

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA – IZTAPALAPA



“Generación de cultivo celular en suspensión de *Arabidopsis thaliana* como método de fitoacumulación de Plomo (II) usando EDTA como quelante”

T E S I S

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

Ing. Israel Montes de Oca Nava

MAT: 2163802259

Asesor:

Dr. Francisco Cruz Sosa

Lector:

Dra. Angélica Román Guerrero

Ciudad de México

Diciembre, 2017

Febrero de 2018

El Jurado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados

"Generación de cultivo celular en suspensión de *Arabidopsis thaliana* como método de fitoacumulación de Plomo (II) usando EDTA como quelante."

Que presentó:

Ing. Israel Montes de Oca Nava

Asesor:

Dr. Francisco Cruz Sosa



Lector:

Dra. Angélica Román Guerrero



DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico en especial a mi madre, pues sin contar con su apoyo moral y económico este proyecto no se pudo haber realizado.

-Nunca menciones que no puedes hacer algo, si
no has tenido la dicha de haberlo intentado-

Agradecimientos

A mí madre por haberme dado la oportunidad de tener apoyo de su parte para realizar este proyecto, siempre ha estado conmigo en el mejor y peor momento de mi vida.

Al doctor Francisco Cruz Sosa por entregarme su confianza para realizar este proyecto en su laboratorio, realmente es un tutor accesible y comprensible.

Al estudiante Aurelio que me brindo todas las herramientas técnicas y consejos para una buena ejecución de métodos, sin duda una persona muy inteligente.

A Sergio Rossano, siendo mi jefe en mi trabajo me apoyo con disponibilidad de tiempo para realizar mis experimentos en la especialidad, siendo un jefe al le admiro por su entrega al trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	6
Índice de tablas	9
Índice de gráficos	10
Resumen	11
1. Introducción	12
2. Antecedentes	13
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> en el campo de la fitorremediación	
2.1.2 Cultivos celulares en suspensión	14
2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> aspectos moleculares para diseño de cultivo celular	15
2.3 EDTA como quelante	18
2.4 Efectos de Plomo en la salud humana.	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	21
6. Materiales y Métodos.	22
6.1 Tratamientos para asépticos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
6.2 Medio de cultivo	23
6.3 Tratamientos para la generación de callo	23
6.3.1 Optimización de callos	24
6.4 Generación de cultivo en suspensión	24
6.5 Determinación de glucosa en el medio de cultivo.	24
6.6 Determinación de viabilidad celular.	25
6.7 Determinación de peso seco	25

6.8 Determinación de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimiento biomasa sustrato	25
6.9 Ensayos de EDTA y Glutamina	26
6.10 Determinación de plomo (II) por espectrometría de masas	26
7. Resultados	27
7.1 Tratamientos para asépticos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
7.2 Tratamientos para la generación de callo	28
7.3 Generación de cultivo en suspensión	31
7.4 Análisis del crecimiento celular	33
7.5 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación	36
7.6 Análisis de tamizados	38
7.7 Ensayos de EDTA y Glutamina	39
7.8 Determinación de Plomo en células en suspensión	
8. Discusión	45
9. Conclusiones	47
10. Perspectivas	47
11. Referencias.	48

INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.** La generación de fitoquelatinas son péptidos sintetizados en 3 pasos enzimáticos a partir de aminoácidos en el primer paso se involucra glutamil cisteína sintetasa (GCS) en el segundo paso glutatión sintetiza es necesaria para la generación de fitoquelatinas en plantas transgénicas la sobreexpresión de estas dos enzimas se relaciona a la resistencia de plantas en contacto con metales pesados
18
- Figura 2.** Investigación de patios de casas en Torreón con una n= 5, se muestra la cantidad de plomo (II) encontrado. **19**
- Figura 3.** Concentración de plomo en la sangre de los niños a diferentes distancias de la inmediación de la empresa metalúrgica **19**
- Figura 4.** Asépticos de *Arabidopsis thaliana* generados a partir de semilla, las plantas en la imagen tienen 2 semanas de germinación **28**
- Figura 5.** Callos generados a partir de tejido vascular de *Arabidopsis thaliana*, de izquierda a derecha, A) tratamiento con 2,4-D + Kin, B) tratamiento con 2,4-D, C) tratamiento con ANA, D) tratamiento con AIB **29**
- Figura 6.** De los asépticos generados se toman secciones de parte vascular de la planta probando con diferentes concentraciones de hormona descritos en la tabla 7 **29**
- Figura 7.** Después de 3 semanas los cultivos celulares con mayor concentración de hormona (a la izquierda aun presenta color verde) **29**
- Figura 8.** Callos en suspensión, el medio contiene 1 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de Kin, la agitación permite la suspensión de células en el medio **31**
- Figura 9.** Células en suspensión con glucosa provenientes de callos con concentración hormonal de 3mg/L y 0.3 mg/L de 2,4-D y Kin respectivamente. En 37 días alcanzaron una concentración celular de 0.3×10^6 con 100% de viabilidad **32**
- Figura 10.** Mismo tiempo de entre pase 2 y pase 3 (59 días), en la tabla se muestra el resumen del crecimiento de las líneas celulares, las líneas alcanzan la mitad de densidad celular que el pase 2, este fenómeno puede ser explicado por un agotamiento de glucosa en el día 36 donde se decidió dar un pulso de glucosa (la línea marca ese evento), el crecimiento fue significativo para ambas líneas **36**
- Figura 11.** Considerando la máxima velocidad de crecimiento como 0.0016 el tiempo de duplicación de la línea es de 433.2 horas equivalentes a 18 días **37**

Figura 12. Considerando la máxima velocidad de crecimiento como 0.0013 el tiempo de duplicación de la línea es de 533.2 horas equivalentes a 22 días
37

Figura 13. Proceso beta, tamizado 2-4 D después de 59 días, por el método colorimétrico no se detectó glucosa.
38

Figura 14. (A la izquierda imagen del proceso alfa correspondiente a la combinación entre 2-4D+ Kin) células de tamizado mayor debri celular (flechas azules) la glucosa se encontraba en 40 g/L, no hubo consumo de glucosa, (lado derecho imagen del proceso alfa correspondiente al tratamiento de 2-4D) la glucosa se encontraba no detectable con el método colorimétrico, se observa mayor aglomeración entre células.
39

Figura 15 Los tratamientos con plomo tanto de células como tamizado mostraron un cambio de color a blanco, este mismo color se presentó en el tratamiento 2 y 4 pero hacer agregado el EDTA el color se tornó cristalino
39

Figura 16. Tratamientos de acuerdo a la descripción en el inciso 6.9, extremo derecho los tratamientos 3 para ambas hormonas el color del medio presento un color blanquecino
40

Figura 17. A la izquierda el control del tamizado células aglomeradas glucosa a 6 g/L), a la derecha tratamiento de tamizado con plomo y glutamina células de mayor tamaño, glucosa 4 g/L (2,4-D) (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales.)
40

Figura 18. Matraz con células control, algunas aglomeradas, (2,4-D) (3 días de tratamiento) la glucosa se encontraba en 6.6 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales) a la derecha mismo Matraz a los 20 días
40

Figura 19. Matraz con tratamiento 2, células de menor tamaño al tratamiento (2,4-D), la glucosa se encontraba en 3.5 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales)
41

Figura 20. Tratamiento 3, no se logra distinguir gran crecimiento celular (2,4-D) la glucosa se encontraba en 6.5 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales) a la derecha mismo matraz a los 20 días.
41

Figura 21. Tratamiento 4, hay un incremento en la cantidad de células en el sobrenadante (2,4-D), la glucosa se encontraba en 7.9 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con

metales) a la derecha mismo matraz a los 20 días
42

Figura 22. Matraz 1 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento
42

Figura 23. Matraz 3 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento
42

Figura 24. Matraz 4 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento
42

Figura 25. Matraz 1,3, 4 (de izquierda a derecha) a los 26 días de tratamiento, las células del tratamiento 3 pierden estructura uniforme al redor de ellas, se aprecia gran ruptura celular
43

Figura 26. Tamizados de Matraz 1, 3, 4 (de izquierda a derecha) de la hormona 2,4-D a los 26 días de tratamiento, célula viable del tratamiento 3 con aspecto granuloso
43

Figura 27. En orden, peso seco de los matraces: control, M3 y M4 de 2,4-D el tratamiento M4 no presenta oxidación en las células
43

Figura 28. En orden, peso seco de los matraces: control, M2, M3 y M4 de (2,4-D + Kin) el tratamiento M4 y M2 no presenta oxidación en las células
44

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	1.	Tratamiento	1
	22		
Tabla	2.	Tratamiento	2
	22		
Tabla 3.	Tratamiento 3		22
Tabla	4.	Tratamiento	4
	22		
Tabla	5.	Compuestos del medio de cultivo MS ½ para 1 L	23
	23		
Tabla	6.	Tratamientos hormonales	24
	24		
Tabla 7.	Concentraciones de la combinación de hormonas		24
Tabla	8.	Tratamientos de Plomo (II), Glutamina y EDTA	26
	26		
Tabla	9.	Resumen los tratamientos para asépticos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
	27		
Tabla 10.	Pase 0 de células de <i>A. thaliana</i> con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D		
	33		
Tabla 11.	Pase 0 de células de <i>A. thaliana</i> con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D + Kin		
	33		
Tabla 12.	Pase 1 de células de <i>A. thaliana</i> con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D		
	34		
Tabla 13.	Pase 1 de células de <i>A. thaliana</i> con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D + Kin		
	34		
Tabla 14.	Pase 2 de células de <i>A. thaliana</i> con 50 g/L de glucosa inicial, 2,4-D		
	34		
Tabla 15.	Pase 2 de células de <i>A. thaliana</i> con 50 g/L de glucosa inicial, hormona		
	2,4-D+	Kin 100 mL en matraz de 500 mL	34
	34		
Tabla 16.	Pase 3 de células <i>A. thaliana</i> con 50g/L de glucosa inicial hormona 2,4-D		
	35		

Tabla 17.	Pase 3 de células <i>A. thaliana</i> con 50g/L de glucosa inicial hormona 2,4-D + Kin	35
Tabla 18.	Peso fresco del pase 3 del tratamiento 2,4-D	35
Tabla 19.	Peso fresco del pase 3 del tratamiento 2,4-D+ Kin	35
Tabla 20.	Peso seco final de tratamientos de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D	44
Tabla 21.	Peso seco final de tratamientos Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D	44
Tabla 22.	Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D	44
Tabla 23.	Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D + Kin	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1.	Se muestra la cantidad de peso fresco de callo de los diferentes tratamientos, el tratamiento 1: 1 mg/L y 0.1 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, tratamiento 2: 2 mg/L y 0.2 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, por último el tratamiento 3: 4 mg/L y 0.4 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, para cada tratamiento se tuvo una n =3	30
Gráfico 2.	Curva tipo de fenol sulfúrico	33

RESUMEN.

Se determinaron los efectos de plomo (II) en un cultivo celular heterótrofo de *Arabidopsis thaliana* con el fin de evaluar la acumulación del metal. Los callos de los cultivos fueron desarrollados por 2-4D y 2-4D + kin, se mantuvieron por 86 días en medio de cultivo Murashige y Skoog suplementado con 40 g.l⁻¹ de glucosa. A los 59 días de crecimiento se suplemento con: 0.3 mM de Pb (NO)₃, 1.6 mM de glutamina, 1.6 mM de EDTA en diferentes combinaciones, se evaluó el consumo de glucosa, la concentración celular y la viabilidad del cultivo. Los cultivos que fueron expuestos con Pb (II) y glutamina con ausencia de EDTA presentaron un menor crecimiento celular sin embargo fueron los que mayor Pb (II) acumularon además de observar inhibición prematura en el consumo de glucosa, mientras que los cultivos con presencia de Pb (II) y EDTA tuvieron un mayor crecimiento, aunque no se encontró en gran medida acumulación de metal, lo cual puede explicar que la presencia de quelantes en un medio permite a las células tomar al metal

como nutriente, mientras que en ausencia del quelante las células solo acumulan al metal, este último suceso puede servir como estrategia para su recuperación en gran medida.

