

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EFECTO DEL PLOMO SOBRE EL CICLO ASCORBATO –
GLUTATIÓN EN *Acacia farnesiana*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. AMALIA MALDONADO MAGAÑA

DIRECTORA: DRA. TANIA L. VOLKE SEPÚLVEDA

México, D.F.

ENERO 2010

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

México D.F. a 28 de Enero del 2010

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Efecto del plomo sobre el ciclo ascorbato – glutatión en *Acacia farnesiana*”

Que presentó

I.B.I. Amalia Maldonado Magaña

Comité Tutorial:

Director: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Asesor: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres

Jurado:

Presidente:

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Secretario:

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Ernesto Favela Torres

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Francisco Cruz Sosa

Vocal:

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Fernando Rivera Cabrera

A los ISRSN

AGRADECIMIENTOS

La finalización de este trabajo no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Primero y antes que nada, gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este tiempo.

Gracias, a mis queridos padres (**Victor y Victoria**), que no tienen idea que diablos estudié (lo digo con mucho cariño), que aun creen que tomo clases. A ellos les debo todo lo que soy; gracias a su esfuerzo y contención he finalizado este proceso superando todas las adversidades.... ¡Los amo! ¡Bravo! ¡Bravo!

A mi hermana **Natalia** por ser mi cómplice y apoyarme en todo momento, a mi sobrino **Victor** quien con su inocencia invadió mi casa de alegría.

A **Uriel** porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

A **Nancy María y Olivia** ya que me brindaron su amistad, y estuvieron apoyándome en los momentos de bipolaridad por los que pase.

A la **Dra. Magdalena Ocampo** por enseñarme que entre el blanco y el negro existen varias tonalidades de grises.

A la **Dra. Tania Volke** por creer en mí y apoyarme desde que llegue a este laboratorio.

Al **Dr. Mariano Gutiérrez** por saber escucharme y aconsejarme en los momentos que lo necesite.

Al **Dr. Fernando Rivera** por su apoyo incondicional y valiosas sugerencias. Gracias por la paciencia que me has tenido.

Al **Dr. Ernesto Favela** por su colaboración y apoyo en la realización de este proyecto.

A los de **CENICA**: Martha, Paulina, Toño por estar dispuestos a ayudarme cuando lo necesite.

A mis compañeros del **Laboratorio de Residuos Sólidos**: Liliana, Manuel, Areli, Miriam, Guille, Ady, César, Marianela, Daniel y en especial a Bety por brindarme su apoyo.

Y en sobretodo le doy gracias a *Acacia farnesiana* por existir, tolerar y acumular altas concentraciones de Pb, ya que sin ella no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

RESUMEN

Uno de los elementos más frecuentes como contaminante en los suelos en México y a nivel mundial es el plomo (Pb), un metal considerado carcinógeno y mutágeno. En las plantas, este elemento puede alterar diversas funciones celulares. No obstante, existen especies, como *Acacia farnesiana* (L.) Willd, capaces de crecer en sitios contaminados con altas concentraciones de metales pesados. Estas plantas toleran la presencia del Pb debido a mecanismos como el secuestro en pared celular, en la vacuola y/o la activación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos capaces de eliminar especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas bajo las condiciones de estrés inducidas por el metal; la sobreproducción de ERO puede destruir biomoléculas y alterar el metabolismo. Uno de los sistemas más eficientes para el control de ERO en las células es el ciclo ascorbato-glutación, que involucra oxidaciones y reducciones sucesivas de ascorbato (AsA) y glutación (GSH) catalizadas por diversas enzimas. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del Pb sobre la morfología, crecimiento y estrés oxidativo en *A. farnesiana*, y su relación con la producción de AsA y GSH y la actividad de algunas enzimas del ciclo AsA - GSH. Para lo anterior, en condiciones *in vitro*, se evaluaron tres concentraciones de Pb (250, 500 y 1000 mg/L) y un control (0 mg/L) durante diferentes tiempos de cultivo (15 - 60 días).

En las plantas crecidas con 1000 mg Pb/L se observó clorosis y una disminución significativa del peso (4 - 6.5 veces) y en la longitud (3 - 13 veces) de tallos y raíces, respectivamente, después de 60 días. Este resultado puede correlacionarse con la mayor lipoperoxidación (2 veces) y acumulación de Pb (>34 g Pb/kg raíz [peso seco, PS]) en las raíces de plantas crecidas en esta condición, respecto con las plantas control. Con estos resultados, se estimó una concentración crítica de Pb para *A. farnesiana* de 765 mg Pb/L. La acumulación de Pb en los tejidos de la planta dependió de la concentración inicial de Pb en el medio MS, encontrando una mayor concentración en las raíces (15 - 70 veces) que en los tallos, lo que indica una baja translocación del metal. Esta capacidad de translocación se estimó mediante el factor de translocación, que osciló entre 0.01 y 0.06 independientemente de la concentración inicial de Pb y del tiempo de cultivo, lo que sugiere que *A. farnesiana* es fitoestabilizadora de Pb. Se observó un aumento en la actividad glutación-S-transferasa (GST) (2 - 4 veces) y en la actividad glutación reductasa (GR) (1.5 -1.7 veces) en tallos y raíces de *A. farnesiana* por efecto del Pb, sugiere que el GSH participa de manera importante como antioxidante durante la detoxificación de ERO generadas por la presencia del Pb. En general, la concentración de GSH fue mayor (hasta 4 veces) en tallos que en raíces, en las plantas expuestas a 250 y 500 mg Pb/L se incrementó 2 veces a partir del día 30 con respecto a las plantas control, disminuyendo al mismo nivel que el control para el final del experimento. La concentración de AsA también fue mayor (1.1 - 4 veces) en los tallos que en las raíces, aumentando (1.9 veces) particularmente en tallos de plantas crecidas con 500 mg Pb/L a los 15 días. El incremento en la concentración de AsA y GSH en *A. farnesiana* crecida bajo condiciones de estrés por Pb indican su participación directa en la eliminación de ERO, principalmente en tejidos fotosintéticos.

Palabras clave: ciclo ascorbato – glutación, estrés oxidativo, plomo, *Acacia farnesiana*

ABSTRACT

One of the most frequent soil pollutants in Mexican and worldwide soils is lead (Pb), a metal considered as carcinogenic and mutagenic. In plants, this element can alter several cellular functions. However, there are species such as *Acacia farnesiana* (L.) Willd, able to grow in sites contaminated with high concentrations of heavy metals. These plants can tolerate the presence of Pb due to mechanisms such as the sequestering in the cell wall or in the vacuole, as well as the activation of enzymatic and non enzymatic systems that eliminate reactive oxygen species (ROS) generated at stress conditions induced by the Pb; the overproduction of ROS can destroy biomolecules and alter the metabolism. One of the most efficient systems for the ROS control in cells is the ascorbate-glutathione cycle, which involves successive oxidations and reductions of ascorbate (AsA) and glutathione (GSH) catalyzed by various enzymes. Based on the previous, the aim of this study was to determine the effect of Pb on the morphology, growth and oxidative stress in *A. farnesiana*, and their relationship with the production of AsA and GSH and the activity of some enzymes of the AsA - GSH cycle. For this, at *in vitro* conditions, three Pb concentrations (250, 500 and 1000 mg/L) and one control (0 mg/L) were assayed during different culture times (15 - 60 days).

In plants grown with 1000 mg Pb/L we observed chlorosis and a significant decrease in weight (4 - 6.5 times) and length (3 to 13 times) of shoots and roots during 60 days. This result may be related to the increased lipid peroxidation (2 times) and accumulation of Pb (> 34 g Pb/kg roots [dry weight, DW]) in the roots of plants grown under this condition, in relation to control plants. With these results, we estimated critical concentration of Pb for *A. farnesiana* of 765 mg Pb/L. The Pb accumulation in plant tissues depended on the initial Pb concentration in the MS medium, finding higher concentration (15 - 70 times) in the roots than in shoots, indicating a low metal translocation. The translocation capacity was estimated by the translocation factor, which ranged between 0.01 and 0.06 independently of the initial Pb concentration and the culture time, suggesting that *A. farnesiana* is a Pb phytostabilizer species. The increase in glutathione-S-transferase (GST) (2 - 4 times) and glutathione reductase (GR) (1.5 -1.7 times) activities in roots and shoots due to the Pb, suggests that GSH participates as an antioxidant important in the detoxification of the ROS generated by the presence of Pb. In general, the GSH concentration was higher (up to 4 times) in shoots than in roots, increasing more than 5 units in shoots of plants exposed to 250 and 500 mg Pb/L with respect to control plants. AsA concentration in the shoots was also higher (1.1 - 4 times) than in roots, increasing up to two-fold particularly in shoots of plants grown with 500 mg Pb/L. The increase in the ASA and GSH concentrations in *A. farnesiana* grown under Pb stress conditions indicates their direct involvement in the ROS elimination, mainly in photosynthetic tissues.

Keywords: ascorbate – glutathione pathway, oxidative stress, lead, *Acacia farnesiana*.

LISTA DE ABREVIATURAS

•O ₂ ⁻	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxígeno singulete
APX	Ascorbato peroxidasa
AsA	Ascorbato
CAT	Catalasa
CC	Concentración crítica
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FB	Factor de bioconcentración
FT	Factor de translocación
G-POD	Guayacol peroxidasa
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
GST	Glutación –S- transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
IT	Índice de translocación
MDA	Malondialdehído
MDHA	Mono-dehidroascorbato
MDHAR	Mono-dehidroascorbato reductasa
MP	Metales pesados
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato + ión hidruro
Pb	Plomo
SOD	Superóxido dismutasa

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 El plomo como contaminante ambiental	3
2.2 Absorci3n del plomo por las plantas	4
2.3 Efecto del plomo sobre las plantas	5
2.4 Generaci3n de especies reactivas de ox3geno	7
2.5 Efecto de las ERO sobre biomol3culas.....	8
2.6 Mecanismos de eliminaci3n de ERO en las plantas	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. HIP3TESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos espec3ficos.....	22
6. M3TODOS Y MATERIALES.....	23
6.1 Dise1o experimental.....	23
6.2 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	23
6.3 Acumulaci3n de plomo	23
6.4 Estimaci3n de 3ndices y coeficientes.....	24
6.6 Obtenci3n de extractos enzimáticos y cuantificaci3n de prote3na	25
6.7 Cuantificaci3n de estr3s oxidativo.....	26
6.8 Cuantificaci3n de actividades enzimáticas.....	26
6.9 Cuantificaci3n de mol3culas antioxidantes	27
6.10 Análisis estadísticos	27
7. RESULTADOS Y DISCUSI3N.....	28
7.1 Efecto del plomo sobre la morfolog3a y crecimiento de <i>A. farnesiana</i>	28
7.2 Acumulaci3n de plomo por <i>A. farnesiana</i>	33
7.3 Disoluci3n de plomo por <i>A. farnesiana</i>	36
7.4 Efecto del plomo en el estr3s oxidativo.....	38
7.5 Efecto del plomo en la actividad GST y GR.....	40
7.6 Efecto del plomo en la concentraci3n de mol3culas antioxidantes.....	43
8. CONCLUSIONES.....	48
9. RECOMENDACIONES	49
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por metales pesados (MP) difiere de la contaminación del aire o del agua, debido a que los metales pesados persisten en el suelo más tiempo que en otros compartimentos de la biosfera. La contaminación por MP en el suelo se debe a los procesos naturales geológicos, minería, actividades industriales y agrícolas (Zhen-Guo *et al.*, 2002). El plomo (Pb) es uno de los elementos más tóxicos y abundantes que existen en el ambiente, afecta a la salud humana y a la vida silvestre, posee baja solubilidad y ha sido clasificado como carcinogénico y mutagénico (Liu *et al.*, 2008). Aunque el Pb no es un elemento esencial para las plantas éstas lo absorben con facilidad. La entrada del Pb y su acumulación en las plantas ocurre directamente, cuando es absorbido a través de las raíces junto con otros minerales y agua (Sengar *et al.*, 2008). En las células vegetales, los MP pueden unirse a átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno, y sustituir metales esenciales, alterando así diversas funciones. Sin embargo, ciertas plantas poseen mecanismos por los que pueden tolerar la presencia de MP, entre éstos se encuentran la unión del metal a la pared celular, su compartimentalización en la vacuola y la activación de sistemas enzimáticos y no enzimáticos que eliminan especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la presencia de MP. El transporte de los MP como el Pb dentro de una planta, así como su localización en las células son factores determinantes en la toxicidad que la planta puede presentar como respuesta. El Pb ocasiona efectos adversos en la morfología, crecimiento y fotosíntesis en las plantas e inhibe algunas actividades enzimáticas, además de provocar alteraciones en el balance de agua, en la permeabilidad de la membrana y en la absorción de minerales. Asimismo, la presencia de este metal en los tejidos de una planta puede ocasionar un incremento en el estrés oxidativo, es decir, una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como respuesta al estrés abiótico provocado por su presencia. Las respuestas bioquímicas de las plantas al estrés oxidativo generado por el Pb, incluyen el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes y en la producción de moléculas antioxidantes capaces de eliminar las ERO producidas. Las células vegetales y organelos como peroxisomas, cloroplastos y mitocondria, contienen múltiples enzimas o sistemas enzimáticos para la eliminación de ERO. Entre estos sistemas se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), localizada en casi todos los compartimentos celulares; el ciclo agua-agua, en cloroplastos; el ciclo ascorbato–glutación, en cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplasto y peroxisomas; y la glutación peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) en peroxisomas.

Debido a que el ciclo ascorbato–glutatión ocurre en casi todos los compartimentos celulares (cloroplastos, mitocondrias, citosol), así como a la alta afinidad de la ascorbato peroxidasa (APX) por el H_2O_2 , se cree que este ciclo juega un papel crucial en el control de las ERO en esos compartimentos celulares (Mittler, 2002). Este ciclo comprende tres parejas redox: ascorbato-dehidroascorbato (AsA-DHA), glutatión-glutatión disulfito (GSH-GSSG) y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato en su forma reducida y oxidada (NADPH-NADP⁺). El ciclo también incluye a las enzimas APX, monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR), que son responsables del ciclo redox del ascorbato, el glutatión y el NADPH. Este ciclo permite mantener el balance redox dentro de la célula a través de la eliminación de las ERO, mediante la conversión del H_2O_2 en H_2O .

En el presente trabajo se evaluó el efecto del Pb sobre algunas enzimas y moléculas antioxidantes que participan en el ciclo ascorbato–glutatión en *Acacia farnesiana* (L.) Willd crecida bajo condiciones *in vitro*. En el primer capítulo se presenta una revisión bibliográfica que incluye una breve revisión de las principales fuentes de contaminación por Pb, los mecanismos de absorción y el efecto del Pb en las plantas, la generación de ERO y sus efectos en las biomoléculas, así como los principales mecanismos antioxidantes en las plantas. Posteriormente, se plantea el problema que justifica este trabajo, así como la hipótesis y los objetivos a cumplir. En el capítulo seis se describen los métodos y materiales utilizados para la obtención *in vitro* de plántulas de la especie en estudio, así como los procedimientos usados para la obtención y análisis de las enzimas y moléculas antioxidantes de la planta; además de las técnicas utilizadas para cuantificar el Pb en los tejidos de *A. farnesiana* y en el medio de cultivo.

Los resultados y la discusión se integran en el capítulo siete. Primero se presentan los resultados correspondientes al efecto del Pb en la morfología y crecimiento de *A. farnesiana*, la acumulación de Pb en los tejidos de la planta, y algunos índices y coeficientes que indican la capacidad fitorremediadora de la especie. Posteriormente se muestran los resultados de Pb soluble en el medio así como del pH de este y por último se presentan los resultados correspondientes al efecto del Pb en el estrés oxidativo y en algunas enzimas y moléculas antioxidantes del ciclo ascorbato – glutatión de esta especie. En los últimos capítulos se presentan las conclusiones y recomendaciones para la realización de futuros estudios.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El plomo como contaminante ambiental

Los metales pesados (MP) son contaminantes que se encuentran comúnmente en países industrializados; en los suelos, éstos persisten por más tiempo que en otros compartimentos de la biosfera. Las principales fuentes de contaminación de suelos por MP son la industria minero-metalúrgica, el tratamiento de aguas residuales, las guerras y entrenamientos militares, el uso de fertilizantes agrícolas y la industria electrónica (Padmavathiamma y Li, 2007). Los MP se consideran peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte por su elevada tendencia a bioacumularse. La bioacumulación es un aumento de la concentración de un contaminante en un organismo en un cierto plazo, de forma que llega a ser superior a la del compuesto o elemento en el ambiente. Así, la toxicidad de un contaminante sobre un organismo, frecuentemente la provoca la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios para su eliminación (Navarro-Aviño *et al.*, 2007). El problema esencial es que, debido a la semejanza entre muchos contaminantes y los elementos traza esenciales, las células pueden incorporar elementos tóxicos que se acumulan o incorporan en su membrana causando un daño letal. Dentro de los MP que provocan mayor daño a los seres vivos se encuentra el plomo (Pb), pues es el metal más propagado en el ambiente en las últimas décadas, ya que su producción es ampliamente distribuida en todo el mundo. México es reconocido como el quinto productor de Pb en el mundo; en 2006 la producción de Pb en nuestro país fue de 135 mil toneladas (INEGI, 2007).

