



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EFFECTOS DEL BORO EN EL PERFIL PROTEÍNICÓ
DE *Lemna gibba* L.

TESIS

QUE PRESENTA LA

BIOL. EXP. MAYRA LUZ SÁNCHEZ VILLAVICENCIO

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Cotutora:

Dra. María Guadalupe Miranda Arce

Cotutor:

Dr. Humberto González Márquez

Asesora:

Dra. Patricia Ramírez Romero

Asesora:

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Asesor:

Dr. Agustín De Jesús Quíroz Flores

México, D.F.

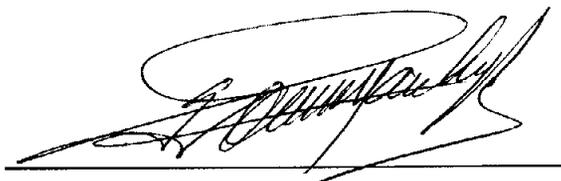
DICIEMBRE 2003

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 8 de diciembre del 2003.



Dra. Ma. Guadalupe Miranda Arce

Presidente



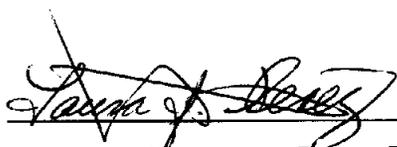
Dr. Humberto González Márquez

Secretario



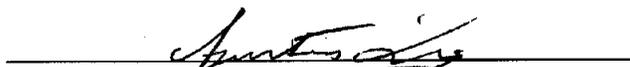
Dra. Patricia Ramírez Romero

Vocal



Dra. Laura Pérez Flores

Vocal



Dr. Agustín Quiroz Flores

Vocal

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracia a la beca-crédito otorgada por el CONACYT con número 162614.

EFFECTOS DEL BORO EN EL PERFIL PROTEÍNICÓ DE *Lemna gibba* L.

TESIS QUE PRESENTA LA

BIOL. EXP. MAYRA LUZ SÁNCHEZ VILLAVICENCIO

Para optar por el grado de

Maestra en Biología Experimental

Cotutora

Dra. MARÍA GUADALUPE MIRANDA ARCE

Cotutor

Dr. HUMBERTO GONZÁLEZ MARQUEZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

COMITÉ TUTORAL

Co-tutora

Dra. María Guadalupe Miranda Arce
Departamento de Hidrobiología
UAM-I

wendy@xanum.uam.mx

Co-tutor

Dr. Humberto González Márquez
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

hgm@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Patricia Ramírez Romero
Departamento de Hidrobiología
UAM-I

patt@xanum.uam.mx

Asesora

Dra. Laura Josefina Pérez Flores
Departamento de Ciencias de la Salud
UAM-I

ljpf@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Agustín De Jesús Quíroz Flores
Departamento de Ecología Funcional
UNAM

qfaj@servidor.unam.mx

Agradecimientos

Agradezco a mis padres y hermanos por todo el amor y apoyo que me dieron durante la realización de este trabajo.

A la Dra. María Guadalupe Miranda por su gran amistad, paciencia y apoyo no sólo en el trabajo sino también en los momentos difíciles.

Al Dr. Humberto González Márquez por su excelente asesoría, sus enseñanzas, sus regaños y su inigualable amistad.

A la Dra. Patricia Ramírez Romero por su amistad, por escucharme en los momentos difíciles y por orientarme en este trabajo.

A la Dra. Laura Pérez Flores por su excelente asesoría durante todo el trayecto de mi trabajo.

Al Dr. Agustín Quíroz Flores por su excelente asesoría, que aunque, un poco de lejos fue de gran apoyo.

A todas las chicas del Laboratorio de Contaminación y Bioensayos por sus sugerencias, ideas y buenas críticas para mi trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Expresión Génica por la ayuda brindada para la realización de mi trabajo.

A mis amigos del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal por su ayuda, paciencia y por las super reuniones.

Al Dr. Edmundo Bonilla González por su apoyo en cuanto a material de laboratorio e información bibliográfica, por su amistad y las palomitas.

A mi madre con todo mi amor

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxiribonucleico

APS: Persulfato de amonio

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Acido ribonucleico mensajero

ATP: Trifosfato de adenosina

ATSDR: Toxicological Profile for Boron

CHAPS: 3-3-colamidopropil dimetil amonio

DTT: Dithiothreitol

EC₅₀: Concentración efectiva media

EPA: Environmental Protection Agency, USA.

HRGPs (proteínas ricas en hidroxiprolina)

HSF: Factor de choque térmico

Hsp: Proteína de choque térmico

IEF: Isoelectroenfoque

IPCS: International Programme on Chemical Safety

Mr: Masa molecular relativa

NAD⁺: Nicotina adenina dinucleótido

pI: punto isoeléctrico

p/v: peso a volumen

RE: Retículo endoplásmico

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

sHsps: proteínas de choque térmico de bajo peso molecular

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina

Tris: □-□-□, trishidroximetil amino metano

□E/m²/s: Micro Einsten/metros cuadrados/segundos

v/v: volumen a volumen

Índice

<i>Agradecimientos</i>	1
<i>Abreviaturas</i>	2
<i>Índice</i>	3
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Macrofitas acuáticas y boro	6
1.2. Forma química del boro.....	7
1.3. Fuentes de boro	8
1.4. Boro en suelo y agua.....	9
1.5. Funciones del boro en plantas vasculares.....	11
1.6. Toxicidad del boro en plantas	13
1.7. Contaminación y respuesta al estrés	17
1.8. Proteínas de estrés como biomarcadores ambientales.....	23
1.9. <i>Lemna gibba</i> L. como modelo de monitoreo y biodepuración de contaminantes.....	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. OBJETIVO GENERAL	28
4. OBJETIVOS PARTICULARES	28
5. HIPÓTESIS	29
6. METODOLOGÍA	30
6.1. Material Biológico.....	30
6.2. Curvas de Crecimiento.....	30
6.3. Inhibición del crecimiento	30
6.4. Determinación de la Concentración efectiva media (EC ₅₀)	31
6.5. Cuantificación de clorofilas totales (Arnon, 1949).....	32
6.6. Extracción de las proteínas del tejido vegetal (López y Palton, 1991).....	32

6.7.	Precipitación de las proteínas y preparación de la muestra	33
6.8.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970)	33
6.9.	Electroforesis bidimensional en gel poliacrilamida (O'Farrell, 1975; O'Farrell y cols., 1977)	34
6.10.	Análisis de electroferogramas.....	35
6.11.	Marcaje radioactivo (Ferreira y cols., 1996)	35
6.12.	Las autoradiografías de los geles secos se realizaron usando dos métodos.	35
7.	RESULTADOS	36
7.1.	En medio AAP 20X.....	36
7.2.	Medio Hoagland.....	36
7.3.	Tasa de crecimiento en plantas expuestas a boro	38
7.4.	Determinación de la Concentración Efectiva Media (EC_{50}).....	40
7.5.	Cuantificación de clorofilas totales.....	43
7.6.	Extracción de proteínas del tejido vegetal.....	44
7.7.	Separación de proteínas en electroforesis monodimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS).....	45
7.8.	Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS 2-D)	47
7.9.	Marcaje y autoradiografía.....	50
8.	DISCUSIÓN	52
8.1.	Crecimiento en medio AAP 20X	52
8.2.	Crecimiento en medio HOAGLAND	52
8.3.	Relación entre la biomasa y velocidad de crecimiento de la concentración efectiva media ($EC_{b50/r50}$)	53
8.4.	Contenido de clorofila total	54
8.5.	Extracción de proteínas del tejido vegetal.....	54
8.6.	Electroforesis monodimensional de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)....	56

8.7. Marcaje y autoradiografía de proteínas recién sintetizadas.....	56
9. <i>CONCLUSIONES</i>	57
10. <i>REFERENCIAS</i>	59
11. <i>ANEXOS</i>	70

1. INTRODUCCIÓN

El boro es un micronutriente esencial para las plantas necesario para la división celular, la síntesis de la pared celular, la translocación de azúcares, la síntesis proteínica y también para las funciones de las membranas. Sin embargo, en concentraciones elevadas puede limitar su crecimiento y alterar su metabolismo general debido a que el nivel mínimo de boro que satisface el requerimiento esencial del mismo no está muy alejado de su umbral de toxicidad (Gupta y cols., 1985).

La fitotoxicidad asociada al boro puede manifestarse por exposiciones a suelos con elevados contenidos de sales de borato, a una fertilización excesiva con minerales de boro, a irrigación con agua de alta concentración de boro y a la reutilización de líquidos residuales provenientes de industrias que utilizan boratos para sus productos. La absorción del boro esta asociada al pH (pH 7), al contenido de materia orgánica, al intercambio iónico, a la humedad, la temperatura y la textura del suelo. Todos estos factores establecen un equilibrio entre el boro absorbido y el boro en disolución.

Una de las fuentes principales de boro es el agua de irrigación. El boro aplicado a través de esta fuente tarda un tiempo considerable en alcanzar el equilibrio, por lo que durante los primeros años de irrigación, la concentración de boro en agua y suelo es relativamente baja.

Los síntomas de toxicidad al boro en plantas se manifiesta con una clorosis, seguida por necrosis en los bordes de las hojas. Por lo tanto, el análisis foliar es utilizado para el diagnóstico de fitotoxicidad. Se ha reportado que el máximo de boro tolerado por algunos cultivos es de hasta 100 ppm (Mass, 1984).

1.1. *Macrofitas acuáticas y boro*

Las plantas vasculares acuáticas también llamadas macrofitas han sido utilizadas para remover distintos compuestos tóxicos del agua, como son el Cu, Cr, Pb. (Rodgers y cols., 1978; Benda y Kouba, 1991). Entre estas plantas destacan las pertenecientes a

la familia Lemnaceae por ser de fácil cosecha ya que llegan a medir de 1.5 a 2.5 cm y crecen sólo sobre la superficie del agua.

Pertenece a esta familia tenemos a *Lemna gibba* L., es un excelente modelo experimental debido a que su manejo es fácil, se encuentra ampliamente distribuida en México, es de alta productividad, tolerante a condiciones naturales adversas, fácil cosecha y tiene un ciclo de vida corto. Es un organismo utilizado muy frecuentemente para pruebas de toxicidad en el monitoreo de ecosistemas acuáticos, y se ha llegado a considerar un indicador ecotoxicológico (Wang, 1990).

Entre los biomarcadores ambientales destacan las proteínas de estrés ya que cumplen con las características que permiten realizar estudios específicos de organismos expuestos directamente a gran número de contaminantes. Las proteínas de estrés forman parte de la respuesta celular de protección, su síntesis es inducida por la presencia de un gran número de químicos y se encuentran presentes desde bacterias hasta plantas y animales superiores. No se han reportado estudios sobre las proteínas específicas que *L. gibba* expresa en respuesta a la presencia de boro.

Es por eso que el presente estudio describe los patrones electroforéticos monodimensionales y bidimensionales de las proteínas solubles totales de *L. gibba* L. en ausencia y presencia de boro. Los resultados indican cambios en la expresión proteínica de *Lemna gibba* L. en respuesta al estrés provocado por boro. Contribuyendo al estudio proteómico de *L. gibba*. De este modo es posible resolver, cuantificar (densitometría, PhosphorImager) y caracterizar (pI y Mr), una amplia variedad de proteínas debido al estrés químico.

1.2. Forma química del boro

El boro es un metaloide que se encuentra en el grupo IIIB, su número atómico es 5, por lo que posee 5 protones/electrones y 6 neutrones. Los números de oxidación con los que trabaja van de -3 a $+3$ y su electronegatividad le permite formar enlaces fundamentalmente covalentes. El boro acepta pares electrónicos de otros átomos, esto se manifiesta en la formación de complejos con número de coordinación 4, especialmente en los trihalogenuros y compuestos con oxígeno o nitrógeno. En otros compuestos, el átomo de boro recibe un par electrónico por coordinación y aumenta

en dos sus seis electrones de tres enlaces covalentes para completar su octeto electrónico (Huheey, 1978).

Por su estado de oxidación, el boro posee una conducta semejante a la de un metal como el aluminio, es decir, forma estructuras con alto grado de carácter covalente como B_2O_2 y $B(OH)_3$. El boro, participa también en la parte negativa o aniónica de algunas sales dando ácidos como el bórico y sales de tipo borato. En la formación de compuestos catiónicos, el boro actúa como átomo central positivo.

El ácido bórico es un ácido débil que en solución acuosa a pH menor de 7 se encuentra no disociado, a pH mayor, éste acepta iones hidroxilo del agua y se forma un anión de borato tetraédrico similar a las sales de borato (Ecuación 1) (Bargalló, 1972).



1.3. Fuentes de boro

El boro se encuentra en diversos minerales de la corteza terrestre, siendo el más abundante el borosilicato de aluminio conocido como turmalina. Una de las principales fuentes de boro proviene de las emanaciones volcánicas. En sedimentos de rocas volcánicas el boro se encuentra como borosilicato, y es poco disponible para las plantas, en esta forma el boro puede moverse fácilmente por lixiviación. La especie dominante de boro en el suelo es el ácido bórico (H_3BO_3) y en esta forma es tomado por las plantas (Chesworth, 1991; Nable y cols., 1997).

El boro no se encuentra libre en la naturaleza, como se menciono anteriormente el boro se encuentra combinado en forma de ácido bórico (H_3BO_3), en aguas minerales de zonas volcánicas y como boratos en bórax, kernita, ulexita o boronatocalcita, colemanita o boracita (Jiménez y cols., 1997).

Su incorporación al agua resulta en gran medida de la meteorización de rocas ígneas y sedimentarias, a este aporte natural se suman las actividades antropogénicas. Esta última parte está constituida por la presencia de boro en líquidos residuales domésticos y de aguas industriales, que provienen de productos de limpieza como el

borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) el ácido bórico (H_3BO_3) y de su utilización en diversas ramas de la industria. Otra parte la conforma el escurrimiento superficial de aguas pluviales en áreas agrícolas donde se aplican sustancias agroquímicas que contienen boro (Larsen, 1988; ATSDR, 1992; Anderson y cols., 1994). La fuente principal de exposición a boro en poblaciones humanas es la ingestión proveniente de frutos y vegetales (Anderson y cols., 1994).

El agua de riego es una de las fuentes potenciales en el aumento de la concentración de boro en suelo y agua. Regularmente éste se encuentra en concentraciones altas cuando está en asociación con suelos y aguas salinas (Chauhan y Powar, 1978; Dchankhar y Dahiya, 1980)

1.4. Boro en suelo y agua

Las concentraciones de boro en rocas y suelos son muy variadas, se pueden encontrar menores valores menores a 10 ppm, y mayores a 100 ppm en esquistos y suelos salinos (Sprague, 1972). Las referencias sobre la ocurrencia mundial de boro en agua dulce superficial indican concentraciones con un rango de 1 a 7 ppm. Sin embargo, se han reportado niveles de hasta 26 ppm en diversos cuerpos de agua en áreas con depósitos ricos en boro de Sudamérica; y de hasta 360 ppm en Norteamérica (IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1998). En los ambientes acuáticos el boro se encuentra en estado de oxidación +3, siendo el ácido bórico no disociado la forma preponderante (Sprague, 1972). En aguas oceánicas la concentración media de boro es de 4.5 ppm (Weast y cols., 1985). En cuanto al agua subterránea, la concentración de boro varía de 0.3 ppm a 120 ppm (IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1998). En el río Guachipas, Argentina se han reportado concentraciones de 10 ppm de boro, lo cual se atribuye a la geología natural (Lomniczi y cols., 1997). También se han observado alteraciones en aguas subterráneas y superficiales del Valle de Lerma y en Salta, Argentina como consecuencia de actividades antropogénicas, en donde se han elevado las concentraciones hasta 6.2 ppm, en agua subterránea y 50 ppm, en cuerpos de agua cercanos a éstos (Bundschuh, 1992).

La especiación química del boro depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre (ej. pH, temperatura, humedad) (ATSDR, 1992). Las concentraciones para aguas con diferentes usos se presentan en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Niveles guía de calidad del agua para boro (ppm) según la EPA

Uso	Concentración de Boro (ppm por día)
Agua de irrigación	0.50
Vida acuática agua dulce	
superficial	0.75
Ganado	5.0
Humano	1.0

EPA: (Environmental Protection Agency, USA)

En la Ciudad de México, los niveles de boro registrados más recientemente en agua, han sido de 2.06 ppm en el Gran Canal y de 2.96 ppm en el sistema central de alcantarillado (Jiménez y cols., 1997). En el agua de los canales de Xochimilco Duran (2000) reportó una concentración de 0.01 ppm de boro durante la primavera y el verano del 2000.

En estudios realizados en cuerpos de agua cercanos al volcán del Tacaná (Chiapas, Mex.) se encontró que las concentraciones de boro varían según la estación del año y el lugar de colecta desde 2.82 hasta 5.1 ppm (Armienta y De la Cruz-Reyna, 1995). Los principales ríos que se encuentran cercanos al volcán son el Suchiate y Cahuacán que riegan la costa fronteriza de Chiapas y cuyas aguas son utilizadas para la agricultura; el río Cuatán que riega plantíos importantes de la región de los altos de Chiapas como son mango Atahulfo y plátano (Sánchez, 2001)

En aguas de poblados cercanos al volcán Popocatepetl se reportan concentraciones de 1.3 a 5 ppm en aguas de áreas aledañas al volcán Chichón, Nevado de Toluca y Popocatepetl se reportan concentraciones desde 38 hasta 433 ppm (Armienta y cols., 2000; Armienta y cols., 2002)

1.5. Funciones del boro en plantas vasculares

El boro es un micronutriente esencial para las plantas vasculares, diatomeas y cianobacterias (Loomis y Durst, 1992). Interviene en el crecimiento de regiones meristemáticas de las plantas así como en el metabolismo fenólico y en el del ARN y muerte cuando se alcanzan niveles fitotóxicos. El boro también participa en otras funciones metabólicas como el transporte de azúcares, síntesis y estructura de la pared celular y metabolismo de carbohidratos (Bonner y Joseph, 1976).