1. INTRODUCCIÓN.

Actualmente en el campo de la biotecnología se utilizan organismos para la producción de metabolitos primarios y secundarios de interés industrial, sin embargo en biotecnología ambiental el interés se basa en la obtención de organismos que sean capaces de eliminar metales pesados en agua, suelo, y aire.

Dentro del uso de plantas se encuentran especies provenientes de la familia de las brasicáceas (Brassicaceae) o crucíferas (Cruciferae) de la familia de angiospermas dicotiledóneas que incluye una de las especie que se considera un organismo modelo en investigaciones biológicas: *Arabidopsis thaliana*, la cual tiene capacidad de adsorción de metales pesados en sus orgánulos disminuyendo

la concentración de metal que se encuentra en el ambiente. (Cobbett, 2002; Kramer 1996)

Una desventaja del uso de plantas como modelos de estudios en eliminación de metales es el tiempo de crecimiento y desarrollo, el cual hace de la investigación una tarea amplia que puede durar meses o años, una estrategia en el campo de la biotecnología para disminuir el tiempo en estudios relacionados en organismos, es el desarrollo de cultivos celulares que ofrecen datos específicos de los efectos ante cambios de gradientes de concentración de una variable de control como: pH, temperatura, iones, esfuerzo de corte, reología, oxígeno, presión, así mismo destacan los estudios de respuesta al agregar algún patógeno, simbiontes, fármacos, hormonas, nutrientes- (Kaur, 2012).

El estudio sobre las aplicaciones de cultivos celulares en suspensión de plantas en procesos de biorremediación, es un campo amplio por explorar, los estudios pueden ser diversos sobre diferentes variables que influyen sobre las células, dando información relevante sobre sucesos específicos, generalmente los estudios se han centrado a nivel organismo, el cual limita el entendimiento del comportamiento celular ante la interacción con metales pesados, la observación *in vitro* de cultivos celulares podrían ayudar a diseñar nuevas metodologías para la utilización de cultivos en suspensión para la recuperación de metales pesados, al igual que el uso de estrategias innovadoras en el uso de organismos para el mismo objetivo.

La propuesta de investigación se basa principalmente en la generación de cultivos celulares de *A. thaliana* la cual se ha clasificado como una planta hiperacumuladora de metales con objetivo de diseñar una metodología de fitoacumulación, a su vez durante el diseño se propone incrementar la eficiencia de adsorción de los metales con la adición de quelates y proteger a de la línea de posible oxidación (fenómeno que se presenta por el contacto al metal), usando glutamina, como protector al fenómeno de oxidación.

2. ANTECEDENTES.

2.1 *Arabidopsis thaliana* en el campo de la fitorremediación.

El área que tiene como objetivo eliminar contaminantes que se encuentren en el ambiente teniendo como herramienta a las especies vegetales, se le conoce como fitorremediación (Huang, & Cunningham., 1996) con respecto a términos económico los procesos de eliminación de contaminantes por métodos convencionales en Estados Unidos se aproximan a los 1.6 millones de dólares mientras que el uso de la fitorremedación es 1000 veces menor el costo que un método convencional, en términos biológicos se tienen varias plantas las cuales han servido como modelos de estudio, existen varios casos descritos dentro de la fitorremediación como: extracción o translocación de cationes, hiperacumulación, reacciones redox donde la especie química se hace menos tóxicas, la fitorremediación tiene gran relevancia pues al ser tratados los contaminantes del ambiente puede disminuir problemas de salud humana relacionados a ellos.(Ames, 1984)

A.thaliana es una planta con flor euroasiática, considerada como modelo de estudio genético, su genoma apenas alcanza las 135 megabases colocándola en una de las especies con genoma pequeño, su importancia radica en que fue la primera especie vegetal en la cual se tuvo información completa de un genoma vegetal, en el campo de la biotecnología ambiental su importancia comprende de su capacidad para acumular en gran cantidad metales pesados y poder tolerarlos en sus organelos, por eso se ha clasificado como hiperacumuladora (Clemens, *et al.*, 2002) y fitoextractora, una vez que se ha producido la adsorción de metales en el orgánulo el agente contaminante no es degradado, lo que favorece la recuperación del agente contaminante si es de interés industrial (Brooks, 1998) esto la hace ser una herramienta importante para en el campo de la fitorremediación.

Existen diferentes explicaciones que intentan describir los fenómenos de la hiperacumulación por ejemplo la generación de quelatos que permiten una mejor

interacción con los metales pesados transportándolos con facilidad a las vacuolas. (Barcelo, 2002) el transporte de los metales especialmente a hojas viejas donde las plantas pueden usarlas como mecanismos de defensa contra algún depredador (Assunção, 2003). La hiperacumulación puede ser mejorada por los microorganismos asociados a las plantas (Hong-Bo, *et al.*, 2010) que pueden sintetizar quelantes que le permitan a la planta una mayor biodisponibilidad de los metales. (Barona, 2001).

Metales como cadmio, arsénico, mercurio y uranio se consideran como inmutables por lo cual representan un reto para la fitorremediación, mientras que Fe (III) y Zn son los modelos más estudiados en *Arabidopsis*, plomo aún sigue siendo un elemento el cual no se tiene información detallada.

2.1.2 Cultivos celulares en suspensión.

Actualmente existen 3 formas de clasificación de cultivos en suspensión el primero son los fotoautótrofos, donde la fuente de carbono es CO₂, el segundo son los heterótrofos donde la fuente de carbono puede ser azúcar, cuando la fuente es agotada, la línea puede desencadenar vías de señalización de estrés por carencia de carbono, mientras que su actividad fotosintética se considera baja o nula en presencia de glucosa, (Hampp, *et al.*, 2012) y por último los cultivos los mixtos son aquellos que pueden ser tanto autótrofos como heterótrofos.

Los cultivos autótrofos encierran en gran medida estudios de fotosíntesis, rutas metabólicas donde se involucra al nitrógeno, producción de metabolitos secundarios y respuestas de defensa, este tipo de cultivos son usados en gran medida para la caracterización de líneas resistentes a herbicidas.

En cuanto a los cultivos en suspensión de *A.thaliana* reportes de Roitsh en 2002, destacan el uso de glucosa para la generación del medio de cultivo y reconocen que la actividad fotosintética para el cultivo es nula, desventaja de los cultivos autótrofos que representan los modelos más poderosos para biotecnología

vegetal, aunque los cultivo heterótrofos pueden tener la ventaja de alcanzar altas densidades celulares en cuanto a los cultivos autótrofos no es posible alcanzar en primer estancia, realizar cultivos en suspensión actualmente representa grandes retos, y se considera una práctica elusiva, sin embargo el objetivo principal es la obtención de población homogénea en los cultivos que proporcionan información ideal pues los resultados pueden ser reproducibles.

2.2 *Arabidopsis thaliana* aspectos moleculares para diseño de cultivo celular.

Estudios actuales en biotecnología vegetal con aplicación a la biorremediación comprende el entendimiento molecular de las interacciones de los microorganismos con las plantas donde se ha reportado que el aumento de pH de la rizosfera permite quelar iones, las plantas tolerantes a metales hacen uso bombas de flujo que son dependientes de energía, proteínas ligadoras de metales como metalineina, y reductasas que realizan reacciones redox para volver a los metales a su forma no toxica.; junto con la ingeniería genética se ha desarrollado la colocación de genes bacterianos de citrato sintasa en tabaco y papaya el cual incrementa la tolerancia contra Al (III) (Morikawa, *et al.*, 2003) estudios metabólicos se han centrado en aumentar la expresión de niveles intracelulares de glutatión y fitoquelatinas que ayuda a la tolerancia al Cd (III).(McGrath, *et al.*, 2003).

Mientras que descripciones en el medio de cultivo la presencia de ácidos orgánicos como citrato permiten la quelación de metales como Al (III) que ayudan al transporte interno a la vacuola. La presencia de aminoácidos como histidina, se relaciona en gran medida a la tolerancia a níquel. (Kramer, *et al.*, 1996), aunque en gran medida aun es desconocido a ciencia cierta el rol de esos ligando. Fuentes de carbono como la glucosa, el ácido cítrico, y el EDTA favorecen la fitoextracción de Cu, y agentes como: EDDS, etilendiamino disuccínico, incrementa la solubilidad de Cu y Zn, lo cual favorece procesos de absorción de la planta (Batista, *et al.*, 2009)

El cadmio es un metal pesado siendo uno de los más tóxicos empleado para la construcción de pilas, su uso comercial es de importancia, una de las respuestas en interacción con células de tabaco y Pb^{+2} , fue la generación peróxido (Haydon, 2007). Relacionado con la ruta de calcio/ calmodin, los estudios moleculares han determinado la íntima relación entre la presencia de cadmio y cobre con la acumulación de calcio y liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno, son especies químicas entre las cuales se destacan el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y los radicales libres: superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo (OH^{\bullet}) debido a que son potencialmente cancerígenos, facilitan la mutagénesis, están relacionados a la activación de apoptosis celular, así como la oxidación de proteínas y lípidos. (Boveris, 2005).

Los radicales libres son altamente inestables debido a que carecen de un electrón en su último nivel, el cual roban de moléculas cercanas a su ambiente. Si esta reacción ocurre sobre aminoácidos de una proteína, puede causar efectos negativos en la estructura y actividad de la proteína. Cuando el peróxido se encuentra con metales como cobre y fierro puede generarse radicales libres (Reacción de Fenton), cuyos productos de reacción son hidroxilos (OH^{\bullet}). El hidroxilo está implicado en la modificación de estructuras terciarias de las proteínas y en la modificación del DNA debido a su alta preferencia a reaccionar con las purinas. (Kasai, et al., 1991).

En los sistemas celulares, la cantidad de ROS se regulan mediante sistemas internos de antioxidación, que inactivan los radicales libres (Kirsch, & De Groot, 2001). Entre estos sistemas se encuentran la catalasa (CAT), superóxido dismutasa, (SOD) y el glutatión (Dröge, 2002). Cuando el sistema interno de anti oxidación no es capaz de poder mantener la homeostasis redox, la célula queda a merced de los daños causados por ROS a este fenómeno se le conoce como estrés oxidativo.

Las reacciones de oxidorreducción del glutatión mantienen a las proteínas que tienen cisteínas en su estructura en un estado reducido. Este es un sistema

dinámico en que el glutatión (GSH) es oxidado a través de la enzima glutatión peroxidasa formando puentes disulfuro (GSSG), regresando a su estado reducido gracias a NADPH y glutatión reductasa. (Kirsch, & De Groot, 2001).

En *A.thaliana* glutatión transferasa (GST6) es activado por la generación de ROS, con el objetivo de mantener la homeostasis redox, (Hong-Bo, et al., 2010). Con respecto a metales en tratamientos de agua residuales las plantas expuestas a metales como cadmio y plomo inhibió de 70 a 100% de GST tanto in vivo como in vitro.

Una de las estrategias para proteger a las células contra los daños que pueden desencadenar las ROS por la presencia de metales pesados, es aumentar las vías de activación de glutatión, esto puede ayudar a la célula a tener una mayor resistencia contra los efectos negativos de las ROS.

