

MARCADORES MOLECULARES DE ESTRÉS OXIDATIVO COMO CRITERIO ECOTOXICOLÓGICO EN RAÍCES DE *ALLIUM CEPA* EXPUESTAS A AGUAS CONTAMINADAS DEL ESTUARIO DEL RÍO COJÍMAR

Karel Mena-Ulecia¹, Dailen Guanche² y Heykel Hernández¹

¹ Vicedirección de Medio Ambiente, Instituto de Geografía Tropical, Calle F #No. 302 e/ 13 y 15, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba, Teléfono: (537) 832-1108, E-mail: karel@geotech.cu; orula.endule@gmail.com

² Laboratorio de Biomedicina, Centro de Investigaciones del ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Calle 15 y 230, Reparto Flores, Playa, Teléfono: (537) 271- 2324, E-mail: dailen.guanche@cnic.edu.cu

RESUMEN

Se midieron los parámetros hidroperóxidos totales (HPT) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) como marcadores de peroxidación lipídica, la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) (EC1.11.1.6) y superóxido dismutasa (SOD) (EC1.15.1.1), así como el glutatión reducido (GSH) y los grupos tiólicos protéicos (GTP), en raíces de *Allium cepa* L expuestas a las aguas contaminadas de la zona estuarina del río Cojímar, como criterio ecotoxicológico. Los HPT y las SRATB estuvieron elevadas en la estación-5. La actividad de la CAT y la SOD se mantuvieron bajas lo que indica la inhibición de la actividad de estas enzimas. Un comportamiento diferente fue el encontrado para el GSH y los GTP, los cuales se mantuvieron elevados en las estaciones 5 y 6, lo que indica un elevado poder oxidante en la zona objeto de estudio. Esta investigación demostró la utilidad del modelo *Allium cepa* en la medición del estrés oxidativo en estudios ecotoxicológicos.

Palabras clave: *Allium cepa*, estrés oxidativo, contaminación del agua, ecotoxicología.

ABSTRACT

We measured the parameters total hydroperoxides (HPT) and thiobarbituric acid reactive substances (SRATB) as markers of lipid peroxidation, catalase (CAT) (EC1.11.1.6) and superoxide dismutase (SOD) (EC1.15.1.1) activity, as well as, glutathione (GSH) and thiolic protein groups (GTP), in roots from *Allium cepa* exposed to water polluted of the coastal zone from Cojímar river, as ecotoxicology criteria. The HPT and SRATB were increased into sampling point 5. The CAT and SOD activities did not show a pronounced increased, indicating the inhibition of these enzymes. A different behaviour we founded in the GSH and GTP parameters, which were risen in the stations 5 and 6, indicating a high oxidant power in the area. This investigation demonstrated the utility of the *Allium cepa* model in the oxidative stress measurement in ecotoxicology studies.

Keywords: *Allium cepa*, oxidative stress, water pollution, ecotoxicology.