El boro se une a carbohidratos de configuración *cis*-diol, con lo que se facilita su transporte a distancia. Además, el boro participa en procesos membranales, principalmente en la liberación y recuperación de protones. También puede interferir con las reacciones enzimáticas dependientes de manganeso. Asimismo, se le ha asociado a un efecto antitóxico ante la presencia de aluminio en las raíces de dicotiledoneas (Blevins y Lukaszewski, 1998).

La glucólisis y el ciclo oxidativo de los fosfatos de pentosa son las vías metabólicas que generan eritrosa 4-fosfato para la síntesis de fenoles. El ion borato al unirse al ácido glucurónico interviene indirectamente en la regulación del metabolismo de los fenoles (Figura 2.1) (Marschner, 1995).

El boro forma complejos con azúcares como el manitol, la manosa y el ácido polimanurónico (Figura 1.1). Compuestos que son constituyentes de la hemicelulosa de las paredes celulares (Marschner, 1995).

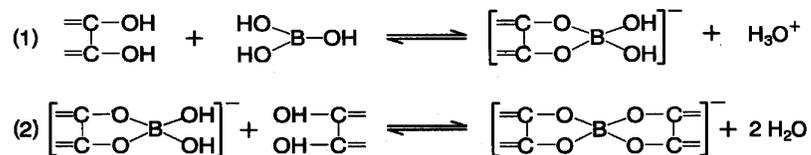


Figura 1.1 (1) complejos *cis*-diol, (2) complejos polioles, configuración que se necesita para la formación de los complejos borato-azúcar (Marschner, 1995).

Los complejos más estables del borato se forman con los *cis*-dioles que presentan anillos furanoides, como la apiosa y la ribosa, que después se convertirán en componentes universales de las paredes celulares de plantas vasculares (Loomis y

Durst, 1992). El boro no sólo forma complejos estables con la ribosa del ARN, sino también con la del NAD⁺ (Johnson y Smith, 1976). De acuerdo con Loomis y Durst (1992), la apiosa encontrada en las paredes celulares, puede ser la clave de la movilidad de los azúcares para que formen los entrecruzamientos de borato con polímeros de la pared celular mientras que la captación de boro por la ribosa de los ribonucleótidos podría ser la causa de la toxicidad del boro (Blevins y Lukaszewski, 1998). Otros candidatos para los entrecruzamientos de borato en paredes celulares primarias son proteínas ricas en prolina como la extensina. Se ha observado que las paredes celulares de nódulos de raíz deficientes de boro contienen bajos niveles de HRGPs, comparados con nódulos que tienen niveles suficientes de boro (Bonilla y cols., 1990).

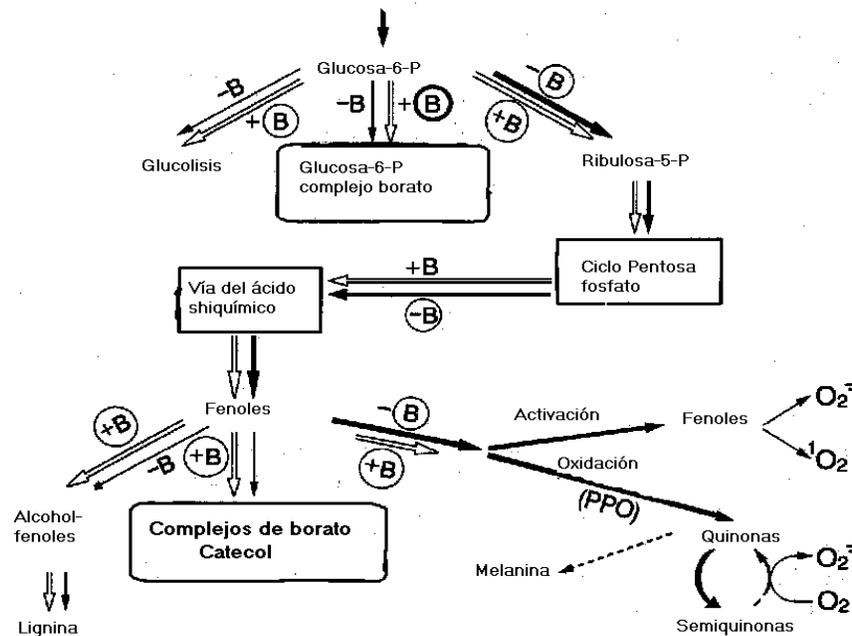


Figura 2.1 Efecto del boro las vías de glucólisis, pentosas fosfato y metabolismo de fenoles (Modificado de Marschner, 1995).

De acuerdo a la figura 2.1, la acumulación de fenoles se promoverá cuando las plantas esten deficientes de boro, cuando hay deficiencia (-B) o exceso de boro (circulo más obscuro) y éste parte de una molécula de glucosa 6-P se promueve la formación de complejos borato.

El ciclo oxidativo de las pentosas fosfato y la glucólisis incrementan los niveles de eritrosa fosfato el cual es precursor en la biosíntesis de fenoles. La formación de complejos de borato con fenoles probablemente está involucrado en la regulación de los niveles de éstos y en la velocidad de la síntesis de fenoles alcohólicos como precursores de la biosíntesis de lignina (Pilbeam y Kirkby, 1983). La acumulación de fenoles promueve la actividad de polifenol oxidasa lo que conduce a intermediarios altamente reactivos como la quinona cafeína en las paredes celulares. Estas quinonas son muy efectivas en la producción de radicales superóxido.

La absorción del boro en las plantas vasculares se realiza a través de las raíces y se acumula en los puntos de crecimiento de hojas y tallos (Blevins y Lukaszewski, 1998). Se ha reportado que existe una relación entre la disponibilidad de boro y la fijación de nitrógeno en cianobacterias (Bonilla y cols., 1990). Probablemente el participa inhibiendo la difusión de oxígeno y por lo tanto evitando la oxidación de la nitrogenasa (García-González y cols., 1991). Por otro lado, el mismo grupo ha observado que la deficiencia de boro provoca la expresión de una proteína de 116 kDa identificada como perteneciente a la familia de las HRGPs (proteínas ricas en hidroxiprolina) y cambios anatómicos en los nódulos de *Phaseolus vulgaris* L (Bonilla y cols., 1997).

Durante la síntesis de la pared celular el boro se requiere para la formación de entrecruzamientos borato-ésteres. Estos entrecruzamientos son relativamente débiles y por lo tanto desempeñan una función de rompimiento y reconstrucción durante la elongación celular dando cargas negativas para las interacciones aniónicas como por ejemplo con Ca^{+2} , (Ramón y cols., 1990; Loomis y Durst, 1992). Sin embargo, comparado con el calcio, el boro se une menos firmemente a la matriz de la pared celular y, probablemente, esto produce sitios separados de unión para el boro y el calcio (Teasdale y Richards, 1990).

1.6. Toxicidad del boro en plantas

La fitotoxicidad asociada al boro puede manifestarse por exposiciones a suelos con altos niveles de las especies químicas biodisponibles, o bien a una fertilización excesiva con minerales de boro. El riego prolongado con aguas ricas en boratos y ácido bórico, así como la reutilización de líquidos residuales provenientes de la

industria y productos químicos utilizados en la agricultura producirán un aumento de boro en el suelo y agua hasta que las concentraciones de éste se tornen tóxicas (Nable y cols., 1997).

En agua de riego las concentraciones de boro menores de 0.70 ppm, son adecuadas para la mayoría de las plantas, sin embargo, los valores comprendidos entre 1.0 y 4.0 ppm producen necrosis celular por lo que no se recomienda su uso para riego (Martínez y cols., 1999).

Otras fuentes con elevados niveles de boro pueden ser los suelos derivados de sedimentos marinos, suelos de regiones áridas o semiáridas o suelos derivados de una roca madre rica en boro encontrándose en solución como ácido bórico o como bórax (Camacho y cols., 2003). El boro tiene una movilidad muy elevada en el suelo, lixiviando fácilmente (Gupta y cols., 1985).

Los cultivos pueden clasificarse de acuerdo a la concentración máxima permitida de boro en agua de riego (0.75 ppm), en tres categorías por orden de tolerancia creciente:

- a) Cultivos sensibles (0.30-1.0 ppm): manzano, cerezo, limón, naranjo, pera, melocotón, aguacate, olmo albaricoquero, higuera, vid, ciruelo y chicharo.
- b) Cultivos semitolerantes (1.0-2.05 ppm): cebada, alfalfa, repollo, zanahoria, lechuga, cebolla, papa, calabaza, espinaca, tabaco, olivo, rosal, tomate y trigo.
- c) Cultivos tolerantes (2.05-4.0 ppm): espárrago, arándano, algodón, pepino, gladiolo, sésamo, tulipán, remolacha, haba, pasto, menta y centeno

Las plantas con tolerancia a boro lo acumulan a una velocidad baja mientras que las plantas sensibles lo hacen muy rápidamente. La tolerancia al boro en plantas también puede ser causada por las distintas proporciones de acumulación de boro en hojas y no por las diferencias de sensibilidad en ellas. Por lo tanto, para establecer la diferencia de tolerancia entre una planta y otra se toma como referencia el tiempo de acumulación (Camacho y cols., 2003).

A pesar de que existen numerosos estudios sobre efectos asociados tanto a la deficiencia de boro como a su toxicidad, las técnicas analíticas utilizadas para expresar las concentraciones de boro relacionadas con tales efectos son diversas. Dos

de las técnicas más utilizadas son la del boro soluble en agua caliente y el boro en extracto de saturación (Gupta y cols., 1985). Los resultados obtenidos con las técnicas indicadas en el párrafo anterior, expresarían directamente el nivel de boro disponible para la planta. Los estudios de fitotoxicidad se han hecho en plantas de limón, naranja, avena, maíz, trigo y cebada; en donde se observó necrosis tanto en los márgenes como en los extremos de las hojas que posteriormente las llevan a la muerte (Mass, 1984). Con estos estudios se han establecido categorías para cultivos en relación a su tolerancia al boro (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Niveles de tolerancia a boro.

Categoría cultivo	Concentración máxima de boro (ppm)
Muy sensible	< 0.5
Sensible	0.5-1
Moderadamente sensible	1-2
Moderadamente tolerante	2-4
Tolerante	4-6
Muy tolerante	6

Establecidos a partir de los estudios realizados por Mass (1984)
Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente
correspondientes a Boro.

Como se mencionó anteriormente, el agua residual que se utiliza para riego contribuye a la toxicidad. Por ello, cultivos sensibles a boro que en un principio crecen regularmente, luego de períodos prolongados de irrigación manifiestan efectos tóxicos, ya que esto incrementa la concentración de boro en suelo y/o agua (Francois, 1984; Mass, 1984).

La textura del suelo es también un factor importante a considerar. Los suelos con textura ligera contienen en general mayores cantidades de boro soluble que los suelos de textura gruesa debido a que en éstos el boro es adsorbido por la arcilla, quedando restringida la lixiviación. Las condiciones climáticas pueden tener relación con la tolerancia al boro, pero los efectos no son los mismos en todos los cultivos, sino que

unos acumulan más boro en condiciones de altas temperaturas y climas secos y otros lo hacen a temperaturas bajas y precipitaciones abundantes (Camacho y cols., 2003). El boro es absorbido por flujo de masas a través de las raíces de las plantas bajo la forma de ácido bórico no disociado, sigue el flujo de la transpiración y es transportado únicamente en el xilema, ya que es en gran parte inmóvil en el floema (Domínguez, 1988).

El contenido de boro en las plantas varía según la especie, la edad y los órganos analizados, de tal manera que los síntomas de toxicidad generalmente aparecerán por encima de 200 ppm. Estos síntomas coinciden en la mayoría de los cultivos con la necrosis progresiva de las hojas que comienza con una clorosis de los bordes de las hojas que progresa entre los nervios laterales hacia los nervios centrales. Las monocotiledóneas muestran necrosis en las puntas, mientras que en las dicotiledóneas la necrosis es tanto marginal como apical. Existen excepciones, como la cebada, en donde la necrosis aparece primero en forma de manchas en la sección terminal de la hoja y finalmente las manchas necróticas se funden (De la Fuente, 2000).

El boro captado por el sistema radicular es trasladado hacia las hojas, acumulándose en puntas y márgenes. El análisis foliar es utilizado para el diagnóstico de la toxicidad causada por boro. En este sentido, el contenido de boro en hojas maduras sanas se encuentra comprendido en el rango de 50-100 ppm mientras que el contenido de boro en plantas con deficiencia del mismo es igual o menor a 20 ppm (Allison, 1964).

En estudios realizados con *L. gibba*, se ha observado un deterioro general de las frondas causado por la presencia de boro. Inicialmente se presenta en los márgenes de las hojas, para después producir la pérdida de raíz o bien un crecimiento limitado de ésta. En concentraciones de 300, 400 y 500 ppm de boro el daño se observa desde los 3 primeros días de la exposición comenzando por clorosis general de las hojas que después se extiende hasta el centro de la hoja que finalmente se necrosa. Estudios realizados en el laboratorio de Cuencas Hidrológicas de la UAM-I han demostrado que *L. gibba* es resistente a concentraciones de 20, 50 y hasta 100 ppm de boro. Así mismo se observó una relación directamente proporcional entre la concentración y el

tiempo de exposición. A los 10 días de iniciado el experimento el número de plantas con necrosis aumentaba en forma proporcional (Mosso, 2002).

El boro puede interferir con enzimas dependientes de manganeso, esta interferencia podría deberse a que el manganeso existe en tres estados de oxidación muy cercanos a los del boro, Mn^{+2} , Mn^{+3} , y Mn^{+4} , a nivel de membranas el boro tiene una función estructural (Salisbury y Ross, 1994; Blevins y Lukaszewski, 1998).

1.7. Contaminación y respuesta al estrés

Cuando un elemento rebasa permanentemente las concentraciones en que se encuentra regularmente en la naturaleza, se convierte en un contaminante. Cuando esto ocurre, se produce una respuesta adaptativa de los organismos que es conocida como respuesta al estrés. Cuando esta respuesta no es suficiente para contender con la agresión, el organismo muere.

El estrés biológico se define como cualquier alteración en las condiciones ambientales que pueda reducir o influir de manera adversa el crecimiento o desarrollo de un organismo. Todos los organismos sintetizan Hsps en respuesta al calor, sin embargo, el balance de proteínas sintetizadas y la importancia de las familias de Hsp individuales en la tolerancia al estrés varía mucho de un organismo a otro. Por ejemplo, en levadura, un miembro de las Hsp100 de la familia de (ClpB/C), la Hsp104, es fuertemente expresado en el compartimento nuclear-citoplásmico en respuesta al estrés y juega un papel pivotal en la tolerancia a situaciones ambientales extremas (Sánchez y cols., 1992; Parsell y cols., 1994). Determinar que proteínas juegan los papeles más importantes en la tolerancia al estrés en diferentes tipos de organismos requiere de análisis genéticos. Sin embargo, los factores críticos que confieren la tolerancia a temperatura en plantas superiores aún no se han entendido claramente (Queitsch y cols., 2000). Algunos estudios sobre plantas relacionan la inducción de las Hsps en respuestas a aumentos moderados de la temperatura, lo que induce tolerancia a un estrés mucho más severo (Ougham y Howarth, 1988; Vierling, 1991; Howarth y Skot, 1994).

Las plantas, como todos los organismos, son capaces de responder y adaptarse a cambios ambientales por medio de la síntesis de proteínas específicas, las cuales

modifican su metabolismo celular. El descubrimiento de la respuesta al estrés se observó por primera vez en la respuesta al choque térmico de las glándulas salivales de *Drosophila* (Ritosa, 1962). Una evidencia directa para la función de una Hsp en tolerancia al estrés en plantas proviene de cultivos celulares de zanahorias transgénicas y plantas en donde se observan ligeros cambios en la expresión de una Hsp de 17.7 kDa y el escape de electrolitos de las hojas después de estrés por temperatura (Malik y cols., 1999)

Hasta ahora todos los organismos examinados muestran una respuesta al choque térmico incrementando la síntesis de proteínas específicas llamadas proteínas de choque térmico o Hsps. Estas proteínas y algunas otras relacionadas se inducen en respuesta a diversos tipos de estrés diferentes del calor (Morimoto y cols., 1990). Esta respuesta celular es la expresión genética más conservada universalmente y es utilizada por las células para preservar la función y homeostasis celulares (Lindquist, 1986). La síntesis de proteínas inducidas por estrés es el inicio de los mecanismos de resistencia y/o tolerancia.

Las proteínas específicas de estrés tienen dos funciones principales, la primera es prevenir el daño inducido y la segunda se activa en caso de que la primera falle, y es reparar el daño (Fig. 3.1) (Ryan y Hightower, 1996).

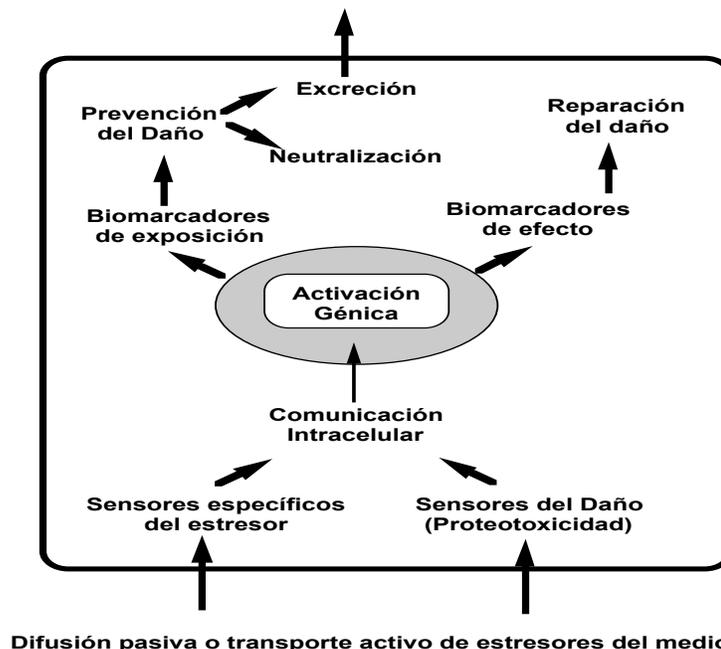


Figura 3.1. Funciones de las proteínas específicas de estrés (Ryan y Hightower, 1996; Tomado de: Stress-Inducible Cellular Responses)

Las proteínas de choque térmico representan entre el 2 al 3% del total de las proteínas en las células normales, esta proporción puede alcanzar el 20% en las células expuestas al estrés (Donati y cols., 1990). Todavía en 1990, se desconocía una función definida para las proteínas sintetizadas en respuesta al estrés, pero se reconocía su participación para ayudar a la célula a sobrevivir al estrés térmico y en la termotolerancia. Las familias de las Hsps están altamente conservadas y se encuentran en procariontes y en todos los compartimentos de las células eucariontes. Las Hsps son inducidas en respuesta al estrés por cambios ambientales o por la presencia de agentes tóxicos como pueden ser: detergentes, fertilizantes, metales pesados, agentes oxidantes o exceso de salinidad, que producen un daño directo o indirecto a las proteínas celulares (Lindquist, 1986; Morimoto y cols., 1990; Hightower, 1991).