Estrategias descritas en los medios de cultivo como los de insecto donde el uso de un vector viral desencadena la generación de ROS, es la adición de compuestos en el medio de cultivo como: cisteína y glutamina, que han jugado un papel importante en el control del estrés oxidante, ya que son precursores de glutatión, principal regulador del redox intracelular (Palomares, et al., 2004). Otro aminoácido como la metionina juega un papel importante en el control del estrés oxidante, ya que es un precursor de cisteína la cual está relacionada en el aumento de la actividad de glutatión. (Doverskog, et al., 1998).

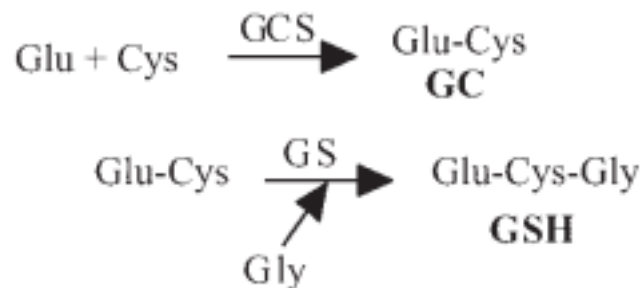


Fig. 1 La generación de fitoquelatinas son péptidos sintetizados en 3 pasos enzimáticos a partir de aminoácidos en el primer paso se involucra glutamil cisteína sintetasa (GCS) en el segundo paso glutatión es sintetizado ya que es necesario para la generación de fitoquelatinas en plantas transgénicas, la sobreexpresión de estas dos enzimas se relaciona a la resistencia de plantas en contacto con metales pesados. (Navarro, *et al.*, 2007)

2.3 EDTA como quelante.

El EDTA también conocido como ácido etilendiaminotetraacético es una sustancia utilizada como quelante que puede crear complejos con metales de forma reversible, lo cual lo convierte en un ligando hexadentado, el EDTA se ha usado en el campo de la fitorremediación para la translocación de metales en suelo a partes arteriales de las plantas, el uso de 2.5 mmol/Kg de EDTA se ha reportado con gran eficiencia para la fitoextracción de metales pesados en el suelo entre ellos: cobre, cadmio, níquel, plomo y zinc, mientras que concentraciones de 4 g/Kg resulto en la estimulación de fitoacumulación de cobre, cobalto y níquel. (Yang, 2005) esto aún o no ha sido reportado en cultivos en suspensión.

2.4 Efectos de Plomo en la salud humana.

En México las empresas metalúrgicas son algunas principales causantes de contaminación ambiental, entre ellos los metales pesados que al ser liberados al ambiente la población es expuesta a sus efectos, un estudio realizado por Vargas en 2007 muestra la cantidad de plomo encontrado en 3 zonas habitacionales, encontrándose concentraciones hasta de 15000 ppm de plomo.

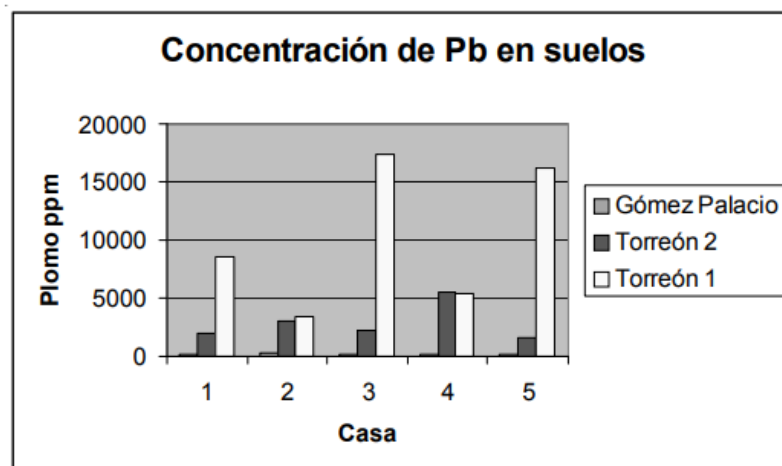


Fig.2 Investigación de patios de casas en Torreón con una n= 5, se muestra la cantidad de plomo (II) encontrado. (Vargas, 2007)

Un estudio por el mismo autor en 2001 detallada la concentración de plomo en sangre de niños que se encontraban viviendo a diferentes distancias de la empresa metalúrgica en Torreón.

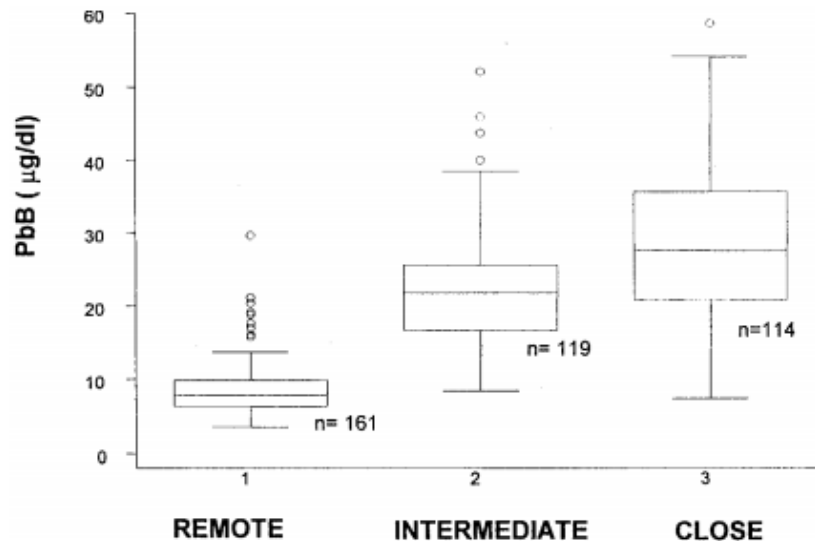


Fig.3 Concentración de plomo en la sangre de los niños a diferentes distancia de la inmediación de la empresa metalúrgica.

Los niños fueron tratados con agentes quelantes para poder eliminar el metal pesado de sus cuerpo.

Las estrategias para la eliminación de metales es de gran relevancia el incremento de enfermedades en la población que están mayormente expuesta, hace un problema para el sector salud. El uso de plantas hiperacumuladoras cerca de esta industria podría ser una estrategia de control de la concentración de metales en el ambiente, mientras que los cultivos en suspensión podrían dar información relevante de la interacción de metal con respecto a las células de las plantas usadas para evaluar parámetros de control que efficienten su adsorción.

3. JUSTIFICACIÓN.

En algunas especies de plantas con capacidad de fitorremediación se han usado de manera *in situ*, sin embargo estos procesos tienen algunas desventajas que se describen a continuación:

El crecimiento limitado de la planta por el contacto de altas concentraciones de contaminantes hace que el proceso sea de larga duración (Ali, 2013).

Si el metal pesado se desea recuperar se debe considerar que hay procesos que las plantas realizan *per se*, por ejemplo pueden liberar los contaminantes a través de sus hojas (fitovolatilización), o aquellos que se acumulan en madera pueden liberarse por procesos de combustión (Bañuelos, 1998) disminuyendo el rendimiento de recuperación del metal.

Con respecto a cultivos celulares el uso de plantas actualmente se ha centrado en la producción de metabolitos secundarios con interés farmacéutico (Smetanska., 2008) mientras que para el campo de la biorremediación aún falta por explorar aplicaciones.

Los cultivos celulares en suspensión en el campo del ambiente puede ofrecer ventajas como:

- Producción de grandes cantidades de biomasa en un lapso corto tiempo con respecto a la generación de un organismo.
- Condiciones controladas para observación de un efecto respuesta ante un estímulo.
- Escalamiento del proceso sin uso de una gran área superficial.
- Diseños controlados para la recuperación de los metales acumulados en las células de la planta.
- Diseño de cultivos que aumenten la capacidad de adsorción de metales sin necesidad del uso de ingeniería genética, como agregar quelatos que ayuden a la biodisponibilidad del metal y aminoácidos como glutamina, que ofrece protección celular contra el estrés oxidativo manteniendo el proceso por más tiempo.

4. HIPÓTESIS.

El uso de cultivo celular en suspensión de células de *Arabidopsis thaliana* puede funcionar como una herramienta de fitoacumulación de plomo (II).

5. OBJETIVOS.

General:

Generar un cultivo celular en suspensión de *Arabidopsis thaliana* evaluando su eficiencia para la adsorción de plomo (II) ante la presencia de un quelante y un protector del estrés oxidativo.

Particulares:

Generar y caracterizar el cultivo celular de *Arabidopsis thaliana* a partir de explantes de hoja y raíz, con la ecuación de Monod.

Evaluar el cultivo celular en presencia de plomo (II) y EDTA para describir si en presencia de un quelante se tiene mayor eficiencia de adsorción del metal y si esto con lleva a una caída de la viabilidad celular.

Evaluar del cultivo celular en presencia de plomo (II) y glutamina, para describir si el aminoácido ayuda a mantener la viabilidad celular.

Evaluar pruebas de cultivo celular en presencia de plomo (II), EDTA y glutamina para describir la eficiencia de adsorción del metal y mantenimiento de la viabilidad celular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6. 1 Tratamientos para asépticos de *Arabidopsis thaliana*.

Se realizaron 4 tratamiento de los explantes de *A. thaliana*, con el objetivo de generar nuevas plantas, y generación de callos de manera aséptica, los tratamientos se basaron en lo descrito por Mroginski, el cual se modificó en tiempo y reactivos usados, a continuación se presenta las condiciones usadas en cada tratamiento:

Tabla 1. Tratamiento 1

Reactivo	Tiempo (minutos)
----------	------------------

Detergente	10
hipoclorito	20

Tabla 2. Tratamiento 2

Reactivo	Tiempo (minutos)
Detergente	10
Etanol 70%	1
hipoclorito	10

Tabla 3. Tratamiento 3

Reactivo	Tiempo (minutos)
Detergente	10
Antibioticos	30
fungicida	20
Etanol 70%	0.75
Hipoclorito	30

Tabla 4. Tratamiento 4

Reactivo	Tiempo (minutos)
Detergente	20
Antibioticos	40
fungicida	40
Etanol 70%	0.5
Hipoclorito	20

El hipoclorito se mezcla con 3 gotas de Tween por cada 100 ml

La sección de antibióticos comprende de: ampicilina 200 mg/L, Tetraciclina 200 mg/L, cetotaxime 15 mg/L, eritromicina 200 mg/L, las concentraciones fueron constantes para los tratamientos.

La sección de fungicida comprende de: Fungoxyl y Antrak ambas en una concentración de 1 g/100 mL, la concentración fue constante para todos los tratamientos.

6.2 Medio de cultivo.

El medio de cultivo para los experimentos fue MS ½. A continuación se muestra las siguientes condiciones de preparación para 1 L.

Tabla 5. Compuestos del medio de cultivo MS ½ para 1 L.

Reactivo	Volumen (mL)
Macronutrientes	50
Vitaminas	0.5
Micronutrientes	0.5
Fe-EDTA	2.5
Antioxidantes	5
Sacarosa	30 g/L
Fitagel	3 g/L

Se agregan todos los compuestos a excepción del fitagel, se ajusta el pH con NaOH 1 N de 5.7 a 5.8, posteriormente se agrega fitagel en agitación y calentamiento hasta que se disuelva completamente.

Para la generación de cultivos en suspensión el fitagel no es necesario en el medio.

6.3 Tratamientos para la generación de callo.

De los asépticos se colocaron por cuadruplicado en tubos de cultivo, tratamientos hormonales para la generar respuesta a formación de callo. A continuación se muestra las hormonas y concentraciones usadas:

Tabla 6. Tratamientos hormonales.