INTRODUCCIÓN

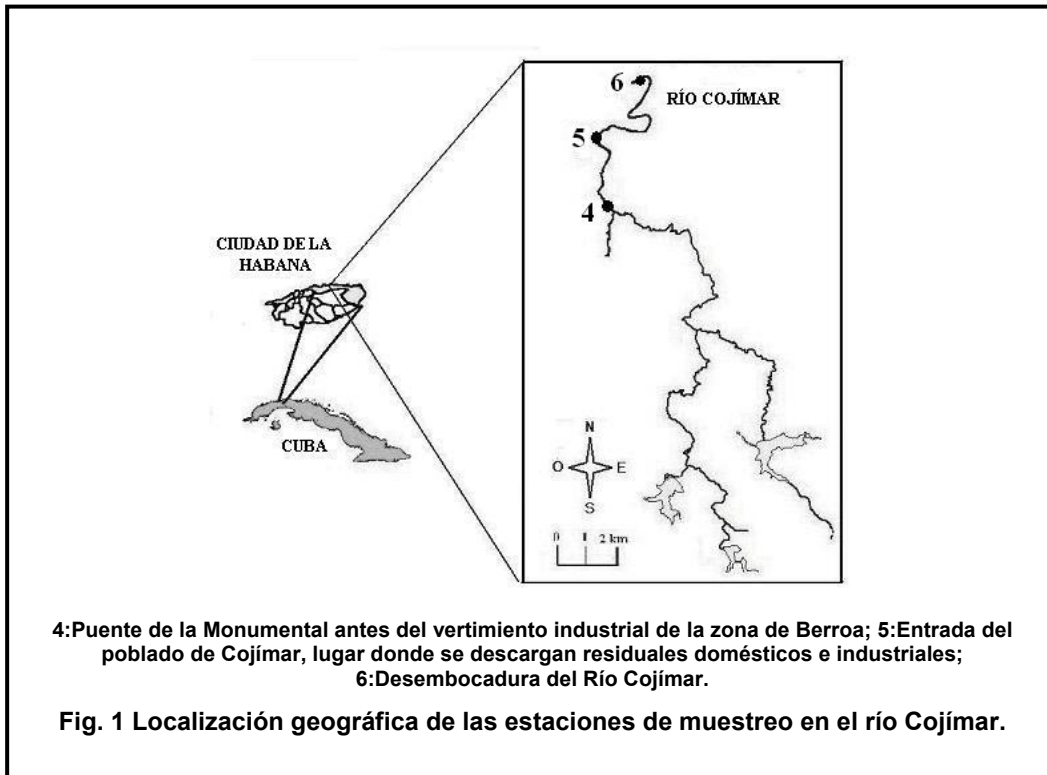
La medición de algunos marcadores moleculares como indicador de la respuesta bioquímica ante los contaminantes ambientales, puede servir para mejorar la valoración de las exposiciones biológicamente importantes frente a químicos tóxicos y a su vez aumentar la habilidad de tasar el riesgo de sus efectos sobre la salud de las poblaciones expuestas, (Fatima y Ahmad, 2005) en tal sentido la determinación de marcadores de estrés oxidativo en plantas expuestas a varios ambientes contaminados es una práctica que viene desarrollándose desde décadas pasadas. (Somasekariah *et al.*, 1992; Vitoria *et al.*, 2001; Fatima y Ahmad, 2005; Mohan *et al.*, 2008) Bulbos de *Allium cepa* L han sido empleados como modelos biológicos en la medición del impacto de la contaminación a través de marcadores pro-oxidante y antioxidante, demostrando su efectividad para estos fines (Fatima y Ahmad, 2005; Mohan *et al.*, 2008).

En Ciudad de La Habana existen varias industrias que vierten sus residuales a ríos de interés como es el caso del río Cojímar, en su mayoría sin tratamiento previo, con compuestos que pudieran generar alteraciones en el estatus redox de las especies que lo habitan, fundamentalmente en la desembocadura, la cual es utilizada como lugar de baño, riego y pesca, por los pobladores de la zona, por lo que se realizó este trabajo el cual tiene como objetivo fundamental: evaluar los niveles de estrés oxidativo de las aguas contaminadas del estuario del río Cojímar mediante una batería de marcadores moleculares de estrés oxidativo, en raíces expuestas de *Allium cepa* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estaciones de Muestreo

Se seleccionaron 3 estaciones de muestreo (Fig. 1), las cuales se corresponden al tercio inferior del río Cojímar (Estaciones 4, 5 y 6), puesto que es la zona del río con mayores vertimientos de aguas residuales correspondientes a la zona industrial de Berroa y aguas albañales procedentes de la comunidad Camilo Cienfuegos. Las muestras de agua fueron colectadas en los meses de enero, febrero, abril, mayo y julio de 2008, entre las 8:00 a.m. y las 12:00 M., indistintamente. En cada punto, de manera simultánea, se colectaron muestras de diferentes volúmenes dependiendo de las mediciones a realizar.



Marcadores moleculares de estrés oxidativo en *Allium cepa L*

Para las mediciones de los parámetros bioquímicos, las muestras se colectaron en botellas plásticas Nansen de 1 500 mL y se trasladaron, conservadas a 4 °C, al Laboratorio de Análisis. Se utilizaron bulbos de *Allium cepa L* variedad *red creole*, los cuales fueron puestos a germinar (cinco bulbos por tratamiento) en agua potable durante 48 h a una temperatura controlada de 25 ± 1 °C. Después del tiempo de germinación, los bulbos se pusieron en tratamiento con las aguas del río Cojímar durante 48 h, las cuales fueron pasadas previamente por papel de filtro para eliminar cuerpos sólidos y esterilizados por filtro mili-poro de 2,5 μ según Córdova-Pedregosa *et al.* (2005).