El Pb, al ser uno de los elementos más tóxicos y abundantes en el ambiente, afecta la salud humana y la vida silvestre, tiene una baja solubilidad y se clasifica como carcinogénico y mutagénico (Liu *et al.*, 2008). Este elemento se encuentra en la naturaleza principalmente como Pb^{2+} y forma compuestos poco solubles en agua. El mineral de Pb más abundante en la naturaleza es la galena (PbS sulfuro de plomo II), de donde habitualmente se extrae dicho metal. Como contaminante, el Pb se libera al ambiente principalmente en forma de $PbSO_4$ y $PbCO_3$. Aunque forma compuestos poco solubles, este metal es movilizado en los ecosistemas causando efectos tóxicos en especies terrestres y acuáticas. Una vez en el suelo, el Pb no se distribuye uniformemente en los horizontes, ya que se asocia con hidróxidos, especialmente de Fe y Mn y también se puede concentrar en partículas de

fosfatos o carbonatos. El Pb generalmente se acumula cerca de la superficie de los suelos debido a su sorción en las partículas que componen la materia orgánica. Este metal se moviliza lentamente, pero algunas características del suelo, como el incremento en la acidez y la formación de complejos orgánicos pueden incrementar su solubilidad.

2.2 Absorción del plomo por las plantas

El Pb, aunque no es un elemento esencial para las plantas, éstas lo absorben con facilidad; su entrada a la planta y su acumulación ocurre directamente, cuando es absorbido a través de las raíces junto con otros minerales y agua (Sengar *et al.*, 2008). El Pb se absorbe por las raíces, a través de los pelos radiculares hasta alcanzar el sistema vascular, lo que permite su translocación a las estructuras aéreas de la planta, como yemas y hojas (Jarvis y Leung, 2002). Sin embargo, el transporte de este metal desde las raíces a la parte aérea es limitado debido a la barrera que existe en la endodermis de las raíces. Dicha barrera es la banda de Caspary, que es el principal factor que restringe el transporte del metal hacia los haces vasculares (Seregin *et al.*, 2004). La banda de Caspary fuerza al agua y los minerales a atravesar las membranas celulares y el citoplasma de las células endodérmicas, en lugar de pasar a través de las paredes celulares o entre ellas. De esta manera, las membranas celulares de la endodermis controlan el tipo y la cantidad de nutrientes minerales que circulan entre el córtex y el tejido vascular (Nabors, 2005).

Hasta ahora no se sabe exactamente cómo el Pb unido a las partículas del suelo queda disponible para ser absorbido por las plantas. Davies (1995), reportó que sólo alrededor de 0.005-0.13% del Pb se encuentra soluble en el suelo y está disponible para su absorción por las plantas. Sin embargo, existen varios factores que afectan su entrada a las plantas, entre ellos se encuentran el tamaño de partícula, la capacidad de intercambio catiónico y pH del suelo, así como la superficie de la raíz, los exudados de las raíces y la presencia de ciertos microorganismos, como los hongos micorrízicos. El transporte de este metal dentro de las plantas, así como su localización celular, son factores que determinan las manifestaciones tóxicas que presentan las plantas; por ejemplo, el almacenamiento de Pb en las vacuolas puede evitar efectos dañinos en la planta. Este metal puede también acumularse en los espacios intercelulares, retículo endoplásmico, dictiosoma y vesículas dictiosómicas y, eventualmente, en el núcleo celular. Puede unirse fuertemente a grupos carboxilo de los ácidos galacturónico y glucorónico de la pared celular, restringiendo su transporte apoplástico (Sharma y Dubey, 2005).

2.3 Efecto del plomo sobre las plantas

En general, los metales pesados (MP) pueden incrementar el estrés oxidativo en las plantas que, en casos extremos, puede conducir a la destrucción de biomoléculas y a alteraciones en el metabolismo. En el caso del Pb, su presencia en exceso ocasiona fitotoxicidad a través de eventos como: (i) reacciones con grupos sulfhidrilo y ligandos de nitrógeno con cationes; (ii) afinidad para reaccionar con grupos fosfato del ADP o ATP, y (iii) sustitución ó deficiencia de metales esenciales (Kucera *et al.*, 2008).

En particular el Pb, ocasiona efectos adversos en la morfología, crecimiento y fotosíntesis en las plantas, inhibe algunas actividades enzimáticas y altera el balance de agua, además de ocasionar alteraciones en la permeabilidad de la membrana y en la absorción de minerales (Figura 1). Dentro de los síntomas visibles de fitotoxicidad por Pb se encuentran: necrosis, clorosis y el oscurecimiento y disminución de la longitud de raíces. La fitotoxicidad ocasiona una disminución en el potencial de agua, altera la permeabilidad de la membrana, disminuye la producción de hormonas y el transporte de electrones, mientras que las actividades enzimáticas pueden incrementar o inhibirse. Todos estos eventos finalmente ocasionan alteraciones en diversos procesos fisiológicos (Sharma y Dubey, 2005).

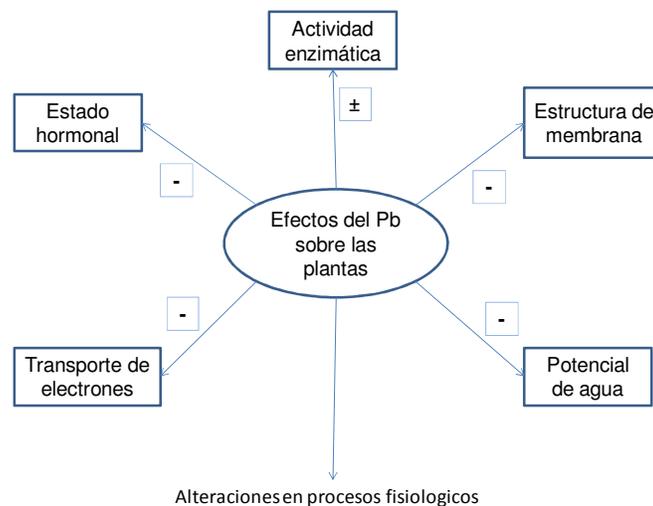


Figura 1. Vista general de los efectos tóxicos causados por el plomo en las plantas. Todos estos eventos relacionados con la fototoxicidad finalmente ocasionan alteraciones en diversos procesos fisiológicos. Los signos "+" y "-" indican efectos positivos y negativos, respectivamente (Sharma y Dubey, 2005).

Las respuestas bioquímicas de las plantas a la presencia del Pb, incluyen incrementos en la actividad de las enzimas antioxidantes y producción de moléculas antioxidantes capaces de

eliminar o suprimir los efectos de los radicales libres producidos por la exposici3n. Lo anterior ocurre como consecuencia de la generaci3n de estr3s oxidativo en las c3lulas, que es provocado por la sobreproducci3n de especies reactivas de ox3geno (ERO) como el radical super3xido ($\bullet\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el per3xido de hidr3geno (H_2O_2) (Verma y Dubey, 2003). La sobreproducci3n de ERO, generalmente incrementa 3 disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la super3xido dismutasa (SOD), guayacol peroxidasa (G-POD), ascorbato peroxidasa (APX), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutati3n reductasa (GR) y catalasa (CAT). El $\bullet\text{O}_2^-$ se puede dismutar en H_2O_2 y O_2 por acci3n de la SOD; el H_2O_2 formado puede ser descompuesto en H_2O y O_2 dentro de los peroxisomas, por acci3n de la CAT, enzima que no requiere un sustrato adicional. Asimismo, la eliminaci3n del H_2O_2 dentro de otros compartimentos celulares depende de distintas peroxidasa, como la G-POD y la APX; ambas enzimas dependen de un sustrato reducido para su actividad. La enzima GR, junto con la DHAR, se encuentran tambi3n involucradas en la eliminaci3n de H_2O_2 a trav3s del ciclo ascorbato – glutati3n (Figura 2) (Noctor y Foyer, 1998).

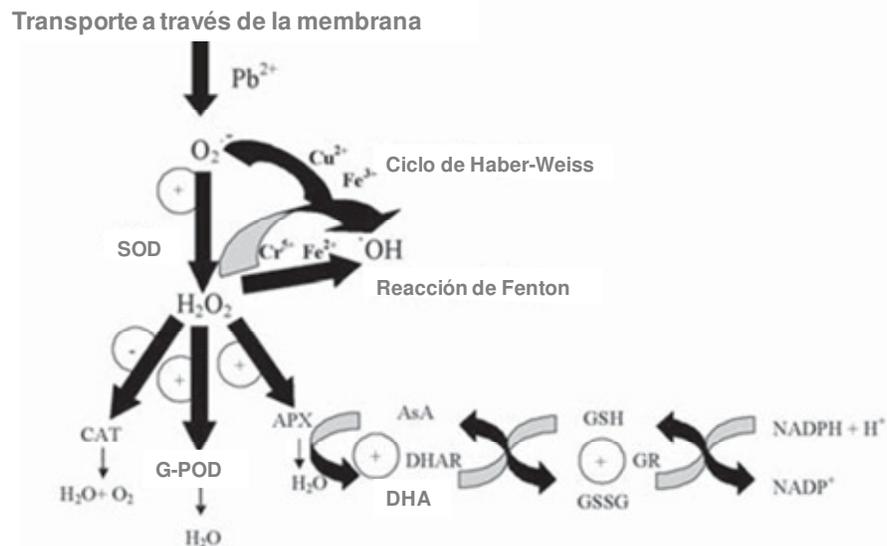


Figura 2. Efecto del Pb sobre la generaci3n de ERO y actividades de enzimas antioxidantes. El Pb induce un aumento en la formaci3n de ERO ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$). El ciclo Haber-Weiss y la reacci3n de Fenton generan radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a partir del an3n super3xido ($\bullet\text{O}_2^-$) y H_2O_2 . SOD: super3xido dismutasa; G-POD: guayacol peroxidasa; APX: ascorbato peroxidasa; DHAR: dehidroascorbato reductasa; GR: glutati3n reductasa; CAT catalasa; AsA: acido asc3rbico y GSH el glutati3n; con formas oxidadas DHA: dehidroascorbato; y GSSG: glutati3n disulfuro. Los signos ‘+’ y ‘-’ indican inducci3n o inhibici3n debido al Pb, respectivamente (Verma y Dubey, 2003).

2.4 Generación de especies reactivas de oxígeno

Las ERO, como el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), son producidas de manera normal como parte del metabolismo aerobio. Estas ERO sirven como moléculas de señalización y, generalmente, cuando hay estrés (biótico o abiótico) la producción de estas moléculas se incrementa.

En las partes verdes de las plantas, los cloroplastos y los peroxisomas son los principales productores de ERO. En las partes no verdes de una planta o en ausencia de luz, la mitocondria es la principal productora de ERO, mientras que los cloroplastos producen $^1\text{O}_2$ en el fotosistema II (PSII) y $\cdot\text{O}_2^-$ en los fotosistemas I (PSI) y II (PSII). Los peroxisomas producen $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 en diversas reacciones metabólicas y la NADPH oxidasa en la membrana plasmática produce $\cdot\text{O}_2^-$. Este último, puede ser convertido en H_2O_2 por la SOD, y el H_2O_2 a su vez, puede formar $\cdot\text{OH}$ a través de la reacción de Fenton, la cual es catalizada por metales de transición libres, como hierro y cobre (Figura 3).

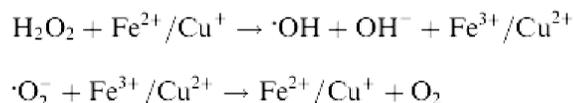


Figura 3. Formación de radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) a través de la reacción de Fenton.

Las ERO poseen características muy distintas entre sí (Tabla 1). El H_2O_2 es relativamente estable y su concentración en los tejidos vegetales está en el rango de μM a mM , dependiendo del compartimento celular en que se encuentre. Las otras ERO tienen una vida media muy corta y están presentes en muy bajas concentraciones (Møller *et al.*, 2007).

Tabla 1. Características de algunas especies reactivas de oxígeno (ERO) en tejidos vegetales.

Característica	$^1\text{O}_2$	$\cdot\text{O}_2^-$	H_2O_2	$\cdot\text{OH}$
Vida media ^a	1 μs	1 μs	1 ms	1 ns
Distancia recorrida ^b	30 nm	30 nm	1 μm	1 nm
Concentración celular	¿?	¿?	μM - mM	¿?
Reacciona con:				
Lípidos	PUFA ^c	Casi nunca	Casi nunca	Rápidamente
ADN	Principalmente guanina	No	No	Rápidamente
Carbohidratos	No	No	No	Rápidamente
Proteínas	Trp, His, Tyr, Met, Cys	Centros Fe-S	Cisteína	Tyr, Trp, Phe, Met

^a Se refiere a la vida media en sistemas biológicos

^b Distancia recorrida durante su vida media, asumiendo un coeficiente de difusión de $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

^c PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

Las ERO también tienen diferentes grados de reactividad, por ejemplo, el $\cdot\text{OH}$ reacciona rápidamente con cualquier tipo de componente celular, mientras que el $\cdot\text{O}_2^-$ reacciona con proteínas que poseen centros Fe-S y el $^1\text{O}_2$ con ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés). Estas características de las ERO determinan las diferentes maneras en que un componente celular es oxidado (Mittler *et al.*, 2004).

2.5 Efecto de las ERO sobre biomoléculas

2.5.1 Modificaciones sobre ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) linoleico (18:2) y linolénico (18:3) son los principales ácidos grasos presentes en las membranas celulares de las plantas, tanto en los galactolípidos (membrana tilacoidal) como en los fosfolípidos (todas las demás membranas). Los PUFA son susceptibles al ataque por $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$, dando origen a complejas mezclas de hidroperóxidos lipídicos (Figura 4). La peroxidación de PUFA provoca una disminución en la fluidez de la membrana, incrementa su permeabilidad y causa daños secundarios a proteínas. Como resultado de la lipoperoxidación de los PUFA se forman diversos aldehídos, como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA), así como hidroxi- y ceto-ácidos grasos. Los productos de rompimiento de los aldehídos pueden formar conjugados con ADN y proteínas, provocando mutaciones y alteraciones en la función de las proteínas.

En las células vegetales, algunos productos de oxidación de PUFA funcionan como mensajeros secundarios para inducir modificaciones enzimáticas (Møller *et al.*, 2007).

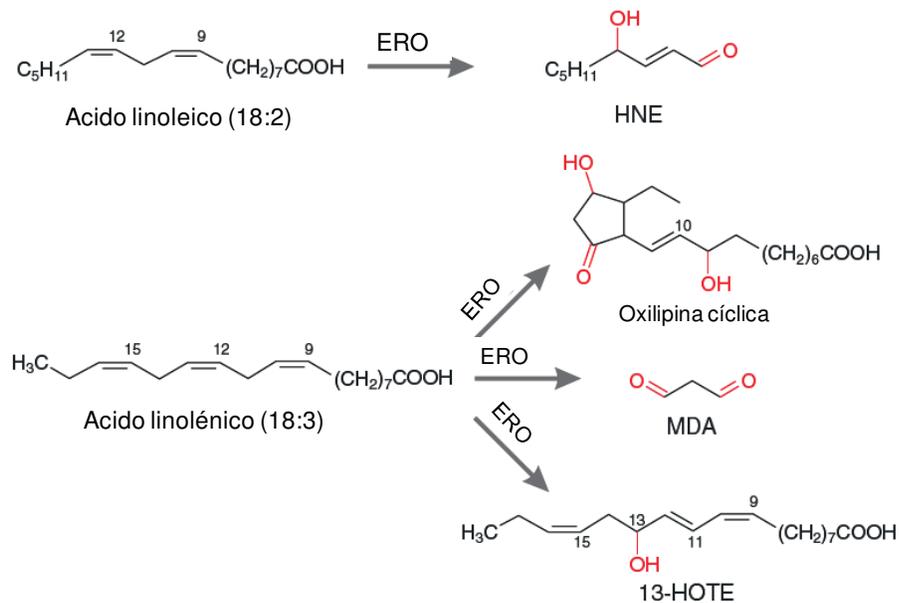


Figura 4. Modificaciones en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) por efecto de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO). HOTE, ácido hidroxi-octadecatrienoico; MDA, malondialdehído (Møller *et al.*, 2007).

2.5.2 Modificaciones sobre el ADN

El ADN puede ser modificado por las ERO de diferentes formas, pero actúan principalmente sobre los nucleótidos. El $^1\text{O}_2$ ataca nucleótidos de guanina, formando 8-hidroxiguanina (Figura 5). Las ERO también pueden modificar indirectamente al ADN; un tipo común de daño ocurre a través de la conjugación de los productos de rompimiento de PUFA, como el MDA, con la guanina, ocasionando un anillo extra en ésta última (Figura 5). Las modificaciones oxidativas en el ADN pueden permitir cambios en la metilación de la citosina, lo que es importante para la regulación de la expresión genética (Møller *et al.*, 2007).

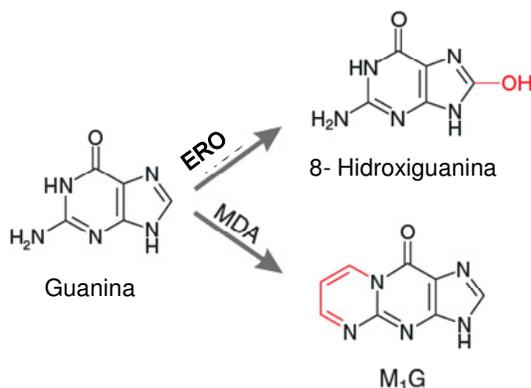


Figura 5. Modificaciones causadas por ERO en el ADN. M₁G, pirimido[1,2-a]-purin-10(3H)ona (M3ller *et al.*, 2007).

2.5.3 Modificaciones sobre carbohidratos y prote3nas

El •OH reacciona con los carbohidratos libres, como azucares y polioles. La oxidaci3n de azucares con el •OH libera como principal producto de rompimiento al 3cido f3rmico (Figura 6), este puede ser sustrato para la enzima formato deshidrogenasa (Igamberdiev *et al.*, 1999).