Hormona	Concentración (mg/L)
AIB	1.5
2,4-D	1.5
ANA	2
2,4-D + Kin	1 y 0.1 respectivamente

6.3.1 Optimización de callos.

De las plantas germinadas en los asépticos se toman secciones vasculares para colocarlas por cuadruplicado a diferentes concentraciones de la combinación 2,4-D + Kin

Tabla 7. Concentraciones de la combinación de hormonas.

Combinación	2,4-D (mg/L)	Kin (mg/L)
1	1	0.1
2	2	0.2
3	4	0.4
4	8	0.8

6.4 Generación de cultivo en suspensión.

De los callos formados con los tratamientos hormonales se eligieron los callos formados con 2,4-D y la combinación entre 2,4-D + Kin, se colocaron de manera aséptica en medio MS ½, por duplicado, las concentraciones a usar en cultivo en suspensión fue 1.5 mg/L para 2,4-D y la combinación 2,4-D + Kin 1 y 0.1 (mg/L) respectivamente.

Los callos se colocaron en los matraces en agitación de 110 rpm, temperatura ambiente, en presencia de luz.

6.5 Determinación de glucosa en el medio de cultivo.

La determinación de la glucosa en el medio de cultivo se realizó a través de la técnica de fenol-sulfúrico el cual te permite medir la concentración de azúcares totales, se preparó un stock de 100 µg/L para la curva patrón, la cual sirvió para las concentraciones de: 80, 60, 50, 40 , 30, 20 y 10 µg/L, las muestras son centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, el sobrenadante se le hace dilución 1:100000, 1 mL de la dilución se le agrega 500 µL de fenol al 5%, posteriormente se le agrega 2.5 mL de ácido sulfúrico, se deja reposar por 10 minutos, se mezcla el contenido se colocan los tubos en agua fría por 15 minutos, al concluir se lee a 490 nm.

6.6 Determinación de viabilidad celular.

Se realizó a través de conteo en hetocitometro en microscopio (Zeiss AX10) con objetivo de 40X, la tinción de azul de Evans se ocupó al 0.025% (v/v). Antes del conteo el azul de Evans se coloca en contacto con las células por 15 minutos. El cálculo de total de células se realizó se la siguiente manera:

Total de células= (células contadas/número de campos) x Factor de dilución x 10000

6.7 Determinación de peso seco

Se construyeron charolas de aluminio para capacidad de 5 mL, se dejaron en horno por 24 horas como mínimo para eliminación de humedad, al culmine del tiempo de eliminación de humedad, se pesaron en balanza analítica y se anotó el peso correspondiente a cada charola, una vez pesada la charola se le coloco la muestra de cultivo (anotando el volumen colocado en cada charola), se dejó en horno por 48 horas, al culmine del tiempo se pesó la charola.

Peso seco en g/L = (peso charola- peso charola con muestra en gramos)/ volumen agregado en L

6.8 Determinación de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y rendimiento biomasa sustrato.

Se utilizó la ecuación de Monod la cual al graficar el $\ln x_2 / \ln x_1$, siendo x_2 concentración celular final y x_1 concentración celular inicial, contra la diferencia de tiempos ($T_2 - T_1$), se obtiene la ecuación de la curva la cual el valor de la pendiente será la velocidad máxima de crecimiento (μ). Este valor puede es sustituido para encontrar el tiempo de duplicación:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

El rendimiento de biomasa sustrato se calcula como:

$$\Delta x / s = (x_2 - x_1) / (S_i - S_f)$$

Siendo (S_i) la concentración final de glucosa y (S_f) la concentración final de glucosa dada en g/L.

6.9 Ensayos de EDTA y Glutamina.

Se colocó 1 g de células en matraces de 25 ml de cada tratamiento hormonal, cada matraz contenía un tratamiento que se describe a continuación, se usó como $Pb(NO)_3$ como fuente de plomo (II), mientras que la L-glutamina (SAFC, USA) se encontraba en líquido a una concentración de 200mM.

Tabla 8. Tratamientos de Plomo (II), Glutamina y EDTA.

Etiqueta	Reactivos	Concentraciones
Matraz 1	control	Sin tratamiento
Matraz 2	EDTA, Plomo, Glutamina	1.6 mM, 0.3mM, 1.6mM
Matraz 3	Plomo, glutamina	0.3mM, 1.6mM
Matraz 4	EDTA, Plomo	1.6 mM, 0.3mM

6.10 Determinación de Plomo (II) por espectrometría de masas.

La biomasa de muestras de los tratamientos del inciso 6.9 se recolectaron y se filtraron en vacío, durante la filtración se realizó de 3 a 4 lavados con agua destilada para cada muestra, posteriormente se dejaron secando en horno a 50°C por 12 horas, al finalizar se pesó la cantidad de biomasa.

La biomasa recolectada se le humedeció con 1 ml de agua destilada, se colocó en calentamiento, cuando se observó la evaporación del agua, se le agregó en una relación 1:3 de ácido nítrico, y ácido clorhídrico, siguiendo ese orden de agregado, posteriormente se dejó calentando por 5 minutos, al concluir la mezcla, y se dejó enfriar. Posteriormente la mezcla de ácidos se filtran y se aforan a 100 ml con agua.

Las muestras fueron medidas en espectrómetro de adsorción atómica (EspectrAA 220FS, Varian) teniendo un rango de medición de 0 a 25 ppm de plomo en la curva de calibración.

7. RESULTADOS

7.1 Tratamientos para asépticos de *Arabidopsis thaliana*

A continuación se muestra una tabla de resumen de los tratamientos realizados a los explantes, el tratamiento 1, y 2 solo contenían etanol y cloro, los cultivos mostraron 100 % contaminación, 0% de oxidación la cual se identifica por pérdida de clorofila de la hoja, el tratamiento 3 y 4 incluían antibióticos y fungicida, los cuales ayudaron a disminuir la contaminación, sin embargo los tejidos de la planta mostraban pérdida de clorofila, en el tratamiento 4 se disminuyó el tiempo de contacto entre etanol y cloro con respecto al explante aumentado el índice de explantes viables para la inducción a callo.

Tabla 9. Resumen los tratamientos para asépticos de *A. thaliana*.

Tratamiento	Oxidación %	Contaminación %
1	0	100%
2	0	100%
3	100%	66%
4	10%	15%



Fig. 4 Asépticos de *Arabidopsis thaliana* generados a partir de semilla, las plantas en la imagen tienen 2 semanas de germinación

7.2 Tratamientos para la generación de callo

De los tratamiento para inducción de callo la combinación entre 2,4-D + Kin fue eficiente en cuanto a tamaño del callo generado, el tratamiento con 2,4-D también resulto en la formación de callos aunque el tamaño era menor, el tratamiento con ANA resulto en la generación de raíz, mientras que el tratamiento con AIB solo 1 tubo de 4 genero una mínima cantidad de callo.

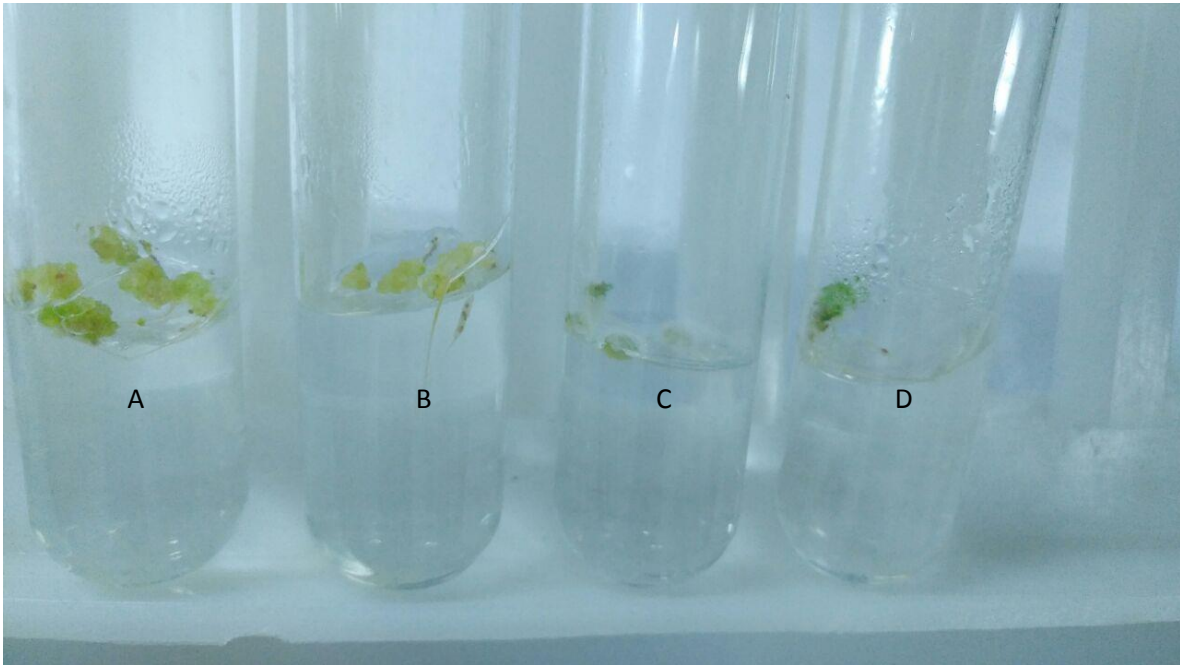


Fig.5 Callos generados a partir de tejido vascular de *Arabidopsis thaliana*, de izquierda a derecha, A) tratamiento con 2,4-D + Kin, B) tratamiento con 2,4-D C) tratamiento con ANA, D) tratamiento con AIB.

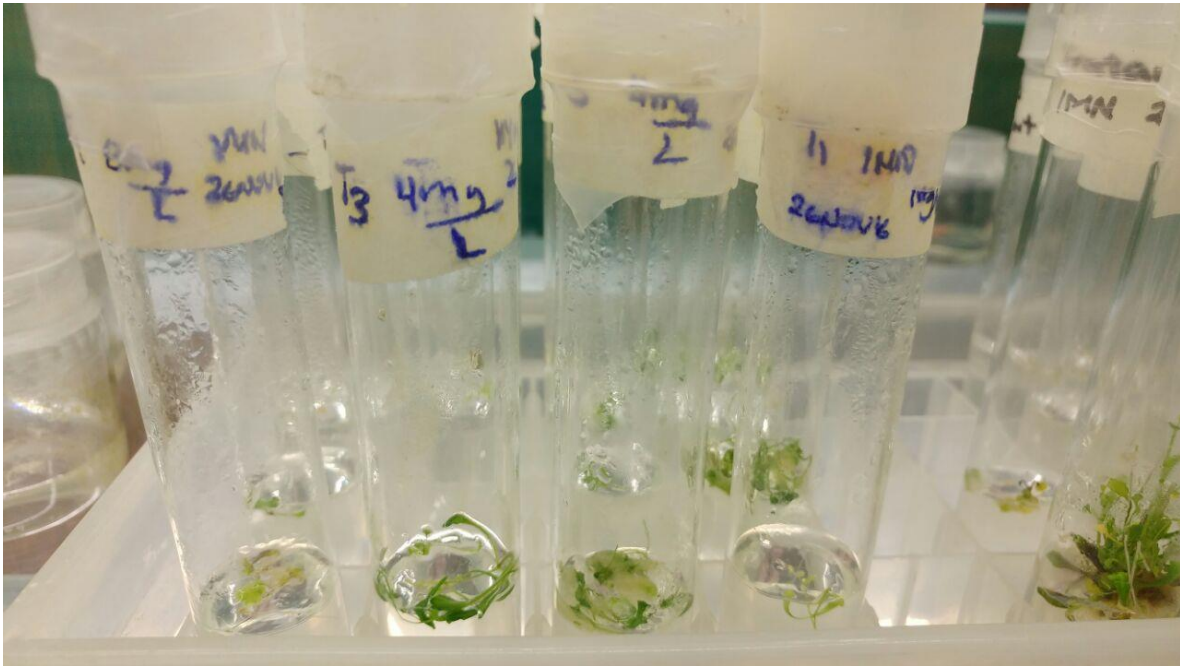


Fig.6 De los asépticos generados se toman secciones de parte vascular de la planta probando con diferentes concentraciones de hormona descritos en la tabla 7.