Las técnicas analíticas empleadas fueron: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) según Mohan *et al.*, 2008; hidroperóxidos totales (HPT) según Halliwell y Whiteman, 2004 como criterio de peroxidación lipídica; glutatión reducido (GSH) según Anderson, 1958; grupos tiólicos (GT) según Ellman, 1959; catalasa (CAT) según Mohan *et al.*, 2008; superóxido dismutasa (SOD) según Beauchamp y Fridovich, 1971 y proteínas totales según el método de Lowry. (Lowry *et al.*, 1951) Se empleó como control negativo, agua corriente.

Métodos Estadísticos

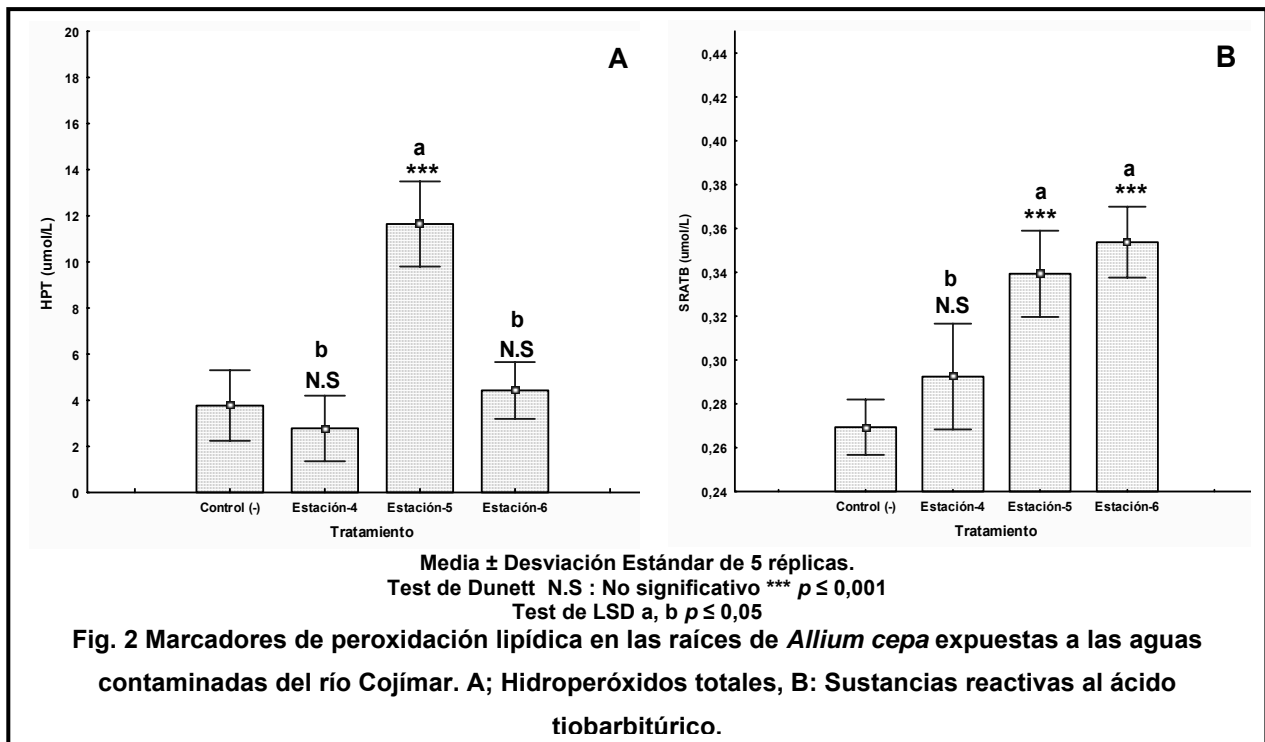
Los datos obtenidos en el laboratorio fueron procesados estadísticamente mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene para comprobar normalidad y homogeneidad de varianza. Aquellos parámetros que cumplieran las premisas del Análisis de Varianza (ANOVA), se sometieron a un ANOVA de clasificación simple y para comparar las medias se utilizó el Test de mínima diferencia significativa (LSD), ambos para un nivel de confiabilidad de un 95 %. Los datos son mostrados en este trabajo como

media ± desviación estándar de cinco réplicas. Todas estas pruebas estadísticas están incluidas en el paquete estadístico Statistica 6.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

