacionados con su sobrevivencia bajo tales condiciones hostiles.

5. Consideraciones finales

La exposición continua de los microorganismos a los derivados del cromo en su entorno, ejerce una presión selectiva que promueve el desarrollo y la adquisición de elementos genéticos que les permiten tolerar sus efectos tóxicos. Se considera que los compuestos de Cr, entre ellos la forma hexavalente tóxica, han estado presentes en la biósfera terrestre desde el inicio de la vida. Así, es de esperar que los organismos procarióticos posean sistemas de tolerancia para contender con los efectos nocivos del cromato. La amplia distribución de genes que codifican proteínas de la superfamilia CHR en los genomas de los procariotes resalta la importancia que ha tenido la exposición del mundo microbiano al Cr. Por otra parte,

la presencia de genes para proteínas CHR en los genomas tanto de bacterias y arqueas como de eucariotes es una clara evidencia de su origen ancestral.

Como ocurre con diversos sistemas procarióticos de adaptación a condiciones ambientales hostiles, los genes de resistencia a cromato se localizan en cromosomas, plásmidos o transposones, lo cual enfatiza que los procesos de transferencia horizontal de genes actúan como formas eficientes de diseminación de dichos elementos adaptativos. El estudio detallado de bacterias con múltiples genes para proteínas CHR contribuirá a entender con mayor precisión las respuestas de los sistemas microbianos ante situaciones de contaminación con el cromo y sus derivados.

Agradecimientos

Durante el desarrollo de la labor de investigación aquí reseñada se contó con la entusiasta participación de numerosos estudiantes de licenciatura y de posgrado, así como de colegas investigadores y técnicos académicos de la UMSNH y de otros centros de investigación, tanto de México como del extranjero. La mayoría de dichos colaboradores aparecen como coautores en las referencias citadas. Para todos ellos, mi sincero agradecimiento. También reconozco con gratitud el financiamiento para mis proyectos de investigación, que provino principalmente de la Coordinación de Investigación Científica (CIC) de la UMSNH y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Referencias

Acosta-Navarrete, Y.M., Y.L. León-Márquez, K. Salinas-Herrera, I.E. Jácome-Galarza, V. Meza-Carmen, M.I. Ramírez-Díaz y C. Cervantes. 2014. Expression of the six CHR chromate ion transporter homologues of *Burkholderia xenovorans* LB400. Microbiology 160: 287-295.

Aguilar-Barajas E., E. Paluscio, C. Cervantes y C. Rensing. 2008. Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 285:97-100.

Aguilar-Barajas, E., C. Díaz-Pérez, M.I. Ramírez-Díaz, H. Riveros-Rosas y C. Cervantes. 2011. Bacterial transport of sulfate, molybdate and related oxyanions. Biometals 24:687-707.

Aguilar-Barajas, E., P. Jerónimo-Rodríguez, M.I. Ramírez-Díaz, C. Rensing y C. Cervantes. 2012. The ChrA homologue from a sulfur-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confers chromate resistance. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28:865-869.

Aguilera S., M.E. Aguilar, M.P. Chávez, J.E. López-Meza, M. Pedraza-Reyes, J. Campos-García y C. Cervantes. 2004. Essential residues in the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 232:107-112.

Alvarez A.H., R. Moreno-Sánchez y C. Cervantes. 1999. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa.* Journal of Bacteriology 181:7398-7400.

Branco R., A.P. Chang, T. Johnston, V. Gurel, P. Morais y A. Zhitkovich. 2008. The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element Tn*OtChr* confers resistance to chromium (VI) and superoxide. Journal of Bacteriology 190:6996-7003.

Caballero-Flores, G.G., Y.M. Acosta-Navarrete, M.I. Ramírez-Díaz, J. Silva-Sánchez y C. Cervantes. 2012. Chromate resistance genes in plasmids from antibiotic-resistant nosocomial enterobacterial isolates. FEMS Microbiology Letters 327:148-154.

Caballero-Mellado J., J. Onofre-Lemus, P. Estrada-de los Santos y L. Martínez-Aguilar. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Applied and Environmental Microbiology 73:5308-5319.

Cervantes, C. 1991. Bacterial interactions with chromate. Antonie van Leeuwenhoek 59:229-233.

Cervantes, C. 1992. Bacterias que expulsan metales pesados. Información Científica y Tecnológica 14:13-17.

Cervantes C., J. Campos-García, S. Devars, F. Gutiérrez-Corona, H. Loza-Tavera, J.C. Torres-Guzmán y R. Moreno-Sánchez. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiology Reviews 25:335-347.

Cervantes C. y J. Campos-García. 2007. Reduction and efflux of chromate by bacteria. P. 407-419. En: Molecular Microbiology of Heavy Metals. Microbiology Monographs, Vol. 6. D.H. Nies y S. Silver (Eds.) Springer-Verlag, Berlin.

Cervantes, C. y H. Ohtake. 1988. Plasmid-determined chromate resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 56:173-176.

Cervantes C., H. Ohtake, L. Chu, T.K. Misra y S. Silver. 1990. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. Journal of Bacteriology 172: 287-291.

Cervantes, C. y S. Silver. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27:65-71.

Cervantes, C. y S. Vaca. 1991. Cromatos: resistencia y destoxificación en bacterias. Revista Latinoamericana de Microbiología 33:71-76.

Cervantes, C. y S. Vaca. 1992. La resistencia bacteriana a los metales pesados. Ciencia y Desarrollo 17:86-96.

Cervantes-Vega, C., J. Chávez, N.A. Córdova, P. de la Mora y J.A. Velasco. 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios 48:159-163.

Chain P.S.G., V.J. Denef, K.T. Konstantinidis et al. 2006. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103:15280-15287.

Córdova-Arredondo N.A. 1986. Resistencia a cromato determinada por plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Licenciatura. Escuela de QFB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, 68 pp.

Díaz-Magaña, A., E. Aguilar-Barajas, R. Moreno-Sánchez, M.I. Ramírez-Díaz, H. Riveros-Rosas, E. Vargas y C. Cervantes. 2009. Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 191:5441-5445.

Díaz-Pérez C., C. Cervantes, J. Campos-García, A. Julián-Sánchez y H. Riveros-Rosas. 2007. Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. The FEBS Journal 274:6215-6227.

Díaz-Pérez, C., H. Riveros-Rosas y C. Cervantes. 2005. Análisis filogenético de la proteína transportadora de cromato ChrA. Ciencia Nicolaita 42:103-121.

Flores-Alvarez, L.J., A.R. Corrales-Escobosa, C. Cortés-Penagos, M. Martínez-Pacheco, K. Wrobel-Zasada, K. Wrobel-Kaczmarczyk, C. Cervantes y F. Gutiérrez-Corona. 2012. The *Neurospora crassa chrA* gene is up-regulated by chromate and its encoded ChrA protein causes chromate-sensitivity and chromium accumulation. Current Genetics 58:281-290.

Henne K.L., C.H. Nakatsu, D.K. Thompson y A.E. Konopka. 2009. High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. BMC Microbiology 9:199.

Jiménez-Mejía R., J. Campos-García y C. Cervantes. 2006. Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters 262:178-184.

León-Márquez, Y.L., M.I. Ramírez-Díaz y C. Cervantes. 2011. Clonación y expresión funcional de proteínas bacterianas de la familia LCHR. Ciencia Nicolaita 53:36-47.

Martínez-Valencia, R., G. Reyes-Cortés, M.I. Ramírez-Díaz, H. Riveros-Rosas y C. Cervantes. 2012. Antiparallel membrane topology of paired short-chain chromate transport proteins in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters 336:113-121.

McGrath S.P. y S. Smith. 1990. Chromium and nickel. P. 125-150. En: Heavy Metals in Soils, B.J. Alloway (Ed.). Wiley: Nueva York.

Nicholson, M.L. y D.E. Laudenbach. 1995. Genes encoded on a cyanobacterial plasmid are transcriptionally regulated by sulfur availability and CysR. Journal of Bacteriology 177:2143-2150.

Nies A., D.H. Nies y S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus.* Journal of Biological Chemistry 265:5648-5653.

Nies D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27:313-339.

Nies D.H., S. Koch, S. Wachi, N. Peitzsch y M.H. Saier, Jr. 1998. CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. Journal of Bacteriology 180:5799-5802.

Pimentel B.E., R. Moreno-Sánchez y C. Cervantes. 2002. Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. FEMS Microbiology Letters 212:249-254.

Ramírez-Díaz M.I., C. Díaz-Pérez, E. Vargas, H. Riveros-Rosas, J. Campos-García y C. Cervantes. 2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. Biometals 21:321-332.

Rapp M., E. Granseth, S. Seppala y G. von Heijne. 2006. Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. Nature Structural & Molecular Biology 13:112-116.

Reyes-Gallegos, R.I., M.I. Ramírez-Díaz y C. Cervantes. 2016. *chr* genes from adaptive replicons are responsible for chromate resistance by *Burkholderia xenovorans* LB400. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32:45.

Robles-Camacho J. y M.A. Armienta. 2000. Natural chromium contamination of groundwater at León Valley, México. Journal of Geochemical Exploration 68:167-181.

Saier M.H. Jr. 2003. Tracing pathways of transport protein evolution. Molecular Microbiology 48:1145-1156.

Shanker, A.R., C. Cervantes, H. Loza-Tavera y S. Avudainayagan. 2005. Chromium toxicity in plants. Environment International 31:739-753.

Silver S. y L.T. Phung. 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32:587-605.

Cortesía del Dr. Gerardo Sánchez.