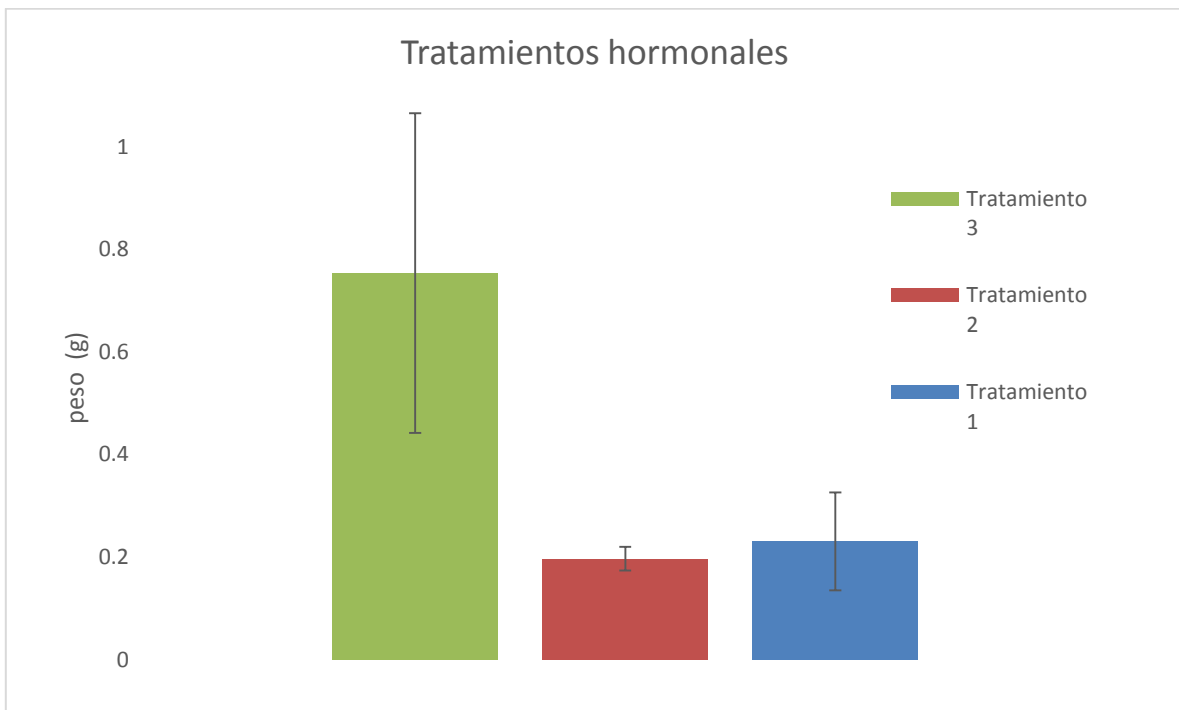


Grafico 1. Se muestra la cantidad de peso fresco de callo de los diferentes tratamientos, el tratamiento 1: 1 mg/L y 0.1 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, tratamiento 2: 2 mg/L y 0.2 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, por último el tratamiento 3: 4 mg/L y 0.4 mg/L de la hormona 2,4-D con Kin respectivamente, para cada tratamiento se tuvo una n =3

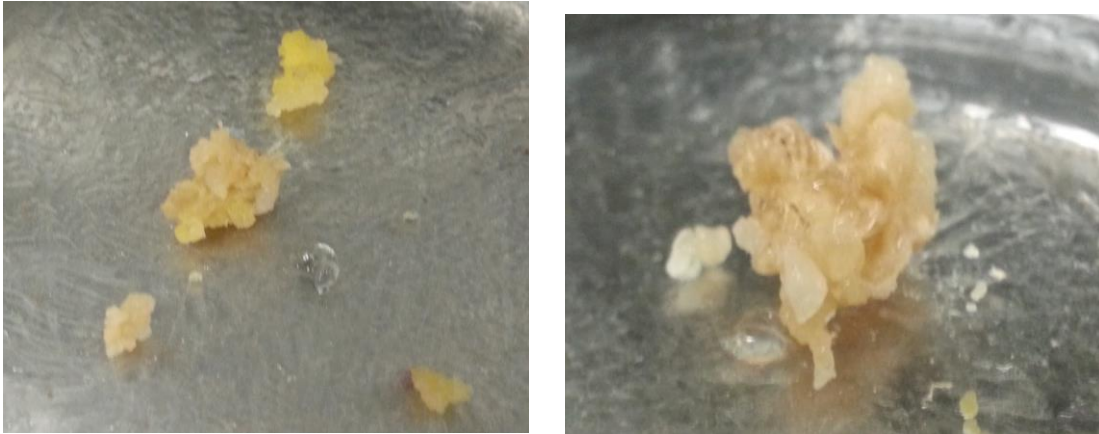


Fig. 7 Después de 3 semanas los cultivos celulares con mayor concentración de hormona (a la izquierda aun presenta color verde)

7.3 Generación de cultivo en suspensión

Los callos son colocados en medio de cultivo sin fitagel, en agitación de 110 rpm, los callos con respecto al tiempo tenderán a incrementar su tamaño, las células que se encuentran en el callo se irán re suspendiendo en el líquido.



Fig.8 Callos en suspensión, el medio contienen 1 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de Kin, la agitación permite la suspensión de células en el medio.



Fig.9 Células en suspensión con glucosa provenientes de callos con concentración hormonal de 3mg/L y 0.3 mg/L de 2,4-D y Kin respectivamente. En 37 días alcanzaron una concentración celular de 0.3×10^6 con 100% de viabilidad.

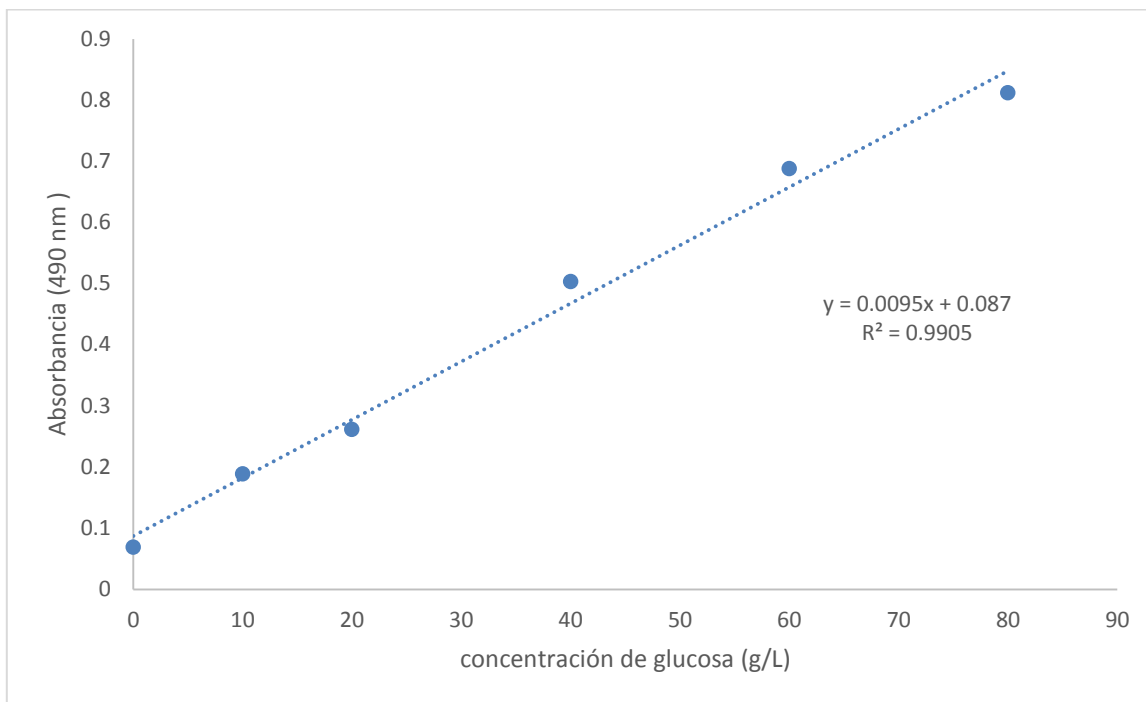


Gráfico 2. Curva tipo de fenol sulfúrico.

7.4 Análisis del crecimiento celular

El pase 0 se encontraba en matraces de 125 mL con volumen de trabajo de 25 mL

Tabla 10. Pase 0 de células de *A. thaliana* con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
24		4.3		

Tabla 11. Pase 0 de células de *A. thaliana* con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D + Kin

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
24		3.52		

Para el pase 1 se coloca en matraces de 250 mL con 50 mL de volumen de trabajo.

Tabla 12. Pase 1 de células de *A. thaliana* con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
37	28 final	8.36 inicia	200000	

Tabla 13. Pase 1 de células de *A. thaliana* con 30 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D + Kin

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
37	25 final	9.10 inicia	300000	

El pase 2 se realizó en matraz de 500 mL con 100 mL de volumen de trabajo.

Tabla 14. Pase 2 de células de *A. thaliana* con 50 g/L de glucosa inicial, 2,4-D

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
37	50	8.36	200000	
52	35.1	-		
59	17.47	6.22	1700000	100

Tabla 15. Pase 2 de células de *A. thaliana* con 50 g/L de glucosa inicial, hormona 2,4-D+ Kin 100 ml en matraz de 500 ml

Tiempo (días)	Glucosa g/L	Biomasa g/L	Millones de células/mL	% viabilidad
37	50	9.18	300000	

52	35	-		
59	28	6.13	1100000	100

Se inoculó un matraz de 1 L con volumen de trabajo de 200 mL con (6.22 g) de células para 2,4-D y 2,4-D + Kin. (6.13 g)

Tabla 16. Pase 3 de células *A. thaliana* con 50g/L de glucosa inicial hormona 2,4-D

Tiempo (días)	Glucosa (g/L)	Millones de células/mL	Viabilidad%
8	16.73	117000	100
15	6.78	130000	100
23	NA	150000	100
36	NA	290000	80
59	NA	400000	70

Tabla 17. Pase 3 de células *A. thaliana* con 50g/L de glucosa inicial hormona 2,4-D + Kin

Tiempo (días)	Glucosa (g/L)	Millones de células/ml	Viabilidad%
8	16.42	110000	100
15	8.2	110000	100
23	5.47	130000	100
36	NA	150000	100
59	NA	280000	94

Tabla 18. Peso fresco del pase 3 del tratamiento 2,4-D

Peso fresco inicial (g)	Peso fresco final (g)
6.22	5.9

Tabla 19. Peso fresco del pase 3 del tratamiento 2,4-D+ Kin

Peso fresco inicial (g)	Peso fresco final (g)
6.13	5.7

En el conteo de los 36 días equivalente al pase 3, la glucosa al ser medida por el método colorimétrico no detecto glucosa, por lo cual se agregó glucosa de un stock concentrado para una concentración de 12.5 g/L (línea color azul en las tablas), se tuvo cuidado en no sobrepasar 250 mL de volumen de trabajo para no comprometer la trasferencia de gases.