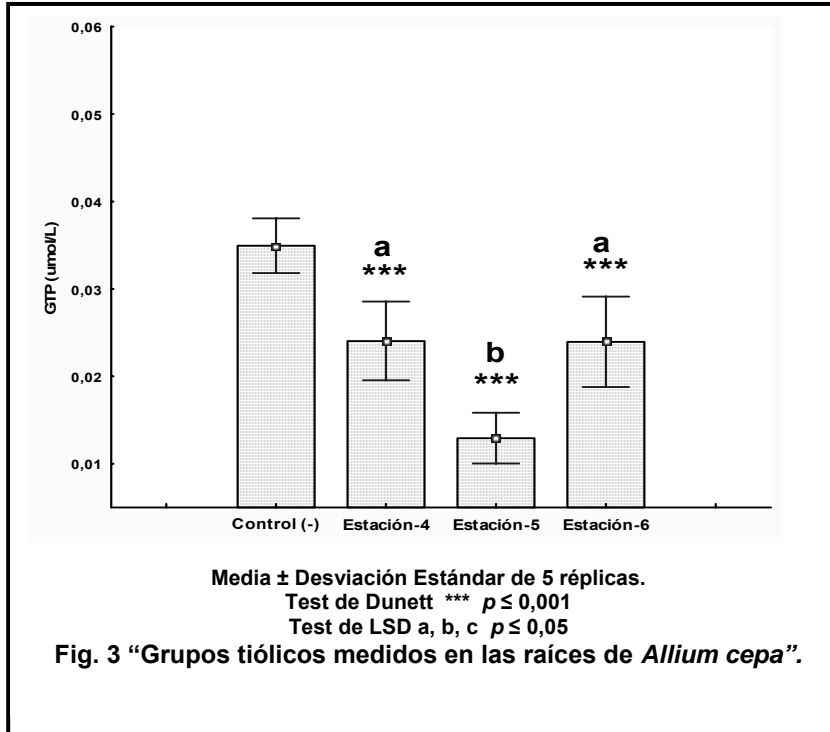
Las determinaciones de hidroperóxidos lipídicos (HPT) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúricos (SRATB) constituyen marcadores de peroxidación lipídica. Estos parámetros son indicadores del daño efectuado a las estructuras, fundamentalmente en membranas, que contienen ácidos grasos. Los resultados obtenidos de HPT y SRATB se presentan en la figura 2.

Como se observa en la figura anterior los valores de HPT en las estaciones 4 y 6 no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Test de Dunnett $p \leq 0,001$) con el control, sin embargo, la estación 5 mostró un incremento altamente significativo para este indicador.



Para el caso de las SRATB se encuentran incrementados significativamente con respecto al control experimental (-) agua corriente las estaciones 5 y 6. Los altos valores de estos marcadores proponen la idea de que hacia la desembocadura del río hay una mayor concentración de compuestos tóxicos capaces de generar especies reactivas del oxígeno que causan la peroxidación lipídica en las células de las raíces de *Allium cepa*. La estación 5 mostró una mayor tendencia a encontrar compuestos capaces de generar un desbalance redox que induzca el aumento de la oxidación de lípidos.

Los valores incrementados de de SRATB y HPT son un indicativo de la presencia de peroxidación lipídica. (Halliwell, 1982; Halliwell, 1990) Este evento puede iniciarse dada la presencia en el medio de metales como el cromo, (Fatima y Ahmad, 2005) el cual se encontró en valores elevados en la desembocadura del río Cojímar (estación 6) (Datos no mostrados en este trabajo).



Los grupos tiólicos proteicos (GTP) comprenden a varios compuestos sulfidrílicos solubles como el caso de la cisteína, glutamilsteína y el propio glutatión. (De Vos *et al.*, 1992) La figura 3 muestra el comportamiento de GTP en las raíces de *Allium cepa* expuesta a las aguas contaminadas del río Cojímar.

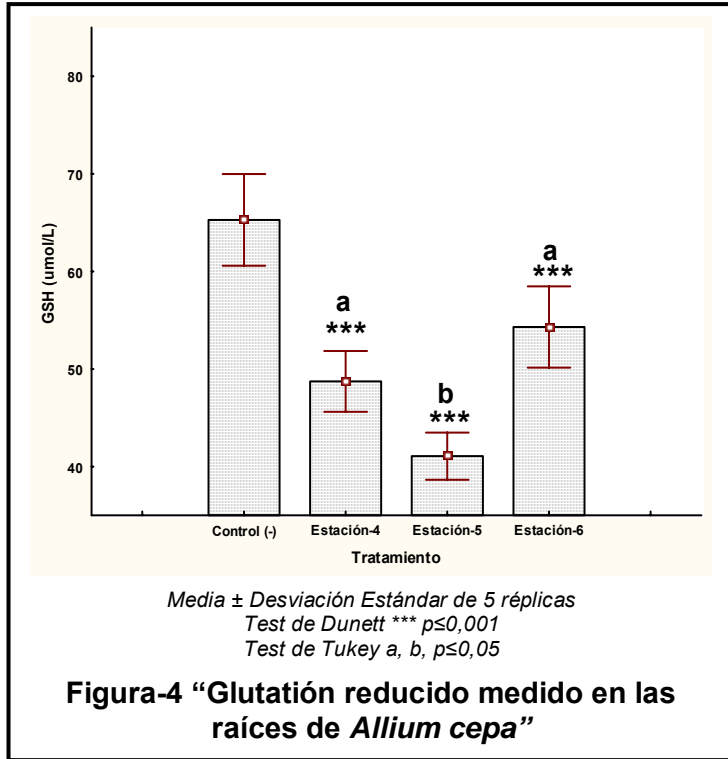
El incremento en este parámetro sugiere el aumento de los niveles de compuestos tiólicos como mecanismo de defensa antioxidante. Sin embargo, su disminución apunta a un estado

redox muy oxidado y por tanto la presencia de un estrés oxidativo.

Las concentraciones de este parámetro demuestran una disminución con relación al control en todos los puntos de muestreo, siendo más acentuada la correspondiente a la Estación-5. El menor valor corresponde a la estación-5 evidenciando un medio más oxidado en las raíces expuestas a esta agua.

Este ambiente puede inactivar reversiblemente numerosas enzimas claves del ciclo de Calvin y de otras vías metabólicas por oxidación de tioles funcionales. (Dietz *et al.*, 1999) Se ha reportado que la reducción de la cisteína puede acarrear la inactivación de enzimas y generar efectos tóxicos en la planta. (Vajpayee *et al.*, 2001)

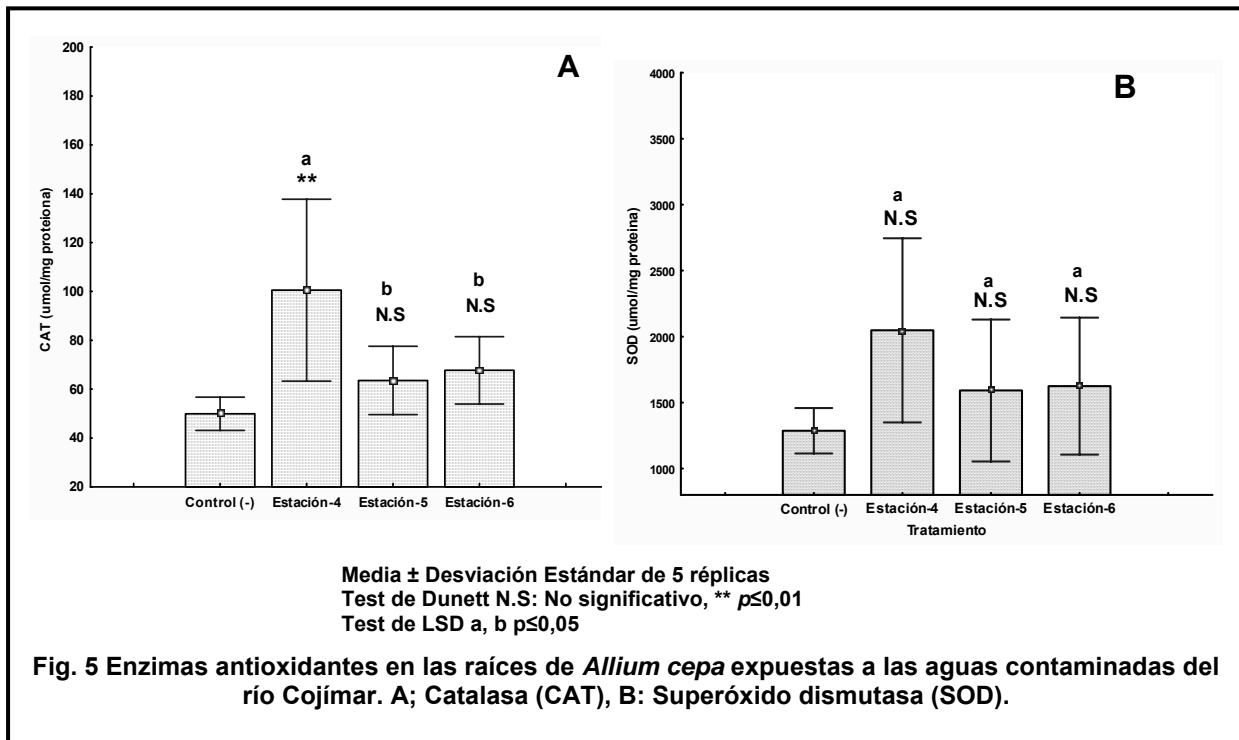
Los valores del glutatión reducido se muestran en la figura 4.



La figura anterior representan los cambios en los niveles de GSH en las raíces de *Allium cepa* tratadas con las muestras de agua de río colectadas en las diferentes estaciones de muestro. Como se observa la concentración de GSH resultó, con respecto al control (-), muy inferior para todos los puntos de muestreo obteniéndose el menor valor en la estación 5 que implica un mayor consumo de glutatión por parte de la planta para la detoxificación, ya sea en la eliminación de compuestos xenobióticos o como cofactor en las reacciones catalizadas por enzimas peroxidadas encargadas de la eliminación de peróxidos orgánicos en la célula.

La molécula de GSH resulta importante durante el proceso de estrés oxidativo. La relación entre las formas oxidadas y reducidas puede dar una medida del grado de estrés por el que atraviesa la planta. La presencia de agentes pro-oxidantes derivados de la contaminación puede provocar una disminución, por oxidación, de la forma reducida del mismo. El GSH en la célula actúa como agente tamponador redox, actividad defensiva frente a agentes tóxicos, como suministro de grupos tiolicos o como precursor de otras moléculas como las fitoquelatinas, por citar un ejemplo. (Dixon *et al.*, 1998; Foyer *et al.*, 2001) Otros autores plantean que metales como el Cu, catalizan la oxidación del GSH. (De Vos *et al.*, 1992; Komoba *et al.*, 1995)

La SOD (Fig. 5) es llamada a ser la primera línea de defensa en la célula contra las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Hassan y Scandalios, 1990), debido a que el radical superóxido, el sustrato sobre quien actúa.



La figura 5 muestra que no hubo diferencias estadísticas entre los valores obtenidos de la actividad en los puntos evaluados con respecto al control, ninguna de las estaciones de muestreo obtuvo significación mientras que las desviaciones estándar resultaron de amplio rango para cada una de ellas.

En la actividad de la SOD, dado que las muestras no arrojaron resultados significativos con el control, podría presumirse que la baja actividad de esta enzima como efecto a la exposición de las células al agua contaminada, es debido a que esta enzima se encuentra inactivada, probablemente como resultado de la propia generación de radicales o por daño severo a los organelos que la contienen. A pesar de la alta variabilidad encontrada en la actividad de esta enzima, la estación 4 obtuvo la mayor actividad.

Compuestos como la azida, la cianida y el fosfato pueden inactivar a la SOD (Bolanm y Ulvik, 1991). El exceso también de H_2O_2 en la célula induce una mayor producción de $\cdot OH$ que constituye un inactivador de la enzima (Yim *et al.*, 1993; Koningsberger *et al.*, 1994) y en este caso el GSH actuaría como un capturador del peróxido. Algunos autores reportan que la actividad de la SOD decrece como resultado de la unión de iones metálicos al centro activo. (Stroinski y Kozłowska, 1997)

La CAT, tuvo un comportamiento similar a la SOD. Las diferencias no significativas en la actividad de esta enzima en las estaciones 5 y 6 que se muestran en la figura 5, también coincidió con aquellos de mayores valores de HPT y SRATB y las menores concentraciones de GSH y GT. Evidenciando un estrés oxidativo severo en la planta expuesta al agua para estas zonas del río.

También sugiere que otros sistemas atrapadores podrían estar actuando, como en el caso de las peroxidasa, de los que se conoce que al menos la glutatión peroxidasa tiene mayor afinidad por el

H₂O₂ que la CAT, (Halliwell, 1974) que pueden encontrarse en el interior de la célula, en el espacio apoplastico, así como unido iónica y covalentemente a la pared celular, (Mohan *et al.*, 2008) y que no fueron medidas en este estudio.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados muestra que las aguas del río Cojímar constituyen una mezcla compleja capaz de inducir peroxidación lipídica en las raíces expuestas de *Allium cepa* L, además la contaminación en la desembocadura, provoca un estado redox desfavorable a los organismos expuestos a esta agua.

Los pobladores que hacen uso de esta agua están expuestos a una contaminación ambiental que puede tener consecuencias fatales para los individuos más vulnerables.

Este trabajo demostró la utilidad del sistema *Allium cepa* como modelo biológico de experimentación en la medición de marcadores de daño oxidativo como consecuencia de la contaminación ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M. E. (1958): Determinatin of glutathione and glutathioine disulphide in biological samples. *Methods of Enzymology*, 113: 548-555.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich (1971): Superoxide dismutase:improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem*, 44: 276-287.
- Bolanm, B.J. and R. J. Ulvik (1991): Improvement of a direct spectrophptmetric assay for routine determination of SOD activity. *Clinical Chemestry*, 37(11).
- Córdova-Pedroza, M. C. *et al.* (2005): Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity,ascorbate redox status,and root elongation induced by enhanced ascorbate contentin *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*, 56(42): 685-694.
- De Vos, C.H.R. *et al.* (1992): Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853-858.
- De Vos, C. H. R.; M. J. Vonk, R. V. Vooijs, and H. Schat. (1992): Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.*, 98: 853-858.
- Dietz, K. J.; M. Baier and U. Kramer (1999): Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds), *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystem*, Springer - Verlag, Berlin, pp. 73-79.
- Dixon, D. P.; I. Cummins, D. J. Cole and R. Edwards (1998): Gluthathione mediated detoxification systems in plants. *Cur. Opin. Plant Biol.*, 1: 258-266.
- Ellman, G.T (1959): Determinatin of glutathione and glutathioine disulphide in biological samples. *Methods Enzymol.*, 113: 548-555.

Fatima, R. and M. Ahmad (2005): Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, 346: 256-273.

Foyer, C. H.; F. L. Theodoulou and S. Delrot (2001): The functions of inter and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.*, 6: 486-492.

Halliwell, B. (1974): SOD, CAT and GPX: solutions to the problems of living with O₂. *New. Phytol.*, 73: 1075-1086.

Halliwell, B. (1982): The toxic effects of oxygen on plant tissues, in: L.W. Oberley (Ed.), *Superoxide Dismutase*, CRC Press, Boca Raton, FL, vol. 1, pp. 89-123.

Halliwell B, Whiteman M (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brasiliian Journal of Pharmacology*, 142: 231-255.

Halliwell, B. (1990): "How to characterize a biological antioxidant", in *Free Radical Research Communication* 9, pp. 1-32.

Hassan, H. M. and J. M. Scandalios (1990): Superoxide dismutases in aerobic organisms. In: Alscher RG, Cumming JR, editors. *Stress responses in plants: adaptation and acclimatation mechanisms*. New York 7 Wiley-Liss. pp.175-199.

Komoba, D. *et al.* (1995): Metabolic processes for organic chemicals in plants. In: *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes* (trapp S McFarlane JC eds.). Boca Raton: CrC Press Inc, pp. 9-13.

Koningsberger, J. C. *et al.* (1994): Cooper, zinc superoxide dismutase and hydrogen peroxide: a hydroxyl radical generating system. *Clinica Chemica Acta*, 230: 51-61.

Lowry, O. H.; A. L. Rosebrough, A. L. Farr and A. L. Randall (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.*, 193: 265-275.

Mohan Murali Achary, Jena S, Panda K K, Panda B B (2008): Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310.

Somashekariah BV, Padmaja K. and Prasad ARK (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant.*, 85: 85-90.

Stroinski A, Kozłowska M (1997): Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. *Acta. Soc. Bot. Pol.*, 66: 189-195.

Vajpayee, P. *et al.* (2001): Chromium - induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluents. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 67: 246-256.

Vitoria AP, Lea PJ, Azevedo RA (2001): Antioxidant enzyme responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, 57 :701-710.

Yim, M. B.; B. Chock and E. R. Stadtman (1993): Enzyme function of cooper, zinc superoxide dismutase of *Echerichia coli* by ozone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 257: 464-471.