Las proteínas de estrés se dividen en dos grupos de familias: a) las proteínas de choque térmico (Hsps) que se inducen principalmente por la elevación de temperatura, análogos de aminoácidos, o por la presencia de metales pesados y contaminantes (Klann y Shelton, 1989; Schlesinger, 1990); b) y las proteínas reguladas por glucosa (GRPs) cuyos niveles aumentan por falta de glucosa, inhibición de glicosilación o perturbación en la homeostasis de calcio intracelular (Subjeck y Thug-Tai, 1986; Welch, 1990; Kang y cols., 1995). De acuerdo con su peso molecular las Hsps se clasifican en seis familias: **i.** Las Hsps de 100-110 kDa que promueven la reactivación de proteínas que ya han sido agregadas, también se ha observado que la Hsp101 tiene un papel crucial en la termotolerancia en Arabidopsis (Queitsch y cols., 2000) **ii.** Las Hsps de 83-90 kDa, **iii.** Las Hsps de 66-78 kDa, **iv.** Las Hsp60, Hsp70 y Hsp90 que están presentes en el citosol y en el núcleo y participan en la reactivación de proteínas dañadas y en el plegamiento correcto de polipéptidos. En Arabidopsis la Hsp70 tiene un papel central en la tolerancia al estrés (Solomon y cols., 1991; Welte y cols., 1993), **v.** Las Hsps de 40 kDa, **vi.** Las Hsps de bajo peso molecular (sHsps) de 13-25 kDa.

Las sHsps están localizadas en diferentes compartimentos celulares y se dividen en al menos en seis subclases: Tres subclases (CI, CII y CIII) están localizadas en el citosol

y en el núcleo y se expresan durante los procesos de desarrollo (Scharf y cols., 2001) las otras tres en los plastidios, retículo endoplásmico (Helm y cols., 1993; Helm y cols., 1995) y la mitocondria (Lenne y Douce, 1994; LaFayette y cols., 1996). Las formas de las sHsps presentes en los diversos organelos parecen ser únicas en las plantas con excepción de la Hsp22 mitocondrial que se encuentra en *Drosophila melanogaster* (Wieining y cols., 2002). Las clases I y II citosólica y nuclear son generalmente codificadas por familias de multigenes, y tienen actividades de chaperonas (Vierling, 1991; Lee y cols., 1997). Las sHsps de la misma clase son altamente homólogas entre diferentes especies de plantas; sin embargo, las de diferentes clases comparten secuencias similares (Vierling, 1991; Waters, 1995; Scharf y cols., 2001).

Por lo general las sHsps no se detectan fácilmente en tejidos vegetales bajo condiciones de crecimiento normales, pero pueden ser inducidas por estrés ambiental y estímulos de crecimiento (Wieining y cols., 2002). La mayoría de las Hsps se expresan continuamente, lo que sugiere que son necesarias permanentemente en el funcionamiento normal de la célula, y funcionan principalmente como moléculas chaperonas (Morimoto y cols., 1990).

En la mayoría de los organismos, las Hsp90, Hsp70, Hsp60 tienen un papel importante en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. En particular la Hsp70 y 90 se unen y favorecen la degradación del factor de transcripción de choque térmico (HSF) lo que suprime su actividad. (Schoffl y cols., 1998). Sin embargo, se sabe que no todas las moléculas expresadas en respuesta a un estrés son chaperonas, algunas otras son proteasas o miembros de la maquinaria de degradación proteínica mientras que otras son factores de transcripción (Gragerov y cols., 1992).

Las proteínas chaperonas o "chaperonas moleculares" se definen como "la familia de proteínas que median el ensamble correcto de otros polipéptidos, pero que ellas mismas no son integrantes de la estructura final" (Hendrick y Hartl, 1993). La actividad de chaperona molecular involucra el reconocimiento de segmentos de residuos, principalmente hidrofóbicos de polipéptidos desdoblados por monómeros, dímeros o multímeros de las chaperonas.

El metabolismo celular cambia debido a los diferentes tipos de estrés, alterando las funciones celulares relacionadas con la expresión genética, como son la transcripción

de los genes de mantenimiento y la traducción general de proteínas, mientras que la transcripción de genes de choque térmico y su traducción se activan (Dubois y Bensaude, 1993). El problema de la agregación y plegado erróneo de las proteínas puede ser el efecto de varios tipos de estrés.

La chaperona molecular más estudiada es la Hsp70 y sus proteínas asociadas, así como los equivalentes en procariontes. Se encuentran en el citosol y en la mayoría de los organelos, y actúan participando en el plegamiento y la translocación de las proteínas a través de las membranas celulares. Pueden estabilizar la síntesis y el transporte de polipéptidos nuevos hasta reunir todos los segmentos necesarios para el repliegado de la cadena, formando complejos largos y cilíndricos que promueven el repliegado de las proteínas en el ambiente de su cavidad central (Dix y cols., 1997). Las proteínas homólogas a las Hsp70 fueron encontradas en complejos no ensamblados en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y en cadenas pesadas de inmunoglobulinas unidas a proteínas como BiP (Binding Proteins), y a proteínas secretoras (James y cols., 1997). Hsp70 también actúa en asociación con otras proteínas de choque térmico, la Hsp 60 (GroEL) y la Hsp 10 (GroES) en la mitocondria y el citoplasma (Georgopoulos y Ang, 1990).

Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular con un peso real de 12-30 kDa son ubicuas entre eucariontes y representan una clase determinada e importante de chaperonas moleculares (Vierling, 1991). Esta familia consiste de 5 formas principales, de las cuales dos están localizadas en el citosol y las restantes en cloroplasto, mitocondria y retículo endoplásmico. Estas últimas funcionan como protectores en el transporte de electrones cuando las plantas son expuestas a calor y estrés oxidativo, así como en la fotoinhibición en cloroplastos (Downs y Heckathorn, 1998; Heckathorn y cols., 1998; Downs y cols., 1999). Las sHsps se han descrito también en eubacterias (González-Márquez y cols., 1997). Las sHsp comparten un dominio C-terminal conservado con una de las proteínas del cristalino de los mamíferos, el α -cristalino. Esta tiene la función de chaperona molecular ya que impide la desnaturalización de otras proteínas al estabilizarlas, lo consigue mediante una acción surfactante al reaccionar hidrofólicamente con monómeros aniónicos. Los análisis bioquímicos indican que *in vivo* las sHps no son monómeros/dímeros sino

agregados de alto peso molecular que va de 200 a 400 kDa. A pesar de la gran variedad de las especies de sHsp, generalmente se arreglan como homo-complejos separados, más bien que como hetero-complejos o mezclas de subunidades. Esto sugiere diversas funciones para cada una de las sHsp, incluso cuando están presentes en el mismo compartimento celular.

Las proteínas de estas familias tienen una amplia gama de funciones, desde antígenos en membrana hasta replegadoras de proteínas desnaturalizadas. Se cree que tienen un papel importante en su autoregulación (Merck y cols., 1993; Merck y cols., 1993)).

In vitro, las sHsp conservan y facilitan la reactivación de proteínas químicamente desnaturalizadas y previenen su agregación cuando son desnaturalizadas por calor (Boston y cols., 1996). De acuerdo con estas observaciones, es probable que las sHsps puedan también actuar *in vivo* como chaperonas moleculares. En contraste con los miembros de las otras clases de chaperonas moleculares, la actividad de las sHsps es ATP independiente.

En plantas superiores, se han descrito cinco familias de genes y una familia en hongos que codifican para las sHsp. Cada familia codifica proteínas que se encuentran en compartimentos celulares distintos, incluyendo el citoplasma, los plástidos, el ER rugoso, y las mitocondrias. Estas familias presentan homología y se encuentran relacionadas filogenéticamente, sus genes parecen haber experimentado duplicaciones, divergencias y convergencias, lo que indica que evolucionaron a distintos ritmos y es muy probable que hayan cambiado de función y localización celular (Waters, 1995).

Además las sHsps específicas se expresan durante varias fases del desarrollo vegetal (Boston y cols., 1996). Este es el caso del girasol en donde el ARNm de la Hsp17.6 se acumula durante la embriogénesis de las semillas durante las últimas etapas de desecación pero no como respuesta al choque térmico. El promotor de este gen tiene poca semejanza con los del choque térmico. Existe una divergencia evolutiva en la regulación de los genes vegetales de sHsp que ha originado genes que responden al estrés y miembros no sensibles al calor (Carranco y cols., 1997).

En el frijol de soya, las sHsps tienen entre 15 y 18 kDa, se encuentran codificadas por dos familias de genes principalmente de la clase I localizada en el citosol y clase VI en

el citosol y en el núcleo, y son el GmHsp18.5-C y el GmHsp17.9-D. Además, de estar reguladas como respuesta al choque térmico, tienen cierta homología en su estructura secundaria y en el dominio C-terminal con otras proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, se sabe que los genes presentan regiones ricas en A y T pero su función todavía no está dilucidada (Reschke y cols., 1988).

Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular juegan un papel en la tolerancia a una variedad de estresantes bióticos y abióticos. Son en general proteínas de estrés que están involucradas en el mantenimiento de la función celular y la supervivencia durante el estrés o bien facilitan su recuperación (Vierling, 1991; Parsell y Lindquist, 1993; Heckathorn y cols., 1998).

Aunque las aplicaciones de la investigación de las proteínas de estrés se han enfocado hacia la medicina, farmacología y toxicología, una aplicación emergente de las HSPs es su uso como biomarcadores moleculares para el monitoreo ambiental, tanto para la exposición a químicos tóxicos como para detectar el daño causado por estos (Ryan y Hightower, 1996).

1.8. Proteínas de estrés como biomarcadores ambientales

Recientemente las proteínas de estrés han cobrado gran importancia como biomarcadores ambientales, ya que estas tienen ciertas ventajas sobre métodos analíticos que se utilizan para calcular niveles de contaminación que afectan a poblaciones de organismos expuestos. Estos métodos requieren más tiempo de trabajo y en general son más costosos, además no pueden predecir eficientemente el daño causado en casos agudos de toxicidad en altas concentraciones de un contaminante, estas pruebas tienen un valor pequeño de predicción en comparación con los biomarcadores, ya que no se obtienen respuestas en exposiciones crónicas en dosis más bajas, es decir, su grado de sensibilidad es mucho más bajo (Johan, 2000).

El uso de biomarcadores moleculares permite una identificación más eficiente de químicos, para una detección más temprana que con los biomarcadores tradicionales (patología tisular, fallas reproductivas, mortalidad en masa o pérdida de la diversidad de especies dentro de una comunidad ecológica). Esta nueva aproximación al

monitoreo puede integrarse a las ya tradicionales pruebas físicas, biológicas y químicas para una mejor detección y manejo de cambios ambientales.

Los biomarcadores proveen evidencia de los organismos que han sido expuestos, ó afectados por agentes xenobioticos, evidencian cambios bioquímicos, histológicos, morfológicos y fisiológicos en todo el organismo y se han complementado para evidenciar cambios a nivel celular y molecular con biomarcadores de ácidos nucleicos y proteínas (Ryan y Hightower, 1996).

Los cambios en la fisiología tanto subcelular como celular y de los organismos completos se relacionan directamente con los agentes estrésantes que los inducen y se han clasificado en: Respuestas adaptativas, que previenen el daño, respuestas de daño subletal y respuestas de daño letal (Ryan y Hightower, 1996).

Las respuestas adaptativas y de daño subletal se pueden evaluar a través de biomarcadores de efecto y biomarcadores de exposición (Sanders, 1990). Los biomarcadores de efecto forman parte de las respuestas que previenen el daño celular mediante mecanismos de desintoxicación, en tanto que los biomarcadores de exposición revelan las lesiones subletales que se originan por la incapacidad de las defensas ante el estrés. Por último, las respuestas letales implican efectos de necrosis o de apoptosis, cuando los mecanismos de protección y corrección fallan o bien son rebasados (Ryan y Hightower, 1996).

La propuesta de utilizar proteínas de estrés como biomarcadores ambientales ha recibido atención recientemente, ya que los biomarcadores pueden utilizarse como medidas en cualquier nivel de organización, así como en poblaciones expuestas a contaminantes en su ambiente natural o bien en cultivos celulares y tejidos vegetales o animales experimentalmente expuestos a estrés físico o químico. Estas medidas proporcionan un índice más sensible de exposición a efectos adversos subletales producidos por químicos tóxicos o bien a una exposición prolongada de algún químico fitotóxico, como es el caso del boro. En niveles altos de organización biológica (tejidos, órganos, o bien el organismo en general), estas proteínas incluyen cambios en el metabolismo, en su fisiología, morfología, histología e inmunología. A nivel molecular y niveles subcelulares de organización, hay primordialmente cambios en ácidos

nucleicos y proteínas (McCarthy y Shugart, 1990; Huggett y cols., 1992; Fossi y Leonzio, 1994)

La selección apropiada de biomarcadores así como el estudio de la reparación de daño causado por tóxicos en ambientes naturales pueden generar información valiosa para la conservación de distintos ecosistemas.

1.9. *Lemna gibba* L. como modelo de monitoreo y biodepuración de contaminantes

Una alternativa ecológica para la remoción de contaminantes que se acumulan en el agua ha sido la remediación basada en plantas (fitoremediación) y otros organismos (bioremediación). Las macrofitas acuáticas han mostrado tener gran capacidad de absorción y bioacumulación. Muchas de ellas pueden remover metales pesados de aguas contaminadas (Aulio y Salin, 1982; Chigbo y cols., 1982; Charpentier y cols., 1987). Entre las macrofitas acuáticas utilizadas para pruebas de toxicidad se encuentra *Lemna gibba*, es un organismo utilizado muy frecuentemente en pruebas de monitoreo de ecosistemas acuáticos, considerándolo un indicador ecotoxicológico ideal (Wang, 1990). La familia Lemnaceae tiene 35 especies de plantas y se dividen en 4 géneros: *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* y *Wolffia*, siendo *Lemna* uno de los más utilizados para el tratamiento de efluentes (Culley y Epps, 1973). Estas plantas se conocen comúnmente como lentejilla de agua, tienen hojas pequeñas que rara vez llegan a medir 5 mm de longitud (Weldon y cols., 1973). La planta está formada por dos partes, fronda y raíz, presenta un talo solitario o en grupos escasos, es orbicular obovado de 2.5 mm de largo y de 2 a 4 mm de ancho y dos capas de espacios aéreos verde oscuro por arriba y frecuentemente sombreado con rojo por debajo. El talo tiene una ligera joroba y de una a tres nervaduras superiores conspicuamente redondeado, usualmente giboso e inflado en el lado ventral debido al engrandecimiento de las capas Figura 4.1 (Miranda, 1998). *L. gibba* es una planta de fácil manejo, de alta productividad en condiciones de invernadero, y con un ciclo de vida corto (1-2 meses). Esta macrofita ha mostrado capacidad en la remoción de metales pesados en agua como cadmio y plomo (Miranda y cols., 2000).



Figura 4.1 *Lemna gibba* L. de fronda y raíz y por debajo tejido del aerenquima.

El uso de plantas en estudios de toxicidad tiene ventajas sobre pruebas tradicionales como patología tisular, fallas reproductivas, mortalidad en masa o pérdida de la diversidad de especies dentro de una comunidad ecológica. Esto se debe a su alto grado de sensibilidad ante la presencia de un gran número de tóxicos. Otra ventaja es que es una alternativa que hasta hoy ha sido poco aprovechada y puede resultar más económica, ya que el cultivo de plantas acuáticas no representa un factor limitante para la obtención de más organismos sanos, siempre y cuando éstos se mantengan bajo condiciones óptimas de luz, nutrientes y temperatura. Esta nueva aproximación al monitoreo puede integrarse a las ya tradicionales pruebas físicas, biológicas y químicas para una mejor detección y manejo de cambios ambientales.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante los años ochenta y noventa se desarrollaron diversas investigaciones sobre el impacto ambiental del transporte y uso de aguas residuales del Valle de México. Se llevaron a cabo estudios sobre la contaminación por metales pesados, químicos y detergentes del aire y suelos agrícolas en el Valle del Mezquital. Los resultados de estos estudios revelaron un aumento en los niveles de distintos contaminantes entre los que figuraba el boro. También se realizaron análisis sobre la calidad del agua que se utiliza para consumo humano en la zona de Hidalgo y sobre la acumulación tóxica de algunos químicos en los tejidos vegetales de cultivos desarrollados en suelos fuertemente contaminados. Un análisis de las aguas residuales del Valle de México reveló que los niveles de boro aumentaron hasta 2.96 ppm en el Sistema Central de Alcantarillado sobrepasando los límites permisibles tanto para consumo humano (1.0 ppm) como para agua de riego (0.50 ppm) (Jiménez y cols., 1997).

El boro es esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas, sin embargo, el requerimiento esencial del mismo es en cantidades muy pequeñas por lo que un ligero aumento de su concentración puede tornarlo tóxico. Situaciones como éstas pueden convertirse en un problema a futuro produciendo repercusiones en la salud de consumidores de productos agropecuarios que han sido regados con aguas residuales contaminadas.

Una alternativa ecológica para la remoción de contaminantes que se acumulan en el agua y que hasta ahora ha sido poco aprovechada es el uso de plantas acuáticas (fitoremediación).

Lemna gibba es cosmopolita, de alta productividad, alta eficiencia en la remoción de nutrientes y contaminantes, alta sobrevivencia bajo condiciones naturales adversas, fácil cosecha y ciclo de vida corto (Wang, 1990). Esto la hace un modelo experimental sensible ante la exposición de un gran número de tóxicos, por lo que se podría considerar un indicador ecotoxicológico.

Estudiar las proteínas que *L. gibba* expresa en respuesta a la presencia de boro es importante, debido a su posible uso como biomarcadores ambientales.

El presente estudio describe el proteoma de *L. gibba* en presencia y ausencia de boro, con el fin de analizar de manera global la expresión genética a nivel de proteínas solubles totales. Por medio de este estudio es posible determinar cambios en la expresión genética de *Lemna gibba* en respuesta al estrés provocado por presencia de boro.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en el proteoma de *Lemna gibba* en respuesta al estrés inducido por boro.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la concentración efectiva media (EC_{50}) de boro para *L. gibba*
- Establecer la técnica más adecuada para la extracción de proteínas solubles totales de *Lemna gibba* libres de ADN y pectinas.
- Cuantificar la producción de clorofilas totales en plantas expuestas a boro.
- Obtener el perfil proteínico monodimensional de *L. gibba* expuesta a boro.
- Obtener el perfil proteínico bidimensional de *L. gibba* expuesta a boro.
- Determinar las proteínas específicas expresadas por *L. gibba* en respuesta al boro mediante autoradiografía de geles bidimensionales de proteínas marcadas radioactivamente.

5. HIPÓTESIS

Si el estrés provocado por la exposición al boro produce variaciones en la expresión de proteínas solubles totales de *Lemna gibba* L., entonces se presentarán cambios en el patrón electroforético mono-dimensional y bidimensional de las proteínas solubles totales.

Considerando que las proteínas de choque térmico se expresan bajo condiciones de estrés, se esperaría la expresión y sobre-expresión de algunas de estas proteínas en las células de *L. gibba* expuestas a boro.

6. METODOLOGÍA

6.1. Material Biológico

Los ejemplares de *Lemna gibba* se colectaron en el Canal Nacional en Xochimilco (Barrio Caltongo, D.F.). Las plantas se lavaron con agua corriente para ser liberadas de desechos. Se enjuagaron con agua destilada, se enjuagaron con cloro al 0.05% y se cultivaron axénicamente en medio Hoagland 1:20 en condiciones de invernadero. Antes de someterlas a las condiciones experimentales, las plantas estuvieron en un periodo de aclimatación de una semana en el invernadero de la UAM-I, con un fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad con una intensidad de luz de 210 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y con temperatura controlada entre 25-29 °C.

6.2. Curvas de Crecimiento

Para seleccionar el medio nutritivo y la concentración del mismo se probaron dos medios de cultivo: 20X AAP y Hoagland. Este último es uno de los más utilizados en el caso de macrofitas acuáticas. Los componentes de cada uno se muestran en los anexos I y II.

Las plantas se cultivaron en vasos de precipitados de 600 ml en condiciones de invernadero. Los medios 20X AAP y Hoagland se prepararon en diluciones 1:20, 1:40 y 1:60 por triplicado a pH 7, ya que éste fue el pH monitoreado en el agua en donde fueron colectadas. Las plantas se mantuvieron en el invernadero de la UAM-I, con un fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad con una intensidad de luz de 210 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y con temperatura controlada entre 25-29 °C.

Se pesaron inicialmente 6 g de planta para cada una de las diluciones. La biomasa se determinó los días 3, 5, 7 y 9 del experimento. Se midió la tasa de crecimiento durante el tiempo de exposición al boro.

6.3. Inhibición del crecimiento

Se determinó por triplicado la inhibición del crecimiento en plantas tratadas con boro. Se pesaron 2.5 g de planta y se cultivaron en medio Hoagland 1:20 en vasos de

precipitados de 600 ml con concentraciones de 0, 20, 50, 100 y 500 ppm de boro en forma de ácido bórico (H_3BO_3) pH 7, con un fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad con una intensidad de luz de $210 \mu E/m^2/s$ y temperatura controlada entre 25-29 °C.

Se obtuvo la biomasa de cada muestra los días 3, 5, 7 y 9 del experimento. El recambio de medio fue cada 48 hrs.

La biomasa inicial de este experimento (2.5 g) fue distinta a la utilizada en las curvas de crecimiento (6 g) debido a que durante los ensayos de crecimiento se observó que la planta crece de forma tal que ocupaba el área total del recipiente lo que en determinado momento podría limitar su crecimiento. Con el fin de excluir cualquier variable que pudiera alterar los resultados esperados se llegó a la conclusión que se debía utilizar menor cantidad de plantas para aumentar el área de crecimiento.

6.4. Determinación de la Concentración efectiva media (EC_{50})

La EC_{50} es la concentración que causa el 50% de la respuesta máxima de daño causado por un tóxico. Se utiliza para elegir las concentraciones a probar. Los parámetros cualitativos son: clorosis, necrosis, pérdida y falta de crecimiento de la raíz y un parámetro cuantitativo fue la biomasa (expresada como peso húmedo). Estos constituyen referencias útiles para indicar cuando un contaminante afecta a una comunidad de plantas inhibiendo su desarrollo y alterando sus características morfológicas

Para determinar la EC_{50} se emplearon dos métodos. Para ambos métodos se formaron lotes 5 de 100 plantas cada uno cultivados en medio Hoagland 1:20 en vasos de precipitados de 600 ml y se expusieron a las concentraciones de 0, 250, 300, 400 y 500 ppm de boro, pH 7 por triplicado. Se tomaron fotografías cada 24 hrs para cada cultivo. En el primer método, se tomaron parámetros cuantitativos y cualitativos de las plantas desde el inicio de la exposición al boro hasta el final. Estos fueron el número de frondas, falta de coloración de las frondas (clorosis), frecuencia de plantas necrosadas (ausencia total de color) y pérdida de raíz (Asby, 1935; Lemnatest, 2000).

En el segundo, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de acuerdo con el procedimiento descrito por (Nyholm, 1990), basado en la relación entre la biomasa y velocidad de crecimiento inicial y final como respuesta al contaminante.

$$EC_{b50}/EC_{r50} = 10 \frac{1}{\frac{In2}{\square_m \cdot t}} \square 0.5 \quad (1)$$

Donde:

In: Logaritmo natural del parámetro de observación al tiempo inicial menos el logaritmo natural del parámetro al tiempo final

\square : Curva de dosis-respuesta para la velocidad de crecimiento relativo vs logaritmo de la concentración

\square_m : Velocidad de crecimiento durante el tiempo de exposición y concentración

6.5. Cuantificación de clorofilas totales (Arnon, 1949))

Se cuantificó la producción de clorofilas totales en plantas tratadas con 0, 20, 50, 100 y 500 ppm de boro en forma de ácido bórico pH 7, cultivadas en medio Hoagland 1:20 por triplicado. Se tomó 1 g de peso fresco de planta. Se maceró con 15 ml acetona al 80% y trazas de carbonato de magnesio (MgCO₃). Se centrifugó a 3,000 g durante 10 min a 25°C. El primer sobrenadante se recogió y el paquete celular se resuspendió con el mismo solvente para centrifugarse nuevamente a la misma velocidad durante 10 min. Los sobrenadantes se juntaron y se llevaron a 25 ml. Se leyó la absorbancia a 645 nm y 663 nm.

6.6. Extracción de las proteínas del tejido vegetal (López y Palton, 1991)

Se cultivaron ejemplares de *L. gibba* en concentraciones de 0, 20, 300 y 400 ppm de boro (H₃BO₃) pH 7. Para cada muestra se tomó 1g de tejido fresco perfectamente libre

de agua se sumergieron de 3 a 5 min en nitrógeno líquido y se congelaron a -70°C . Se maceraron con nitrógeno líquido hasta lograr un polvo fino, ahí mismo se homogenizaron con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma catálogo P-9599 082k4061). Los ácidos nucleicos se precipitaron con sulfato de protamina 1mg/ml a 4°C en agitación. El extracto se aclaró mediante centrifugaciones a 12,000 g durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -70°C en alícuotas de 1 ml.

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976).

6.7. Precipitación de las proteínas y preparación de la muestra

Se tomaron 250-500 μl de proteínas del extracto de *L. gibba*. (35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína). Se precipitó con 4 volúmenes de acetona fría y se dejó reposar durante 15 min a 4°C . El precipitado se centrifugó a 13,000 g durante 10 min a 4°C . Se desechó el sobrenadante, el botón resultante se enjuagó con acetona al 70% hasta lograr un botón claro. Se calentó a 100°C con 40-50 μl de amortiguador de muestra (SDS 2% p/v, glicerol 19% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v, azul de bromofenol al 0.01% p/v en Tris-HCl 62.4 mM pH 6.8) durante 2 min antes de colocarse en los geles de poliacrilamida al 13%.

6.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970)

El gel de separación se preparó al 13%. Se mezclaron 5 ml de acrilamida al 30%, 2.34 ml de agua desionizada, 2.5 ml de buffer Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8. Se agregaron 100 μl de SDS al 10%, 50 μl de APS al 10% p/v y 5 μl de TEMED. La cámara electroforética previamente preparada con separadores de 0.75 mm, se llenó con la mezcla anteriormente mencionada. Se añadieron tres gotas de isobutanol y se dejó polimerizar durante 1 hr.

El gel de compactación se preparó al 4% con 1.33 ml de acrilamida al 30% p/v, 6.1 ml de agua desionizada, 2.5 ml de amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, se desgasificó durante 15 min. Se agregaron 100 μl de SDS al 10%, 50 μl de APS al 10% y 10 μl de TEMED. Los geles monodimensionales se fijaron en una solución de ácido acético al

10% v/v, etanol al 40% v/v y agua desionizada durante 1 hr y se tiñeron con azul de Coomassie durante 1-1 1/2 hr. Se decoloraron con ácido acético al 10% v/v.

En la electroforesis monodimensional se depositaron 35 µg de proteína por carril en geles al 13%. Después de la tinción y digitalización de los geles se compararon los distintos patrones obtenidos de las proteínas solubles totales de *L. gibba* en presencia de boro.

6.9. Electroforesis bidimensional en gel poliacrilamida (O'Farrell, 1975; O'Farrell y cols., 1977)

La muestra se diluyó a una concentración de 2 mg de proteína por ml con buffer de muestra Urea 9 M, 0.5 % p/v CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% v/v de anfolitas y 0.001 % p/v azul de bromofenol.

La primera dimensión se realizó con bandas de gradiente de pH inmovilizado de 4-7 en una cámara Protean IEF (BioRad) según las instrucciones del fabricante.

La banda focalizada se equilibró con amortiguador de muestra SDS-PAGE adicionado con Urea 6 M durante 10 minutos. La banda se colocó sobre un gel de acrilamida al 13% para separar las proteínas durante tres fases de isoelectroenfoque según el manual que van desde 200-20,000 V.

La segunda dimensión se corrió en geles de acrilamida al 13% según (Laemmli, 1970) y se revelaron mediante tinción de plata.

Tinción de plata.

Los geles se enjuagaron tres veces durante 20 min con agua ultra-pura

Se remojaron 30 min en solución DTT al 0.0005% p/v

Se tiñeron durante 30 min con una solución de Nitrato de Plata al 0.2% p/v

Se enjuagaron durante 5 min con agua ultrapura

Se revelaron de 7 a 10 min en una solución de Carbonato de Sodio al 3.5% p/v y formaldehído al 0.05% v/v.

La reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 3% v/v

Los geles revelados se enjuagaron con agua ultra-pura y se secaron.

6.10. Análisis de electroferogramas

Los geles se secaron y digitalizaron y analizaron mediante el programa para geles mono-dimensionales (Quantity-One). Se determinaron la masa molecular y la densidad relativa mediante comparación con estándares de Sigma 96269.

6.11. Marcaje radioactivo (Ferreira y cols., 1996)

Las plantas se cultivaron en 5 ml de medio Hoagland 1:20 en cajas de petri y se mantuvieron en un micro-invernadero de acrílico con temperatura y luz controladas con las condiciones más parecidas a las muestras anteriores. Muestras de 0 y 300 ppm con sus duplicados se marcaron *in vivo* con [³⁵S] metionina (30 kBq/ml; Amersham) a las 2 y 8 horas, el pulso tuvo una duración de 2 hrs. Una vez que se cumplió el tiempo del pulso las muestras fueron lavadas con medio Hoagland. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica de extracción de proteínas arriba mencionada. Del homogenizado se tomaron alícuotas de 20 μ l y se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo. Del extracto claro se tomaron alícuotas de 94 μ l y se precipitaron con TCA al 10% p/v, del sobrenadante resultante se tomaron 20 μ l y se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo. Todas las muestras se leyeron en un contador de centelleo. Se obtuvieron los cpm totales/mg de proteínas solubles totales para todas las muestras. A partir de estos resultados se realizaron las electroforesis monodimensionales y bidimensionales de cada muestra. Antes de secar los geles se remojaron en una solución de ácido acétilsalicílico al 5 M durante 20 min para detectar quimioluminiscencia.

6.12. Las autoradiografías de los geles secos se realizaron usando dos métodos.

En el primero los geles secos se analizaron en un digitalizador de imágenes Phosphor Imaging Systems Myer (GS-525/GS-505) en donde los geles se expusieron durante 4 días. Las imágenes de los geles secos se obtuvieron del digitalizador laser que forma parte del Imaging Systems Myer. En el segundo método los geles se expusieron a una película Kodak X-Omat a -70°C durante 15 días (Pérez y cols., 1990).

7. RESULTADOS

7.1. *En medio AAP 20X*

En la figura 7.1, se muestra el aumento de biomasa de *L. gibba* en medio AAP 20X. En las diluciones 1:20 y 1:40 se duplicó la biomasa a los tres días de cultivo. Mientras que en la dilución 1:60 tuvo un aumento menor. En todos los casos se presentó un crecimiento máximo a partir del día 7. Estos resultados indican que tanto la concentración de 1:20 como la de 1:40 son adecuadas para cultivos de *L. gibba*, (Fig. 7.1).

A pesar de que en este medio de cultivo se obtuvo aumento en la biomasa de *L. gibba*, el tamaño de las frondas fue más pequeño que el de las plantas cultivadas en medio Hoagland.

7.2. *Medio Hoagland*

En medio Hoagland la biomasa tuvo un incremento del 100% a los 5 días de iniciado el experimento en todas las diluciones utilizadas (Figura 7.2). Las plantas cultivadas en la dilución 1:20 presentaron frondas más grandes. Se observaron diferencias evidentes en la biomasa de las diluciones 1:60 y 1:20 hasta el día 9 de iniciado el experimento, ésta fue del 20%. Las diluciones de 1:40 y 1:60 llegaron a un peso máximo de 12g (Fig. 7.2). Las plantas no presentaron clorosis o malformación de sus hojas durante el experimento, aunque en la dilución 1:20 se presentó un mayor número de frondas con respecto a las plantas mantenidas en las otras dos diluciones utilizadas.

Se ha observado que *L. gibba* duplica su biomasa de 24 a 48 hrs en condiciones naturales. En condiciones de laboratorio puede crecer indefinidamente con un aporte adecuado de luz, nutrientes y agua (Wang, 1990). En nuestras condiciones *L. gibba* duplicó su biomasa a las 72 hrs en medio AAP 20X y a las 120 hrs en medio Hoagland.

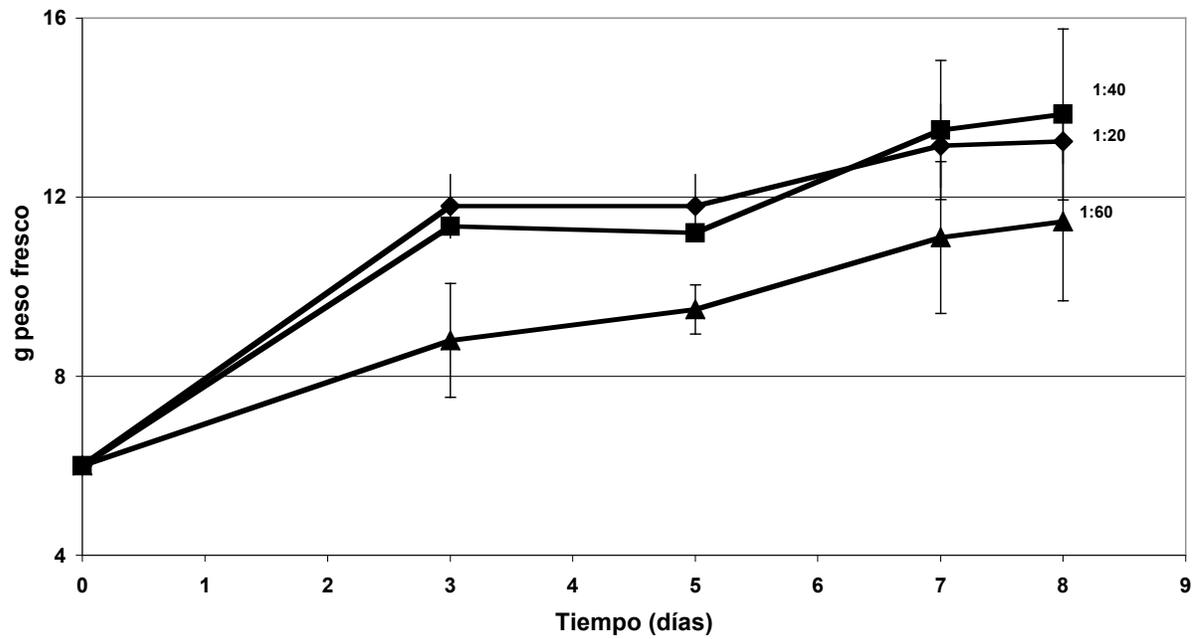


Fig.7.1 Crecimiento *Lemna gibba* L. vs tiempo (días) medio 20X AAP en diluciones de 1:20, 1:40 y 1:60 N= 6

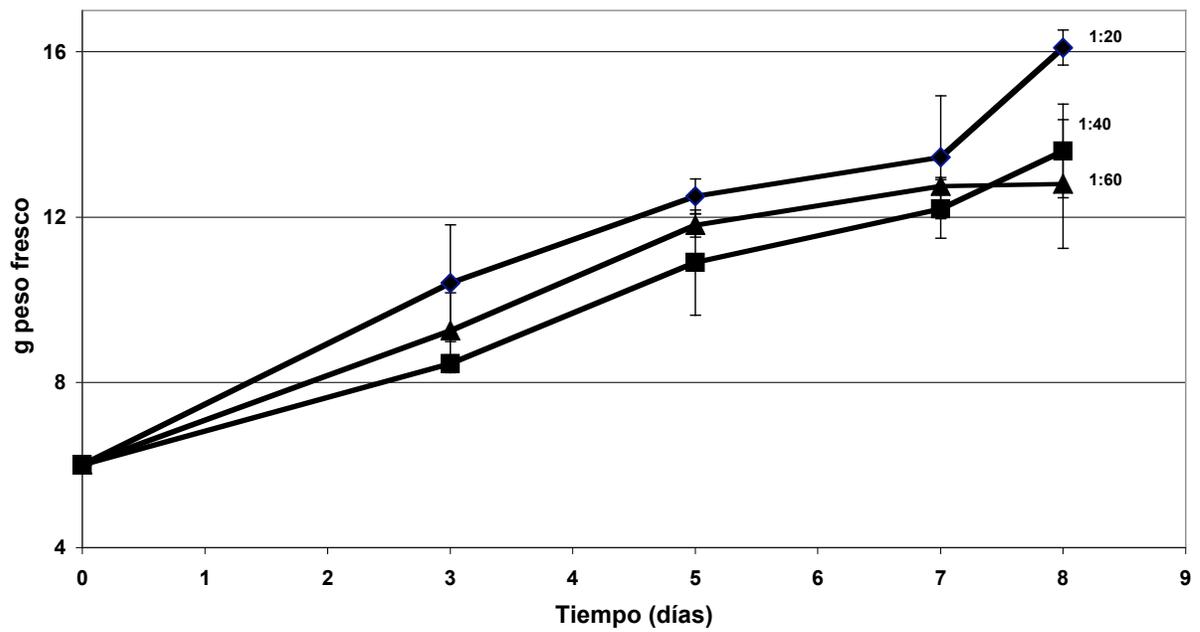


Fig. 7.2 Crecimiento *Lemna gibba* L. vs tiempo (días) en medio Hoagland en diluciones de 1:20, 1:40 y 1:60 N = 6

7.3. Tasa de crecimiento en plantas expuestas a boro

No se observó incremento de la biomasa en las muestras con 20 y 50 ppm de boro durante 72 hrs. El crecimiento reinició después del día 3 sin presentarse daños morfológicos evidentes. Las diluciones de 100 y 500 ppm produjeron inhibición del crecimiento desde el inicio a la exposición, en el tratamiento con 100 ppm hubo un incremento de la biomasa a partir del día 3 pero se presentaron daños morfológicos (Fig. 7.3). En las diluciones de 20 y 50 ppm de boro *Lemna gibba* se observó clorosis en un número menor de 10 frondas durante las primeras 24 hrs de exposición, pero éste incrementó con una notable recuperación en el aspecto de sus hojas (Fig. 7.4). El daño morfológico fue más evidente se presentó en la concentración de 500 ppm desde el inicio del experimento.

Como se mencionó anteriormente las plantas inoculadas con las diluciones 20 y 50 ppm tuvieron una recuperación que se reflejó en la biomasa y en la apariencia general de sus frondas. Esta conducta fue muy parecida a la que se observó durante la aclimatación (Fig. 7.4).

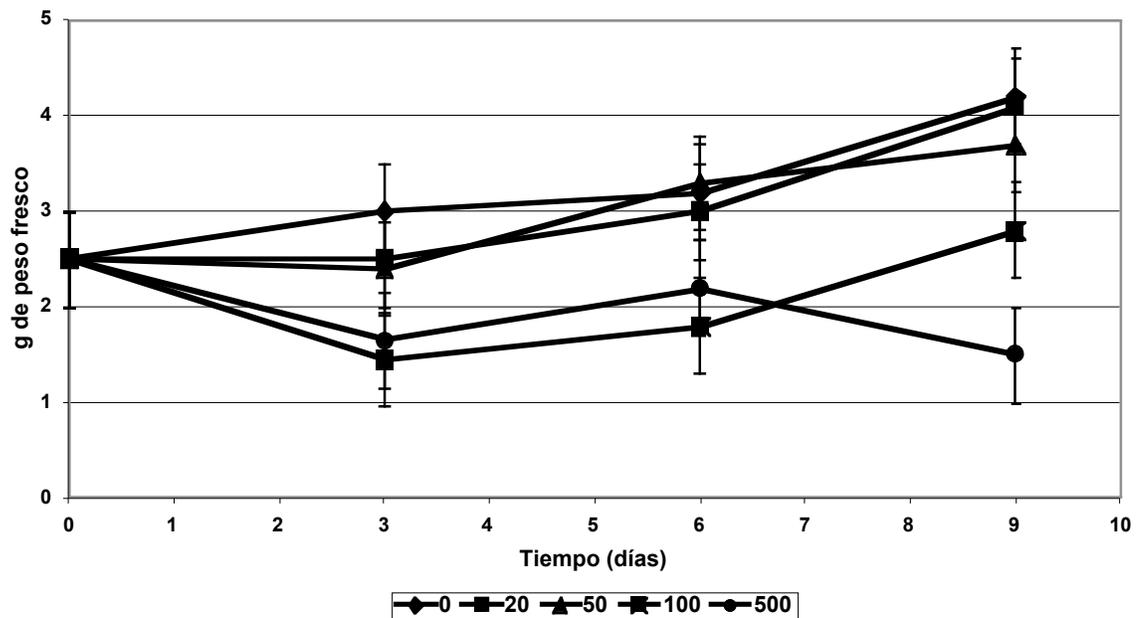


Fig. 7.3 Tasa de crecimiento de *L. gibba* L. expuesta a boro vs tiempo de exposición . Concentración de boro en ppm.

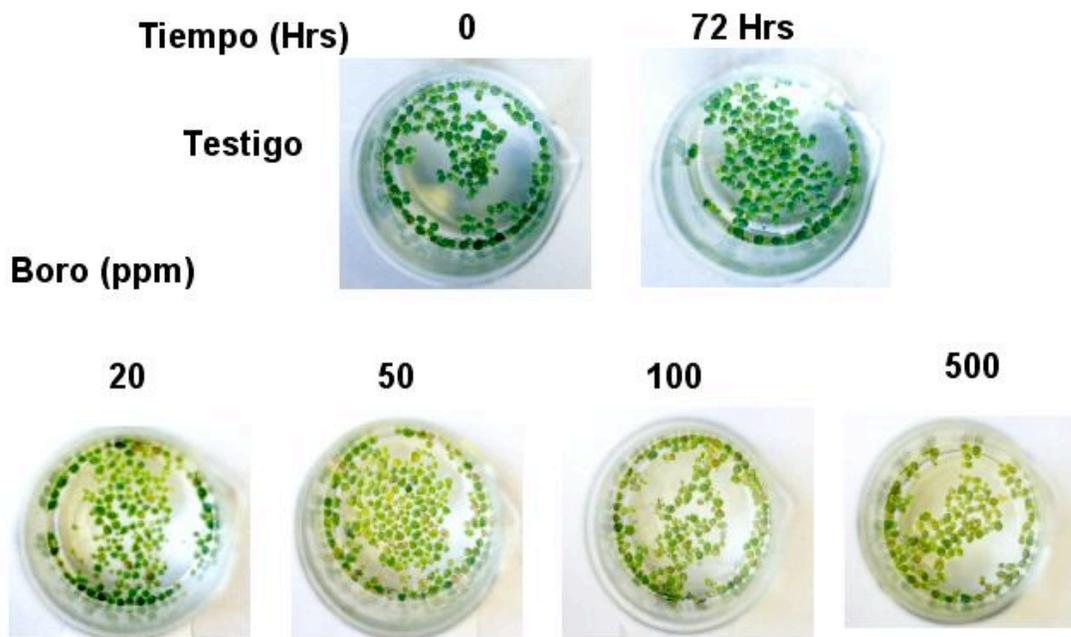


Fig. 7.4 Daños morfológicos durante la tasa de crecimiento en *L. gibba* L. expuesta a distintas concentraciones de boro.

7.4. Determinación de la Concentración Efectiva Media (EC_{50})

La EC_{50} del boro para *L. gibba* se determinó analizando parámetros cualitativos como: la clorosis, necrosis, pérdida y crecimiento de la raíz y cuantitativos como la biomasa y la velocidad de crecimiento a las 72 horas de exposición. El mejor parámetro resultó ser la relación clorosis/necrosis pues refleja fiel y gradualmente el daño ocasionado por el boro. La EC_{50} correspondió a 300 ppm de boro a las 72 hrs de exposición. El control presentó un 8% de plantas necrosadas a los 3 días. Los grupos experimentales presentaron de 45 a 60 % de necrosis (Tabla 7.1). También se obtuvo la relación de biomasa y velocidad de crecimiento a partir de la ecuación propuesta por Nyholm (Nyholm, 1985). En dicha ecuación se plantea que la EC_{50} se deriva de dos respuestas distintas: la primera es pérdida de biomasa por presencia del contaminante y la segunda al efecto que tiene el contaminante sobre la velocidad de crecimiento. En la figura 7.5 se grafica esta relación con respecto al tiempo de exposición asumiendo \square como la curva de dosis-respuesta para la velocidad de crecimiento contra la concentración de boro. El tiempo de duplicación de *Lemna* se ha determinado entre 72 y 120 hr. Para ajustar los datos experimentales a la ecuación (1) se obtuvo el factor \square_m que representa el cambio de biomasa con respecto al tiempo de exposición y a la concentración del contaminante, este valor se cálculo a partir de la biomasa final menos la biomasa inicial suponiendo un crecimiento exponencial mediante una regresión lineal (Nyholm, 1985). Para calcular los cambios en la biomasa en relación con la velocidad de crecimiento y la concentración del químico tóxico al que la planta este expuesta, se utilizó un factor numérico representado por \square , que con base en la experiencia del autor éste tiene una variación de 0.3 a 3. Los resultados de esta relación mostraron que a tiempos cortos de exposición y velocidad de crecimiento lenta se observan mayores diferencias en las plantas expuestas con respecto al control con un $\square=1$ (Fig. 7.5). La biomasa no resultó ser un parámetro fiable para obtener la EC_{50} (Fig. 7.6). Los parámetros de crecimiento mostraron que el boro afecta las frondas de *L. gibba* inhibiendo su desarrollo, con signos visibles de clorosis, senescencia, pérdida de la raíz o bien crecimiento limitado lo que finalmente desencadena necrosis (Fig. 7.7). La relación EC_{b50} y EC_{r50} muestra que a tiempos

cortos y velocidad lenta de crecimiento se observan mayores diferencias entre las plantas tratadas y el control, lo cual concuerda con la bibliografía a pesar de la variación en las distintas metodologías utilizadas para pruebas de toxicidad (Kallqvist y cols., 1980; Nyholm, 1990);

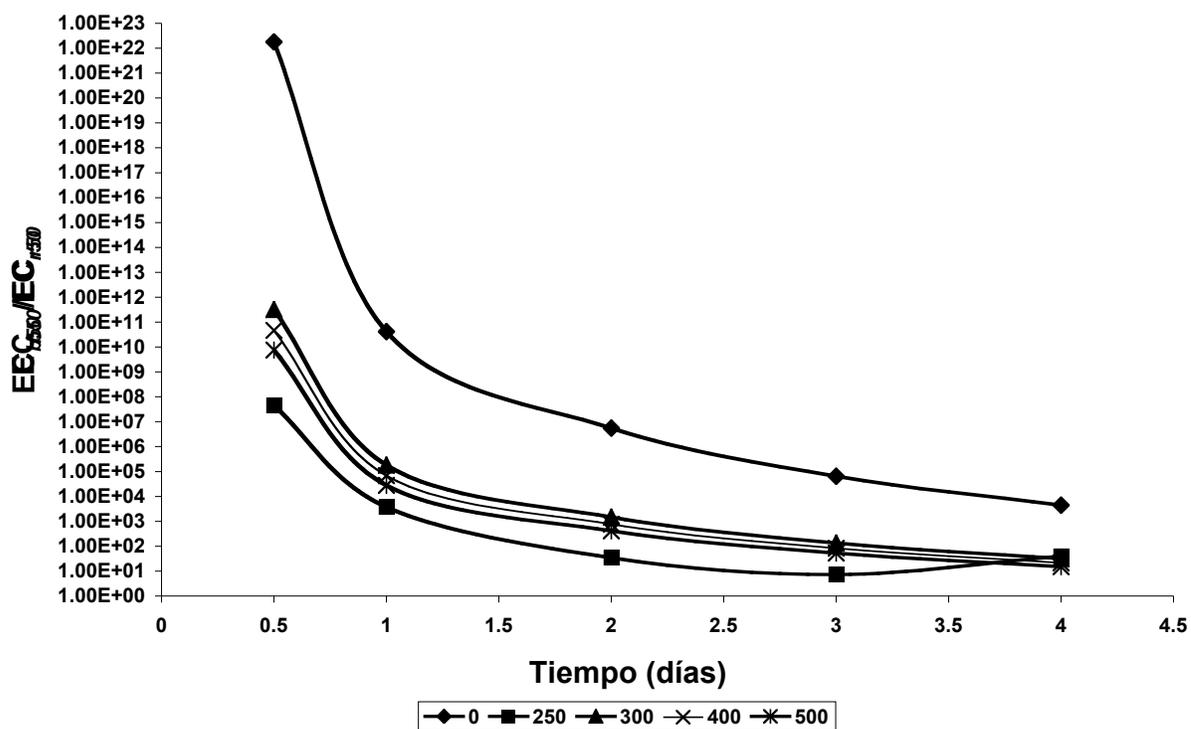


Fig. 7.5 Relación EC_{b50}/EC_{r50} en *Lemna gibba* expuesta a Boro (concentraciones en ppm).
Escala logaritmica, con un \square de 1. N=15

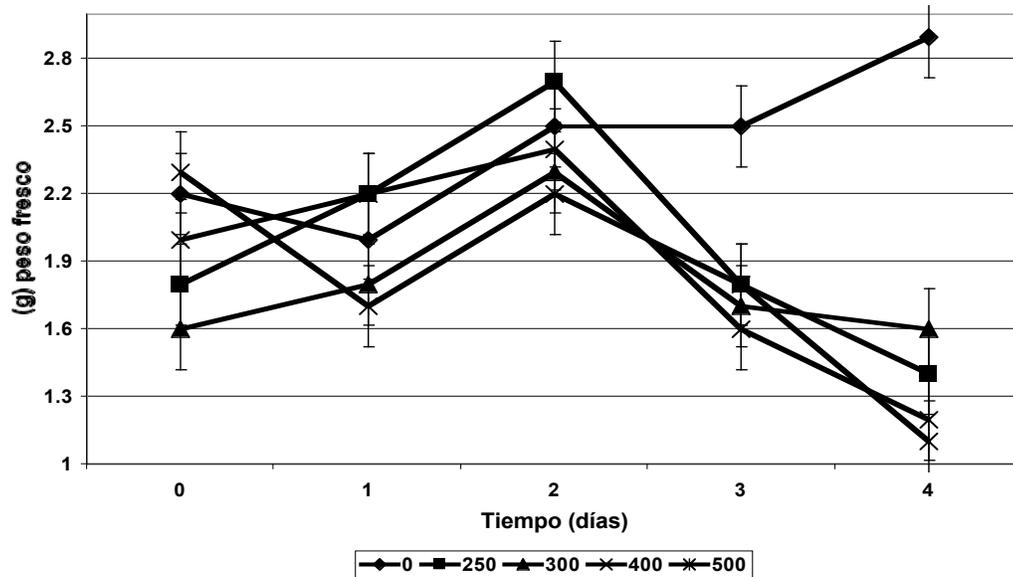


Fig. 7.6 Biomasa vs Tiempo en días de *Lemna gibba* expuesta a Boro (concentraciones en ppm).
N=15

Tabla 7.1 Parámetros cualitativos utilizados para medir el daño causado por boro en *L. gibba* a las 72 hrs de exposición.

Boro (ppm)	Número de plantas con daño			
	(%)			
	Clorosis	Necrosis	Pérdida de Raíz	Crecimiento de Raíz
0	5	8	15	Si
250	28	45	20	Si
300	33	50	16	No
400	31	62	16	No
500	32	58	10	No

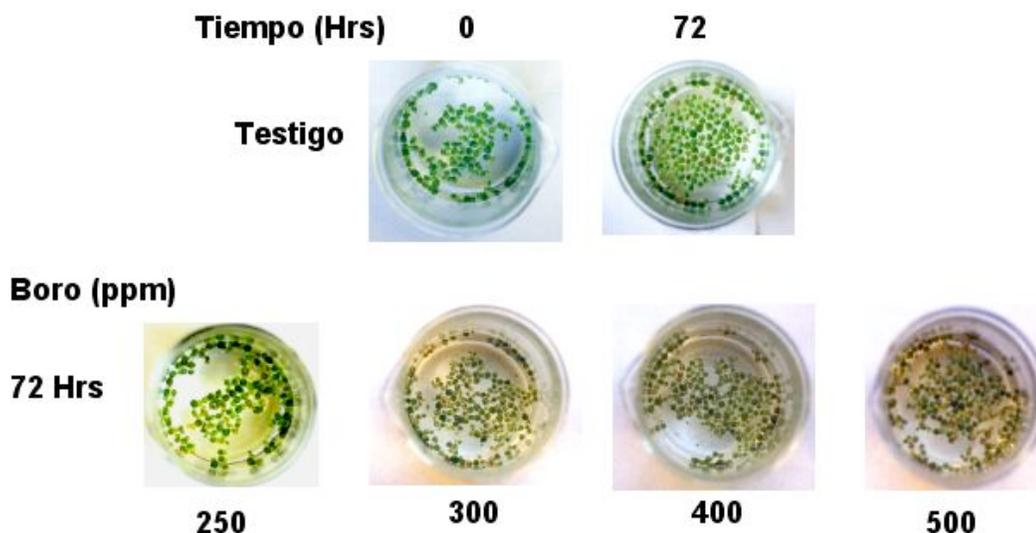


Figura 7.7 Características de *Lemna gibba* expuesta a distintas concentraciones de Boro. Correspondientes a la EC_{50}

7.5. Cuantificación de clorofilas totales

Se observa una disminución en la producción de clorofilas totales con respecto al tiempo de exposición y a la concentración de boro. Las concentraciones elevadas de boro produjeron un descenso en la cantidad de clorofilas desde el inicio del experimento y esto es más evidente en la concentración de 500 ppm (Fig. 7.8). En esta última concentración se presentó daño severo en las frondas en más de la mitad de la población de las muestras. Hasta el día 4 la clorofila de las plantas expuestas a las concentraciones de 20, 50 y 100 ppm mantuvieron valores cercanos al control. Entre el día 4 y el día 6 se observó una disminución en la producción de clorofilas con respecto al control (Fig. 7.8). Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza con un α de 0.05, seguido de una prueba de variables múltiples (Tamhne's). Esta prueba mostró diferencias evidentes entre los grupos experimentales y el control sobre todo en la concentración de 500 ppm. Mientras que en las concentraciones de 20, 50 y 100 ppm esta diferencia fue notable al aumentar el tiempo de exposición. Las desviaciones estándar correspondientes a la figura 7.8 se realizaron en una hoja de cálculo y resultaron ser muy pequeñas por lo que no se alcanzan a observar en la grafica.

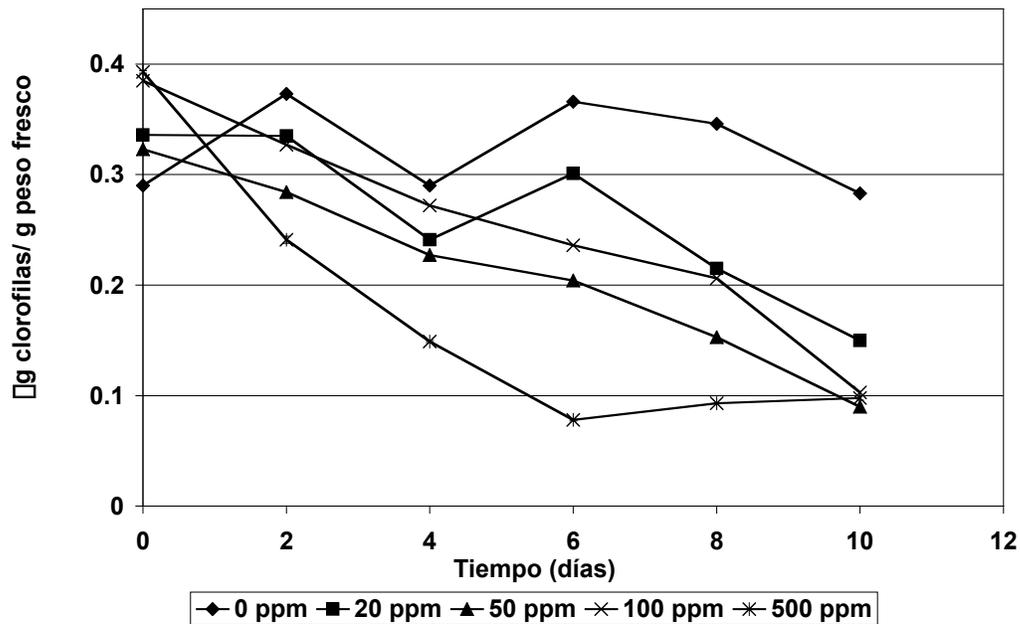


Figura 7.8. Producción de clorofila total vs tiempo en *Lemna gibba* expuesta a boro
N=15

En el Laboratorio de Cuencas Hidrológicas de la UAM-I *Lemna gibba* fue expuesta a plomo (Pb) en concentraciones de 50, 100, 200 y 300 mg/L. Como resultado disminuyeron sus niveles de almidón, clorofilas y proteínas totales, así mismo se presentó clorosis cuando en presencia de 300 ppm de plomo. Este estudio también demostró que *L. gibba* L. puede absorber metales pesados (Miranda y cols., 2000). Recientemente, el mismo grupo expuso a *L. gibba* L. a boro, y encontraron que la planta resiste concentraciones de hasta 10 ppm de boro, sin disminuir su contenido de clorofilas (Sánchez, 2000).

7.6. Extracción de proteínas del tejido vegetal

La extracción de proteínas se realizó mediante una modificación de la técnica propuesta por López (1991). La concentración promedio de proteínas obtenida de los extractos de *Lemna gibba* fue de 2.68 ± 0.12 mg de proteína / g de peso fresco de planta. No se presentaron diferencias significativas en el rendimiento de extracción entre los tratamientos y el control.

7.7. Separación de proteínas en electroforesis monodimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS)

A las 2 hr de exposición a boro no se observaron cambios importantes en el patrón electroforético de *L. gibba*, con excepción de una banda de 97 kDa en 300 ppm (Fig. 7.9 A). A las 4 hr de exposición se observó el incremento de tres bandas, de 45, 50 y 55 kDa en las concentraciones de 300 y 500 ppm en la concentración de 400 ppm el incremento de estas bandas es menor (Fig. 7.9B). Otro cambio importante se observó a las 8 hr en las concentraciones de 300 y 400 ppm en donde se sobre-expresó una banda de 55 kDa, una banda de 21kDa y una banda de 80 kDa en 300 y 400 ppm (Fig. 7.9 C).

Con 300 y 400 ppm de boro y 24 y 48 hrs de exposición, se observó que incrementaron su densidad relativa bandas de 14, 21, 45, 55 y 80 kDa (Fig. 7.10A). La banda de 14 kDa se observa únicamente en la concentración de 300 ppm (Fig. 7.10A). Las bandas de 14 y 21 kDa que se manifiestan en las concentraciones de 300 y 400 ppm podrían tratarse de las sHsps. Las bandas de 45-55 podrían corresponden a la Hsp 60. Finalmente la de 80 kDa podría ser una Hsp 70.

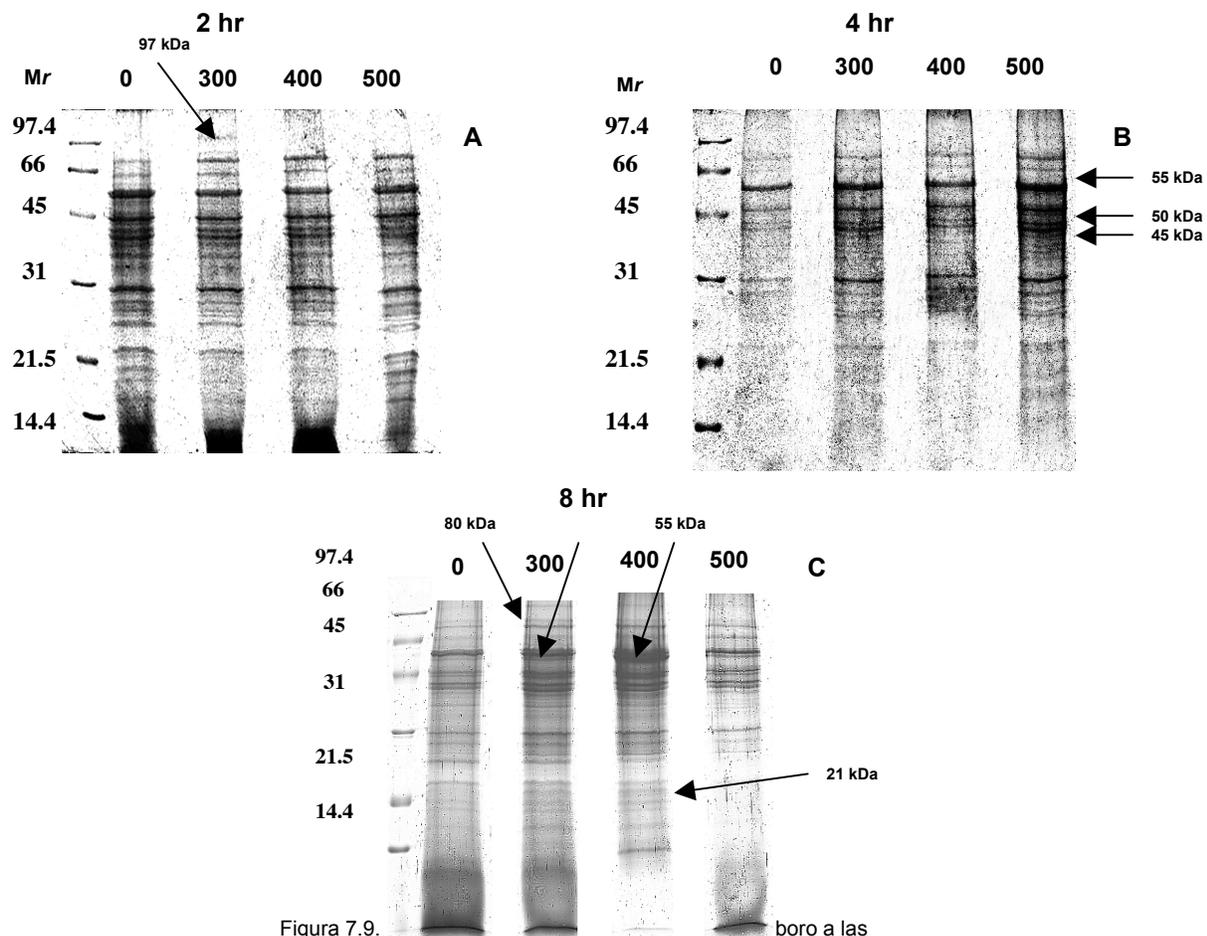


Figura 7.9. boro a las 2 (A), 4 (B) y 8 (C) hrs. Concentración de boro en ppm

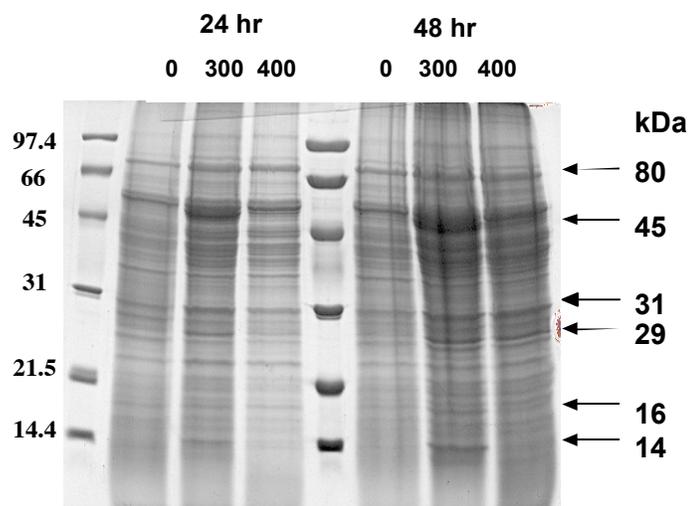
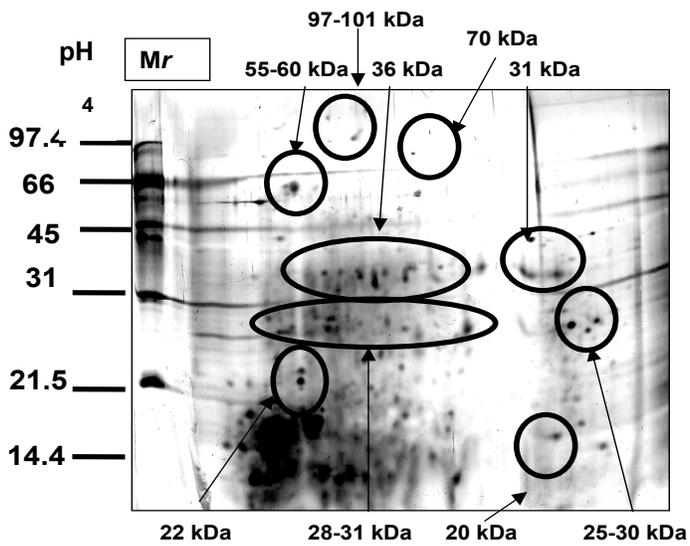


Figura 7.10 PAGE-SDS en *Lemna gibba* L. expuesta a boro a las 24 y 48 hr. Concentración de boro en ppm

7.8. Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS 2-D)

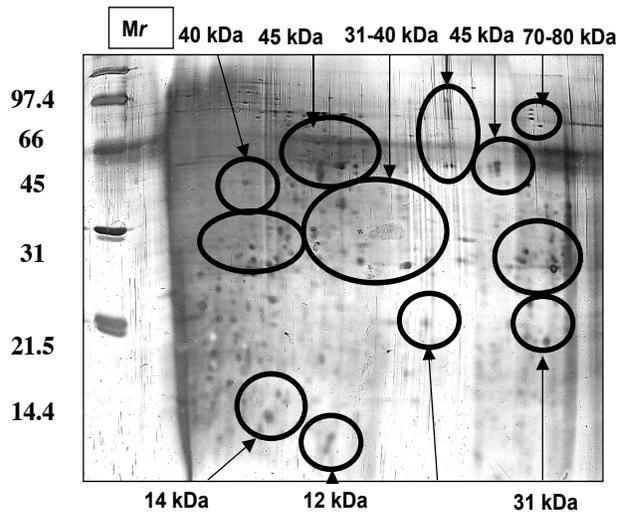
A las 48 hrs de exposición al boro se observó el incremento de proteínas de 14, 21, 25, 30 y de 40, 45 55, 60 y 80 kDa en las concentraciones de 300 y 400 ppm (Fig. 7.11 B y C). En el control aparece una proteína de 97 kDa y una de 101 kDa, que no se observaron en ninguno de los tratamientos (Fig. 7.11 A). En la concentración de 300 ppm se aprecia la sobre-expresión de un grupo de proteínas de 45 kDa, mientras que en la de 400 ppm no se observó el incremento de estas proteínas. Otro cambio importante de la concentración de 400 ppm es la aparición de proteínas de 14 y 25 kDa.



7

A) 0 ppm

B) 300 ppm



C) 400 ppm

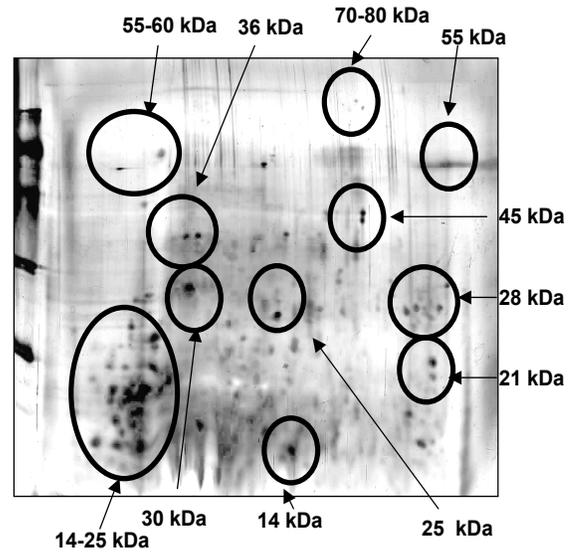


Fig. 7.11. Efecto del boro en los patrones bidimensionales de *Lemna gibba* L. a las 48 hr de exposición. A (plantas sin tratamiento) B y C (plantas con tratamiento)

Tabla 7.2. Proteínas de geles bidimensionales de *Lemna gibba* L. en 0, 300 y 400 ppm de Boro

kDa 0 ppm	P.I.	kDa 300 ppm (Boro)	P.I.	kDa 400 ppm (Boro)	P.I.
20	6.5	14	5.1	14	4.5-4.8
22	5	21	6.1	21	6.5
28	4.8-6.6	31	5.6-6.6	25	5.5
31	4.8-6.6	40	5.5	28	6.3-6.5
36	5-5.7	45	5.5-5.6	30	5
55	5	70	6.6	36	5
60	5	80	6.6	45	6
70	5.6			55	4.8-6.6
97	5.3			60	5
101	5.2			70	6
				80	5.9

En la tabla 7.2 se presentan los pesos moleculares en kDa de cada condición, así como sus puntos isoeléctricos. En el control se encontró mayor número de proteínas entre los 28 y 31 kDa con rango de pl entre 5 y 6. Para la concentración de 300 ppm se presentan proteínas desde 14 hasta 80 kDa con un rango de pl des 5 a 6.6. En la concentración de 400 ppm se presentaron un gran número de proteínas que abarcan puntos isoeléctricos desde 4.5 hasta 6.6. Las proteínas que se presentan para cada condición en los distintos pl se consideraron importantes debido a la desaparición o aparición de éstas para una condición distinta.

7.9. Marcaje y autoradiografía

Se observó un aumento en la síntesis de proteínas a las 3 hrs de exposición a boro, mientras que a las 9 hrs de exposición la síntesis disminuye en los grupos experimentales con respecto al control. (Figura 7.12 A y B) Aparentemente existe una síntesis de nuevas proteínas por presencia de boro al inicio del tratamiento, sin embargo, se presentaron muchas proteínas marcadas (Fig. 7.12 B), lo que al compararse con el patrón electroforetico de *L. gibba* en las mismas condiciones pero sin marca radioactiva mostró gran similitud en la síntesis de proteínas (Fig. 7.12 A), indicando así que muy probablemente no existe una marca selectiva. .

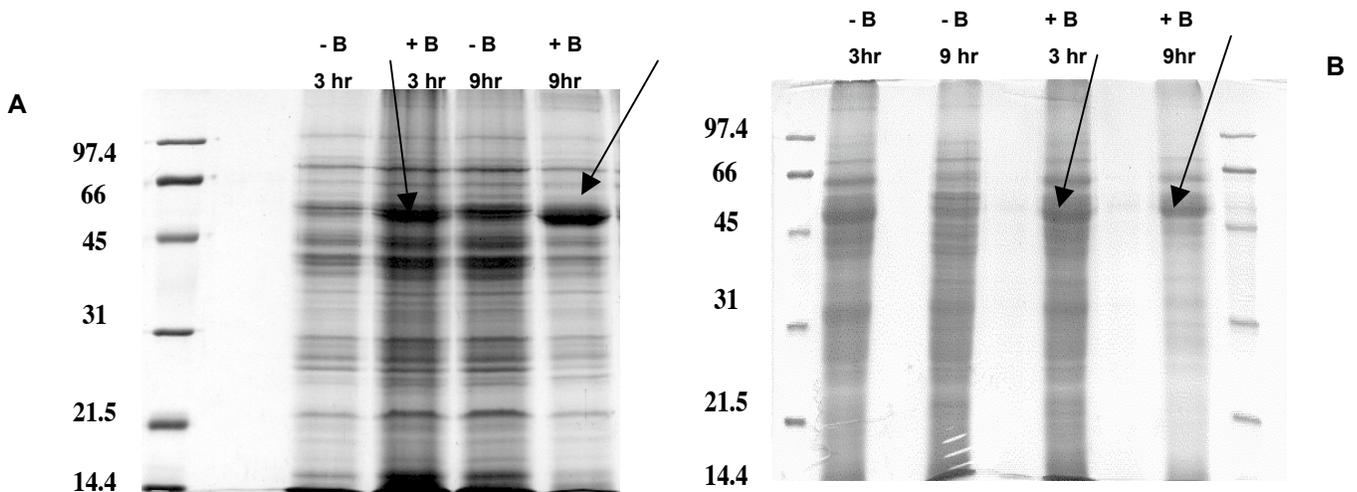


Figura 7.12 A. Electroforesis monodimensional de proteínas no marcadas de *L. gibba* expuesta a boro. Boro 300 ppm

Figura 7.12 B. Proteínas de *L. gibba* expuesta a boro marcadas con [³⁵S] metionina. Boro 300 ppm.

Como se observa en la figura 7.12 A y B, se sobre-expresan proteínas de 55 kDa en ambas condiciones.

La figura 7.13 muestra la incorporación específica de [³⁵S]-metionina (cuentas totales por minuto entre los mg de proteínas solubles totales) para cada condición. Se observó mayor incorporación en el tratamiento de 300 ppm al inicio y a las 9 horas de exposición al boro con respecto al control.

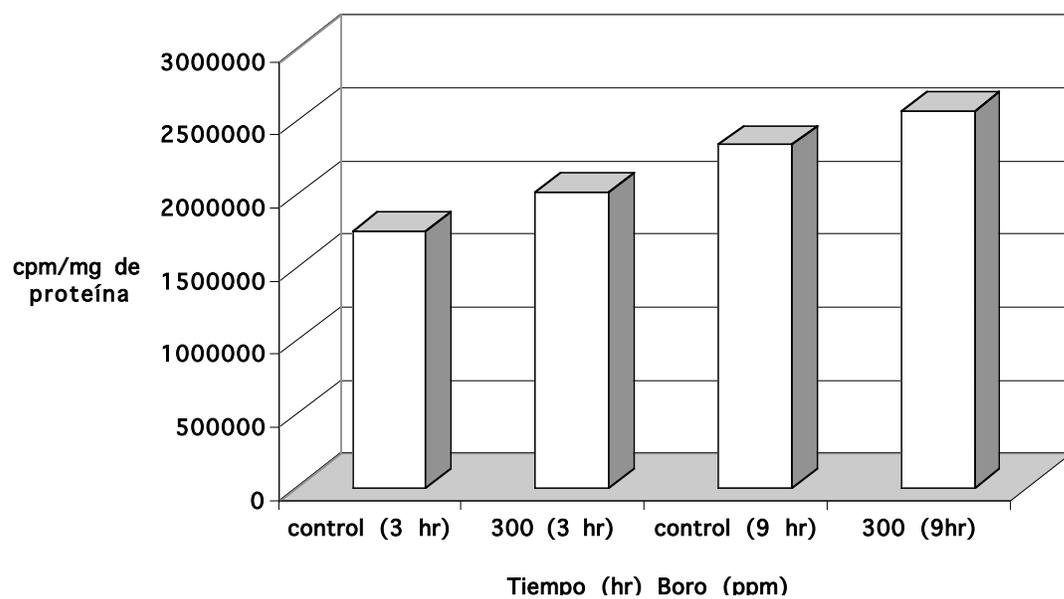


Figura 7.13 incorporación específica de [³⁵S] metionina de *Lemna gibba* L en presencia y ausencia de Boro.

8. DISCUSIÓN

8.1. *Crecimiento en medio AAP 20X*

El medio AAP 20X es recomendado para pruebas de toxicidad con plantas acuáticas. Sin embargo, se presentaron dificultades para su preparación debido a la rápida precipitación de macronutrientes, y a la dificultad para ajustar el pH. Las plantas aumentaron su biomasa, pero de acuerdo con lo observado y con lo revisado en la bibliografía los resultados obtenidos nos permitieron tomar la decisión de no utilizar el medio AAP 20X, el cual a pesar de ser aceptado por algunos autores ideal en el caso específico de *Lemna gibba*, también se ha reconocido que puede resultar difícil de controlar. (Sims y cols., 2000).

8.2. *Crecimiento en medio HOAGLAND*

En medio Hoagland se observó que al igual que en el medio AAP 20X el crecimiento de las plantas comenzó desde el inicio del experimento. La dilución que resultó más favorable para el crecimiento de *L. gibba* en medio Hoagland fue la de 1:20, ya que siempre se mantuvo por arriba de las otras dos concentraciones. En la dilución de 1:60 se observó una ligera disminución de la biomasa al día 7, pero esto no representó un daño para las plantas, ya que, aunque se observaron algunos bordes de las frondas dañados, estas no llegaron al 5% del total de las plantas.

Los antecedentes revisados acerca de los distintos medios nutritivos para macrofitas acuáticas, coinciden con respecto a que es relativamente fácil obtener un crecimiento satisfactorio y plantas saludables, así el medio Hoagland resulta adecuado para obtener plantas de *L. gibba* saludables lo cual se puede considerar óptimo para este tipo de pruebas (Wang, 1990). A pesar de que el tiempo de duplicación en este medio fue hasta el quinto día las plantas siempre se observaron más saludables que en el medio 20X AAP. Otras ventajas del medio Hoagland observadas durante el experimento fueron que las soluciones se pueden almacenar hasta por ocho meses sin presentar contaminación manteniéndolo en condiciones axénicas y un lugar fresco

siempre. Estos resultados fueron decisivos para seleccionar el medio de crecimiento más adecuado para *L. gibba*.

8.3. Relación entre la biomasa y velocidad de crecimiento de la concentración efectiva media ($EC_{b50/r50}$)

Con regularidad las pruebas de toxicidad pueden variar en sus resultados, debido a factores físicos (temperatura, humedad, tipo de suelo) y químicos (pH, salinidad) que difieren entre los métodos utilizados o bien a un control inadecuado de distintas variables aún cuando se utilice un mismo modelo experimental (Nyholm, 1990). Por esta razón se recomienda relacionar dos parámetros importantes en el caso de plantas acuáticas. El primero que es la EC_{b50} se refiere a la biomasa y el segundo que es la EC_{r50} se refiere a la velocidad de crecimiento. Esta relación permite determinar cual de los dos parámetros (biomasa o velocidad de crecimiento), proporciona la respuesta máxima de daño causado por el tóxico. Como se menciona en la pagina 32 los datos experimentales se ajustaron a la ecuación (1), a partir de los datos de biomasa en función del tiempo se obtuvo \square_m . Finalmente se utilizó un $\square = 1$ como parámetro de ajuste, el cual como se mencionó anteriormente puede variar desde 0.3 a 3, en el caso de plantas acuáticas en ensayos de toxicidad. Fuera de este rango los datos experimentales en pruebas de crecimiento en presencia de contaminantes que se acumulan en el agua no se pueden ajustar y por lo tanto no es posible observar diferencias entre grupos experimentales y grupos control. Lo que plantea Nyholm (1985) es que la estimación de la EC_{50} puede diferir al aumentar el tiempo de exposición, es por esto que tiempos cortos de exposición se observan mayores diferencias, ya que si el tiempo de exposición es prolongado ya no se estará midiendo únicamente una concentración efectiva media, sino una concentración letal que se influenciada por el tiempo de exposición (Fig. 7.6).

La relación de $EC_{b50/r50}$ indicó un comportamiento asintótico para todas las condiciones, lo que coincide con lo reportado en la bibliografía (Kallqvist y cols., 1980; Nyholm, 1990).

8.4. Contenido de clorofila total

La inhibición de la producción de clorofilas totales por presencia de boro es evidente en concentraciones de 100 y 500 ppm desde el inicio a la exposición, mientras que en las concentraciones de 20 y 50 ppm de boro va inhibiéndose paulatinamente al tiempo de exposición.

Las clorofilas son marcadores cuantitativos sensibles del daño de tóxicos sobre las plantas. La disminución en la producción de clorofila total por presencia de boro, aunque significativa, es menor que la que se observa por presencia de metales pesados (Miranda y cols., 2000) Los síntomas de clorosis fueron más evidentes en *L. gibba* se comenzaron a observar a los cuatro días de exposición al boro, a excepción de la concentración de 20 ppm que tuvo una recuperación el día 6, sin embargo, declinó en la producción de clorofilas al igual que las concentraciones de 50, 100 y 500 ppm (Fig. 7.8). Los cultivos tratados con boro presentaron daño en los márgenes de sus hojas que se manifestó inicialmente como una deshidratación seguida de clorosis; para las diluciones más altas la necrosis comenzó a los tres días de exposición al boro. Estos resultados sugieren que *Lemna gibba* es resistente a concentraciones de boro menores a 50 ppm, siempre y cuando la exposición no se prolongue más de una semana.

La toxicidad del boro varía mucho de una especie vegetal a otra. Por ejemplo, cultivos de cebada y trigo a los que se les ha suministrado cantidades de 15 ppm de H_3BO_3 , mantienen un crecimiento adecuado, sin embargo, al incrementar estas concentraciones desarrollan síntomas de toxicidad como clorosis en los bordes de las hojas y malformación de la raíz, que en consecuencia detiene su desarrollo (Nable, 1988).

8.5. Extracción de proteínas del tejido vegetal

Durante la extracción de proteínas de *L. gibba* L. fue difícil homogeneizar el tejido congelado con nitrógeno líquido. Posteriormente se analizaron algunos aspectos de la técnica de López y cols. (1991), en la que se apoyaron los primeros intentos de la extracción de las proteínas. Para controlar las pectinas, se cuidaron detalles que comenzaron desde la liberación casi total de agua de la muestra antes de ser

sumergida en nitrógeno líquido, para después y de inmediato ser congelada a - 70° C durante toda la noche y finalmente sumergirla por lo menos 3 minutos en nitrógeno líquido antes de ser homogenizada mediante nitrógeno y amortiguador de homogenización Tris-HCl pH 8.

Las pectinas son polisacáridos y sus moléculas forman la matriz en donde las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas y se unen de manera adyacente a las paredes celulares. Debido a sus cargas negativas las pectinas atrapan moléculas de agua dando como resultado una consistencia de gel que puede ser muy fluida o muy rígida, dependiendo de las propiedades físicas y químicas de las moléculas de las pectinas que estén presentes (Becker y cols., 2000).

L. gibba es una planta útil en la remoción de contaminantes que se acumulan en el agua, conocer las proteínas que expresa en situaciones de exposición a elementos tóxicos podría ser una prueba complementaria para el monitoreo ambiental. Esta planta es alimento complementario para especies de patos y bovinos por lo que se ha considerado como forraje. Se ha reportado que *Lemna gibba* es de alta calidad proteínica en contenido de hasta un 40% en peso seco. No hay una técnica totalmente adecuada para la extracción de las proteínas del tejido de *L. gibba*, o bien la literatura basada en el tema es relativamente poca y poco actualizada. Por otro lado las referencias más actualizadas no reportan la técnica de manera específica (Oron y cols., 1986; Landolt y Kandeler, 1987).

La técnica que se adaptó a los recursos y las necesidades del trabajo fue la propuesta por López y cols., (1991), en donde se analizan patrones bidimensionales en un complejo de mezclas proteínicas en plantas de Brócoli. Una vez modificada y adaptada la técnica, se obtuvieron extractos libres de ADN y pectinas que permitieron comparar distintos patrones electroforéticos de *L. gibba* en diferentes condiciones mediante geles monodimensionales y bidimensionales.

8.6. Electroforesis monodimensional de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Bajo condiciones normales, la mayoría de las sHsps no son detectables en tejidos vegetales, pero se producen rápidamente como respuesta a un choque térmico lo que indica una situación de estrés (Sun y cols., 2002). Todo esto depende de la temperatura y la duración del periodo de estrés (Howarth, 1990). Después de este periodo las sHsps se estabilizan llegando a tener una vida media de 30-50 hr, lo que sugiere que tienen un papel importante en la recuperación (Chen y cols., 1990; DeRocher y Vierling, 1994; Waters y cols., 1996). Una respuesta interesante en *L. gibba* ante la presencia del boro fue que presentó repetidas veces la expresión de las mismas proteínas cuando fue expuesta a 300 ppm, lo cual indica que su nivel de tolerancia a la presencia de boro es alto.

8.7. Marcaje y autoradiografía de proteínas recién sintetizadas

Se ha observado que 1 hr de marcaje de [³⁵S] metionina no es suficiente para producir la síntesis de polipeptidos de novo (Ferreira y cols., 1996). En nuestras condiciones experimentales la marca fue de 2 hrs y se observaron cambios en el patrón general de proteínas, sin embargo, la cantidad de proteínas marcadas no fue muy selectiva en el tiempo analizado. Aunque en las tres primeras horas de exposición al boro se observó una mayor síntesis de proteínas en los tratamientos que en el control a las nueve horas de exposición que finalizó el tiempo de marcaje, la tendencia en la síntesis de proteínas tanto de los controles como de los tratamientos fue muy similar (Fig. 7.12 B).

9. CONCLUSIONES

- En nuestras condiciones experimentales el tiempo mínimo de duplicación fue de 72 hrs y el máximo de 120 hrs. Esto se consideró satisfactorio.
- La EC_{50} de boro para *L. gibba* L se encontró en 300 ppm a las 72 hrs de exposición.
- La técnica de extracción de proteínas fue modificada y resultó ser adecuada para *Lemna gibba*.
- Los contenidos de clorofilas disminuyen paulatinamente en las plantas expuestas a boro y es inversamente proporcional a la concentración y tiempo de exposición.
- Los daños morfológicos observados en las plantas expuestas tuvieron una relación directa con el tiempo de exposición en todos los tratamientos.
- Se observaron cambios en la expresión de proteínas de las plantas expuestas.
- Se observó un aumento importante en algunas proteínas en las plantas tratadas con boro que podrían corresponder a Hsp de alto y bajo peso molecular.
- Se observaron diferencias en las manchas de proteínas separadas en electroforesis bidimensional en 300 y 400 ppm con respecto al control.
- Se observó un aumento de proteínas más expresadas en los geles de los tratamientos. Así como la aparición y la desaparición de proteínas para cada condición.
- Las electroforesis bidimensional mostraron la sobre-expresión de un grupo de proteínas de 45 kDa en la concentración de 300 ppm, mientras que en la concentración de 400 ppm no se observó el incremento de este grupo de proteínas, pero sí la aparición de proteínas de 14 y 25 kDa.
- Aparecen proteínas de bajo peso molecular de entre 22 y 31 kDa en las proteínas de las plantas tratadas con boro.
- Se observaron proteínas de 70-80 kDa en el tratamiento de 400 ppm
- Se observó un aumento en la síntesis de proteínas a las 3 hrs de exposición a boro, mientras que a las 9 hrs de exposición la síntesis disminuye en los grupos experimentales con respecto al control.

- Aparentemente existe una síntesis de nuevas proteínas por presencia de boro al inicio del tratamiento, sin embargo, no se observó una marca selectiva en el tiempo analizado.

10. REFERENCIAS

- Allison, L E (1964). Salinity in relation to irrigation. *Adv. Agron.* **16**: 139-180.
- Anderson, D L, Kitto, M E, McCarthy, L y Zollar, W H (1994). Sources of atmospheric distribution of particulate and gas phase boron. *Atmos Environ* **28**: 1401-1410.
- Armienta, M A y De la Cruz-Reyna, S (1995). Some hydro-geochemical fluctuations observed in Mexico related to volcanic activity. *App Geochem* **10**: 215-227.
- Armienta, M A, De la Cruz-Reyna, S y Macías, J L (2000). Chemical characteristics of the crater lakes of Popocatepetl, Elchichon, and Nevado de Toluca volcanoes, Mexico. *J Volcanol Geothermal Res* **97**: 105-125.
- Armienta, M A, Varley, N y Ramos, E (2002). Radon and hydrogeochemical monitoring at Popocatépetl volcano, Mexico. *Geofísica Internacional* **41 (3)**: 271-276.
- Arnon, D (1949). Copper enzyme in isolate chloroplast. Polyphenoloxidase in (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol* **24**: 1-15.
- Asby, E (1935). An analysis of the influence of light and temperature on the assimilation rate and the rate of multiplication. *Ann Bot* **49**: 309-336.
- ATSDR (1992). Toxicological profile for boron. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. In: IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1998. Environmental Health Criteria 204. Boron. World Health Organization. Geneva.
- Aulio, K y Salin, M (1982). Enrichment of copper, zinc, manganese and iron in five species of pondweeds *Potamogeton* spp. *Bull Environ Contam Toxicol* **29**: 320-325.
- Bargalló, M (1972). Tratado de Química Inorgánica. México, Porrúa S.A.
- Becker, W, Kleinsmith, L y Hardin, J (2000). The World of the Cell. New York, N. Y.
- Benson, W H y Birge, W J (1985). Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows: Result from field and laboratory experiments. *Environ Toxicol Chem* **4**: 209-217.

- Blevins, G D y Lukaszewski, M K (1998). Boron in Plant Structure and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 481-500.
- Bonilla, I, Garcíá-González, M y Mateo, P (1990). Boron requirement in cyanobacteria. Its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. *Plant Physiol* **94**: 1554-1560.
- Bonilla, I, Mergold-Villasenor, C, Campos, M E, Sanchez, N, Perez, H, Lopez, L, Castrejon, L, Sanchez, F y Cassab, G I (1997). The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins. *Plant Physiol* **115**: 1329-40.
- Bonner, J y Joseph, E (1976). *Plant Biochemistry*. New York, N.Y., Academic Press.
- Boston, R S, Viitanen, P V y Vierling, E (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* **32**(1-2): 191-222.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Ann Biochem* **72**: 248-254.
- Bundschuh, J (1992). Boron contamination of the ground and surface waters of Lerma Valley, Argentina. *J Water SRT Aqua* **41 (1)**: 13-17.
- Camacho, E, Fuente, M y Rodríguez, M (2003). Toxicidad del Boro en las Plantas. En: *Ingeniería Química Universidad de Coruña*. Universidad Politécnica de Madrid.
- Carranco, J, Almoguera, C y Jordano, J (1997). A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *Biol Chem* **272**: 274-283.
- Charpentier, S, Garnier, J y Flaugnatti, R (1987). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in experimental cultures of duckweed, *Lemna polyrrhiza* L. *Bull Environ Contam Toxicol* **38**: 1055-1061.
- Chauhan, R P y Powar, S L (1978). Tolerance of wheat and pea to boron in irrigation water. *Plant and Soil* **50**: 145-149.

- Chen, Q, Lauzon, L M, DeRocher, A E y Vierling, E (1990). Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat shock protein. *J Cell Biol* **10**: 1873-1883.
- Chesworth, W (1991). Geochemistry of micronutrients. Micronutrients in Agriculture. Mortvedt, J J, Cox, F, Shuman, L M y Welch, R M. Madison, WI, USA, Soil Sci Soc Am: 1-30.
- Chigbo, F E, Smith, R W y Shore, F L (1982). Uptake of arsenic, cadmium, lead and mercury from polluted waters by the water hyacinth *Eichhrnia crassipes*. *Environ Pollution* **27**: 31-36.
- Culley, D D y Epps, E A (1973). Use of duckweed for water treatment and animal feed. *J Wat Pollution* **45**: 337-347.
- Dchankhar, D P y Dahiya, S S (1980). The effect of different levels of boron and soil salinity on the yield of dry matter and its mineral composition in Ber (*Zizyphus rotundifolia*) In. *Symp on Salt Affect Soils*. Karnal, India. : 396-403.
- De la Fuente, M (2000). Diseño y desarrollo de un sistema de tratamiento para la eliminación de boro en vertidos industriales, Universidad Politécnica de Madrid.
- DeRocher, A E y Vierling, E (1994). Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J* **5**: 93-102.
- Dix, D J, Allen, J W, Collins, B W, Poorman-Allen, P, Mori, C, Blizard, D R, Brown, P R, Goulding, E H, Strong, B D y Eddy, E M (1997). HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* **124**: 4595-603.
- Domínguez, A (1988). Los microelementos en la agricultura. Ediciones Mundiprensa.
- Donati, Y R, Slosman, D O y Polla, B S (1990). Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol* **40**: 2571-7.
- Downs, C A y Heckathorn, S A (1998). The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett* **430**: 246-50.

- Downs, C A, Jones, L R y Heckathorn, S A (1999). Evidence for a novel set of small heat-shock proteins that associates with the mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH:ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **365**: 344-50.
- Dubois, M F y Bensaude, O (1993). MAP kinase activation during heat shock in quiescent and exponentially growing mammalian cells. *FEBS Lett* **324**: 191-5.
- Duncan, D A y Klaverkamp, J F (1983). Tolerance and resistance to cadmium in white sucker (*Catostomus commersoni*) previously exposed to cadmium, mercury, zinc, or selenium. *Canad J Fish* **40**: 128-138.
- Duran, S (2000). Remoción de cadmio y boro por *Lemna gibba* L. Biología. México, D.F., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco: 25-26.
- Fossi, M C y Leonzio, C (1994). *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Francois, L E (1984). Effect of excess boron on tomato yield, fruit size and vegetative growth. *J Am Soc Hort Sci* **109**: 322-324.
- Garcíá-González, M, Mateo, P y Bonilla, I (1991). Boron requirement for envelope structure and product Anabaena PCC7119 heterocysts. *J Exp Bot* **42**: 925-929.
- Georgopoulos, C y Ang, D (1990). The *Escherichia coli* groE chaperonins. *Semin Cell Biol* **1**: 19-25.
- González-Márquez, H, Perrin, C, Bracquart, P, Guimont, C y Linden, G (1997). A 16kDa protein family overexpressed by *Streptococcus thermophilus* PB18 in acid environments. *Microbiology* **143**: 1-8.
- Gragerov, A, Nudler, E, Komissarova, N, Gaitanaris, G A, Gottesman, M E y Nikiforov, V (1992). Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10341-4.
- Gupta, U C, Jame Y.W., Cambell, A J y Nicholaichuk, W (1985). Boron Toxicity and Deficiency: A Review. *Can J Soil Sci* **65**: 381-409.

- Heckathorn, S A, Downs, C A, Sharkey, T D y Coleman, J S (1998). The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol* **116**: 439-444.
- Helm, K W, LaFayette, P R, Nagao, R T, Key, J R y Vierling, E (1993). Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. *Mol Cell Biol* **13**: 238-247.
- Helm, K W, Schmeits, J y Vierling, E (1995). An endomembrane-localized small heat-shock protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**: 287-288.
- Hendrick, J P y Hartl, F U (1993). Molecular Chaperone Functions of Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Biochem* **62**: 349-384.
- Hightower, L E (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-197.
- Howarth, C (1990). Heat shock proteins Sorghum bicolor Pennisetum americanum. II. Stored RNA in sorghum seed and relationship to heat shock protein synthesis during germination. *Plant Cell Environ* **13**: 51-64.
- Howarth, D J y Skot, K P (1994). Detailed characterization of heat shock protein synthesis and induce thermotolerance in seedling of *Sorghum bicolor* L. *J Exp Bot* **45**: 1353-1363.
- Huggett, R J, Kimerle, R A, Mehrle, J P M y Bergman, H L (1992). Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Huheey, J (1978). Química Inorgánica, Principios de estructura y reactividad. Segunda Edición. México, HARLA.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1998). Environmental Health Criteria 204 Boron. Geneva, World Health Organization.
- James, P, Pfund, C y Craig, E A (1997). Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* **275**: 387-9.
- Jiménez, B, Chavez, A y Barrios, E (1997). Estudio de la Calidad y Suministro del Agua para Consumo Doméstico en el Valle del Mezquital, Instituto de Ingeniería, UNAM.

- Johan, G E A (2000). Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* **153**: 61-72.
- Johnson, S L y Smith, K W (1976). The interaction of borate and sulfite with pyridine nucleotides. *Biochemistry* **15**: 553-559.
- Kallqvist, T, Ormerod, K y Sortkjaer, O (1980). Ring test med metoder for mikroorganismer. Report no. 15. Ecotoxicological Methods for Aquatic Environments. Nordic Cooperative Organization for Applied Research, Helsinki, Finland.
- Kang, H S, Kim, C R, Hah, J C y Kim, H D (1995). Biochemical characterization of glucose-regulated proteins, grp94 and BiP/grp78. *Korean J zool* **38**: 167-176.
- Klann, E y Shelton, K R (1989). The effect of lead on the metabolism of nuclear matrix protein which becomes prominent in lead-induced intranuclear inclusion bodies. *J Biol Chem* **264**: 16969-16972.
- Laemmli, U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LaFayette, P R, Nagao, R T, O'Grady, K y Vierling, E (1996). Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Mol Biol* **30**: 159-169.
- Landolt, K y Kandeler, R (1987). The family of Lemnaceae ----a monography study. Veroff. Geobot. Inst. ETH. Stiftung Rubel, Zurich 95, Heft **2**.
- Larsen, L A (1988). Boron. In: Seiler, H.G. and Sigel, H. ed. Handbook on toxicity of inorganic compounds. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc.,: 129-141.
- Lee, G J, Roseman, A M, Saibil, H R y Vierling, E (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J* **16(3)**: 659-671.
- Lemnatest, V f e I C E z (2000). Duckweed growth inhibition test; Determination of the nonpoisonous effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*, *Lemna gibba*). Würselen, Germany, Lemna Norm E Oberabeiltet.
- Lenne, C y Douce, R (1994). A Low Molecular Mass Heat-Shock Protein Is Localized to Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol* **105**: 1255-1261.

- Lindquist, S L (1986). The heat shock response. *Ann Rev Biochem* **55**: 1151-1191.
- Lomniczi, I, Musso, H y Pereyra, R (1997). Assessment of boron concentration in surface and groundwater in the Lerma and Calchaquí valleys (Province of Salta, Argentina). *Ans Asoc. Quím. Arg* **85 (5/6)**: 283-293.
- Loomis, W D y Durst, R W (1992). Chemistry and Biology of Boron. *Biofactors* **3**: 229-39.
- López, M F y Palton, W F (1991). Preparative 2-D Electrophoresis, MCLC Purification and Amino Acid Sequencing of Plant Proteins. Proceedings of the Internatina Meeting on 2-D Electrophoresis, London July 16.
- Malik, M K, Slovin, J P, Wwang, C y Zimmerman, J L (1999). Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, HSP17.7 results in increased or decrease thermotolerance. *Plant J.* **20**: 1-11.
- Marschner, H (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. U.S.A, Academic Press.
- Martínez, J L, De la Fuente, M M y Muñoz, E (1999). El boro en los vertidos industriales. *Ingeniería Química* **9**: 163-169.
- Mass, E V (1984). Salt Tolerance of plantas. Hadbook of Plant Science in Agriculture. B.R. Christie CRC Press, Boca Raton, Florida.
- McCarthy, J F y Shugart, L R (1990). Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Merck, K B, Groenen, P J, Voorter, C E, de Haard-Hoekman, W A, Horwitz, J, Bloemendal, H y de Jong, W W (1993). Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J Biol Chem* **268**: 1046-52.
- Merck, K B, Horwitz, J, Kersten, M, Overkamp, P, Gaestel, M, Bloemendal, H y de Jong, W W (1993). Comparison of the homologous carboxy-terminal domain and tail of alpha-crystallin and small heat shock protein. *Mol Biol Rep* **18**: 209-15.
- Miranda, G, Quiroz, A y Salazar, M (2000). Cadmium and lead removal from water by the duckweed. *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). *Hidrobiológica* **10 (1)**: 7-12.

- Miranda, M G (1998). Estudio sobre absorción de plomo por *Lemna gibba* cambios bioquímicos básicos. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias. México, D.F., UNAM: 91-93.
- Miranda, M G, Quíroz, A y Salazar, M (2000). Cadmium and lead removal from water by the duckweed. *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). *Hidrobiológica* **10**(1): 7-12.
- Morimoto, R I, Tissieres, A y Georgopolos, C (1990). Stress Proteins in Biology and Medicine. Stress-Inducible Cellular Responses. Feige, U, Morimoto, R I, Yahara, I y Polla, B S. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mosso, A (2002). Respuestas de toxicidad en *Lemna gibba* L. México, D.F., Depto. Biología, Universidad Autónoma Metropolitana: 50.
- Nable, R O (1988). Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars. a preliminary examination of the resistance mechanism. *Plant and Soil* **112**: 45-57.
- Nable, R O, Bañuelos, G S y Paull, J G (1997). Boron toxicity. *Plant and Soil* **193**: 181-198.
- Nyholm, N (1985). Response variable in algal growth inhibition test biomass or growth rate? . *Wat Res* **19**: 273-279
- Nyholm, N (1990). Expression of results from growth inhibition toxicity tests with algae. *Arch Environ Contam Toxicol* **19**: 518-522.
- O'Farrell, P H (1975). High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- O'Farrell, P Z, Goodman, H M y O'Farrell, P H (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**: 1133-1142.
- Oron, G, Porath, D y Wildschut, L R (1986). Watewater Treatmet and Renovation by Different Duckweed Species. *Journal of Environ Eng* **112 (2)**: 247-263.
- Ougham, H J y Howarth, C J (1988). Temperature shock proteins in plants. *Symp Soc Exp Biol* **42**: 259-280.

- Parsell, D A, Kowal, A S, Singer, M A y Lindquist, S (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478.
- Parsell, D A y Lindquist, S (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance. Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496.
- Pérez, L, Aguilar, R, Pérez-Méndez, A y Sánchez de Jiménez, E (1990). Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiol* **94**: 1270-1275.
- Pilbeam, D J y Kirkby, E A (1983). The physiological role of boron in plants. *J Plant Nutr* **6**: 563-582.
- Queitsch, C, Hong, S, Vierling, E y Lindquist, S (2000). Heat Shock Protein 101 Plays a Crucial Role in Thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 479-492.
- Ramón, A M, Carpena-Ruíz, R O y Gárate, A (1990). The effects of short-term deficiency of boron on potassium, calcium and magnesium distribution in leaves and roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. Plant Nutrition Physiology and Application. van Beusichem, M L. Dordrecht, Kluwer Academic: 287-290.
- Reschke, E, Baumann, G y Schoffl, F (1988). Nucleotide sequence analysis of soybean small heat shock protein genes belonging to two different multigene families. *J Mol Biol* **199**: 549-557.
- Ritosa, A (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**: 571-573.
- Ryan, J A y Hightower, L E (1996). Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. Stress Inducible Cellular Responses, Feige, U. Morimoto, R.I.; Yahara, I.; Polla, B.S.; **77**: 411-24.
- Salisbury, F B y Ross, C W (1994). *Fisiología Vegetal*. México, D.F., Iberoamericana.
- Sánchez, J (2001). Comunicación personal. Tapachula, Chis.
- Sánchez, M (2000). Efectos de toxicidad por boro en *Lemna gibba* L. México, D.F., Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa: 46.

- Sánchez, Y, Taulien, J, Borkovich, K A y Lindquist, S (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357-2364.
- Sanders, B (1990). Stress Proteins: potenciales multitiered biomarkers. In JF. McCarty y L.R. Shugart (Eds): Biomarkers o environmental Contamination, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida: 165-192.
- Scharf, K D, Diddique, M y Vierling, E (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress protein and a new family of protein containing alpha-crystallin domain (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones* **6**: 225-237.
- Schlesinger, M J (1990). Heat Shock proteins. *J Biol Chem* **265**: 12111-12114.
- Schoffl, F, Prandl, R y Reindl, A (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol* **117**: 1135-1141.
- Sims, I, Whitthouse, P y Lacey, R (2000). The OECD Lemna growth inhibiton test. USEPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- Solomon, J M, Rossi, J M, Golic, K, McGarry, T y Lindquist, S (1991). Changes in hsp70 alter thermotolerance and het shock regulation in *Drosophila*. *New Biol* **3**: 1106-1120.
- Sprague, R W (1972). The ecological significance of boron. Anaheim, California, U.S. Borax Research Corporation. : 58.
- Subjeck, J R y Thug-Tai (1986). Stress protein synthesis of mammalian cells. *Am J Physiol* **250**: 1-17.
- Sun, W, Montagu, V y Verbruggen, N (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1577**: 1-9.
- Teasdale, R D y Richards, D K (1990). Boron deficiency in cultures pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg. *Plant Physiol* **93**: 1071-1077.
- Vierling, E (1991). The roles of the heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **42**: 579-620.
- Wang, W (1990). Literature Review on Duckweed Toxicity Testing. *Environ Res* **52**: 7-22.

- Waters, E R (1995). The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**(2): 785-95.
- Waters, E R, Lee, G J y Vierling, E (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Biol* **47**: 325-338.
- Weast, R C, Astle, M C y Beyer, W H (1985). IPCS (International Programme on Chemical Safety). 1998. Environmental Health Criteria 204. Boron. World Health Organization. CRC Handbok of Chemistry and Physics. Geneva, CRC Press, Inc.: 77-129.
- Welch, W J (1990). The Mammalian Stress Response. *Cell Physiology and Biochemistry of Stress Proteins*. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Weldon, L W, Blackburn, R H y Harrison, S D (1973). *Common aquatic weeds*. New York, Dover Publications Inc.
- Welte, M A, Dellavalle, R P y Lindquist, S (1993). A new method for manipulating transgenes: Engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Curr Biol* **3**: 842-853.
- Wieining, S, Montagu, M V y Verbruggen, N (2002). Small heat shock proteins and stress toleance in plants. *Bioch Bioph Acta*: 1-9.

11. ANEXOS

MEDIO AAP 20X

Reactivos	mg/L de medio
NaHCO ₃	230.2
K ₂ HPO ₄	9.38
MgSO ₄	38.22
NaNO ₃	84
MgCl ₂ .6H ₂ O	58.08
CaCl ₂	24.04
H ₃ BO ₃	0.649
MnCl ₂ .4H ₂ O	2.3075
ZnCl ₂	0.0314
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0071
CuCl ₂ .2H ₂ O	.08 µg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0576
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.661
Na ₂ EDTA	.3

MEDIO Hoagland

Reactivos	mg/L de medio
Macronutrientes	
K ₂ HPO ₄	13.6
MgSO ₄	24.6
Na ₂ EDTA	3.72
KNO ₃	10.1
Ca(NO ₃)	23.6
Micronutrientes	
MnCl ₂ .4H ₂ O	.18
CaCl ₂ .2H ₂ O	.005
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	.002
ZnCl ₂	.01
H ₃ BO ₃	.28

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 8 de diciembre del 2003.

Dra. Ma. Guadalupe Miranda Arce
Presidente

Dr. Humberto González Márquez
Secretario

Dra. Patricia Ramírez Romero
Vocal

Dra. Laura Pérez Flores
Vocal

Dr. Agustín Quiroz Flores
Vocal