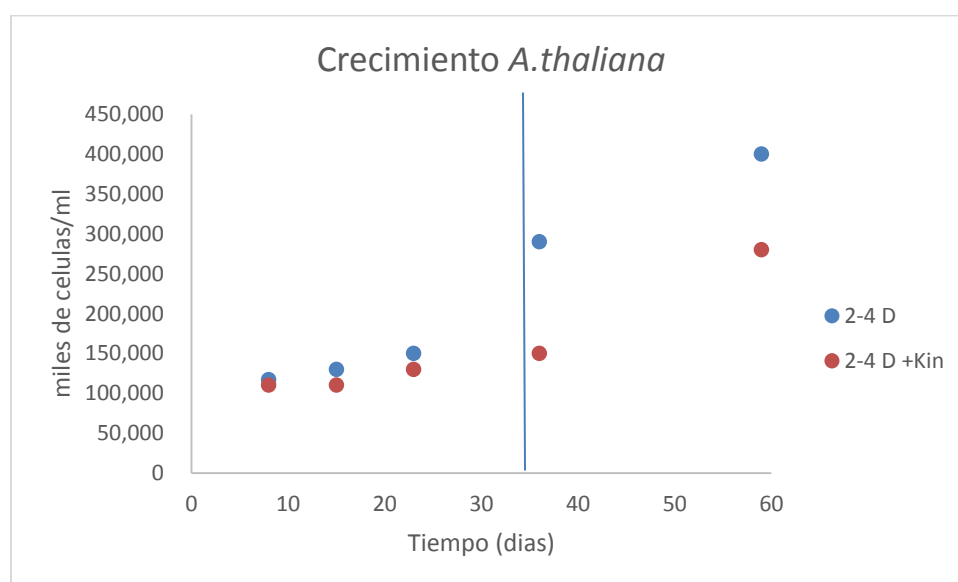


Fig. 10 Mismo tiempo de entre pase 2 y pase 3 (59 días), en la tabla se muestra el resumen del crecimiento de las líneas celulares, las líneas alcanzan la mitad de densidad celular que el pase 2, este fenómeno puede ser explicado por un agotamiento de glucosa en el día 36 donde se decidió dar un pulso de glucosa (la línea marca ese evento), el crecimiento fue significativo para ambas líneas.

7.5 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación

Determinación del tiempo de duplicación para las líneas celulares como se indica en el inciso 6.8, se realizó análisis de los datos de la tabla 16 y 17.

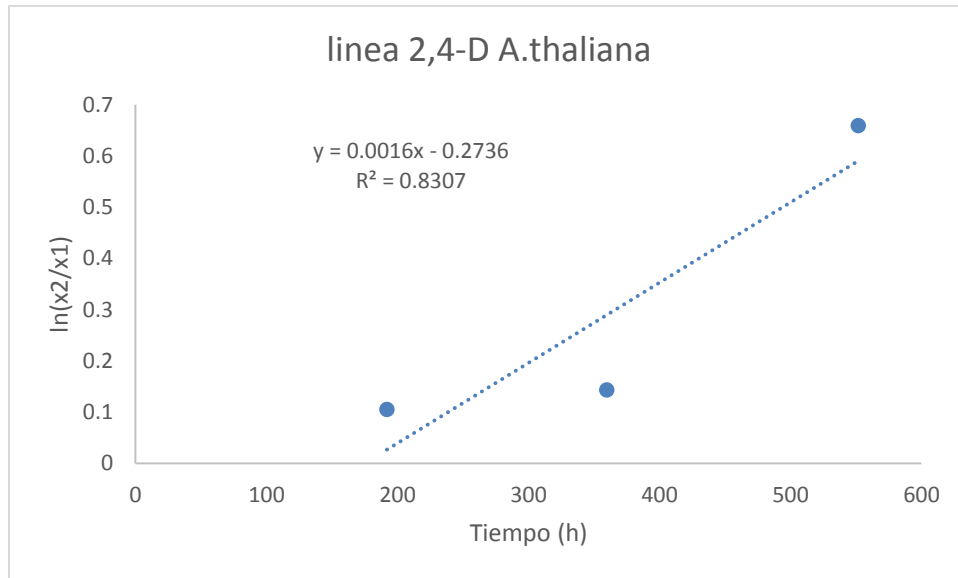


Fig.11 Considerando la máxima velocidad de crecimiento como 0.0016 el tiempo de duplicación de la línea es de 433.2 horas equivalentes a 18 días.

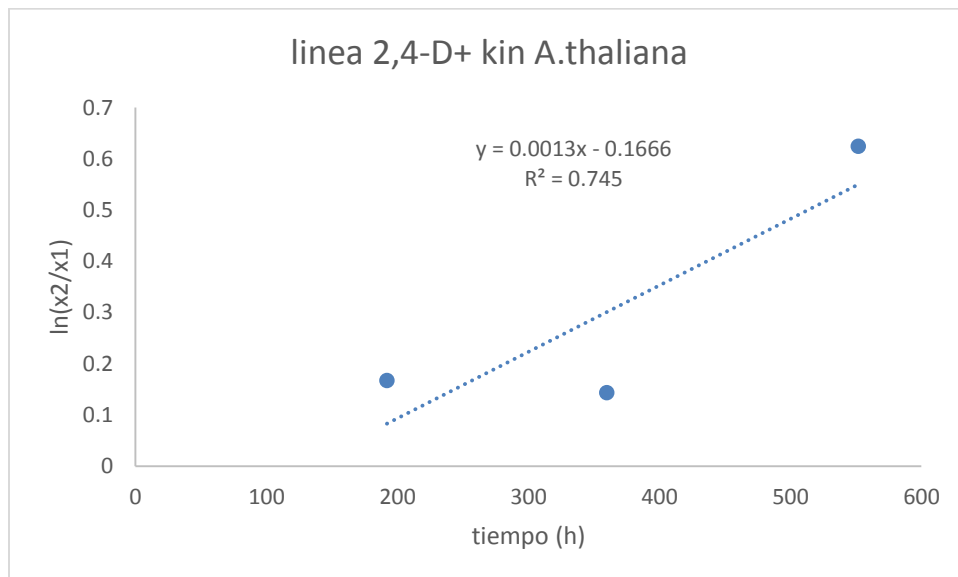


Fig. 12 Considerando la máxima velocidad de crecimiento como 0.0013 el tiempo de duplicación de la línea es de 533.2 horas equivalentes a 22 días.

Al realizar la comparación entre los tratamientos hormonales el tiempo de duplicación es menor con el tratamiento 2,4-D, los fenómenos relacionados a esto es la obtención de mayor biomasa en un menor tiempo, además de que se observó mayor consumo de glucosa sobre el tratamiento con Kin.

7.6 Análisis de tamizados

Proceso alfa: A los 59 días de crecimiento se prepararon matraces de 125 mL con 25 mL de volumen de trabajo a una concentración celular de 100000 cel/mL a partir de los tamizados concentrados de 400000 (cel/ml) de 2,4-D y 280000 (cel/mL) de 2,4-D + Kin se dejaron 59 días, a 110 rpm a 28 °C.

Proceso beta: del tamizado de 2,4-D se agregó 72 mL de medio fresco y 50 mL de cultivo de tamizado se dejó crecer por 59 días.



Fig. 13 Proceso beta, tamizado 2,4-D después de 59 días, por el método colorimétrico no se detectó glucosa.

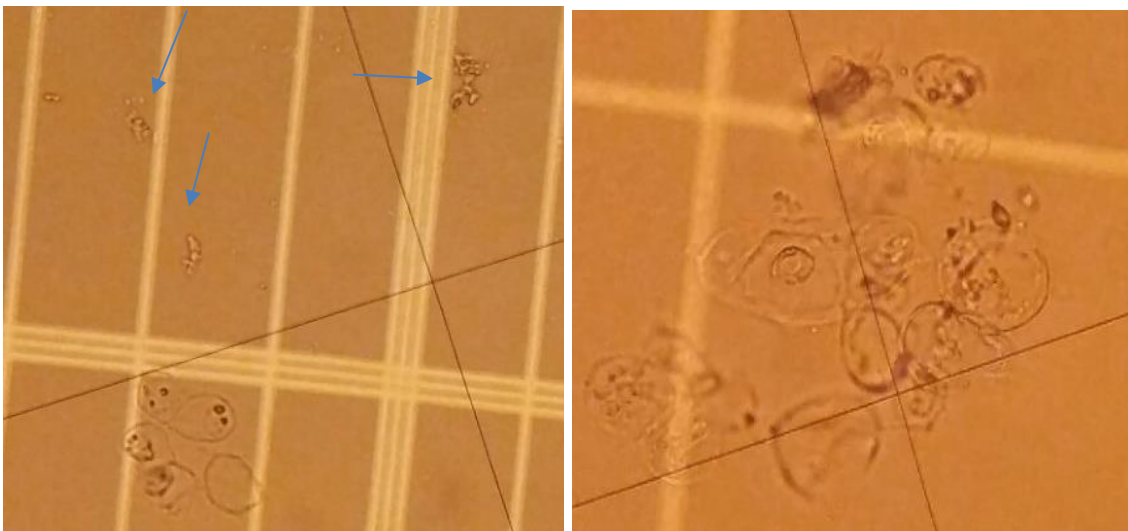


Fig.14 (A la izquierda imagen del proceso alfa correspondiente a la combinación entre 2,4-D+ Kin) células de tamizado mayor de bri celular (flechas azules) la glucosa se encontraba en 40 g/L, no hubo consumo de glucosa, (lado derecho imagen del proceso alfa correspondiente al tratamiento de 2,4-D) la glucosa se encontraba no detectable con el método colorimétrico, se observa mayor aglomeración entre células.

7.7 Ensayos de EDTA y Glutamina.

Pase 4

El peso fresco a los 59 días fue de 5.9 g para 2,4-D y para 2,4-D + Kin 5.7 g se colocaron en matraces de 500 mL con volumen de 100 mL se dejaron crecer por 31 días, al finalizar se obtuvo una concentración celular de 3.9 g de biomasa de 2,4-D y 4.5 g de biomasa de 2,4-D+ Kin se ajustó la cantidad de gramos de biomasa para inocular 4 matraces de 125 mL, con volumen de trabajo de 25 mL, de cada tratamiento hormonal con la misma cantidad de biomasa, la concentración de glucosa fue de 40 g/L se realizó los tratamientos descritos en el inciso 6.9.



Fig. 15 Los tratamientos con plomo tanto de células como tamizado mostraron un cambio de color a blanco, este mismo color se presentó en el tratamiento 2 y 4 pero hacer agregado el EDTA el color se tornó cristalino.



Fig. 16 Tratamientos de acuerdo a la descripción en el inciso 6.9, extremo derecho los tratamiento 3 para ambas hormonas el color del medio presento un color blanquecino.