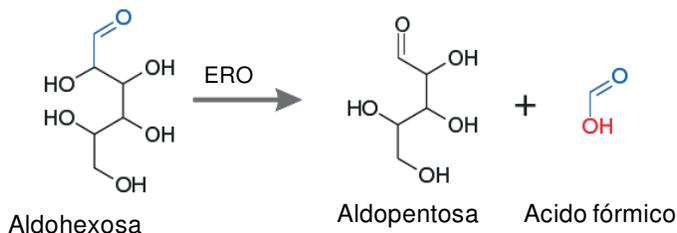


Figura 6. Ejemplo de modificaciones oxidativas sobre un az3car (M3ller *et al.*, 2007).

En cuanto a las prote3nas, su oxidaci3n implica la formaci3n de nuevos enlaces dentro de su estructura. Los enlaces son inducidos por la presencia de ERO o de productos derivados de 3stas. La mayor3a de los tipos de oxidaci3n de prote3nas por ERO son irreversibles, aunque las que contienen amino3cidos azufrados en su estructura son reversibles. Algunos de los procesos m3s comunes de oxidaci3n de prote3nas se muestran en la Figura 7 (M3ller *et al.*, 2007).

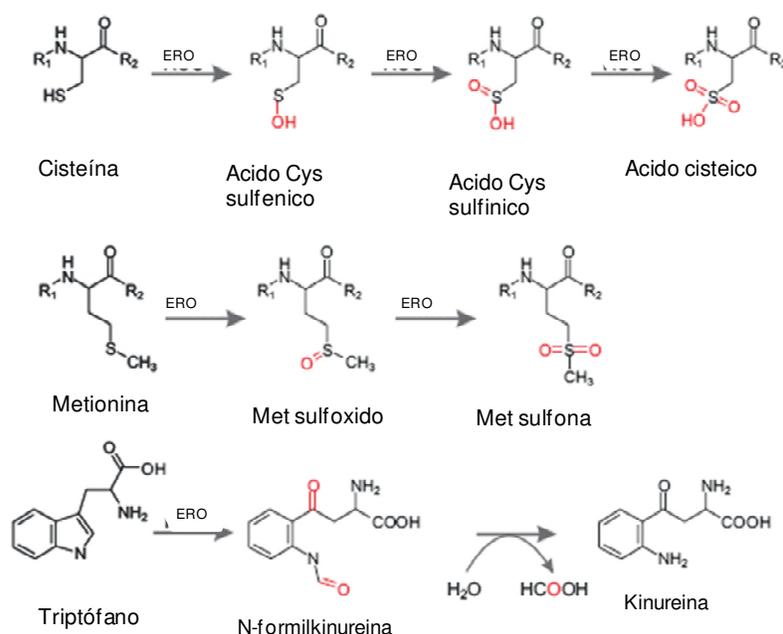


Figura 7. Procesos de oxidación de proteínas mediados por modificaciones sobre la estructura de algunos aminoácidos por efecto de ERO (Møller *et al.*, 2007).

Los aminoácidos cisteína y metionina son altamente reactivos, especialmente con $\cdot\text{O}_2^-$ y $\cdot\text{OH}$. La oxidación del grupo tiol a disulfuro ($\text{R}_1\text{-S-S-R}_2$) es un importante mecanismo metabólico de regulación redox. Se pueden formar enlaces disulfuro intra- o inter- moleculares entre cisteínas y éstos pueden ser nuevamente regenerados a su forma reducida por los sistemas de la tiorredoxina o glutarredoxina. La oxidación de la metionina a sulfóxido de metionina es otra modificación reversible. En los aminoácidos que no contienen azufre, la carbonilación es la reacción de oxidación más común. En particular, la oxidación de los aminoácidos arginina, histidina, lisina, prolina, treonina y triptófano, produce grupos carbonilo (Møller *et al.*, 2007).

2.6 Mecanismos de eliminación de ERO en las plantas

Las células vegetales, así como sus organelos (peroxisomas, cloroplastos y mitocondria), contienen múltiples enzimas y/o sistemas enzimáticos que contribuyen a la eliminación de ERO. Con excepción de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), que usan la oxido-reducción interna de su sustrato, el poder reductor para todos estos sistemas depende directa o indirectamente del NADPH o de la ferredoxina (Mittler *et al.*, 2004). En la Tabla 2 se muestran los principales sistemas antioxidantes en las plantas.

Tabla 2. Principales mecanismos de eliminaci3n de ERO en c3lulas vegetales.

Mecanismo	Remueve (Produce)	Localizaci3n celular ^a
Superoxido dismutasa (SOD)	•O ₂ ⁻ (H ₂ O ₂)	Chl, Cyt, Mit, Per
Catalasa (CAT)	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Mit?, Per
Peroxidasas	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Muchas localizaciones
Ciclo ascorbato-glutati3n	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit, Per
Glutati3n peroxidasa (GPX)	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, ER, Mit
	Hidroper3xidos lip3dicos	
	Otros hidroper3xidos	
Sistema peroxirredoxinas	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit, Nucl
	Alquilperoxidos	
	Peroxinitrito	
Sistema tioredoxinas	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit
Sistema glutarredoxinas	H ₂ O ₂ (H ₂ O)	Chl, Cyt, Mit, Sec
	Hidroper3xidos	
Carotenoides y tocoferol	¹ O ₂ (O ₂)	Chl

^a Chl, cloroplasto; Cyt, citosol; ER, ret3culo endoplasmico; Mit, mitocondria; Nucl, n3cleo; Per, peroxisomas; Sec, v3a secretora. (Mittler *et al.*, 2004)

Los principales mecanismos de eliminaci3n de ERO en las plantas incluyen la SOD, localizada en casi todos los compartimentos celulares, la CAT y la ascorbato peroxidasa (APX). El balance en la c3lula entre las actividades de estas tres enzimas es crucial para controlar la concentraci3n de •O₂⁻ y H₂O₂. Este balance, junto con el secuestro de iones met3licos (Fe y Cu), son importantes para prevenir la formaci3n de •OH por la v3a de la reacci3n de Fenton o de Haber-Weiss (Mittler, 2002). Adem3s de la SOD, que es la primera enzima que act3a sobre el •O₂⁻, las principales v3as de eliminaci3n de ERO en las plantas incluyen (Figura 8): (i) el ciclo agua-agua, en cloroplastos; (ii) el ciclo ascorbato-glutati3n, en cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplasto y peroxisomas; (iii) la glutati3n peroxidasa y (iv) la CAT en peroxisomas (Mittler, 2002).

Debido a que el ciclo ascorbato-glutati3n se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, as3 como a la alta afinidad de la APX por el H₂O₂, se cree que este ciclo juega un papel crucial en el control de ERO en esos compartimentos celulares (Mittler, 2002). Por otra parte, los antioxidantes como el ascorbato (AsA) y el glutati3n (GSH) han sido encontrados en altas concentraciones (5-20 mM AsA y 1-5 mM GSH) en cloroplastos y otros compartimentos celulares, lo que confirma su importancia en la defensa contra el estr3s oxidativo (Noctor y Foyer, 1998). La relaci3n entre el AsA y GSH en sus formas reducida y oxidada debe de ser

alta para eliminar las ERO en la célula. Esta relación es mantenida por la glutatiión reductasa (GR), la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR) usando NADPH como poder reductor (Figura 8) (Semane *et al.*, 2007). En las siguientes secciones se describen las características de algunas moléculas y enzimas antioxidantes importantes en el ciclo ascorbato-glutiación.

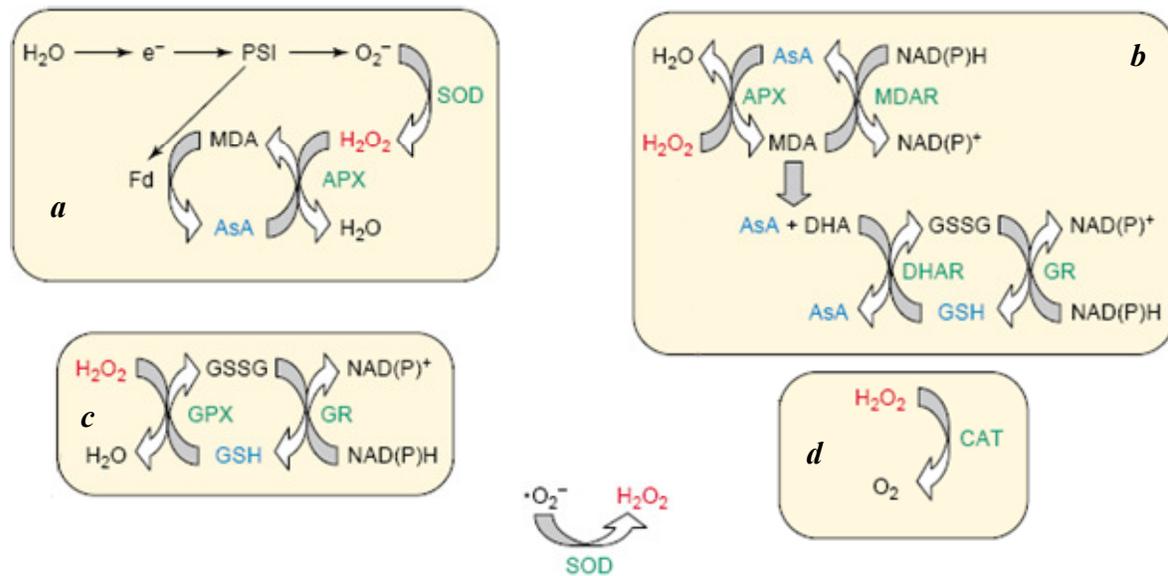


Figura 8. Vías de eliminación de ERO en plantas. (a) Ciclo agua-agua; (b) ciclo ascorbato-glutiación; (c) ciclo glutatiión peroxidasa (GPX); (d) acción de la catalasa (CAT) sobre el H_2O_2 . La SOD actúa como la primera línea de defensa convirtiendo el $\cdot O_2^-$ en H_2O_2 ; la APX, GPX y CAT entonces detoxifican el H_2O_2 . Fd, ferredoxina; MDHA, monodehidro-ascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; PSI, fotosistema I; tAPX, APX tilacoidal (Modificado de: Mittler, 2002).

2.6.1 Moléculas antioxidantes

En los tejidos vegetales, las principales moléculas que actúan como eliminadoras de ERO, incluyen el AsA, alcaloides, tocoferoles, carotenoides y aminoácidos no proteicos como el GSH, además de compuestos fenólicos como flavonoides, taninos y precursores de lignina. Todos estos antioxidantes actúan como una red cooperativa que emplea una serie de reacciones de óxido-reducción para evitar el daño por ERO (Blokhina *et al.*, 2003; Gratão *et al.*, 2005). Uno de los mecanismos de las plantas para soportar el exceso de H_2O_2 es a través de su transporte a vacuolas para su detoxificación. Las vacuolas son ricas en flavonoides, poderosos antioxidantes que eliminan varias ERO y peroxinitrito, y también pueden contener altos niveles de AsA, GSH y peroxidasa ubicadas en la superficie interna

del tonoplasto (Gechev *et al.*, 2006). El α -tocoferol se encuentra en altas concentraciones en las membranas fotosintéticas donde es el principal antioxidante lipofílico que interactúa con radicales peroxi- de lípidos y con $\bullet\text{O}_2^-$. Los carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides también pueden neutralizar ERO como $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$ (Davey *et al.*, 2000).

De las moléculas antioxidantes, el glutatión junto con el ascorbato, son los dos principales amortiguadores redox que mantienen el ambiente intracelular reducido y se encuentran involucrados en la detoxificación de ERO (Gratão *et al.*, 2005). A continuación se presenta una breve descripción de las principales características y funciones de GSH y AsA.

Glutatión (GSH)

En su forma reducida el glutatión (GSH) (Figura 9) es un tripéptido (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) que juega un importante papel en diversos organismos y puede existir en también en estado oxidado como glutatión disulfuro (GSSG). El GSH es el antioxidante de bajo peso molecular más importante sintetizado en las células. Éste es sintetizado por la adición secuencial de cisteína al glutamato seguida por la adición de glicina. El grupo sulfhídrido (-SH) de la cisteína es el que participa en las reacciones de reducción y conjugación, las cuales son consideradas las principales funciones del GSH. Estas reacciones participan en la eliminación de peróxidos y muchos compuestos xenobióticos; sin embargo, el GSH también está involucrado en la regulación del ciclo celular (Forman *et al.*, 2009). En las plantas el GSH se localiza en todos los compartimentos celulares, como el citosol, retículo endoplásmico, vacuolas y mitocondrias. Sus funciones fisiológicas pueden ser divididas en dos categorías: metabolismo del azufre y mecanismo de defensa. En el primer caso, el GSH es el principal tiol no proteico que regula la entrada de azufre a nivel de la raíz. En el segundo, es usado por la glutatión-S-transferasa para detoxificar xenobióticos y es precursor de las fitoquelatinas, moléculas importantes para el control de las concentraciones celulares de metales pesados (Blokhina *et al.*, 2003). Junto con su forma oxidada, el GSH mantiene el equilibrio redox en los compartimentos celulares donde se localiza.

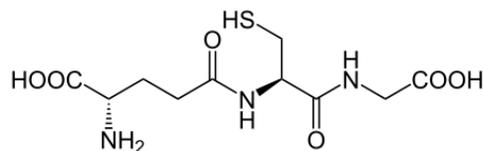


Figura 9. Estructura del glutatión (GSH)

En general, durante la exposición de especies vegetales a la presencia de metales pesados no se ha encontrado un patrón general en la concentración de GSH en tejidos. Por ejemplo, Liu *et al.* (2007) reportan que la exposición de *Bechmeria nivea* a 3 mg Cd/L durante 10 días provocó un incremento (125%) en la concentración de GSH. En otros estudios, se ha encontrado que metales como el Cd y el Cu, pueden causar una disminución en la concentración de GSH. En un estudio realizado con *Scenedesmus bijugatus* en presencia de cobre, se registró una disminución considerable (138%) en la concentración de GSH (Nagalakshimi y Prasad, 2001). La exposición de *Ceratophyllum demersum* a 1 mg Cd/L durante 7 días ocasionó una disminución (33%) en la concentración de GSH (Aravind y Prasad, 2005).

Acido ascórbico (AsA). El AsA (vitamina C) es un antioxidante primario clave presente y predominante en la mayoría de las células vegetales. Bajo condiciones fisiológicas, el AsA se encuentra mayoritariamente (90%) en forma reducida en hojas y cloroplastos y su concentración intracelular puede encontrarse en un rango mM (Blokhina *et al.* 2003; Gratão *et al.*, 2005), con una concentración celular promedio de 2 a 25 mM en los cloroplastos (Smirnoff, 1996). Las hojas contienen a menudo más AsA que clorofila y la reserva de este ácido representa alrededor del 10% de los carbohidratos hidrosolubles totales. Se sabe que el AsA es el mayor y probablemente el único amortiguador antioxidante en el apoplasto y se encuentra implicado en funciones celulares vitales, como la regulación de la división celular y la elongación de células, además del crecimiento de la raíz, vacuolarización celular y la expansión de la pared celular. Es también importante en la fotoprotección y en la regulación de la fotosíntesis. Además de ser un antioxidante esencial en el ciclo AsA-GSH, protege enzimas que poseen iones metálicos de transición, es sustrato de la ascorbato oxidasa y cofactor de muchas enzimas, incluyendo APX y las involucradas en la síntesis de pared celular y en la hidroxilación de residuos de prolina. También interviene en la regeneración del α -tocoferol a partir del radical α -cromanoxilo y funciona como donador de electrones durante el transporte fotosintético y mitocondrial. Su capacidad para donar electrones en una serie de reacciones enzimáticas y no enzimáticas, hace al AsA el principal compuesto detoxificador de ERO en la fase acuosa, ya que puede reaccionar directamente con $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$, y reducir H_2O_2 a agua por la reacción de la APX, una peroxidasa con especificidad por el ASC como reductor (Smirnoff, 1996; Blokhina *et al.*, 2003).

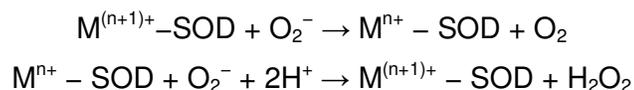
Existen algunos trabajos que han estudiado los efectos de los MP en la producción de AsA en diferentes especies vegetales. Por ejemplo, en hojas de *A. thaliana* expuesta a 5-100 mM

Cu durante 3 días, la concentración de AsA aumentó considerablemente (173-249%) con respecto al control (Drazkiewicz *et al.*, 2003); Cuypers *et al.* (2001), al exponer a *Phaseolus vulgaris* a 3 mg Zn/L durante 7 días observaron un incremento (160%) en la concentración de AsA. En *Ceratophyllum demersum* en presencia de 1 mg Cd/L durante 7 días se encontró una disminución (64%) en la concentración de AsA (Aravind y Prasad, 2005).

2.6.2 Sistemas enzimáticos antioxidantes

Los mecanismos enzimáticos de eliminación de ERO en las plantas incluyen varias enzimas, entre estas se encuentran la SOD, la APX, la GPX y la CAT (Figura 8). La SOD y la CAT son las enzimas antioxidantes más eficientes y son las primeras en actuar durante la defensa contra las ERO, convirtiendo el radical superóxido en H₂O₂ y posteriormente en O₂. Después, las enzimas APX, GPX eliminan el H₂O₂ (Scandalios, 1993).

Superóxido dismutasa (SOD). La SOD (EC 1.15.1.1) es una enzima ampliamente distribuida entre los organismos aerobios, aerotolerantes y en algunos anaerobios obligados (Scandalios, 1993). Es responsable de la dismutación del radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) a peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y oxígeno (O₂), y es considerada como la primera línea de defensa contra las ERO (Gratão *et al.*, 2005). A continuación se muestra la reacción de dismutación del superóxido catalizada por la SOD en presencia de un catión:



En donde M = Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2).

En esta reacción, el estado de oxidación del catión metálico oscila entre n y n+1. Las SOD se clasifican en tres grupos, de acuerdo al metal que contienen en su sitio activo: pueden contener cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD) o hierro (Fe-SOD). Con pocas excepciones, las Cu/Zn-SOD se encuentran en el citosol y cloroplastos de células eucariontes. Las Mn-SOD se encuentran en la matriz mitocondrial y en procariontes. Las Fe-SOD se encuentran en procariontes y han sido reportadas en algunas plantas. También se ha reportado la presencia de una Mn-SOD asociada a la membrana, en los cloroplastos de algunas plantas, así como una Cu/Zn-SOD tetramérica glucosilada, en fluidos extracelulares de mamíferos. No se han reportado SOD extracelulares en las plantas (Blokhina *et al.*, 2003).

La respuesta de la SOD al estrés producido por la presencia de metales pesados varía dependiendo de la especie vegetal, tipo de tejido, estado de desarrollo y tiempo de exposición (Gratão *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el Pb puede mediar la acumulación de ERO, induciendo un aumento en la actividad SOD en ciertas especies vegetales, lo cual puede considerarse un biomarcador sensible al estrés oxidativo. Por lo tanto, fluctuaciones anormales de la SOD en una planta pueden considerarse como un importante biomarcador de suelos contaminados con plomo (Wang *et al.* 2008). Por otra parte, Gajewska *et al.*, (2006) reportaron una disminución de la actividad de la enzima por la exposición de *Triticum aestivum* a níquel. En otro estudio, realizado con *Pinus sylvestris*, en presencia de Cd (50 μ M), se encontró un incremento en la actividad de la enzima que, después de las primeras doce horas de tratamiento decayó (Schützendübel *et al.*, 2001).

Catalasa (CAT). La CAT (EC 1.11.1.6) metaboliza el H_2O_2 liberado en los peroxisomas para su conversión en H_2O y O_2 , a través de la conversión de glicolato en glioxalato durante la fotorespiración. La CAT también descompone el H_2O_2 formado durante la β -oxidación de los ácidos grasos en los glioxisomas de los tejidos de almacenamiento lipídico.

La actividad CAT, al igual que la SOD, varía en respuesta al estrés producido por metales pesados. Por ejemplo, se ha encontrado que la actividad CAT disminuye en presencia de Cd en *Phaseolus vulgaris* y *Lemna minor*, e incrementa su actividad en *Agropyron repens* y *Raphanus sativus* (Gratão *et al.*, 2005). Asimismo, se ha encontrado que en presencia de Cu, la actividad de la CAT aumentó en *Lemna minor* (Teisseire, 2000).

2.6.3 Ciclo ascorbato-glutación

El ciclo ascorbato – glutación juega un papel central en la remoción de las ERO y permite mantener el balance redox dentro de la célula. Este ciclo comprende tres parejas redox: AsA/DHA, GSH/GSSG y NADPH/NADP y a las enzimas responsables de las reacciones de oxidación-reducción del AsA, GSH y NADPH: la APX (EC 1.11.11), mono-dehidroascorbato reductasa (MDHAR, EC 1.6.5.4), dehidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1) y glutación reductasa GR (EC 1.6.4.2). Para la eliminación de ERO, este ciclo convierte el H_2O_2 en H_2O mediante la oxidación del AsA a monodehidroascorbato (MDHA) por la APX. Entonces el AsA puede ser regenerado por la MDHAR, usando $NADPH^+$ como poder reductor. El MDHA puede ser transformado espontáneamente en dehidroascorbato (DHA) y, entonces, la regeneración del AsA puede ser mediada por la DHAR, oxidando el GSH a GSSG.

Finalmente la GR puede regenerar el GSH a partir del GSSG en presencia de NADPH^+ (Figura 8b). A continuación se describe con mayor detalle la función de cada enzima implicada en el ciclo AsA-GSH.

Glutación reductasa (GR). Esta enzima (EC 1.6.4.2) es una flavoproteína oxidoreductasa encontrada en procariontes y eucariontes, que cataliza la reducción del GSSG a GSH y su actividad depende del NADPH^+ . La GR se localiza principalmente (70-80%) en cloroplastos, pero también se ha encontrado en el citosol, mitocondria y peroxisomas. La GR está involucrada en la defensa contra el estrés oxidativo (Figura 8b), ya que mantiene el balance redox celular, manteniendo las reservas de GSH reducido y AsA (Figura 10) (Lascano *et al.*, 2001).

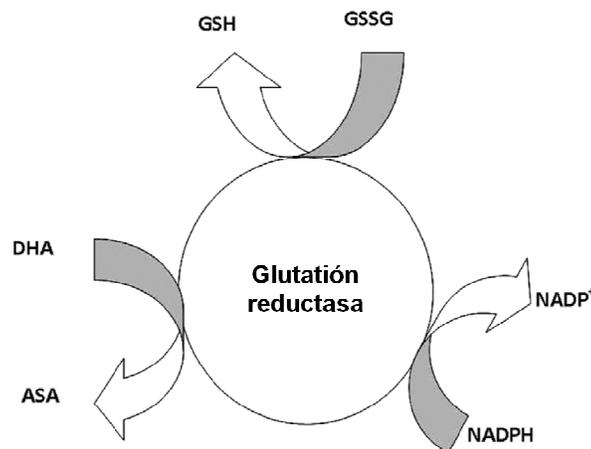


Figura 10. Papel de la enzima glutatión reductasa en el mantenimiento del balance redox celular (Lascano *et al.*, 2001)

En *Raphanus sativatus*, *Crotalaria juncea* y *Phaseolus vulgaris*, además de plantas de pimiento y de soya expuestas a Cd, se ha reportado que la actividad de la GR se incrementó como parte de su sistema antioxidante (Gratão *et al.*, 2005). En contraste, en *Lemna minor* y *Scenedesmus bijugatus* en presencia de cobre, la actividad de esta enzima disminuyó (Razinger, 2007, Nagalakshmi y Prasad, 2001).

Ascorbato peroxidasa (APX). La familia de la APX (EC 1.11.1.11) consiste en, al menos, cinco isoformas que se localizan en los cloroplastos y en el citoplasma. Esta enzima elimina el H_2O_2 utilizando AsA como sustrato, para convertir el peróxido de hidrogeno en agua (Figura 8b). Por ejemplo, Aravind y Prasad (2005) encontraron que en *Ceratophyllum demersum* en presencia de Cd y Zn la actividad APX se incrementó.

Glutación-S-transferasa (GST). Las GST (EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas que catalizan la conjugación del GSH con una variedad de sustratos hidrofóbicos, electrofílicos y citotóxicos y se encuentran en casi todos los organismos vivos. Existen varias clases de enzimas en la súper-familia de las GST (ϕ , τ , θ , ζ , λ) además de la dehidroascorbato reductasa (DHAR). Para eliminar xenobióticos, las células vegetales, primero los conjugan con GSH para formar moléculas objetivo que deben eliminarse. Una vez formados, los conjugados de GSH son transportados a las vacuolas por bombas ATP-dependientes y degradados (Rouhier *et al.* 2008). Se ha reportado que la actividad de la GST aumentó considerablemente en plantas de *Scenedesmus bijugatus* crecidas en presencia de Cu (0 - 50 mg/L) (Razinger *et al.*, 2007) y en plantas de chícharo expuestas a Cd (Gratão, 2005).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación ambiental por MP como Pb, Cd, Hg y As, representa un problema de salud, ambiental y económico de grandes proporciones. La fitorremediación es una alternativa ecológicamente viable y puede implicar mayor efectividad que los métodos fisicoquímicos utilizados tradicionalmente para la remediación de suelos contaminados con dichos elementos. Sin embargo, el avance en este campo en nuestro país se ha retardado debido, en parte, a la falta de conocimiento acerca de mecanismos involucrados en dicho proceso, como son la captación, movilización, inmovilización y metabolismo de los metales en las plantas, así como por la falta de especies vegetales con potencial para fitorremediar sitios contaminados en las condiciones climatológicas y geográficas particulares de México.

Con base en lo anterior, este trabajo se realizó con el objeto de evaluar el efecto del plomo en el ciclo ascorbato-glutación y la capacidad fitorremediadora de *Acacia farnesiana* (L.) Willd., un arbusto distribuido en zonas áridas y semi-áridas de México, presente en muchos sitios contaminados con residuos mineros. Dicha especie es muy tolerante a la sequía, fácilmente adaptable a altas temperaturas y puede crecer tanto en regiones húmedas como secas en una gran variedad de suelos (Francis, 2002). *A. farnesiana* es una especie escasamente estudiada con fines de fitorremediación; sin embargo, se ha demostrado su capacidad para acumular altas concentraciones de plomo (> 1500 ppm) y cadmio (> 500 ppm) con una alta tolerancia a la presencia de dichos elementos (Salas, 2007; Solís, 2007).

Debido a que metales como el plomo provocan un incremento en el estrés oxidativo en las plantas, debido a la generación de ERO, moléculas altamente reactivas que pueden ocasionar daño a biomoléculas en las células vegetales, en el presente trabajo se propuso relacionar la capacidad fitorremediadora de esta especie con algunos mecanismos enzimáticos del ciclo ascorbato - glutación, que pueden estar involucrados en su capacidad para tolerar la presencia de MP como el plomo. De esta manera, la generación de conocimiento relativo a estos mecanismos enzimáticos pueden contribuir a mejorar, a mediano y largo plazo, los procesos de fitorremediación de suelos contaminados con metales mediante el uso de *A. farnesiana*.

4 HIPÓTESIS

4. HIP3TESIS

La presencia de plomo provoca un incremento en la actividad de enzimas y en la concentraci3n de mol3culas antioxidantes que participan en el ciclo ascorbato – glutati3n en *Acacia farnesiana*.

5 OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del plomo sobre la actividad del ciclo ascorbato-glutación en *Acacia farnesiana*.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del Pb en la morfología y el crecimiento de tallos y raíces de *A. farnesiana*
- Evaluar la capacidad de acumulación, translocación y concentración crítica de Pb para *A. farnesiana*
- Determinar el efecto de la concentración de plomo en los niveles de lipoperoxidación en *A. farnesiana* como un indicador de estrés oxidativo
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de plomo en la actividad de algunas enzimas y en la concentración de algunas moléculas antioxidantes del ciclo ascorbato-glutación.

6. MÉTODOS Y MATERIALES

6. MÉTODOS Y MATERIALES

6.1 Diseño experimental

Para la realización de este trabajo se propuso un diseño experimental en el que se evaluó el efecto de tres concentraciones de plomo (250, 500 y 1000 mg/L) y un control (0 mg/L) en cuatro diferentes tiempos de muestreo (15, 30, 45 y 60 d) sobre el ciclo ascorbato – glutación de *Acacia farnesiana* (L.) Willd. Todos los ensayos se hicieron por triplicado, usando como unidad experimental la biomasa de cuatro plántulas de *A. farnesiana* crecidas bajo condiciones *in vitro*, en medio MS utilizando como contenedor cajas Magenta (Sigma). Los parámetros que se cuantificaron en tallos y raíces, por separado, fueron: (i) concentración de plomo en parte aérea y raíces; (ii) crecimiento (peso fresco y longitud) de parte aérea y raíces; (iii) concentración de malondialdehído; (iv) concentración de moléculas antioxidantes (GSH y AsA); y (v) actividad de enzimas antioxidantes (GST y GR).

6.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Los ensayos se realizaron con semillas colectadas de árboles de *A. farnesiana* crecidos en sitios contaminados con residuos mineros. Las semillas se escarificaron mecánicamente y se desinfectaron a través de lavados sucesivos con las siguientes soluciones: detergente comercial (2%, 30 min), etanol (70%, 30 s), hipoclorito de sodio comercial (12%, 20 min). Entre cada solución, las semillas se enjuagaron repetidamente con agua desionizada estéril, bajo condiciones asépticas. Posteriormente, se sembraron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (*Sigma Aldrich*) con sacarosa (30 g/L, *Sigma*), Phytigel (2 g/L, *Sigma Aldrich*) y Na₂-EDTA (0.5 mM, *J.T. Baker*), adicionado con tres diferentes concentraciones de Pb (250, 500 y 1000 mg/L) en forma de Pb(NO₃)₂. El pH del medio se ajustó a 5.5 con NaOH 1N. Las plántulas se mantuvieron a 25 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16 h durante diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 días).

6.3 Acumulación de plomo

Después cada tiempo de incubación (15, 30, 45 y 60 días) las plantas se retiraron del medio y se separaron en parte aérea y raíces, éstas últimas se lavaron con una solución de EDTA (10 mM) con el fin de eliminar el plomo extracelular acumulado. Las partes aéreas y las raíces se deshidrataron en una estufa (WTB, *Binder*) a 60 °C durante 24 h.

Para determinar el contenido de Pb en los tejidos vegetales (parte aérea y raíces por separado), se pesó alrededor de 0.1 g de tejido seco, se le adicionó 5 mL de HNO₃ concentrado y 4 mL de agua desionizada para su digestión por microondas (MARS-Xpress, CEM) a 1600 W durante 15 min. Las muestras se aforaron a 10 mL con agua desionizada y se filtraron empleando una membrana de 0.45 μm (GN-6 *Metricell*).

El contenido total de Pb de las partes aéreas y raíces se cuantificó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) en un espectrómetro *Shimadzu* (AA-6300), por el método de flama a una longitud de onda de 283.3 nm. Las curvas estándar se prepararon con una solución estándar de plomo (*J.T. Baker*).

6.4 Estimación de índices y coeficientes

Índice de tolerancia. El índice de tolerancia (IT) es una medida de la capacidad de una especie para crecer en lugares contaminados con metales. Este índice se obtuvo relacionando la longitud de las raíces de plantas crecidas en presencia de plomo con la longitud de las raíces de las plantas crecidas en el tratamiento control (0 mg/L), a través de la siguiente relación (Audet y Charest, 2007):

$$\text{Índice de tolerancia (IT)} = \left(\frac{\text{Longitud de la raíz con metales}}{\text{Longitud de la raíz sin metales}} \right) \times 100$$

Concentración crítica. La concentración crítica (CC) se determinó a partir de una curva de crecimiento de plantas de *A. farnesiana* en medios con diferente concentración de plomo. La CC indica la concentración de contaminante en la cual la elongación de raíces disminuye 50% con respecto al tratamiento control (0 mg/L):

$$\text{Concentración crítica (CC)} = \frac{(50\% \text{ de la máxima elongación de raíces} + O)}{P}$$

Donde *O* es la ordenada al origen y *P* es la pendiente

En este caso, se seleccionó la elongación de raíces como la principal medida del efecto tóxico de la concentración de Pb sobre la planta, debido a que éstas son particularmente sensibles a la presencia de toxinas y contaminantes (Deng *et al.* 2004).

Factor de translocación. El factor de translocación (FT), indica la capacidad de una planta para transportar los metales desde las raíces a la parte aérea. Para estimar este factor se

relacionó la concentración de plomo en la parte aérea con la concentración en la raíz, a través de la siguiente ecuación (Mattina *et al.*, 2003):

$$\text{Factor de translocación (FT)} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{tallos}}}{[\text{Metal}]_{\text{raíces}}}$$

Factor de bioconcentración. El factor de bioconcentración (FB) indica la eficiencia de acumulación de MP por una especie vegetal. Valores mayores a uno indican que la planta es potencialmente hiperacumuladora del MP (Audet y Charest, 2007):

$$\text{Factor de bioconcentración (FB)} = \frac{[\text{MP}]_{\text{planta}}}{[\text{MP}]_{\text{suelo}}}$$

6.5 Cuantificación de Pb soluble

Para cuantificar el Pb soluble en los medios de cultivo, una vez que se colectaron las plantas en los diferentes tiempos de muestreo (15, 30, 45 y 60 días) los medios con Phytigel se calentaron a 120°C durante 15 min con el fin de fundir el agente gelificante y obtener una muestra homogénea, de donde se tomó una alícuota de 5 mL que se adicionó con 20 mL de agua desionizada para evitar su solidificación. El medio diluido se filtró con papel Watman No. 2, se registró el pH y se cuantificó el contenido de Pb soluble mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) en un espectrómetro *Shimadzu* (AA-6300) por el método de flama (283.3 nm). Las curvas estándar se prepararon con una solución estándar de plomo de 1000 µg/ml (*J.T. Baker*).

6.6 Obtención de extractos enzimáticos y cuantificación de proteína

Las plantas de *A. farnesiana* crecidas durante diferentes tiempos se retiraron del medio, y las raíces se enjuagaron con EDTA (10 mM) para eliminar el Pb extracelular y se separaron en tallos y raíces para registrar su peso y longitud. Los tejidos, por separado, se congelaron y pulverizaron con N₂ líquido para su conservación a -70°C hasta su análisis.

Para la obtención de extractos enzimáticos crudos (EEC), los tejidos pulverizados se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7.5) y se centrifugaron a 13,000 rpm (4°C) por 15 min. El sobrenadante (EEC) se utilizó para determinar el estrés oxidativo, a través de cuantificación de la lipoperoxidación, así como la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR). La concentración de proteína en los EEC se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) con seroalbúmina bovina como estándar.

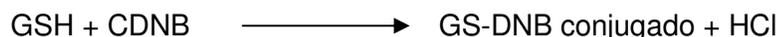
6.7 Cuantificación de estrés oxidativo

El estrés oxidativo en las plántulas como respuesta a la presencia de Pb, se cuantificó a través de la lipoperoxidación por medio de la concentración de malondialdehído (MDA). Para esto, se usó un kit comercial (*Biomol*) que se basa en la reacción de un agente cromogénico, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA a 45°C. Una molécula de MDA reacciona con dos de N-metil-2-fenilindol para formar un cromóforo estable que se cuantifica por espectrofotometría a 586 nm (Esterbauer y Cheeseman, 1990).

6.8 Cuantificación de actividades enzimáticas

6.8.1 Glutación S-transferasa (GST)

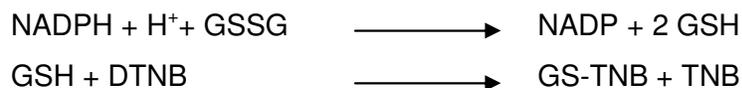
La actividad GST se determinó mediante el uso de un kit comercial (*Sigma-Aldrich*). El principio del ensayo se basa en que la GST cataliza la conjugación del GSH con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenueno (CNDNB), a través del grupo tiol del GSH, de acuerdo a la siguiente reacción:



El producto de la reacción absorbe a 340 nm y la velocidad del aumento en la absorbancia es proporcional a la actividad GST. Una unidad de actividad (U) GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por min a 25°C y pH 7.5 (Wilce y Parker, 1994).

6.8.2 Glutación reductasa (GR)

Para determinar la actividad GR se empleó un kit comercial (*Sigma-Aldrich*). El principio del ensayo se basa en la reducción de glutación oxidado (GSSG) por NADPH en presencia de la GR. Con la adición de ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) se forma un cromóforo que absorbe a 412 nm.



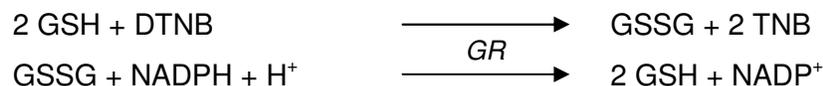
La actividad enzimática se cuantificó a través del incremento en la absorbancia a 412 nm causado por la reducción del DTNB. Una unidad de actividad (U) GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 μmol de DTNB a TNB por min a 25°C y pH 7.5 (Smith *et al.*, 1988).

6.9 Cuantificaci3n de mol3culas antioxidantes

Para cuantificar la concentraci3n total de glutati3n (GSH) y ascorbato (AsA), las muestras pulverizadas conservadas a -70°C se homogeneizaron con una soluci3n de 3cido metafosf3rico (5%) y se centrifugaron a 13,000 rpm (4°C) por 15 min. El sobrenadante se utiliz3 para cuantificar el GSH y el ASC.

6.9.1 Glutati3n

Para cuantificar la concentraci3n total de GSH, las muestras del extracto de 3cido metafosf3rico (50 µL) se mezclaron con agua desionizada (2 µL) y se neutralizaron con trietanolamina (1 M, 18 µL). El m3todo para cuantificar el GSH total se basa en la capacidad de la GR para catalizar la oxidaci3n del NADPH por el DTNB en presencia de GSH. La velocidad de la reacci3n es proporcional a la concentraci3n total de GSH. El producto TNB se cuantific3 espectrofotom3tricamente a 412 nm.



La curva est3ndar de GSH se prepar3 en 3cido metafosf3rico al 5% (Griffith, 1980).

6.9.2 Ascorbato

Para determinar la concentraci3n total de ascorbato, el extracto con 3cido metafosf3rico se neutraliz3 con trietanolamina (1.5 M) y se mezcl3 con amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7.5) y ditiotreitolo (DTT, 10 mM). La mezcla se incub3 a temperatura ambiente por 15 min para reducir el dehidroascorbato en el extracto. Para eliminar el exceso de DTT se adici3n3 N-etilmaleimida (0.5% p/v) y, a continuaci3n, 3cido tricloroac3tico (10% p/v), 3cido fosf3rico (44% v/v), 2,2'-dipiridilo (4% p/v) y FeCl₃ (3% p/v). Las muestras se mezclaron y se incubaron 1 h a 37°C. El AsA se cuantific3 espectrofotom3tricamente a 525 nm usando una curva est3ndar se preparada en 3cido metafosforico al 5% (Kn3rzer *et al.* 1996).

6.10 An3lisis estad3sticos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un an3lisis de varianza y las medias se compararon utilizando al prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$) para establecer diferencias significativas. Para lo anterior, se utiliz3 el paquete estad3stico NCSS.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Efecto del plomo sobre la morfología y crecimiento de *A. farnesiana*

Se ha reportado que altos niveles de Pb pueden inducir signos de fitotoxicidad, como la disminución en el crecimiento y clorosis (Sharma y Dubey, 2005), además de alteraciones en la morfología (Sengar *et al.*, 2008). En este trabajo, en las plantas crecidas con 250 y 500 mg Pb/L no se observaron signos de fitotoxicidad por Pb, como necrosis o clorosis, mientras que una concentración de 1000 mg Pb/L provocó signos evidentes de clorosis (Figura 11). Sin embargo, en el primer grupo de plantas (250 y 500 mg Pb/L) sí se detectaron efectos del metal en la morfología y crecimiento, observando raíces más gruesas y oscuras que en las plantas crecidas sin Pb, de acuerdo a Paivoke (1983) esto se puede deber a que el Pb ocasiona un engrosamiento irregular de la pared celular de la endodermis y lignificación del parénquima cortical de las raíces.

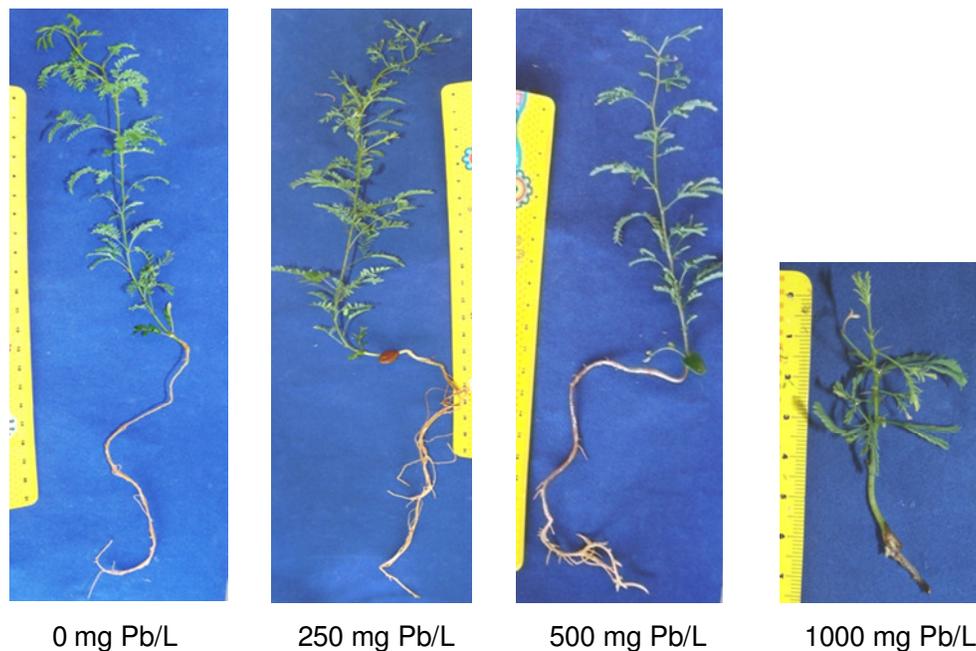
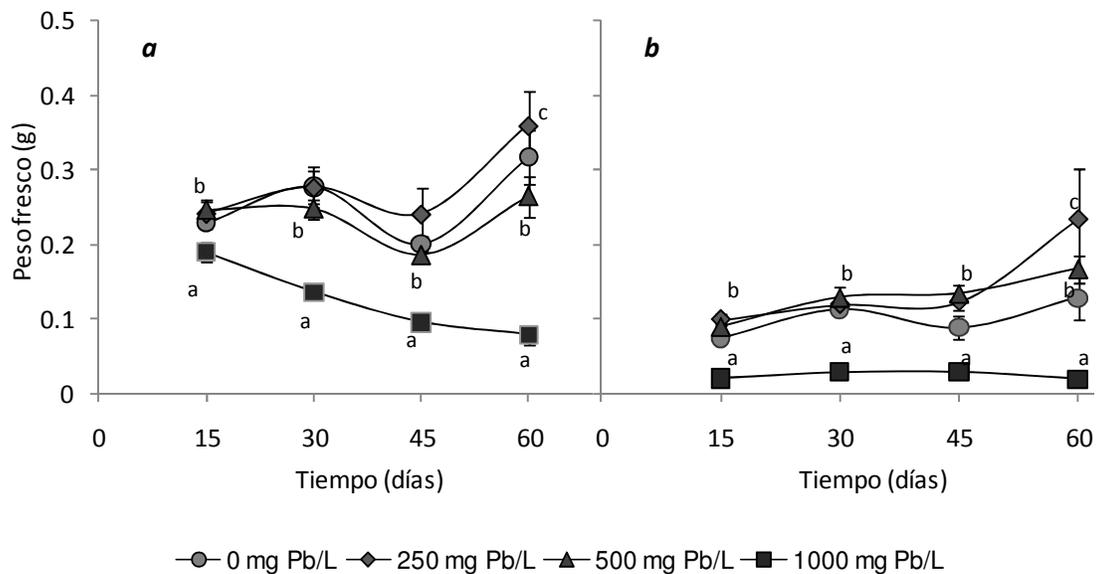


Figura 11. Efecto de plomo a diferentes concentraciones sobre la morfología de plantas de *A. farnesiana*, crecidas durante 60 días.

Las diferencias cualitativas en el crecimiento de *A. farnesiana* por efecto del Pb, se corroboraron cuantitativamente a través de la longitud y peso fresco de tallos y raíces (Figuras 12 y 13). Cuantitativamente, no se encontraron diferencias en el crecimiento de tallos y raíces de plantas crecidas con 500 mg Pb/L con respecto a las plantas control durante 60 días.



Contrario a lo esperado, en las plantas crecidas con 250 mg Pb/L se registró un aumento en el crecimiento (peso y longitud) de tallos y raíces después de 30 días, con respecto a las plantas control (Figuras 12 y 13). Sin embargo, las plantas expuestas a 1000 mg Pb/L mostraron una disminución significativa en el crecimiento (peso y longitud).

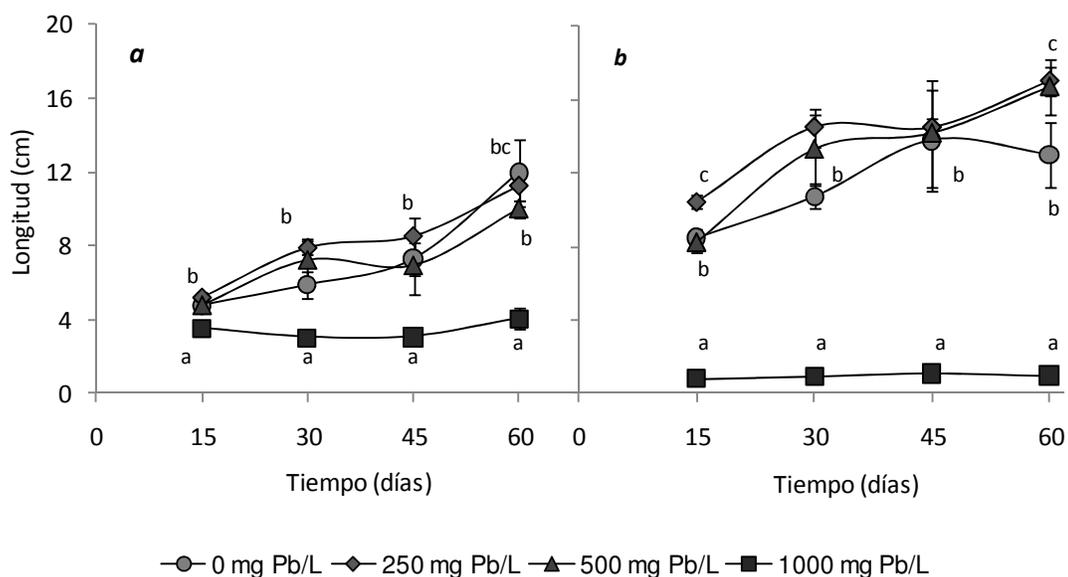


Figura 13. Efecto de la concentración de plomo en la longitud de tallos (a) y raíces (b) de *A. farnesiana* durante 60 días. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Este resultado se puede explicar debido a que el Pb altera el crecimiento de las plantas debido a la inhibición de la división celular (Sengar, 2008; Sharma y Dubey, 2005). Por ejemplo, Verma y Dubey (2003), sometieron a dos especies de arroz (*Oryza sativa L. cvs. Ratna y Jaya*) a una concentración de Pb 1000 μM durante 20 días, encontrando una disminución en la longitud de tallos y raíces de 31 y 40%, respectivamente, además de una disminución (29 y 43%, respectivamente) en el peso fresco de tallos y raíces. En contraste, Wierzbicka (1998), encontró que la presencia de Pb aumentó el peso de tallos y raíces en plántulas de *Allium cepa*, con respecto a plantas crecidas sin el metal; este resultado se atribuyó a un aumento en la síntesis de polisacáridos en la pared celular. Los resultados anteriores, concuerdan con los obtenidos en este estudio e indican que *A. farnesiana* es una planta más tolerante al estrés inducido por Pb que otras especies dicotiledóneas y monocotiledóneas. Hewitt (1953) reportó clorosis y disminución del crecimiento en plantas de remolacha crecidas en concentraciones de 100-200 mg Pb/L. Baker (1972) encontró que una concentración de 0.005 mg Pb/L redujo significativamente el crecimiento de raíces de lechuga y zanahoria y que, en plantas de soya, el metal (300 mM) disminuyó el crecimiento (peso fresco) en un 35% (Huang *et al.*, 1974).

Con el fin de determinar la tolerancia de *A. farnesiana* a la presencia de diferentes concentraciones de plomo, se estimó el índice de tolerancia (IT). En los organismos vegetales la tolerancia a un MP puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies vegetales la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de MP (Baker *et al.*, 1994). En la Figura 14 se muestra el IT evaluado para *A. farnesiana* en diferentes concentraciones de Pb en función del tiempo de cultivo. Se observa que esta especie no solo es tolerante a Pb sino que además, en las plantas crecidas con concentraciones de 250 y 500 mg Pb/L, el desarrollo de sus raíces fue estimulado. Estos resultados pueden atribuirse a que el estrés ocasionado por el Pb promueve la absorción de elementos esenciales del medio de cultivo que permiten la síntesis de biomoléculas y con esto un mayor crecimiento de la planta (Peralta Videa *et al.*, 2002). Para las plantas crecidas con 1000 mg Pb/L, el índice de tolerancia disminuyó a valores alrededor de 8%, lo que corrobora la fuerte inhibición del crecimiento que ocasiona el Pb. Estos resultados demostraron que la respuesta de la planta estuvo en función de la concentración de Pb; es decir, en concentraciones menores a 500 mg Pb/L, el IT superó el 100%, mientras que con 1000 mg Pb/L, el IT fue menor a 100%. Este tipo de respuesta se conoce como hormesis que se define como un proceso en el cual la exposición a bajas dosis de un agente ambiental tóxico, que es dañino en altas concentraciones, induce un efecto adaptativo sobre las células u organismos (Mattson, 2008).

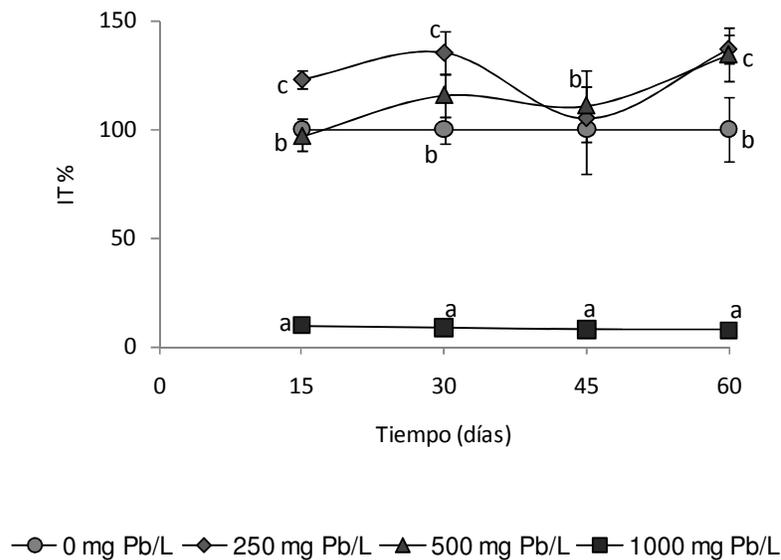


Figura 14. Índice de tolerancia (IT) en función del tiempo para plantas de *A. farnesiana* crecidas con diferentes concentraciones iniciales de Pb. Las barras de error representan la desviación estándar (n = 3).

Estos resultados sugieren que *A. farnesiana* tolera hasta 500 mg Pb/L sin mostrar signos de fitotoxicidad. Para conocer la concentración de Pb con la cual la planta empieza a manifestar signos de toxicidad, se determinó la concentración crítica (CC) de Pb para la especie en estudio (Figura 15). La CC se calculó a partir de una curva de longitud de las raíces; encontrando un valor de 765 mg Pb/L. La CC de un MP para una especie vegetal es aquella que ocasiona una disminución de 50% en la longitud de las raíces, con respecto a la longitud de raíces en las plantas crecidas en ausencia del MP (Deng, 2004).

El Task Group (1973) y el Task Group on Metal Toxicity (1976) definen la CC a nivel celular como la concentración de un metal que produce en la célula cambios funcionales indeseables, reversibles o irreversibles (OPS-OMS, 1980). En este trabajo se encontró que a concentraciones de 1000 mg Pb/L esta especie muestra signos de fitotoxicidad, lo cual indica que existen cambios en la fisiología de la planta.

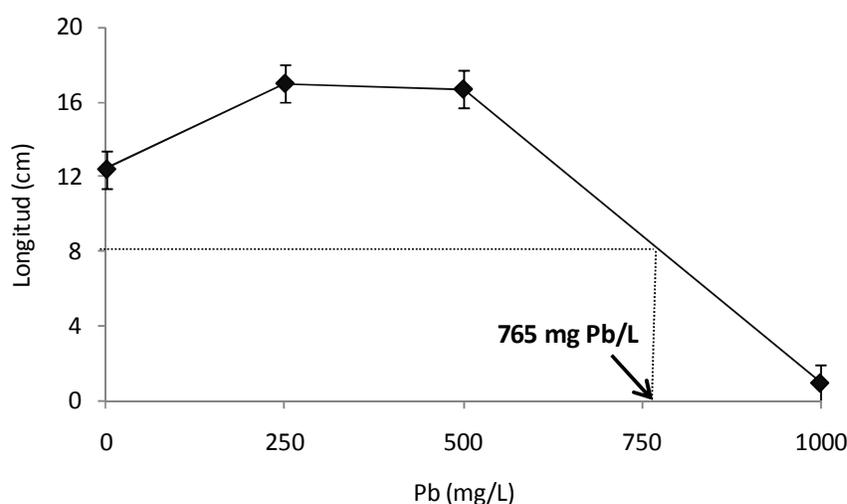


Figura 15. Cálculo de la concentración crítica (CC) de Pb para *Acacia farnesiana* a partir de la elongación de raíces, a los 60 días de crecimiento. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

7.2 Acumulación de plomo por *A. farnesiana*

El Pb se absorbe por las raíces a través de pelos radiculares hasta alcanzar el sistema vascular, esto permite que el metal sea translocado hacia las estructuras aéreas de la planta como yemas y hojas (Jarvis y Leung, 2002). No obstante, el transporte del plomo de las raíces a la parte aérea es restringido, debido a la presencia de la banda de Caspary en la endodermis (Seregin, 2004). De hecho, nuestros resultados mostraron que las raíces de *A. farnesiana* acumularon entre 15 y 70 veces más plomo que los tallos (Tabla 3), alcanzando concentraciones mayores a 30 mg Pb/g de raíz (peso seco) para una concentración inicial de 1000 mg Pb/L (Figura 16).

Tabla 3. Acumulación de plomo en tallos (mg Pb/kg MS) de *A. farnesiana* en función de la concentración inicial de metal en el medio durante 60 días de incubación.

Plomo (mg/L)	Tiempo (días)			
	15	30	45	60
0	ND	ND	ND	ND
250	49.9 ± 2.7	77.4 ± 8.5	30.2 ± 20.1	28.2 ± 13.1
500	40.7 ± 6.8	96.1 ± 9.1	114.6 ± 13.4	68.2 ± 4.9
1000	300.6 ± 91.9	773.4 ± 71.4	802.6 ± 81.4	3318.6 ± 75.2

En general, la cantidad de Pb acumulada en tejidos dependió de la concentración inicial del metal en el medio, encontrando mayor acumulación a medida que el Pb inicial aumentó.

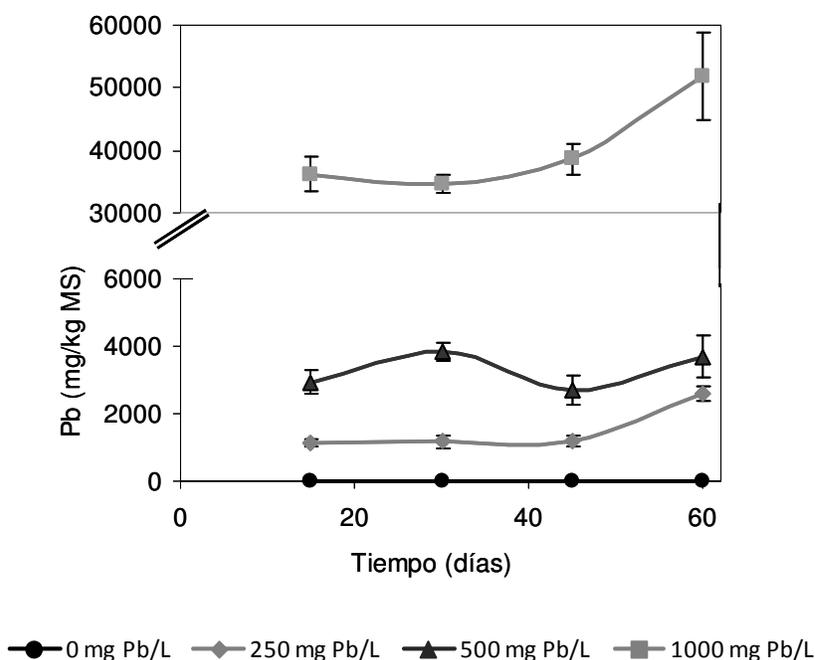


Figura 16. Efecto de la concentración inicial de Pb sobre su acumulación en raíces de *A. farnesiana* durante 60 días de incubación.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados de acumulación de Pb en tejidos, se determinó la capacidad de la planta para translocar el metal de las raíces a los tallos. Para lo anterior, se estimó el factor de translocación (FT) que es una relación entre la concentración de plomo en los tallos y las raíces (Deng *et al.* 2004). Los FT para las concentraciones de plomo estudiadas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Factor de translocación en las diferentes concentraciones de Pb y tiempos de muestreo^a.

Pb inicial (mg/L)	Tiempo (días)			
	15	30	45	60
0	ND	ND	ND	ND
250	0.045 ± 0.003 b	0.063 ± 0.013 b	0.027 ± 0.013 a	0.011 ± 0.005 a
500	0.014 ± 0.003 a	0.023 ± 0.006 a	0.037 ± 0.016 a	0.016 ± 0.007 a
1000	0.010 ± 0.003 a	0.021 ± 0.004 a	0.014 ± 0.013 a	0.061 ± 0.057 a

^a Valores con la misma letra en columnas no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

De acuerdo con Deng *et al.* (2004), valores del FT ≥ 1 indican una translocación eficiente del metal a la parte aérea, por lo que la planta puede ser fitoacumuladora. Si el valor de FT es menor a 1 la planta tiene potencial para fitoestabilización. Nuestros resultados mostraron que, independientemente de la concentración inicial de plomo en el medio, así como del tiempo de cultivo, los FT para *A. farnesiana* fueron mucho menores a uno, lo que sugiere que *A. farnesiana* es una especie fitoestabilizadora de plomo.

También se determinó la capacidad relativa que la planta posee para absorber Pb del medio de cultivo. Para lo anterior, se estimó el factor de bioconcentración (FBC), que es una relación entre la concentración del Pb en la planta y el Pb en el medio donde ésta crece (Figura 17).

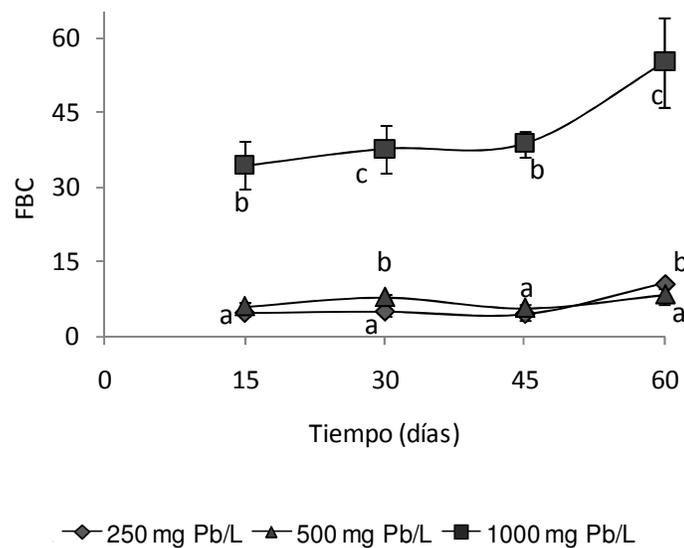


Figura 17. Factor de bioconcentración (FBC) de Pb para *A. farnesiana* en función del tiempo de cultivo y de la concentración inicial del metal. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Audet y Charest (2007) mencionan que si el valor del FBC es mayor a 1, la acumulación del metal por la planta es eficiente, lo que es un indicador para considerar a la especie con potencial para acumular MP. En la Figura 17 se observa que el FBC para *A. farnesiana* fue mayor a 4, y alcanzó valores superiores a 30 cuando la planta creció en una concentración de 1000 mg Pb/L. Lo anterior indica que *A. farnesiana* es una especie con gran potencial para acumular Pb en sus tejidos. Los mayores valores del FBC se alcanzaron a los 60 días de cultivo, lo que corrobora que el tiempo de cultivo favorece una mayor acumulación del metal. De acuerdo con Neumann *et al.* (1994), un valor alto en el FBC se puede explicar debido a

mecanismos espec3ficos en algunas plantas que ayudan a detoxificar la presencia de altas concentraciones de MP acumulados en sus c3lulas. Entre los mecanismos que permiten una elevada bioacumulaci3n de MP, se encuentran ligandos que pueden formar complejos con los MP como son los amino3cidos, el 3cido c3trico, el 3cido m3lico y las fitoquelatinas.

En general, los IT de Pb mayores a 100% indican que *A. farnesiana* es una especie que posee tolerancia al Pb. Sin embargo, las concentraciones menores de 1000 mg Pb/Kg en los tallos, y el hecho de que se encontraron las mayores concentraciones de Pb en las ra3ces nos demuestran que esta especie no es hiperacumuladora para Pb de acuerdo a lo propuesto por Baker (1994). La acumulaci3n de altas concentraciones de Pb en las ra3ces de *A. farnesiana*, sin que se hayan presentado signos de fitotoxicidad y disminuci3n en la biomasa, as3 como, los altos 3ndices de FBC y bajos 3ndices de FT, sugieren que esta especie es tolerante a Pb.

7.3 Disoluci3n de plomo por *A. farnesiana*

En un estudio abi3tico bajo las mismas condiciones en las que se incub3 *A. farnesiana* se demostr3 que, independientemente de la concentraci3n inicial de Pb en el medio de cultivo, se encuentra disponible (soluble) una concentraci3n m3xima de 226 ± 9 mg Pb/L. De acuerdo con Davies (1995) una planta puede acumular en sus tejidos solamente el plomo que se encuentra disponible en el medio. Sin embargo, existen otros factores que afectan tambi3n la entrada del Pb a la planta, entre ellos est3n el pH del medio, la superficie de la ra3z y los exudados de las ra3ces. En la Figura 18 se muestran los cambios en la concentraci3n de Pb soluble en el medio por efecto del crecimiento de *A. farnesiana* en funci3n del tiempo de cultivo.

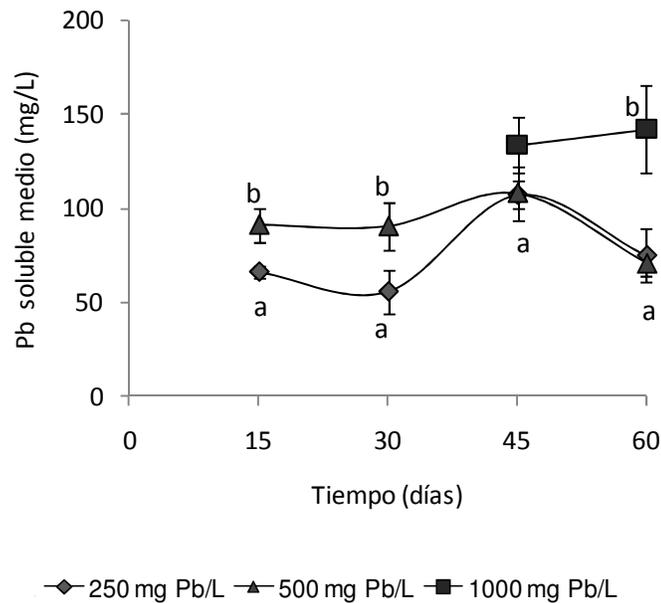


Figura 18 Concentraci3n de Pb soluble en el medio de cultivo en funci3n del tiempo de cultivo. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En la Figura 18 se observa una mayor fracci3n de Pb soluble con el aumento en la concentraci3n de Pb total, esto debido a que las ra3ces al estar sometidas a estr3s por Pb secretan una serie de compuestos org3nicos que favorecen la solubilizaci3n del metal. Lo anterior se observ3 particularmente para el medio con 1000 mg Pb/L, en donde la concentraci3n de Pb soluble fue significativamente mayor (2 veces) que en el resto de los medios a los 60 d3as. Estos resultados sugieren que las ra3ces de las plantas de *A. farnesiana* crecidas en presencia de Pb liberan compuestos al medio, modificando la solubilidad de iones esenciales y no esenciales, a trav3s de la acidificaci3n, quelaci3n, precipitaci3n y reacciones de oxidoreducci3n (Uren y Reisenauer, 1988). De hecho, se encontr3 que el pH del medio disminuy3 significativamente (m3s de una unidad), con respecto a un control incubado en condiciones abi3ticas (Figura 19), por efecto del crecimiento de *A. farnesiana*. Puede verse que el cambio en el valor del pH del medio se registr3 por efecto de la planta; sin embargo, en presencia de plomo esta disminuci3n fue significativamente diferente a la observada en las plantas sin Pb desde los 15 d3as de cultivo. Este resultado podr3a atribuirse a la liberaci3n al medio de exudados radiculares, en donde pueden encontrarse compuestos como 3cidos org3nicos (c3trico, m3lico y ox3lico, entre otros), los cuales pueden ocasionar la disminuci3n en el pH (Uren y Reisenauer, 1988).

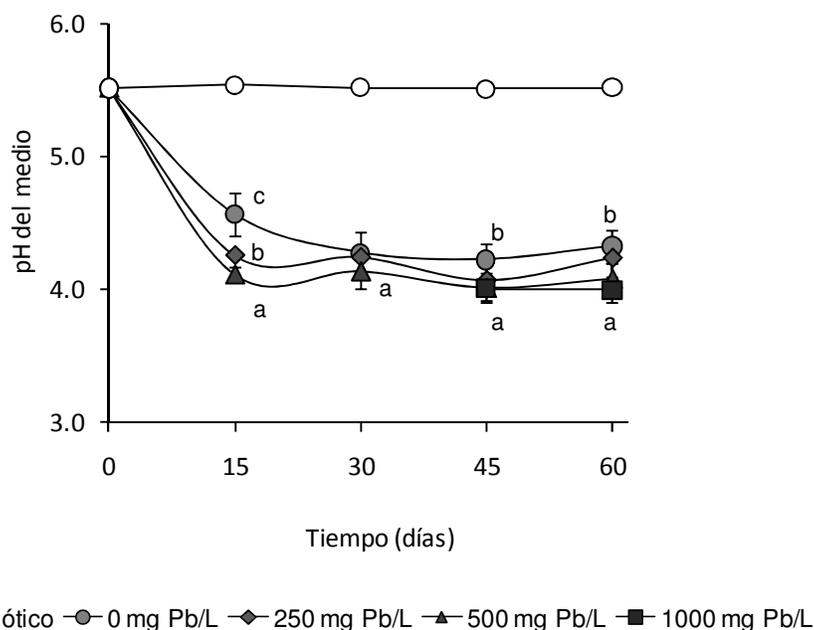


Figura 19. Efecto del crecimiento de plantas de *A. farnesiana* sobre el pH del medio en función del tiempo de cultivo. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Los ácidos orgánicos como el cítrico, málico y oxálico juegan un papel importante en la disolución de MP y en la movilización de nutrientes minerales. Además, estos ácidos tienen la capacidad para detoxificar intracelularmente los MP mediante la formación de complejos metálicos. Bajo condiciones de estrés, este tipo de compuestos suele liberarse a través de la raíz en grandes cantidades (Dinkelaker *et al.*, 1989; Delhaize *et al.*, 1993; Jones y Darrah, 1995).

7.4 Efecto del plomo en el estrés oxidativo

La lipoperoxidación es un proceso complejo que implica la formación y propagación de radicales lipídicos, así como la destrucción de membranas, produciendo una variedad de productos de ruptura, incluyendo alcoholes, aldehídos y éteres. Se sabe que el Pb induce la generación de ERO (Asada, 1994), las que pueden iniciar la lipoperoxidación al eliminar un átomo de hidrogeno de los ácidos grasos insaturados presentes en membranas celulares, conduciendo así a la formación de radicales lipídicos. El nivel de lipoperoxidación en *A. farnesiana* por efecto del plomo, se cuantificó a través de la concentración de malondialdehído (MDA), uno de los productos de la oxidación de ácidos grasos. En la Figura 20 se muestra el efecto del Pb sobre la producción de MDA en tallos y raíces de *A. farnesiana*.

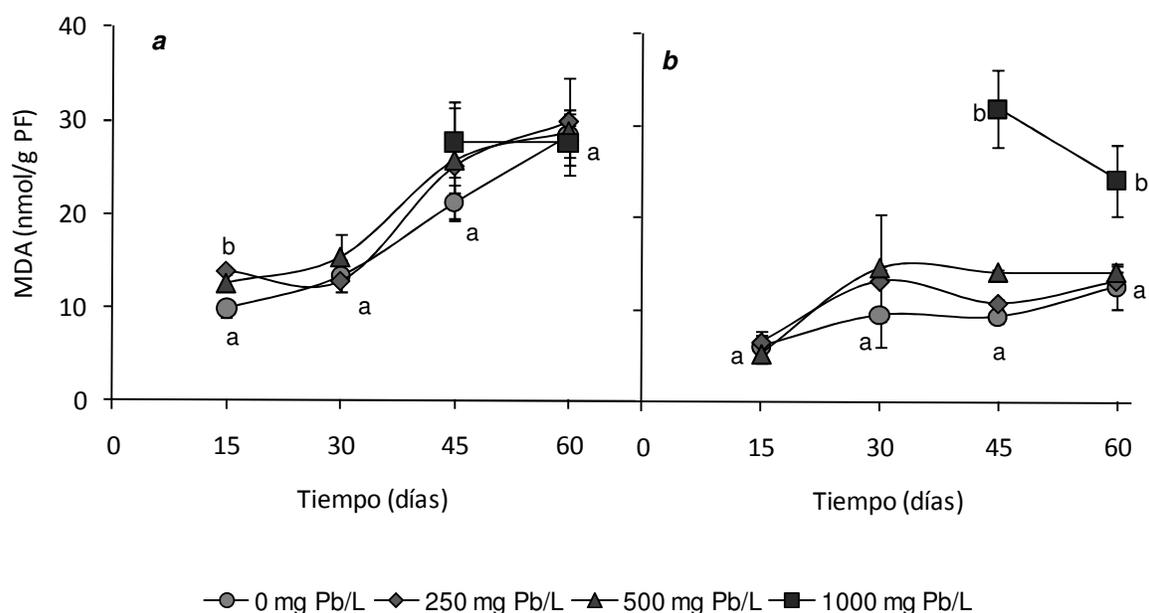


Figura 20. Efecto de la concentración de plomo sobre el nivel de lipoperoxidación en tallos (a) y raíces (b) de *A. farnesiana*, cuantificado a través de la concentración de malondialdehído (MDA) durante 60 días. Valores con la misma letra por tiempo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En general, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de lipoperoxidación por efecto de la concentración de Pb en los tallos, pero sí se registró un aumento (> 2 veces) en la concentración de MDA con el tiempo de cultivo (Figura 20a). Este incremento con el tiempo de cultivo pudo deberse a los procesos metabólicos que lleva la planta (fotosíntesis), para crecer, se sabe que los principales sitios de generación de ERO en las partes verdes de las plantas son los cloroplastos y los peroxisomas (Møller *et al.*, 2007). En el caso de las raíces (Figura 20b), no se observaron diferencias por efecto del tiempo ni de la concentración inicial de Pb hasta una concentración de 500 mg/L, pero sí se registró un aumento significativo (~2 veces) en el nivel de lipoperoxidación en las raíces de plantas crecidas con 1000 mg Pb/L con respecto al resto de las plantas. Estos resultados pueden relacionarse con la alta concentración de Pb encontrada en las raíces de las plantas crecidas en esta concentración, lo que pudo provocar un mayor estrés oxidativo en dichas estructuras, reflejándose en un aumento en la concentración de MDA. Para el caso de las plantas crecidas en concentraciones de Pb \leq 500 mg/L, el hecho de que no haya existido un incremento en la concentración de MDA se pudo deber a que los sistemas antioxidantes de la planta estuvieron actuando de manera eficiente para detoxificar a las ERO o a que la

planta posea otros mecanismos (formación de complejos) para evitar una producción elevada de ERO cuando es expuesta a estas concentraciones de Pb.

De forma similar a nuestros resultados, Liu *et al.* (2008), no encontraron diferencias en la concentración de MDA en cultivos de *Bechmeria nivea* expuestos a Cd (1 mg/L) durante 10 días, con respecto a plantas crecidas sin el metal. Este grupo encontró que al aumentar la concentración de Cd (7 mg/L) la producción de MDA se incrementó (1.8 y 1.6 veces en tallos y raíces, respectivamente). Mishra *et al.* (2006), también registraron un aumento significativo (74%) en la concentración de MDA (22 nmol/g PF) después de 7 días de exposición a Pb en cultivos de *Ceratophyllum demersum*, con respecto a plantas crecidas sin Pb.

7.5 Efecto del plomo en la actividad GST y GR

7.5.1 Actividad glutación-S-transferasa (GST)

Aunque la GST no es una enzima del ciclo ascorbato-glutación, su actividad es importante debido a que cataliza la conjugación del glutación (GSH) con una variedad de sustratos hidrofóbicos, electrofílicos y citotóxicos. Las GST utilizan GSH para reducir peróxidos como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), producido en respuesta al estrés abiótico por la presencia de metales pesados, lo que les confiere la capacidad de remover compuestos potencialmente cito- y genotóxicos (Edwards *et al.*, 2000). Los resultados mostraron un incremento significativo (2 – 4 veces) en la actividad GST a los 15 días, en los tallos y raíces de plantas crecidas en diferentes concentraciones de Pb, en comparación con las plantas control (Figura 21).

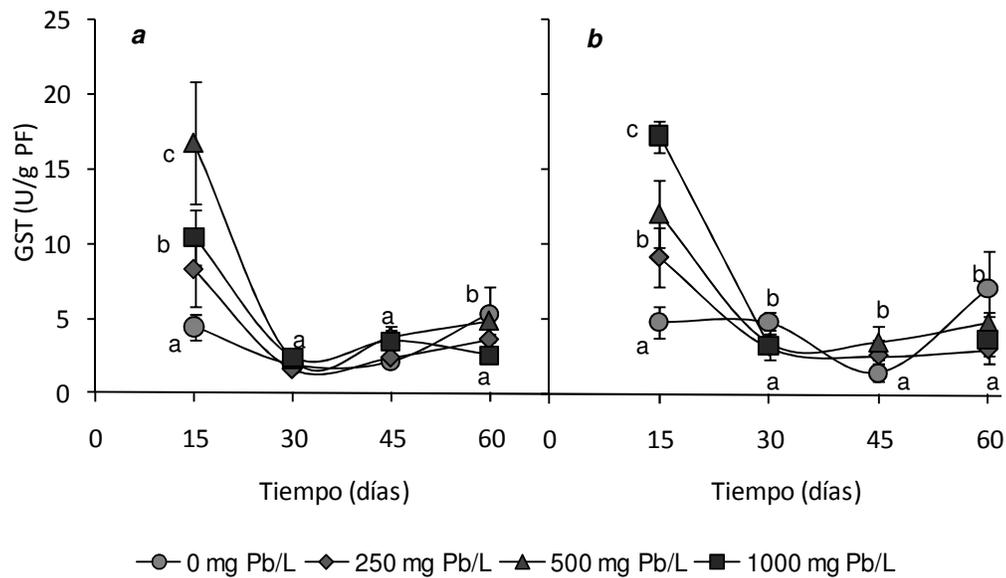


Figura 21. Actividad GST durante 60 días en tallos (a) y raíces (b) de *A. farnesiana* crecida con diferentes concentraciones de Pb. Una unidad (U) de actividad GST se define como la cantidad de enzima que cataliza la formaci3n de 1 μmol de producto por min a 25°C y pH 7.5. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En presencia de 1000 mg Pb/L, la actividad GST en las raíces de *A. farnesiana* fue mayor que la encontrada en los tallos, probablemente debido a que las raíces son las primeras en entrar en contacto con el contaminante. La actividad GST detectada a los 15 días no se mantuvo durante los 60 días del ensayo ya que, después de 30 días, la actividad disminuy3 y no se encontr3 un efecto por la concentraci3n de plomo con respecto a las plantas control, la disminuci3n en la actividad GST pudo deberse a que la planta activ3 mecanismos para evitar la formaci3n de ERO por la exposici3n a Pb, evitando as3 daño a estructuras celulares. Por otro lado, el incremento en la actividad GST a los 15 días, puede atribuirse a que esta enzima cataliza la conjugaci3n de iones de Pb con el GSH 3 directamente actúa como prote3na de uni3n para conjugar los iones de Pb. Un fuerte incremento en la actividad GST bajo condiciones de estr3s por Pb puede favorecer la detoxificaci3n de los iones de Pb, permitiendo as3 que *A. farnesiana* tolere altas concentraciones de este metal. Estos resultados coinciden con lo reportado por Reddy *et al.* (2005), quienes registraron un aumento (3-4 veces) en la actividad de dicha enzima en plantas de *Macrotyloma uniflorum* y *Cicer arietinum* expuestas a 200, 500 y 800 mg Pb/L durante 12 días.

7.5.2 Actividad glutatión reductasa (GR)

Las reservas celulares de moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH) se mantienen en su estado reducido por un grupo de enzimas capaces de usar NADPH para regenerar el glutatión oxidado (GSSG). Una de las enzimas que cataliza esta reacción es la glutatión reductasa (GR), que utiliza al NADPH como donador de electrones, y mantiene la relación GSH/GSSG intracelular en concentraciones adecuadas (>1) (Verma y Dubey, 2001, Mittler *et al.*, 2004). Esta enzima cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH). El GSH está involucrado en la regulación del ciclo celular y se considera un metabolito importante en la defensa contra el estrés oxidativo, ya que muchos radicales y agentes oxidantes pueden oxidarlo a GSSG (Noctor y Foyer, 1998). En la Figura 22 se muestra la actividad GR en tallos y raíces de *A. farnesiana* en presencia de diferentes concentraciones de Pb. Concentraciones iniciales de 250 y 500 mg Pb/L no provocaron efectos en la actividad GR de tallos ni raíces de *A. farnesiana*, con respecto a las plantas control, durante 60 d. En general, se observó una mayor actividad GR (~1.5 veces) en las plantas crecidas con 1000 mg Pb/L, con respecto al resto de las concentraciones y a las plantas control, desde los 15 hasta los 45 días de cultivo. Tanto en tallos como en raíces, la actividad GR registró una disminución significativa a los 60 días.

Los resultados obtenidos pueden atribuirse a una mayor producción de ERO en las plántulas crecidas con 1000 mg Pb/L, lo que provoca un incremento en la actividad de esta enzima, contribuyendo así a la eliminación de ERO a través de la oxidación de GSH a GSSG, para evitar daños en biomoléculas. Una vez que la planta alcanza el equilibrio redox, mediante la adaptación a las condiciones de estrés ocasionadas por las altas concentraciones de Pb, o bien, por la activación de otros mecanismos (síntesis de fitoquelatinas) que evitan que los iones de Pb se encuentren libres y por lo tanto, se disminuye la producción de ERO, las plántulas vuelven disminuir la actividad de esta enzima.

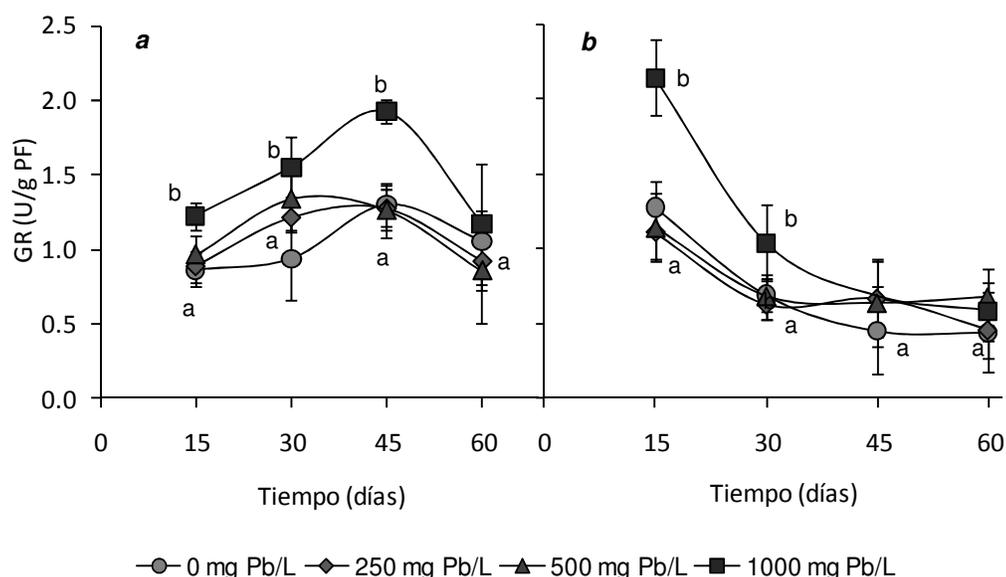


Figura 22. Actividad GR durante 60 d3as, en tallos (a) y ra3ces (b) de *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de Pb. Una unidad GR se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducci3n de 1 μmol de DTNB a TNB por min a 25°C y pH 7.5. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

7.6 Efecto del plomo en la concentraci3n de mol3culas antioxidantes

7.6.1 Glutati3n total

Como ya se ha mencionado, el glutati3n es una mol3cula fundamental para mantener el equilibrio redox intracelular. Con el objeto de conocer si el Pb alteraba la producci3n de GSH, se cuantific3 la concentraci3n de GSH total ($\text{GSH}_T = \text{GSH} + \text{GSSG}$) en tallos y ra3ces de plantas de *A. farnesiana* crecidas con Pb (Figura 23). En general, la concentraci3n de GSH_T fue mayor en tallos que en ra3ces, observ3ndose que en 3stas 3ltimas no hubo efecto por la concentraci3n de Pb durante el tiempo de cultivo, con excepci3n de las ra3ces de plantas expuestas a 1000 mg Pb/L, en donde el GSH_T aument3 con respecto al resto de las condiciones probadas. En los tallos se observ3 que el GSH_T aument3 significativamente (~2 veces) en las plantas crecidas con 250 y 500 mg Pb/L desde los 30 d3as de cultivo, manteni3ndose sin cambios significativos hasta los 60 d3as por efecto de la concentraci3n de plomo. Estos resultados pueden indicar que el sistema antioxidante dependiente del glutati3n en *A. farnesiana* en concentraciones ≤ 500 mg Pb/L resulta m3s eficiente que con 1000 mg Pb/L, lo que se deduce de una mayor producci3n de GSH_T , el cual es usado en diferentes

reacciones, actuando como un donador de electrones en la regeneración del DHA a AsA y como precursor en la síntesis de fitoquelatinas, ya que se ha demostrado que los metales pesados inducen la síntesis de fitoquelatinas (Gupta *et al.*, 1999).

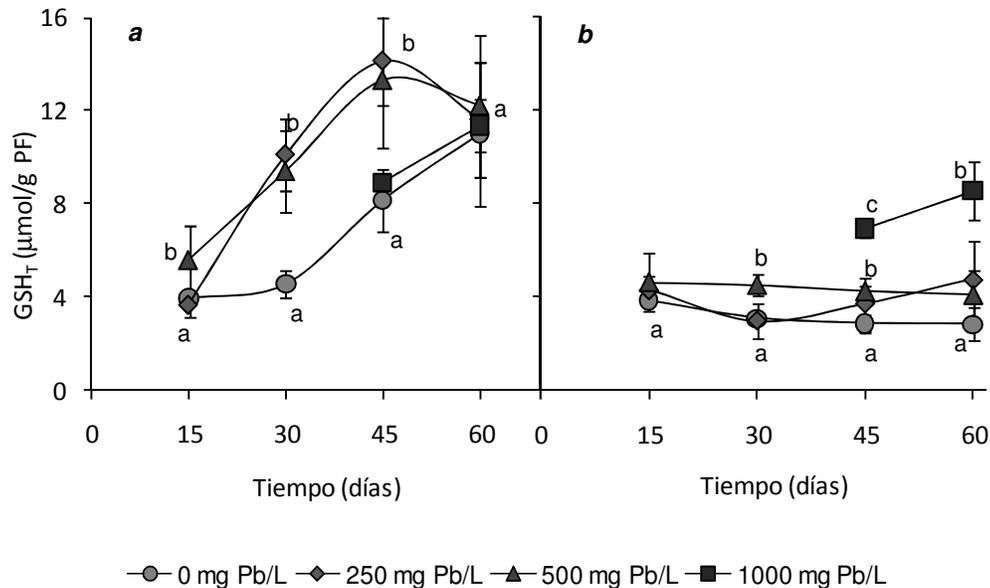


Figura 23. Concentración de GSH durante 60 días en tallos (a) y raíces (b) de *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de Pb. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Estos resultados coinciden con los descritos por Liu *et al.* (2007), quienes encontraron un incremento de 125% en la concentración de GSH total en plantas de *Bechmeria nivea* expuestas a 3 mg Cd/L durante diez días. Este grupo atribuye tal aumento a un incremento en la síntesis de GSH como resultado de la activación de la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa y al incremento en la actividad GR, como respuesta a estrés por Cd.

7.6.2 Ascorbato

El AsA es un antioxidante primario clave, que reacciona con ERO tales como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ y $^1\text{O}_2$. Es el mayor, y probablemente el único amortiguador antioxidante en el apoplasto además de ser un metabolito esencial implicado en las funciones celulares vitales (Gratão *et al.*, 2005). En la Figura 24 se presentan las concentraciones de AsA en tallos y raíces de plantas de *A.*

farnesiana; en general, la concentración de AsA en los tallos fue mayor que la encontrada en raíces. Para las plantas crecidas con 500 mg Pb/L, la concentración de AsA en los tallos fue hasta 1.9 veces mayor que la registrada en las plantas crecidas en las otras condiciones. Este resultado podría atribuirse a que hay una estimulación de la síntesis de AsA y también puede ser resultado de un incremento en la concentración de GSH (Figura 23). Por otro lado, se sabe que el incremento en la concentración de AsA participa en la preservación de la actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) (Chaparzadeh *et al.*, 2004).

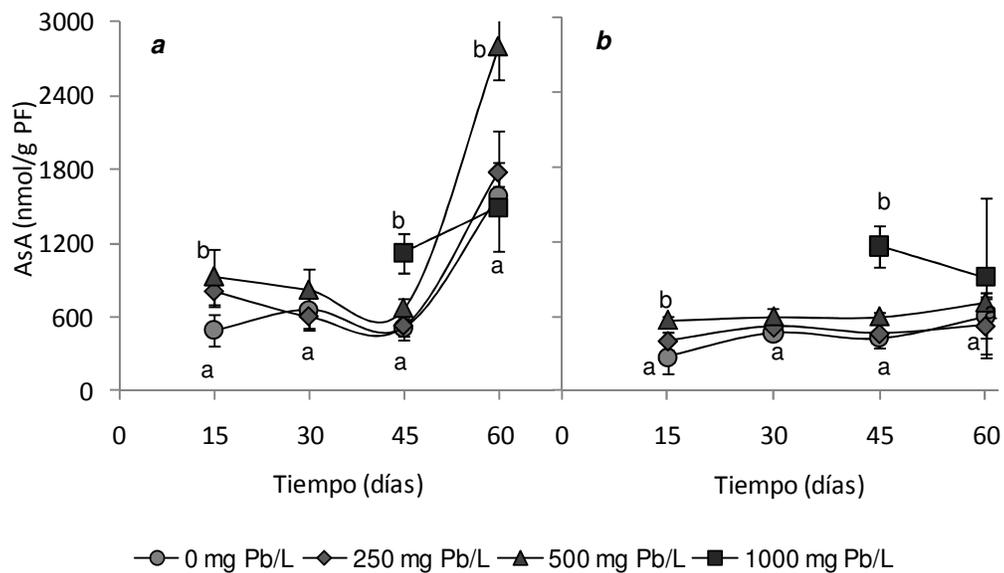


Figura 24. Concentración de AsA durante 60 d, en tallos (a) y raíces (b) de *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de Pb. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En cuanto a las raíces, no se observaron diferencias significativas por efecto del plomo en ninguna concentración utilizada con respecto a las plantas testigo, con excepción de las plantas crecidas con 1000 mg Pb/L, en donde se registró un ligero aumento en la concentración de AsA. Asimismo, nuestros resultados mostraron que la concentración de AsA en tallos fue significativamente mayor que en raíces de *A. farnesiana*, lo que corrobora el hecho de que este ácido se localiza principalmente en tejidos fotosintéticos (Noctor y Foyer, 1998). Por otra parte, el incremento en la producción de AsA en las plantas sometidas a altas concentraciones de Pb se podría explicar debido a que este metabolito antioxidante está reaccionando directamente con la eliminación de ERO producidas bajo condiciones de estrés

abi6tico, el cual, en este caso, pudo generarse por la presencia de altas concentraciones de plomo en el medio (Drazkiewicz *et al.*, 2003).

La relaci6n entre el AsA y el DHA es importante debido a que es esencial para la eliminaci6n de las ERO en la c6lula. En general se sabe que se debe mantener una relaci6n alta entre el AsA y el DHA (Mittler, 2002). Tambi6n se ha sugerido que una relaci6n oxidado:reducido de las diferentes mol6culas antioxidantes pueden servir como se1al de modulaci6n de los mecanismos antioxidantes. (Mittler, 2002). Con el objeto de conocer el estado redox celular se calcul6 la relaci6n DHA/AsA para *A. farnesiana* crecida con diferentes concentraciones de plomo (Figura 25). En el caso de los tallos de plantas incubadas con 250 mg Pb/L, la relaci6n DHA/AsA a los 30 d1as disminuy6 significativamente (1.5 veces) con respecto al control, mientras que para el resto de la cin6tica, el valor de la relaci6n se mantuvo similar al control. Los valores de la relaci6n DHA/AsA obtenidos para los tallos, indican que las c6lulas de esta especie son capaces de mantener el balance redox celular mediante el incremento en la s1ntesis de AsA, pues este antioxidante puede participar de manera enzimática y no enzimática en la eliminaci6n de H₂O₂ (Sminorff, 1996).

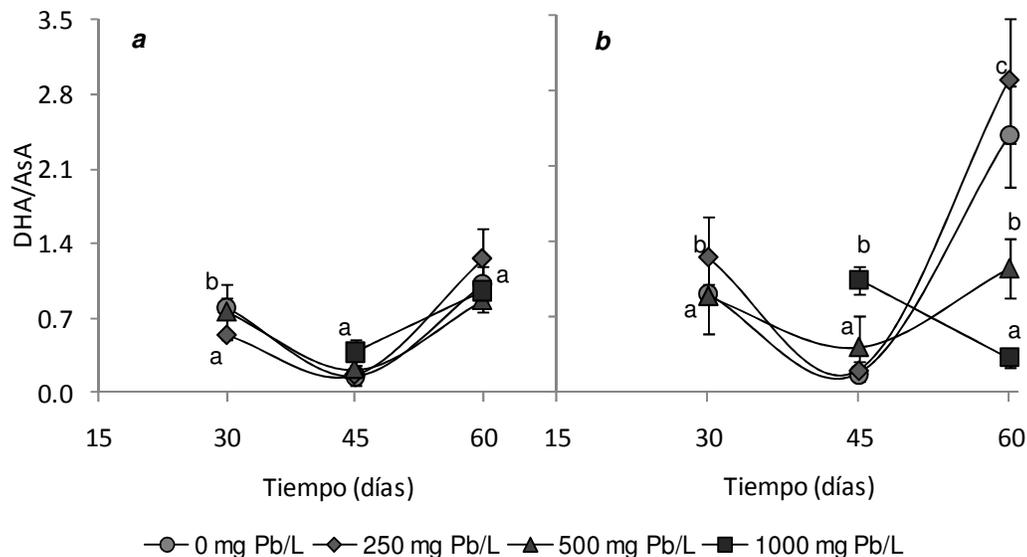


Figura 25. Relaci6n DHA/AsA durante 60 d1as, en tallos (a) y ra1ces (b) de *A. farnesiana* expuesta a diferentes concentraciones de Pb. Valores con la misma letra en cada tiempo de muestreo no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En general, los valores de la relaci6n DHA/AsA fueron mayores en las ra1ces que en los tallos; este resultado puede deberse a que las ra1ces son el primer contacto que la planta

tiene con el medio de cultivo contaminado. En el caso de las plantas crecidas en 250 mg Pb/L, la relaci3n DHA/AsA no mostr3 ninguna diferencia significativa con respecto al control durante todo el experimento. En cambio, las ra3ces de las plantas crecidas con 500 y 1000 mg Pb/L, a los 60 d3as mostraron una disminuci3n (2 y 7 veces, respectivamente) significativa con respecto al control. Lo anterior sugiere que en las ra3ces de *A. farnesiana* hubo un incremento en la s3ntesis de AsA, favoreciendo as3 un estado celular reductor, lo que le confiere a *A. farnesiana* la capacidad para ser una especie tolerante a Pb.

8 CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

A. farnesiana es una especie que, en condiciones *in vitro*, puede crecer en concentraciones de hasta 500 mg Pb/L sin presentar efectos fitotóxicos visibles. Aunque las raíces de las plantas crecidas en presencia del metal (≤ 500 mg Pb/L) fueron más gruesas y oscuras que las plantas crecidas en su ausencia, no se registraron cambios significativos en el peso y longitud. Con base en lo anterior, se estimó que la concentración crítica de plomo para esta especie es de 765 mg Pb/L.

Las raíces de *A. farnesiana* acumularon entre 15 y 70 veces más plomo que los tallos, encontrando concentraciones de 1000 - 50000 mg Pb/kg raíz (peso seco), dependiendo de la concentración inicial en el medio. Estos resultados indican que, bajo las condiciones estudiadas, la planta tiene potencial para fitoestabilizar Pb en sus raíces, ya que los factores de translocación encontrados fueron muy bajos (0.01 – 0.06).

Concentraciones de hasta 500 mg Pb/L no provocaron estrés oxidativo, cuantificado a través de la lipoperoxidación, en las raíces ni tallos de *A. farnesiana*. Sin embargo, como se observaron cambios morfológicos bajo tales condiciones, es recomendable cuantificar el estrés oxidativo utilizando otro indicador, como proteínas oxidadas.

El aumento en la actividad GST por efecto de todas las concentraciones de Pb evaluadas, así como en la actividad de GR en tallos y raíces de plantas crecidas con 1000 mg Pb/L durante los primeros días de experimentación, sugieren que el glutatión participa de manera importante como antioxidante durante la detoxificación de ERO generadas por efecto del Pb en *A. farnesiana*, o bien, que dicho péptido puede ser utilizado para la síntesis de fitoquelatinas. Con base en lo anterior, resulta interesante continuar estudiando el papel del glutatión como parte del mecanismo de tolerancia y detoxificación de Pb por esta especie.

El incremento en las concentraciones de AsA y GSH en *A. farnesiana* crecida bajo condiciones de estrés por Pb indican su participación directa en la eliminación de ERO.

9 RECOMENDACIONES

9. RECOMENDACIONES

- Para saber si los exudados radiculares actúan en la solubilización y por lo tanto en la acumulación de Pb en la planta, es necesario realizar estudios en los que se cuantifique la producción de ácidos orgánicos y polifenoles, pues se sabe que este tipo de compuestos son algunos de los que participan en la solubilización de los metales pesados en el suelo.
- Como otro parámetro indicador de estrés oxidativo en *A. farnesiana* es necesario determinar el efecto del Pb sobre la oxidación de proteínas.
- Para conocer otros mecanismos de tolerancia y detoxificación de Pb en *A. farnesiana*, es recomendable determinar el efecto del Pb en la producción de fitoquelatinas (FQ) y metalotioneínas (MT).
- Es recomendable conocer los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia y detoxificación de Pb en *A. farnesiana*, por lo que es conveniente conocer los grupos de proteínas que llevan a cabo estos procesos.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology Biochemistry*, 43: 107–116.
- Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer CH, Mullineaux PM (ed) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, CRC Press, Boca Raton, pp. 77-104.
- Audet P., Charest C. 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution*, 147: 231-237.
- Baker, W.G. 1972. Toxicity levels of mercury, lead, copper and zinc in tissue culture systems of cauliflower lettuce, potato and carrot. *Canadian Journal of Botany*, 50:973–976.
- Baker A.J.M., Reeves R.D. y Hajar A.S.M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J & C. Presl (*Brassicaceae*). *New Phytologist*, 127: 61-68.
- Barcel3 J., Poschenrieder C. 2002. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 75–92.
- Blokhina, O., E. Virolainen, K.V. Fagerstedt. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chaparzadeh, N., D'Amico, M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R., Izzo, F.N., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology Biochemistry*, 42, 695–701.
- Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. 2001. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology Biochemistry*, 39: 657–664.
- Davey, M.W., M. van Montagu, D. Inz3, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnov, I.JJ Benzie, J.J Strain, D. Favell y J. Fletcher. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.
- Davies B.E. 1995. Lead. En: Alloway BJ (ed). Heavy metals in soils. *Blackie Academic*, London, 206–223 pp.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Randall, P.J. 1993. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices). *Plant Physiology*, 103: 695–702.

- Deng, H., Ye, H.Z., Wong, H.M. 2004 Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution*, 132: 29-40.
- Dinkelaker, B., Romheld, V., Marschner, H. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell and Environment*, 12: 285–292.
- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z. 2003. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 164: 195-202.
- Edwards, R., Dixon, D. P. 2000. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism, in: A.H. Cobb, R.C. Kirkwood (Eds.), *Herbicides and Their Mechanisms of Action*, Sheffield Academic Press, pp. 38–71.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407-421.
- Forman, H.J., Zhang, A., Rinna, H. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 1–12.
- Foyer CH., Noctor G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146: 359-388.
- Francis, J.K. 2002. Species descriptions: *Acacia farnesiana* L. (Willd). International Institute of Tropical Forestry, USDA Forest Service. 247-249.
- Gajewska, E., Sklodowska, M., Słaba, M., Mazur, J. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50: 653-659.
- Gechev, T.S., F. van Breusegem, J.M. Stone, I. Denev y C. Laloi. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28: 1091-1101.
- Gratão, P., A. Polle, P.J. Lea y R.A. Azevedo. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32: 481-494.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 106: 207–212.
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 106: 262-267.
- Hewitt, E. J. 1953. Metal inter-relationships in plant nutrition. *Journal of Experimental Botany*, 4: 59-64.
- Huang, C. V., Bazzaz, F. A., Venderhoef, L. N. 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiology*, 34: 122–124.
- Igamberdiev, A., U., Byrkova, N., V., Kleczkowski, L., A. 1999. Origins and metabolism of formate in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37: 503-513.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2007. La Minería en México. 146 pp.
- Jarvis, M. D., Leung, D. W. M. 2002. Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Journal of Experimental Botany*, 48: 21–32.
- Jones, D.L., Darrah, P.R., 1995. Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere flow. *Plant and Soil*, 173: 103–109.
- Kn3rzer O.C., Durner J., B3ger P.1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 97: 388–396.
- Kucera T., Horakova H., Sonska A. 2008. Toxic metal ions in photoautotrophic organisms. *Photosynthetica*, 46(4): 481-489.
- Lascano H.R., Casano L.M., Melchiorre M.N., Trippi V.S. 2001. Biochemical and molecular characterization of wheat chloroplast glutathione reductase. *Biologia Plantarum*, 44 (4): 509-516.
- Liu D., Li TQ., Jin XF., Yang XE., Islam E., Mahmood Q. 2008 Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (2): 129-140.
- Mattina M. I., Lannucci-Berger W., Musante C., White J. C. 2003. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution*, 124: 375-378.
- Mattson M. P. 2008. Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7: 1–7.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., Gupta, D. K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65: 1027–1039.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F., V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498.
- M3ller, I., M. Jensen, P., E. Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459-481.
- Nabors, M.W. 2005. La ra3z, el tallo y las hojas: el cuerpo vegetal primario. En: Introducci3n a la bot3nica. Ed. Pearson. Espa3a. 712 pp.
- Nagalakshmi N., Prasad M.N.V. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, 160: 291-299.
- Navarro-Avi3o, J. P., Aguilar-Alonso, I., L3pez-Moya, J. R.2007. Aspectos bioqu3micos y gen3ticos de la tolerancia y acumulaci3n de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16: 10-25.

- Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L. 1994. Heat shock proteins induce heavy metal tolerance in higher plants, *Planta*, 194: 360-336.
- Noctor G., Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Organizaci3n Panamericana de la Salud – Organizaci3n Mundial de la Salud (OPS/OMS). 1980. Principios y m3todos para evaluar la toxicidad de las sustancias qu3micas. <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/004415/04415-08.pdf>.
- Padmavathiamma PK., Li LY. 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation of metals in plants. *Water Air Soil Pollution*, 184: 105–126.
- Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L., Gomez E., Tiemann K.J., Parsons J.G., Carrillo G. 2002. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*, 119: 291–301.
- Razinger, J., Dermastia, M., Drinovec, L., Drobne, D., Zrimec, A., Koce, J. D. 2007. Antioxidative Responses of Duckweed (*Lemna minor* L.) to Short-Term Copper Exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 14: 194 - 201.
- Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., Sudhakar, C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60: 97–104
- Rouhier, N., S.D. Lemaire y J.P. Jacquot. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annual Review of Plant Biology*, 59:143-66.
- Salas-Salmeron, F. K. 2007. Selecci3n *in vitro* de plantas tolerantes a plomo para su uso en fitorremediaci3n. *Tesis Especialidad Biotecnolog3a*. UAM-Iztapalapa. 37 pp.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101: 7-12.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots, *Plant Physiology*, 127: 887-889.
- Semane, B., Cuyper, A., Smeets, K., Belleghem, F., V., Horemans., N., Schat, H., Vangronsveld, J. 2007. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum*, 129: 519–528.
- Sengar R.S., Gautam M., Sengar R.S., Garg SK., Sengar K., Chaudhary R. 2008. Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196: 73-93.
- Seregin IV., Shpigun LK., Ivaniov VB. 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51(4): 525-533.
- Seth C.S, Chaturvedi P.K., Misra V. 2008. The role of phytochelatin and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 76–85.

- Sharma P., Dubey R.S. 2005. Lead toxicity in plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 35-52.
- Smirnoff, N.1996. Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78: 661-669.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A. 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175: 408-413.
- Solis-Ibarra, A. 2007. Evaluación de especies vegetales tolerantes y/o hiperacumuladoras para su potencial uso en fitorremediación de suelos. Informe servicio social. UAM-Xochimilco. Departamento el hombre y su ambiente. 36 pp.
- Teisseire, H., Guy, V. 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*, 153: 65-72.
- Uren, N.C., Reisenauer, H.M. 1988. The role of root exudates in nutrient acquisition. *Advances in Plant Nutrition*, 3: 79-114.
- Verma S., Dubey R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655.
- Wang, C., X. Wang, Y. Tian, Y. Xue, X. Xu, Y. Sui, H. Yu. 2008. Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 685-691.
- Wierzbicka M. 1998. Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. root tips—ultrastructural studies. *Plant Science*, 133(1): 105-119.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205: 1-18.
- Zhen-Guo, S., Xian-Dong, L., Chun-Chun, W., Huai-Man, Ch., Hong, Ch. 2002. Lead phyto remediation from contaminated soil with high-biomass plant species. *Journal of Environmental Quality*, 31: 1893-1900.