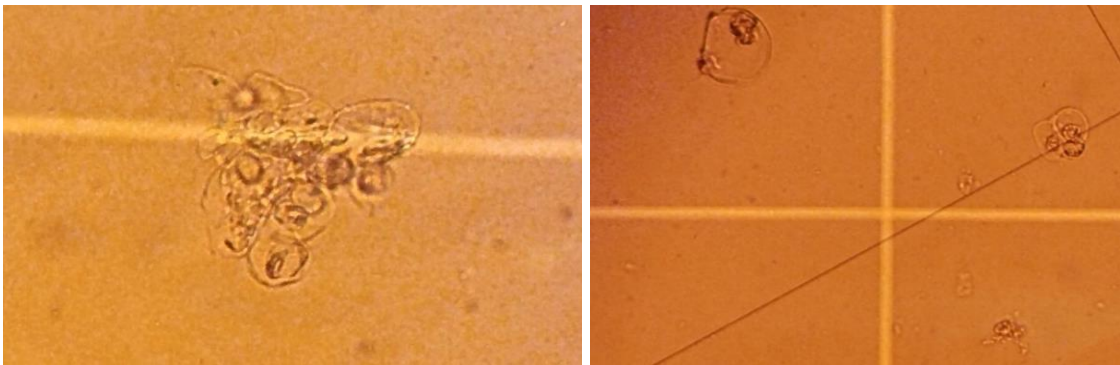


Fig. 17 A la izquierda el control del tamizado células aglomeradas glucosa a 6 g/L), a la derecha tratamiento de tamizado con plomo y glutamina células de mayor tamaño, glucosa 4 g/L (2,4-D) (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales.)

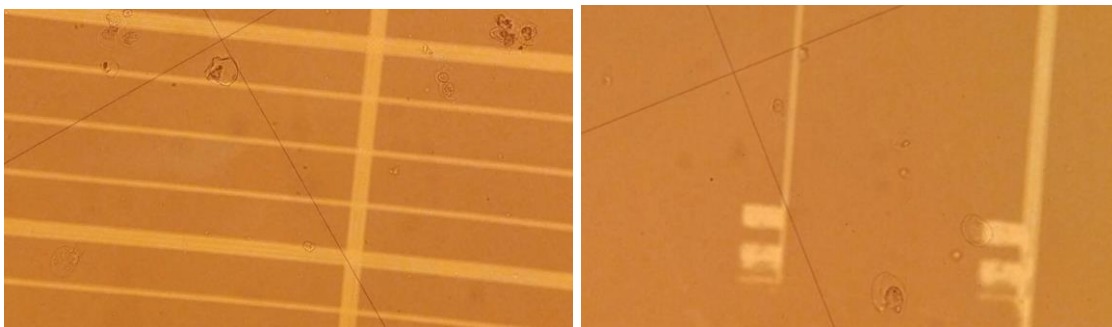


Fig. 18 Matraz con células control, algunas aglomeradas, (2,4-D) (3 días de tratamiento) la glucosa se encontraba en 6.6 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales) a la derecha mismo Matraz a los 20 días.



Fig. 19 Matraz con tratamiento 2, células de menor tamaño al tratamiento (2,4-D), la glucosa se encontraba en 3.5 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales)

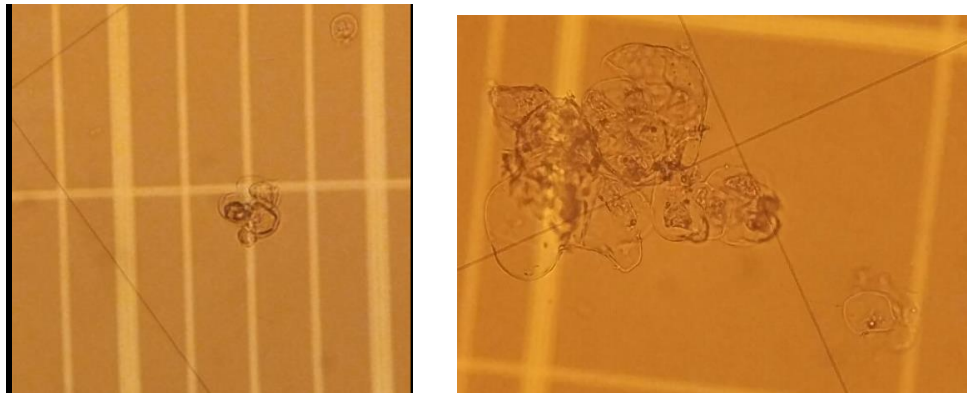


Fig. 20 Tratamiento 3, no se logra distinguir gran crecimiento celular (2,4-D) la glucosa se encontraba en 6.5 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales) a la derecha mismo matraz a los 20 días.

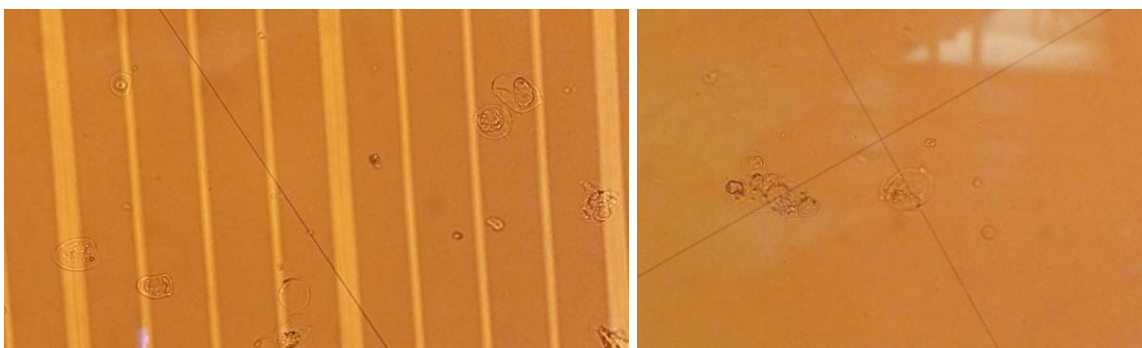


Fig. 21 Tratamiento 4, hay un incremento en la cantidad de células en el sobrenadante (2,4-D), la glucosa se encontraba en 7.9 g/L (31 días de crecimiento y 3 días de tratamiento con metales) a la derecha mismo matraz a los 20 días.



Fig. 22 Matraz 1 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento.

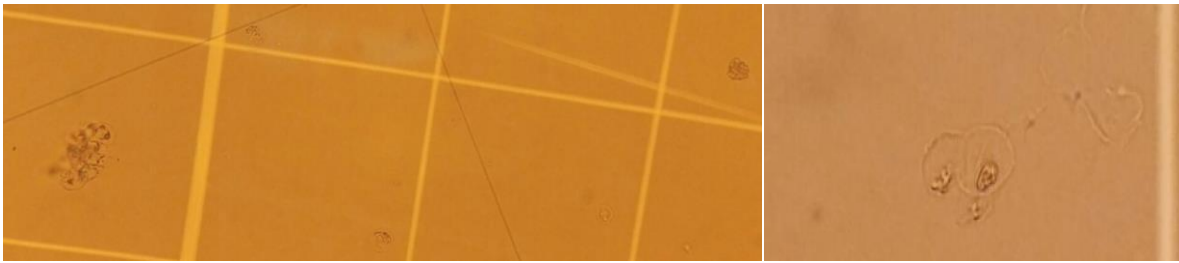


Fig. 23 Matraz 3 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento.

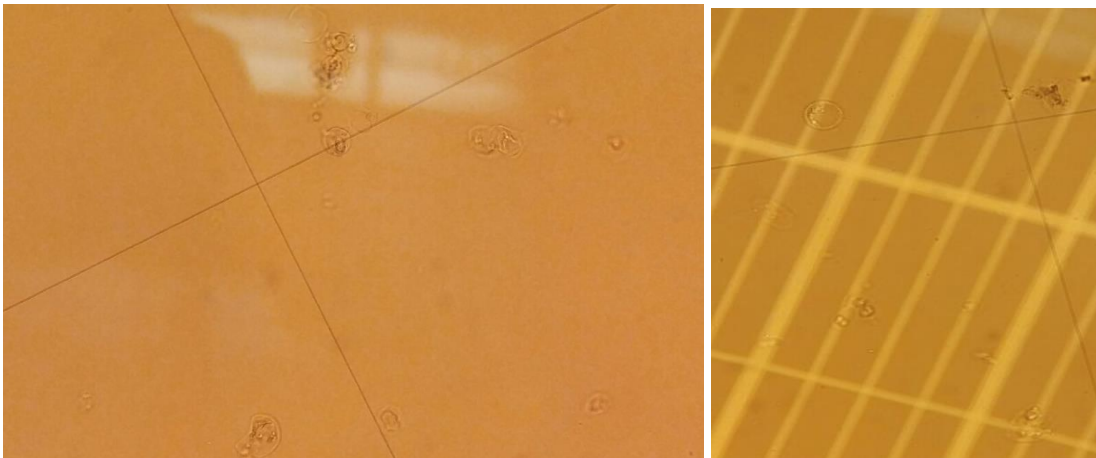


Fig. 24 Matraz 4 con combinación hormonal a la izquierda a los 20 días de tratamiento, a la derecha a los 26 días de tratamiento.

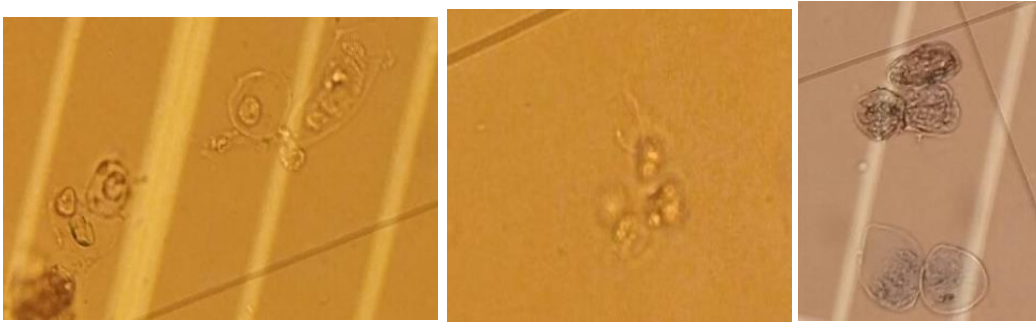


Fig. 25 Matraz 1,3, 4 (de izquierda a derecha) a los 26 días de tratamiento, las células del tratamiento 3 pierden estructura uniforme al redor de ellas, se aprecia gran ruptura celular.



Fig.26 Tamizados de Matraz 1, 3, 4 (de izquierda a derecha) de la hormona 2,4-D a los 26 días de tratamiento, célula viable del tratamiento 3 con aspecto granuloso.



Fig. 27 En orden, peso seco de los matraces: control, M3 y M4 de 2,4-D el tratamiento M4 no presenta oxidación en las células.



Fig. 28. En orden, peso seco de los matraces: control, M2, M3 y M4 de (2,4-D + Kin) el tratamiento M4 y M2 no presenta oxidación en las células.

Tabla 20. Peso seco final de tratamientos de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D

Etiqueta	Reactivos	Concentraciones en tratamiento	Ppm de plomo •	Biomasa Peso seco (g)	Glucosa (g/L)
Matraz 1	control	Sin tratamiento	0.134	0.0141	17.31
Matraz 2	EDTA, Plomo, Glutamina	1.6 mM, 0.3mM, 1.6mM	NA	NA	NA
Matraz 3	Plomo, glutamina	0.3mM, 1.6mM	5.603	0.0188	35
Matraz 4	EDTA, Plomo	1.6 mM, 0.3mM	0.211	0.0148	4.36

Tabla 21. Peso seco final de tratamientos Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D

Etiqueta	Reactivos	Concentraciones en tratamiento	Ppm de plomo •	Biomasa Peso seco (g)	Glucosa (g/L)
Matraz 1	control	Sin tratamiento	0.134	0.0106	19.52
Matraz 2	EDTA, Plomo, Glutamina	1.6 mM, 0.3mM, 1.6mM	NA	0.0102	3.052
Matraz 3	Plomo, glutamina	0.3mM, 1.6mM	5.603	0.0116	34
Matraz 4	EDTA, Plomo	1.6 mM, 0.3mM	0.211	0.0896	4.36

7.8 Determinación de Plomo (II) en células en suspensión.

Tabla 22. Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2,4-D

Etiqueta	Reactivos	Concentraciones en tratamiento	Ppm de plomo •	Biomasa Peso seco
Matraz 1	control	Sin tratamiento	0.134	6.4×10^{-4}
Matraz 2	EDTA, Plomo, Glutamina	1.6 mM, 0.3mM, 1.6mM	NA	NA

Matraz 3	Plomo, glutamina	0.3mM, 1.6mM	5.603	0.27
Matraz 4	EDTA, Plomo	1.6 mM, 0.3mM	0.211	1.1x10 ⁻³

• **Valor de espectrómetro**

Tabla 23. Concentración de Plomo (II), Glutamina y EDTA. Hormona 2-4 D + Kin

Etiqueta	Reactivos	Concentraciones	Ppm de plomo•	mM plomo/biomasa
Matraz 1	control	Sin tratamiento	0.250	1.2x10 ⁻³
Matraz 2	EDTA, Plomo, Glutamina	1.6 mM, 0.3mM, 1.6mM	0.488	2.4x10 ⁻³
Matraz 3	Plomo, glutamina	0.3mM, 1.6mM	2.219	0.010
Matraz 4	EDTA, Plomo	1.6 mM, 0.3mM	0.348	1.7x10 ⁻³

• **Valor de espectrómetro**

8. DISCUSIÓN

Los cultivos celulares a los 59 días presentaron una disminución en la cantidad de fuente de carbono, sin embargo como explica Roitsch 2002 cuando realizaron pruebas en la generación de su cultivo autótrofo el inicio de los cultivos donde se colocaba el callo en agitación, el medio de cultivo contenía azúcar, esta se fue consumiendo hasta no ser localizada en el medio mientras que el aumento de biomasa continuaba, eso explica por qué bajas concentraciones de glucosa, en un cierto punto para ciertas líneas no es una variable crítica debido a que estas tienen una regulación metabólica que les permite seguir obteniendo energía a través de luz, eso explica porque la línea 2,4-D a pesar que no había detección de glucosa continuo con su crecimiento, es posible que eventos de agotamiento de fuente de carbono en líneas heterótrofas en combinación con adaptaciones autótrofas y alimentación posterior de fuente de carbono sirva como estrategia para crecimiento celular. Además cabe destacar que la línea 2,4-D fue la que obtuvo mayor cantidad de absorción de plomo en los experimentales esto es posible ya que la línea *perse* genera mayor cantidad de biomasa en tamizado.

La alimentación de los cultivos con glucosa permite el metabolismo celular segregue ácidos orgánicos el medio de cultivo la acidificación del medio es

ambiente ventajoso para la absorción de metales e internalización a las células, esto descrito en el apartado 2.2

La disminución del peso fresco esta aunado al incremento de células en el tamizado, debido a esto era complicado determinar rendimiento de biomasa sustrato, pues cada pase celular se realizaba con peso fresco, por lo tanto el apartado 6.7 no pudo ser realizado de manera preciso por lo cual se descartó los datos obtenidos.

En cuanto a los tratamientos con plomo, EDTA, y glutamina se observaron varios cambios morfológicos, las células que solo contenían plomo y glutamina incrementaron su tamaño de manera significativa (ver figura 20), al final de los 26 días de tratamiento no se lograba localizar una gran cantidad de células en tamizado por lo cual existe la posibilidad que el callo allá tenido cambios metabólicos en los cuales la división celular allá sido inhibida, sin embargo algo que cabe destacar es que en ambos tratamientos hormonales tuvo mayor absorción de plomo tabla 22 y 23.

En cuanto al peso seco, los tratamientos que contenían glutamina, EDTA y plomo no mostraban oxidación aparente, esto mismo fue observado en el tratamiento de EDTA y plomo, siendo el común denominador el plomo y EDTA por lo cual la concentración de estos dos reactivos pueden jugar un papel importante en la nutrición de célula, cabe mencionar que el matraz M4 de la combinación hormonal alcanzo mayor concentración de biomasa (tabla 21), analizando los sobrenadantes los matraces M4 contenían mayor cantidad de células (ver figura 24 y 21). Aunque es posible explicar porque el tratamiento 3 que contenían plomo y glutamina son los que mayor plomo se encontró, al no contar con EDTA, las células solo acumulan al metal y no lo usan como nutriente, ya que el EDTA permite la biodisponibilidad del metal, este efecto también puede verse en la inhibición de crecimiento de células y el la inhibición de consumo de glucosa, (ver tabla 19 y 20), es decir que en presencia de EDTA las células toman a plomo como nutriente, mientras que en carencia de EDTA las células solo empaquetan al metal.

9. CONCLUSIONES

Se desarrolló una línea celular de *A.thaliana* en base a diferentes concentraciones hormonales 2,4-D y 2,4-D + Kin, la cual generaron diferente tamaño y peso de callo, los rendimientos fueron distintos en crecimiento celular y de tamizado, se analizó durante 4 pases distribuidos en 9 meses: glucosa, viabilidad y velocidad máxima de crecimiento, el tiempo de duplicación de línea 2,4-D fue de 18 días mientras que para 2,4-D + Kin fue de 22 días, el consumo de glucosa de la línea celular con menor tiempo de duplicación agotaba de manera pronta la fuente de carbono que la de combinación hormonal.

Las líneas celulares primarias fueron puestas a prueba con concentraciones de 0.3 mM de plomo, 150 mM de glutamina y 1.6 mM de EDTA, los tratamientos que solo contenían glutamina y EDTA tuvieron un mayor rendimiento de absorción de plomo, pero no hubo crecimiento celular, teniendo un efecto de hipercumulación de metal, con respecto a los que contenían EDTA y plomo hubo mayor crecimiento celular, lo cual conlleva a que la célula puede usar a plomo como nutriente.

Este trabajo ayudo ampliamente al entendimiento de juego de las hormonas para generación de línea celular primaria, así mismo ayudo a conocer parámetros de diseño para hiperacumular plomo o eliminación de plomo, que depende ampliamente de la presencia o ausencia de un quelante.

10. PERSPECTIVAS

El estudio puede amplificarse realizando catálisis enzimática que permita ver las expresión de glutatión en los tratamientos.

Se puede realizar ensayos controlando fotoperiodos, al igual que realizar ensayos con otras líneas que permitan ver si tienen este efecto de empaquetamiento de metal.

12. REFERENCIAS

- Ames, B. N. (1984). Charles S. Mott prize. The detection of environmental mutagens and potential carcinogens. *Cancer*, 53(10), 2034-2040.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Assunção, A. G., Schat, H., & Aarts, M. G. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159(2), 351-360.
- Banuelos, G. S., Ajwa, H. A., Wu, L., & Zambruski, S. (1998). Selenium accumulation by *Brassica napus* grown in Se-laden soil from different depths of Kesterson Reservoir. *Journal of Soil Contamination*, 7(4), 481-496.
- Barcelo, J., & Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 75-92.
- Batista, R., & Sánchez, A. (2009). Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, (16), 1-6.
- Barona, A., Aranguiz, I., & Elias, A. (2001). Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. *Environmental Pollution*, 113(1), 79-85.
- Boveris, A. (2005). La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars pharmaceutica*, 46(1), 85-92.
- Brooks, R. R., Chambers, M. F., Nicks, L. J., & Robinson, B. H. (1998). Phytomining. *Trends in plant science*, 3(9), 359-362.
- Cobbett, C. S., & Meagher, R. B. (2002). *Arabidopsis* and the genetic potential for the phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *The Arabidopsis Book*, e0032.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, 7(7), 309-315.
- Djordjević, V. B. (2004). Free radicals in cell biology. *International review of cytology*, 237, 57-89.
- Doverskog M., Han L., Häggström L. (1998). Cysteine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology*. 26: 91-102.

- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Ducruix, C., Junot, C., Fievet, J. B., Villiers, F., Ezan, E., & Bourguignon, J. (2006). New insights into the regulation of phytochelatin biosynthesis in *A. thaliana* cells from metabolite profiling analyses. *Biochimie*, 88(11), 1733-1742.
- Hampp, C., Richter, A., Osorio, S., Zellnig, G., Sinha, A. K., Jammer, A., & Roitsch, T. (2012). Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* for photosynthetic, metabolic, and signaling studies. *Molecular plant*, 5(2), 524-527.g
- Haydon, M. J., & Cobbett, C. S. (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174(3), 499-506.
- Hong-Bo, S., Li-Ye, C., Cheng-Jiang, R., Hua, L., Dong-Gang, G., & Wei-Xiang, L. (2010). Understanding molecular mechanisms for improving phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Critical reviews in biotechnology*, 30(1), 23-30.
- Huang, J. W., & Cunningham, S. D. (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New phytologist*, 134(1), 75-84.
- Kasai, H., Chung, M. H., Jones, D. S., Inoue, H., Ishikawa, H., Kamiya, H., ... & Nishimura, S. (1991). 8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis. *The Journal of toxicological sciences*, 16, 95-105
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts.
- Kirsch, M., & De Groot, H. (2001). NAD (P) H, a directly operating antioxidant?. *The FASEB Journal*, 15(9), 1569-1574.
- Kumar, P. A. (2001). Plant biotechnology: Future perspectives. *Defence Science Journal*, 51(4), 353.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635.
- Lyubenova, L., & Schröder, P. (2011). Plants for waste water treatment—effects of heavy metals on the detoxification system of *Typha latifolia*. *Bioresource technology*, 102(2), 996-1004.
- McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 277-282.

Morikawa, H., Takahashi, M., Hakata, M., & Sakamoto, A. (2003). Screening and genetic manipulation of plants for decontamination of pollutants from the environments. *Biotechnology advances*, 22(1), 9-15.

Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*.

Navarro-Aviñón, J. P., Alonso, I. A., & López-Moya, J. R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista Ecosistemas*, 16(2).

Palomares, L. A., López, S., & Ramírez, O. T. (2004). Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures. *Biochemical engineering journal*, 19(1), 87-93

Roitsch, T., & Sinha, A. K. (2002). Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science. *Photosynthetica*, 40(4), 481-492.

Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food biotechnology* (pp. 187-228). Springer Berlin Heidelberg.

Vargas, G. G., Andrade, M. R., Razo, L. D., Aburto, V. B., Aguilar, E. V., & Cebrian, M. E. (2001). Lead exposure in children living in a smelter community in region Lagunera, Mexico. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 62(6), 417-429.

Vargas, G. G., Andrade, M. R., González, M. R., Acevedo, R. G., García, G., Arenas, J. L.,... & Caravanos, J. (2007). Contaminación por metales en suelos de la ciudad de torreon, coahuila, mexico metal contamination in soil of the city of torreon, coahuila, mexico. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*, 6, 165-168.

Vera-Estrella, R., Miranda-Vergara, M. C., & Barkla, B. J. (2009). Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and in vitro regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Planta*, 229(4), 977-986.

Yang, X. E., Peng, H. Y., Jiang, L. Y., & He, Z. L. (2005). Phytoextraction of copper from contaminated soil by *Elsholtzia splendens* as affected by EDTA, citric acid, and compost. *International journal of phytoremediation*, 7(1), 69-83.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00190

Matrícula: 2163802299

GENERACIÓN DE CULTIVO CELULAR EN SUSPENSIÓN DE *Arabidopsis Thaliana* COMO MÉTODO DE FITOACUMULACIÓN DE PLOMO (II) USANDO EDTA COMO QUELANTE

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 2 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

siendo el primero asesor del alumno y lectora la segunda, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: ISRAEL MONTES DE OCA NAVA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ISRAEL MONTES DE OCA NAVA
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

ASESOR

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

LECTORA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO