

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS
ANTIOXIDANTES DE *Festuca arundinacea* EN PRESENCIA DE
HIDROCARBUROS *in vitro*

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

Biol. Cinthya Esther Nava Fernández

DIRECTOR:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

México, D.F.

Junio 2009

México D.F. a 22 de Junio del 2009

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES DE
Festuca arundinacea EN PRESENCIA DE HIDROCARBUROS *in vitro*.**

que presentó

Cinthya Esther Nava Fernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Lector: Dra. Letícia Ponce de Leon García

Este Trabajo esta dedicado a:

Las personas más importantes en mi vida...

Mi Mama

Mi Hermano

Mi Papa

Mis tíos Pepe y Sergio

Mi Paco

Mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A mi Mama por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme en todo.

A Mariano por creer en mi, por su paciencia, sus acertados consejos y su cariño.

A Fer por sus consejos, su gran ayuda y por motivarme siempre.

**A Lety Ponce por sus valiosos comentarios en la revisión de este informe.
Y por darme siempre ánimos para seguir adelante.**

A Marco Aurelio por su amistad y apoyo en todo momento.

A Asma por ser mi amiga, por sus consejos, paciencia y su gran gran ayuda.

A mis compañeros del laboratorio: Areli, Miri, Oli, Nancy, Lili, Tania, Cesar, Manuel, Pedro, Marianela, Chayito, Bety, Guille y Adriana, por sus consejos y amistad.

A Gaby, Yanin, Viole, Isaías y Paco por ser mis amigos y cómplices durante este tiempo.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	13
3.1 Cultivos <i>in vitro</i>	13
3.2 Los hidrocarburos y la fitorremediación	13
3.3 <i>Festuca arundinacea</i>	14
3.4 Especies reactivas de oxígeno	15
3.5 Estrés oxidativo	16
3.6 Enzimas antioxidantes	16
3.7 Daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación)	18
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1 Preparación del medio de cultivo	23
6.2 Escarificación y desinfestación de las semillas	23
6.3 Mezcla de Hidrocarburos	23

6.4 Bioensayos.....	24
6.5 Extractos enzimáticos.....	24
6.6 Actividades enzimáticas	25
6.6.1 Actividad Guaiacol-Peroxidasa G –POX.....	26
6.6.2 Actividad Catalasa CAT.....	26
6.7 Lipoperoxidación	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1 Cultivo <i>in vitro</i>	28
7.2 Crecimiento de <i>F. arundinacea</i>	28
7.3 Obtención de extractos enzimáticos.....	29
7.4 Ruptura de biomasa.....	30
7.5 Montaje de las técnicas enzimáticas	31
7.6 Actividad específica.....	33
7.6.1 Actividad G-POX.....	33
7.6.2 Actividad CAT.....	35
7.7 Niveles de lipoperoxidación.....	37
8. CONCLUSIONES.....	41
Para <i>Festuca arundinacea</i> bajo condiciones de cultivo <i>in vitro</i> , expuesta a una mezcla hidrocarburos de concentraciones 0 y 500 ppm.....	41
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

ABREVIATURAS

CAT	Catalasa
FEN	Fenantreno
EE	Extracto Enzimático
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
G-POX	Guaiacol Peroxidasa
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HXD	Hexadecano
MDA	Malondialdehído
MHC	Mezcla de hidrocarburos
MS	Murashige y Skoog (medio de cultivo)
PIR	Pireno

1. RESUMEN

Festuca arundinacea Schreb es una especie de la familia de las gramíneas, nativa de Europa y del norte de África, comúnmente usada como forraje en climas templados. Numerosos reportes señalan a *F. arundinacea* como una planta tolerante a estrés biótico y abiótico como por ejemplo: altas temperaturas, sequía, salinidad y contaminación por hidrocarburos. El estrés abiótico y biótico puede inducir una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las plantas. Debido a su alta reactividad, las ERO, tales como peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo alteran la función de biomoléculas incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos dando como resultado lipoperoxidación y eventualmente pérdida de la integridad de la membrana. Para mitigar el daño oxidativo causado por estrés biótico o abiótico, las plantas disponen de un complejo mecanismo de defensa antioxidativo que involucra la acción de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y guaicol peroxidasa (G-POX). El objetivo de este estudio fue determinar la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y G-POX y su posible correlación con los niveles de lipoperoxidación en *Festuca arundinacea* cultivada *in vitro* expuesta a una mezcla de hidrocarburos como factor estresante.

Las semillas de *F. arundinacea* fueron manualmente escarificadas, desinfectadas y germinadas *in vitro*. La planta se sometió a dos tratamientos: (i) Murashige and Skoog (MS) medio, como control; (ii) MS mas mezcla de hidrocarburos (pireno, fenantreno y hexadecano; 1/1/2 p/p/v), a una concentración final de 500 mg de mezcla kg⁻¹ de gel. Las plántulas fueron cultivadas por 50 días para ambos tratamientos. Las unidades experimentales fueron tubos de vidrio de 2.4 cm de diámetro por 15 cm de altura, con 10 mL de medio de cultivo y una semilla cada uno. Las determinaciones experimentales se aplicaron sobre 10 plántulas tratadas de la misma forma. Las muestras fueron colectadas de la parte aérea y de la raíz a los 20, 30, 40 y 50 días de cultivo. La actividad de las enzimas CAT y G-POX y los niveles de lipoperoxidación fueron cuantificados en el extracto crudo obtenido de cada muestra. No se observaron diferencias significativas en los niveles de lipoperoxidación entre los tratamientos. La disminución observada en los niveles de lipoperoxidación en el día 40,

independientemente del tratamiento, puede ser explicado por el incremento transitorio en la actividad de las enzimas G-POX y CAT en este mismo día.

En este estudio no se encontraron efectos directos de la concentración inicial de hidrocarburos utilizada (500 mg de mezcla (kg de gel)⁻¹) en los niveles de lipoperoxidación y de las actividades enzimáticas analizadas, tomando en cuenta que por arriba de 5 000 mg de mezcla (kg de gel)⁻¹ *F. arundinacea* presenta signos morfológicos de daño así como una disminución en la tasa de sobrevivencia, por lo tanto, es posible que la concentración utilizada en este estudio hay sido insuficiente para provocar la expresión de los mecanismos enzimáticos antioxidantes.

ABSTRACT

Festuca arundinacea Schreb is specie in the grass family (Poaceae), native to Europe and North Africa, which is commonly used as fodder in temperate climates. However, there are reports of the use of *F. arundinacea* as a tolerant plant to biotic and abiotic stresses, such as high temperatures, drought, saltiness and recently contamination by hydrocarbons. Either biotic or abiotic stresses may induce excessive production of reactive oxygen species (ROS) in the plant. Due to their high reactivity, ROS, such as hydrogen peroxide and superoxide and hydroxyl radicals, might alter the function of biomolecules, including lipids, proteins and nucleic acids, resulting in lipoperoxidation and eventually leading to loss of membrane integrity. To mitigate the oxidative damage caused by biotic or abiotic stresses, plants have evolved complex anti-oxidative defense mechanisms, which involve the action of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX).

The objective of this study was to determine the CAT and GPX antioxidant enzymatic activities as well as the lipid peroxidation levels in grown in vitro *F. arundinacea* exposed to a hydrocarbons defined mixture (HM). In order to accomplish the task, seeds of tall fescue were manually scarified, desinfested and germinated in vitro. Grass was subjected to two treatments: (i) Murashige and Skoog (MS) medium as a control; (ii) MS plus a HM, which include hexadecane, pyrene and phenantrene (1:0.5:0.5; v/w/w), 500 mg of HM (kg of gel)-1 were dissolved into dichloromethane (DCM), added to seedling tubes and excess of DCM was eliminated. The seedlings were grown in glass tubes for 50 d for both treatments. Each treatment was evaluated with 10 homogenous seedlings. Samples from aerial part and root were collected at 20, 30, 40 and 50 d of growing (25°C; 16 h photoperiod). CAT and GPX enzymatic activities and lipoperoxidation levels were quantified in crude extracts obtained from each sample. No significant differences were observed between treatments in lipoperoxidation levels. The decrease in lipoperoxidation levels observed at 40 d independently of treatment in both aerial part and root might be explained by a transitory increase in POX and CAT activities observed at such particular sampling time.

There was not a direct effect of the hydrocarbons at the assayed concentration in the lipoperoxidation levels and the enzymatic activities analyzed.

Taking into account that 2 500 mg of HM (kg of gel)⁻¹ represents a lethal concentration of hydrocarbons for *F. arundinaceae*, it is possible that the hydrocarbon concentration used in this study was not high enough (stressing factor) to cause an increase in the antioxidative enzymatic mechanisms.

2. INTRODUCCIÓN

En México hay un número considerable de sitios contaminados con hidrocarburos, esto como resultado de fugas, derrames o descargas accidentales de petróleo crudo, así como por la disposición de recortes de perforación, lodos aceitosos y aceites lubricantes gastados. (Iturbe, y col., 2002)

La fitorremediación es una tecnología emergente que usa plantas y los microorganismos asociados a su rizósfera para remover, transformar o contener químicos tóxicos presentes en suelos, sedimentos, aguas e, incluso en la atmósfera. Actualmente, la fitorremediación se usa para tratar diversos tipos de contaminantes, incluyendo hidrocarburos derivados de actividades petroleras, solventes clorados, pesticidas, explosivos, metales y lixiviados. La fitorremediación incluye mecanismos que pueden ofrecer una manera efectiva de remediar miles de kilómetros cuadrados de suelos contaminados (Meagher 2000). Las plantas, además, se encuentran adaptadas a un amplio rango de condiciones ambientales, y han desarrollado sistemas bioquímicos únicos para la obtención de nutrientes, detoxificación y control de condiciones geoquímicas (Susarla y col., 2002).

Una alternativa para incrementar el conocimiento en la materia, es la utilización de sistemas sencillos que eviten el efecto de las complejas interacciones que ocurren en la rizósfera, tales como los cultivos *in vitro* con células y tejidos vegetales (Macek y col., 2000).

Por otra parte, es de gran importancia realizar investigación básica acerca de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de xenobióticos por plantas, ya que, en la medida en que el entendimiento de los procesos implicados aumente, será posible incrementar el potencial para la fitodegradación y detoxificación de dichos compuestos. En este sentido, es necesario evaluar la capacidad de plantas que crecen en sitios contaminados con compuestos tóxicos, así como la de sus sistemas enzimáticos y el efecto que la etapa de desarrollo de la planta tiene sobre todos los mecanismos involucrados.

Diferentes tipos de estrés abiótico, tales como sequía, alta salinidad, bajas y altas temperaturas, contaminantes como metales pesados e hidrocarburos provocan en las plantas

una sobre producción de especies reactivas de oxígeno (ERO); estas son formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno atmosférico O_2 , debido a su alta reactividad, las ERO, tales como peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo alteran la función de biomoléculas incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, dando como resultado, en el caso de los lípidos, lipoperoxidación y eventualmente la pérdida de integridad de la membrana. Para mitigar el daño oxidativo causado por estrés biótico o abiótico, las plantas tienen un complejo mecanismo de defensa antioxidativo, que puede ser enzimático y no enzimático, el primero incluye la acción de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y gualcol peroxidasa (G-POX), este complejo elimina o transforma las ERO a formas menos tóxicas.

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1 Cultivos *in vitro*

Los sistemas axénicos *in vitro* de semillas, son sistemas modelo, sencillos y reproducibles, que tienen diferentes ventajas, como; acelerar los procesos de germinación y crecimiento de plantas, donde es posible discriminar entre el papel metabólico que juega la planta y el de los microorganismos del suelo, pues evitan el efecto de las complejas interacciones que ocurren en la rizósfera (Reynosos-Cuevas y col., 2008). Con el uso de cultivos *in vitro* es posible controlar las condiciones del ambiente como temperatura, humedad, fotoperiodo; además, facilitan las determinaciones cuantitativas de compuestos y moléculas orgánicas producidas por la misma planta.

3.2 Los hidrocarburos y la fitorremediación

Los hidrocarburos derivados de actividades petroleras, una vez fuera de control, se constituyen como contaminantes orgánicos universalmente detectados en el ambiente debido a su alto uso en industrias en todo el mundo. El consumo de petróleo a nivel mundial en 2001 fue de 77 millones de barriles por día (Collins y col., 2007), esta escala de uso resulta en contaminación potencial dada por fugas o accidentes.

La importancia económica y el tamaño de esta contaminación han generado un esfuerzo significativo orientado a desarrollar tecnologías de remediación para su limpieza. (Collins y col., 2007). Entre los componentes del petróleo potencialmente carcinogénicos se identifican los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que son hidrofóbicos, y su solubilidad disminuye cuando aumenta su peso molecular. Los HAP en los suelos contaminados son usualmente resistentes a la degradación (Parrish y Schwab, 2005).

La fitorremediación es una de las técnicas de remedio desarrollada para el problema. La fitorremediación se define como el uso de vegetación y la microbiota asociada para el tratamiento *in situ* de suelos, sedimentos y aguas contaminadas. Puede utilizarse para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes orgánicos (herbicidas, pesticidas, hidrocarburos) e inorgánicos (metales) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Meagher 2000; Van Deuren y col., 1997). Es ventajosa

cuando se requiere de una solución de bajo costo fácilmente aplicable para limpiar zonas contaminadas.

3.3 *Festuca arundinacea*

Festuca alta (*Festuca arundinacea* Schreb.) Es una especie que pertenece a la familia de las Gramíneas (Poaceae). *Festuca alta* es un pasto perenne amacollado de clima templado que es cultivado para praderas de pastoreo. Este pasto es nativo de Europa y norte de África, fue introducido de Europa a Norte y Sudamérica. *Festuca alta* está bien adaptado a las áreas húmedas y templadas. La tolerancia a climas calientes depende principalmente de la humedad disponible en el suelo. En condiciones de estrés por calor o sequía, el crecimiento generalmente se detiene. Sin embargo, cuando la humedad es adecuada, *festuca alta* permanece verde y continúa aún creciendo bajo climas cálidos. *Festuca alta* se cultiva principalmente para forraje, ensilaje y heno. También se emplea para el control de la erosión del suelo, reciclaje de nutrientes procedente del estiércol y biosólidos, y como césped. (Hannaway y col., 1999)

Desde el inicio de los años 1970's, *festuca alta* ha sido el pasto perenne de clima templado predominante en los Estados Unidos de América, ocupando casi 35 millones de acres. Su uso tan amplio se debe a varias características favorables (Hannaway y col., 1999) tales como:

- Adaptación a un rango amplio de condiciones de suelo.
- Buena producción de forraje.
- Larga estación de pastoreo.
- Excelente persistencia.
- Tolerancia al manejo de bajos insumos.
- Excelente producción de semillas.

Festuca alta también se siembra para mejorar y estabilizar franjas de suelos minados y sobre sitios destinados por mucho tiempo a la conservación de suelo. La alta densidad de tallos en la planta (ver Figura 1) la hacen efectiva en la protección del suelo de la erosión y en la filtración de agua que fluye en la superficie sobre los cultivos (Hannaway y col., 1999).

Además de estas características, que hacen a *festuca alta* una planta que se desarrolla en una amplia gama de condiciones ambientales, también se ha demostrado que es una planta

fitorremediadora, es decir, capaz de remover y/o degradar contaminantes, en este caso hidrocarburos, del suelo y otros medios. Chen y col. (2003) reportaron en su estudio que *F. arundinacea*, después de 190 días logró mineralizar 38% de pireno de una concentración inicial de 50 mg (kg de suelo)⁻¹ en suelo seco. Reynoso-Cuevas L. y col. (2008) reportaron que a una concentración 4000 mg (kg de gel)⁻¹ de una mezcla de hidrocarburos, no causa efectos en la sobrevivencia de *F. arundinacea*.



Figura 1. Imagen de un ejemplar de *Festuca arundinacea* creciendo en el bosque de Wisconsin EUA. Disponible en:

http://dnr.wi.gov/invasives/photos/images/medium/Festuca_arundinacea.jpg&imgrefurl=http://dnr.wi.gov/

3.4 Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno atmosférico (O₂). Generalmente provienen de la excitación de O₂ para formar oxígeno singulete (¹O₂) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O₂ para formar, al radical superóxido (O₂ –•), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o al radical hidroxilo (•OH), respectivamente.

El $^1\text{O}_2$ intracelular se forma en las plantas principalmente por la fotoexcitación de la clorofila, puesto que en este caso, un electrón se eleva a un orbital de energía superior, liberando al oxígeno de su estado de *spin* restringido y favoreciendo su reacción con moléculas orgánicas (Hansberg, 1999). Normalmente los carotenoides (agentes fotoprotectores) apagan el estado excitado de la clorofila previniendo así la formación del $^1\text{O}_2$. Al igual que en las células de los animales, en las plantas generalmente el $\text{O}_2-\bullet$ es la primera ERO producida por reducción del oxígeno con un electrón, su vida media es inferior a un segundo. Dos moléculas de $\text{O}_2-\bullet$ dismutan rápidamente generando H_2O_2 , ya sea por una reacción no enzimática o por una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

En contraste con el O_2 , que en su estado basal es relativamente poco reactivo, las ERO son altamente reactivas, tóxicas y capaces de oxidar diversas biomoléculas (lípidos de membranas, proteínas y DNA) que alteran el metabolismo y pueden llevar a la destrucción oxidativa de la célula. En consecuencia, la evolución de los organismos aerobios ha dependido del desarrollo de mecanismos eficientes de remoción de las ERO para minimizar sus efectos citotóxicos (Rivera y col., 2008).

3.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre cuando tiene lugar una sobreproducción de ERO o una disminución de las defensas antioxidantes, que provocan un desbalance entre las sustancias oxidantes y antioxidantes, a favor de las primeras (Freí B., 1994).

3.6 Enzimas antioxidantes

Debido a que las plantas generan ERO como parte de su metabolismo y a que estos niveles se incrementan en condiciones de estrés, no es sorprendente que las plantas también posean mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para prevenir que las ERO alcancen niveles destructivos y mantener el balance redox celular. Estos mecanismos son importantes ya que en la naturaleza, las plantas están expuestas frecuentemente a distintos tipos de estrés biótico (virus, bacterias, nematodos, hongos e insectos), abiótico o ambos (cambios climáticos como sequía, frío, intensidad luminosa elevada, distintos tipos de contaminación entre otros).

Los principales mecanismos de remoción de las ERO en las plantas incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y peroxiredoxina (PRXR). Estas enzimas junto con los antioxidantes ácido ascórbico y glutatión (GSH), proveen a las células de una maquinaria altamente eficiente para la desintoxicación de $O_2-\bullet$ y del H_2O_2 . El balance entre las actividades de estas enzimas en las células es crucial para determinar el nivel de estado estacionario de $O_2-\bullet$ y H_2O_2 . Este balance junto con el secuestro de iones metálicos por la ferritina y otras proteínas que unen metales previenen la formación del $\bullet OH$, considerado el radical más agresivo (Rivera y col., 2008).

Peroxidasas y Catalasas

Las peroxidasas son las enzimas responsables de eliminar los hidroperóxidos que se acumulan en las células. Esta eliminación ocurre por medio de una reacción de oxidorreducción que emplea una molécula específica como agente reductor. Las peroxidasas pueden utilizar agentes reductores para llevar a cabo esta reacción y pueden desarrollar mecanismos catalíticos distintos. Según el Comité de Nomenclatura de las Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las peroxidasas (EC 1.11.1) se clasifican de acuerdo con su especificidad; sin embargo, en términos generales, se han agrupado tradicionalmente en catalasas y peroxidasas.

Las catalasas son enzimas que descomponen al H_2O_2 directamente en O_2 y agua (ver reacción (a) en la Figura 2). Para ello, emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como oxidante. Por su parte las peroxidasas utilizan una molécula distinta del H_2O_2 como agente reductor (ver reacción (b) en la Figura 2). Es común también que las peroxidasas puedan reducir a hidroperóxidos distintos del H_2O_2 , como los peróxidos orgánicos (ver reacción (c) en la Figura 2) (Peraza R., 2008).

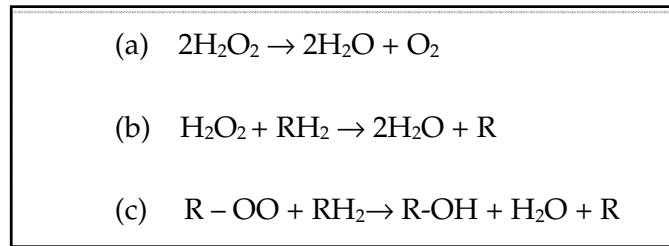


Figura 2. Reacción de óxido-reducción del peróxido de hidrógeno catalizado por catalasas (a), peroxidasas (b y c), donde RH_2 pueden ser diferentes sustratos reducidos como glutatión y ascorbato, entre otros.).

3.7 Daño oxidativo a lípidos (lipoperoxidación)

La participación de los radicales libres y otras ERO con los lípidos de las membranas biológicas ocasiona la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas y las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular (Zenteno y Saldaña , 2008).

El incremento en el estrés oxidativo a nivel celular ha cobrado gran importancia como uno de los eventos predominantes en la senescencia vegetal y en las respuestas de las plantas a distintos tipos de estrés (bióticos o abióticos). La principal manifestación molecular de este incremento en el estrés oxidativo es la peroxidación de los lípidos de membrana, la cual se ha propuesto como punto de confluencia de varios desórdenes fisiológicos y diversos tipos de estrés (Shewfelt y del Rosario, 2000). El deterioro de los lípidos llevaría a la pérdida de la integridad y fluidez membranal, que a su vez afectaría la función apropiada de las proteínas de membrana ya sea por un ataque directo de las proteínas por ERO o por la pérdida de actividad debida a un ambiente lipídico desfavorable. Aunque los lípidos, las proteínas y el DNA son susceptibles al ataque por radicales libres, se ha observado que la peroxidación de lípidos esta cinéticamente favorecida (Shewfelt y Purvis, 1995). De esta manera, la peroxidación preferencial de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas tiene una función protectora al prevenir el ataque a las proteínas y al DNA (Shewfelt y Purvis, 1995; Shewfelt y del Rosario, 2000).

Todas las ERO son extremadamente reactivas y citotóxicas en todos los organismos. Estas especies pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados y causar la peroxidación de los lípidos esenciales de la membrana en el plasmalema o en las membranas de los organelos intracelulares. El daño causado por la peroxidación de los lípidos de la membrana conduce a la pérdida de la compartimentalización celular, fuga o pérdida del contenido celular, a una rápida desecación y a la muerte celular en casos extremos.

La lipoperoxidación surge como una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que involucra reacciones de iniciación, propagación, y terminación (Snaich, 1992; Winston, 1990).

Las especies reactivas de oxígeno tales como el superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son productos que se originan a partir del transporte de electrones en los cloroplastos y mitocondrias, entre otros (Winston, 1990). La interacción del superóxido y el peróxido de hidrógeno con especies de hierro (Fe^{3+} , Fe^{2+}) en las membranas conduce a la formación de radicales libres de lípidos presumiblemente vía la formación del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Borg y Snaich, 1998). Por otra parte, el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el cual se forma en los cloroplastos durante la fotosíntesis (Chakraborty y Trypathy, 1992) es también una molécula altamente reactiva que reacciona con los lípidos (Bradley y Min, 1992).

Como se ilustra en la Figura 3, la lipoperoxidación comienza con la remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado (ver primer paso en la Figura 3), lo que da por resultado la formación de un radical lípidico (ver molécula 2 en la Figura 3). El rearrreglo de las dobles ligaduras produce dienos conjugados (3). El ataque por oxígeno molecular produce un radical peroxilídico (4), el cual puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico (5), o un endoperóxido lipídico (6) que a su vez puede conducir a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de degradación (7) (Buege y Aust, 1978). Por lo tanto, no es sorprendente que los lípidos de membrana sean muy susceptibles al ataque peroxidativo. La medición o cuantificación del malondialdehído (MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer y col., 1991).

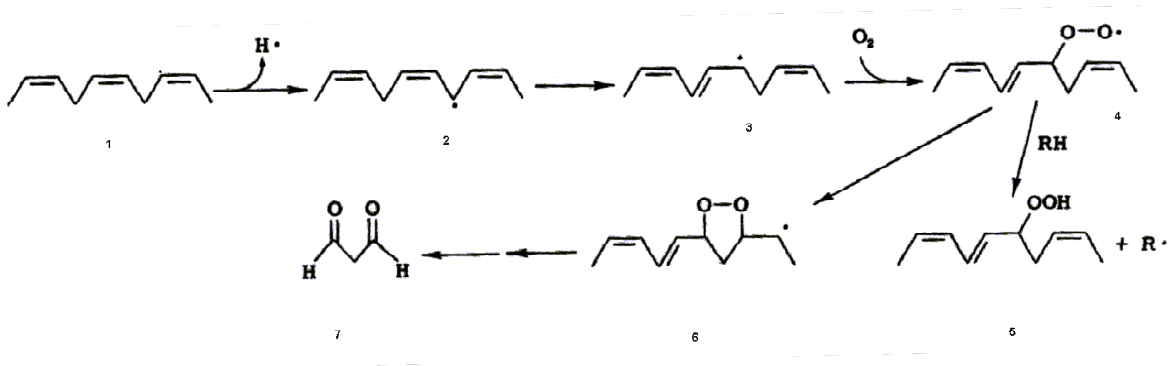


Figura 3. Diagrama general de la lipoperoxidación de las cadenas de ácidos grasos.

4. HIPÓTESIS

El aumento en la actividad de al menos una de las enzimas: Guaiacol Peroxidasa y Catalasa en células de tejidos de *Festuca arundinacea*, es evidencia de un mecanismo de respuesta inducido por la exposición a hidrocarburos, reflejado en los niveles de lipoperoxidación por acumulación de MDA.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar actividades enzimáticas antioxidantes y los niveles de lipoperoxidación en *Festuca arundinacea*, en presencia de hidrocarburos en cultivos *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* que permitan la propagación de *Festuca arundinacea* a través de la germinación de semillas en medios de cultivo especializados.
2. Establecer las condiciones experimentales que permitan obtener extractos enzimáticos y puesta a punto de las técnicas para determinar las actividades enzimáticas peroxidasa y catalasa.
3. Determinar la actividad de enzimas antioxidantes; Guaicol Peroxidasa, y Catalasa, en el extracto enzimático de raíces y parte aérea, en *Festuca arundinacea* en presencia y ausencia de hidrocarburos.
4. Determinación de los niveles de lipoperoxidación en el extracto enzimático de raíces y parte aérea, en *Festuca arundinacea* en presencia y ausencia de hidrocarburos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) de SIGMA. A una solución de 4g/L, se agregó 10g/L de sacarosa. El pH se ajustó con KOH 0.1 N a 5.7 y se agregó 2 g de fitagel por litro.

El medio preparado se vertió en tubos de ensaye (2.4 cm de diámetro por 15 cm de longitud), 10 ml por cada tubo, los tubos con el medio fueron cerrados y esterilizados en autoclave (15 min a 15 lb/in²).

6.2 Escarificación y desinfestación de las semillas

Las semillas fueron seleccionadas por tamaño y apariencia, para la escarificación, la testa se removió manualmente. Las semillas fueron introducidas en un sobre de papel filtro, se sumergieron en una solución con detergente comercial a una concentración de 0.02 g/mL, por 30 min con agitación constante, y se lavaron con abundante agua desionizada. El sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 1 min, seguido por una solución de hipoclorito de Sodio 10 % (v/v) adicionada junto con 0.1 ml de TWEEN-20 con agitación por 30 min, cada 10 minutos y nuevamente el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 1 min. El sobre se lavó con 150 mL de agua esterilizada desionizada. El sobre se abrió bajo condiciones estériles, siempre bajo una campana de flujo laminar, y se colocó en una caja de Petri estéril. Las semillas escarificadas y desinfestadas fueron almacenadas en los sobres en la oscuridad para su uso posterior.

6.3 Mezcla de Hidrocarburos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que se utilizaron en este trabajo, fueron: fenantreno con una pureza mayor al 96%(Aldrich), pireno con una pureza mayor al 98% (Aldrich), además de hexadecano (Aldrich). Los compuestos fueron disueltos en diclorometano (DCM) (Mallinckrodt Chemical).

6.4 Bioensayos

Las semillas de *F. arundinacea* se adquirieron en la Central de Abastos de la Cd. de México. Los bioensayos se llevaron a cabo sembrando plantas en sólo medio MS y plantas en medio MS más mezcla de hidrocarburos. La mezcla de hidrocarburos (MHC) fue la siguiente: hexadecano, y mezcla de HAP (1:1; v/p); La mezcla de HAP fue de fenantreno y pireno (1:1; p/p). Se disolvieron todos en DCM hasta una concentración de 500 mg de MCH (kg de gel)⁻¹.

La solución de MHC se agregó a los tubos de cultivo que contenían el medio MS, los tubos se agitaron en vortex, se mantuvieron abiertos a temperatura ambiente durante 24 h para posteriormente esterilizarlos a 15 lb/in² durante 15 min. Todos los ensayos se realizaron en tubos simultáneos con y sin MHC. Los tubos se cultivaron bajo condiciones estériles, siempre se conservaron cerrados con una tapa de plástico y sellados con parafilm a 25 °C, con fotoperíodos de 16/8 horas día/noche durante 50 días. A partir de estas plantas se obtuvieron los extractos para determinar las actividades enzimáticas y los productos de la lipoperoxidación, como se detalla más adelante.

6.5 Extractos enzimáticos.

Para la obtención de los extractos enzimáticos se colectaron plantas crecidas a los 20, 30, 40 y 50 días; para obtener un extracto se utilizó un mínimo de 10 plantas, en cada día de colecta, se retiró del medio cada una de las plantas, la raíz se enjuagó con agua desionizada, se sumergió en DCM, se agitó; posteriormente se volvió a enjuagar con agua desionizada, la parte aérea se separó de la raíz con un bisturí, ambas se secaron con papel absorbente. Se utilizaron aproximadamente 10 plantas para reunir un peso de 100 mg. Para romper las células de las plantas se probaron dos técnicas; en la primera se utilizó un molino de perlas donde se ensayaron cinco diferentes tiempos de molienda, (10, 18, 30, 60 y 90 s) y se determinó la proteína. En la segunda técnica se rompieron las células con nitrógeno líquido durante 1, 3, 5 y 7 min en un mortero de porcelana y se determinó la proteína. Una vez seleccionada la mejor técnica para romper células, se obtuvieron los extractos enzimáticos de la siguiente manera: cuando las células estaban completamente destruidas fueron resuspendidas en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.4), posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se recuperó como extracto

enzimático (EE), todo el procedimiento se llevó a cabo a 4° C. El EE fue almacenado en alícuotas de 1 mL, que fueron conservadas a -20° C hasta su posterior uso.

El contenido total de proteína en los extractos enzimáticos se determinó de acuerdo con el método de Lowry (1951), utilizando sero albúmina bovina como estándar.

6.6 Actividades enzimáticas

Con el objeto de determinar la cantidad de EE adecuada para la mezcla de reacción que mostrara la mayor actividad G-POX y CAT se realizaron 5 diferentes pruebas, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Determinación de la actividad enzimática G-POX y CAT ajustando diferentes cantidades de los componentes de las mezclas de reacción específica para cada enzima.

	Guaiacol peroxidasa (G-POX)					Catalasa (CAT)		
	1	2	3	4	5	1	2	3
¹ Buffer (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	----	----	----
EE (µL)	200	100	100	100	50	100	200	400
Guaiacol (µL)	800	400	200	100	100	----	----	----
² H ₂ O ₂ (µL)	800	800	400	400	400	2000	2000	2000
Vol. Total (mL)	3.8	3.3	2.8	2.6	2.55	2.1	2.2	2.4

¹El buffer de fosfatos utilizado fue de pH 7.4, 100mM

²CAT H₂O₂ se usó H₂O₂ 20mM, preparado en buffer de fosfatos pH 7.4, 100 mM,

²G-POX se usó H₂O₂ 10 mM

Las cantidades de los compuestos en la Tabla 1, marcadas en negritas son aquellas que constituyen la mezcla de reacción que mostró la mayor actividad y por lo tanto la que se utilizó en las determinaciones enzimáticas posteriores.

6.6.1 Actividad Guaiacol-Peroxidasa G –POX

En tubos, se preparó la siguiente mezcla de reacción (2.6 mL)

- 400 μL de guaiacol 10% en buffer de fosfatos pH 7.4
- 2000 μL de buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4
- 100 μL de extracto enzimático
- 100 μL de H_2O_2 10 mM o H_2O (control)

La reacción se inició con la adición de H_2O_2 . En el control se sustituyó el H_2O_2 por H_2O destilada, la reacción corrió a 27°C durante 5 min. Se midió el aumento en la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 2. La actividad se determinó con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 26.6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para tetraguaiacol (producto) y se expresa como unidades por gramo de peso de planta fresco.

La unidad de actividad G - POX se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1.0 μmol de tetraguaiacol producido por min bajo las condiciones del ensayo.

6.6.2 Actividad Catalasa CAT

En tubos se preparó la siguiente mezcla de reacción (2.4 mL)

- 400 μL de extracto enzimático
- 2000 μL de H_2O_2 20 mM preparado en buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.4

Para determinar la actividad catalasa, se utilizaron los mismos extractos obtenidos de las plantas de los dos diferentes tratamientos. La reacción se inició con la adición del extracto enzimático. En el control se sustituyó el H_2O_2 por H_2O destilada, la reacción se corrió a 27°C durante 5 min. Se midió el aumento en la absorbancia a 240 nm. La actividad se determinó con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de 0.047 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. La actividad se corroboró mediante la lectura de controles midiendo H_2O_2 y EE por separado con las mismas condiciones de la mezcla de reacción. Para determinar la longitud de onda del H_2O_2 se realizó un barrido con una solución de 40 mM en un rango de 200-400 nm.

La unidad CAT se definió como la cantidad de enzima necesaria que cataliza la conversión de 1.0 mmol de H_2O_2 por min a 27°C .

6.7 Lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación fueron determinados mediante la técnica de TBARS (Buege y Aust, 1978). Con esta técnica se determinó el malondialdehído MDA resultante de la peroxidación de lípidos de las membranas vegetales, mediante la reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA, por su denominación en inglés) como sigue: se preparó una solución stock que contenía ácido tricloroacético (TCA, por su denominación en inglés) 15%, TBA 0.05% y HCl 0.025N

En tubos se preparó la siguiente mezcla de reacción (1.5mL)

- 500 μL de extracto enzimático
- 1000 μL de la solución stock

La reacción se llevó a cabo durante 15 min (100°C) en baño María, después se dejó enfriar por 10 minutos, y se midió la absorbancia a 535 nm. Para calcular la concentración de MDA, se utilizó un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $1.56 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los niveles de lipoperoxidación detectados se reportaron como nmoles de malondialdehído (MDA) por gramo de peso fresco.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cultivo *in vitro*

Como primer resultado de esta tesis, se establecieron las condiciones de cultivo *in vitro* que permitieron la propagación de *F. arundinacea* a través de la germinación de semillas empleando el medio de cultivo especializado MS. En la Figura 4 se muestra una imagen de las semillas de *F. arundinacea* que se emplearon en la parte experimental de esta tesis.



Figura 4. Semillas de *Festuca arundinacea*

7.2 Crecimiento de *F. arundinacea*

En la Figura 5 se muestra el crecimiento de *F. arundinacea* en los cultivos en tubos con y sin hidrocarburos. Como se aprecia, la parte aérea de plantas en ausencia de hidrocarburos (a), tiene una longitud tres veces mayor que las plantas crecidas en presencia de hidrocarburos (b), a los 30 días de crecimiento, en cuanto a la longitud de las raíces no existen diferencias para ambos tratamientos. El peso seco disminuyó 0.6 veces en presencia de hidrocarburos comparado con el crecimiento en ausencia de hidrocarburos. Cruz H. 2008. En estudios previos se reporta que una mezcla de FEN, PIR, benzo(a)pireno y aceite crudo maya a una concentración de 1 500 mg (kg de medio)⁻¹, afecta hasta en un 55.5% el crecimiento *in vitro* de *F. arundinacea* (Reynoso-Cuevas y col., 2008). En este trabajo, el crecimiento de la raíz no presentó diferencias significativas con y sin MHC, a diferencia del trabajo de Reynoso-Cuevas y col (2008) que sí disminuye en un 60%. El tipo y concentración de mezcla de hidrocarburos en el medio MS posiblemente tiene efectos tóxicos, provocando alteraciones en la morfología de la planta.



Figura 5. *F. arundinacea* cultivada *in vitro*, bajo los dos tratamientos, a los 30 días de crecimiento. a) cultivo en medio MS y b) cultivo en medio MS con adición de la mezcla de hidrocarburos (MHC)

7.3 Obtención de extractos enzimáticos

Se establecieron las condiciones para la obtención de extractos enzimáticos, de acuerdo al método mencionado en la sección de materiales y métodos, para la determinación de actividades enzimáticas. Para obtener los extractos enzimáticos fue necesario utilizar un mínimo de 10 o 12 plantas ya que la raíz de estas es demasiado delgada y fina, como se observa en la Figura 6.

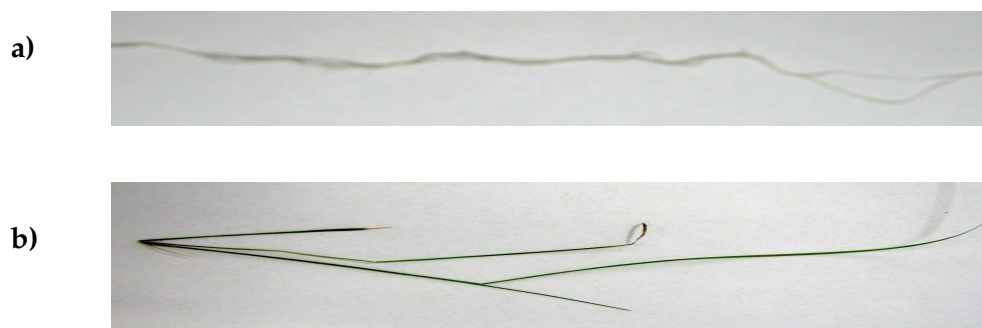


Figura 6. Raíz (a) y Parte aérea (b) de *F. arundinacea*, cultivada *in vitro*.

7.4 Ruptura de biomasa

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos de la ruptura de la biomasa con las técnicas de nitrógeno líquido (N_2) y molino de perlas a diferentes tiempos de exposición. La eficiencia de las técnicas se evaluó a través del contenido de proteína soluble producido.

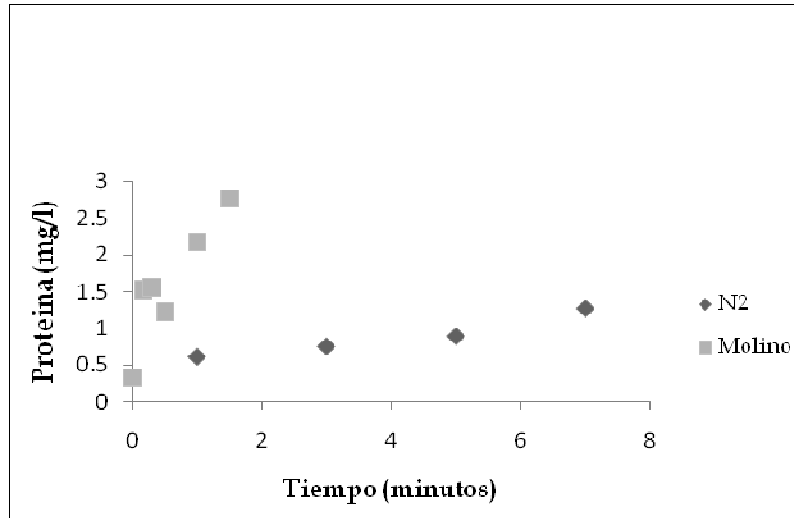


Figura 7. Ruptura de biomasa con N_2 líquido (◆) y molino de Perlas (■) a diferentes tiempos de exposición.

Se observa que con las dos técnicas, cuando aumenta el tiempo de ruptura la concentración de proteína soluble liberada, también aumenta. Sin embargo, las diferencias son claras, las células de plantas destruidas con el molino de perlas tienen una mayor concentración de proteína alcanzando hasta 2.4 mg/mL de EE en 9 seg respecto a las plantas tratadas con N_2 líquido. En contraste con los resultados obtenidos de las plantas tratadas con N_2 alcanzaron hasta 1.1 mg/L en 7 min; sin embargo, bajo las condiciones experimentales de nuestro trabajo, no es recomendable utilizar el molino de perlas ya que los viales donde se coloca el tejido vegetal se calientan conforme aumenta el tiempo de ruptura lo que podría provocar desnaturalización de proteínas. Por lo tanto, se decidió utilizar la técnica que incluye nitrógeno líquido para las determinaciones subsecuentes.

7.5 Montaje de las técnicas enzimáticas

En este experimento se determinó la actividad de la enzima G-POX expuesta a cuatro diferentes tratamientos: sin hidrocarburos, con diclorometano, concentraciones bajas de mezcla de hidrocarburos (estas van de 500 a 1 000ppm) y concentraciones altas de hidrocarburos (estas van de 1 500 a 2 500 ppm). En la Figura 8 se presenta el incremento promedio, en la absorbancia, de muestras compuestas por 12 plantas, durante los 5 min del ensayo.

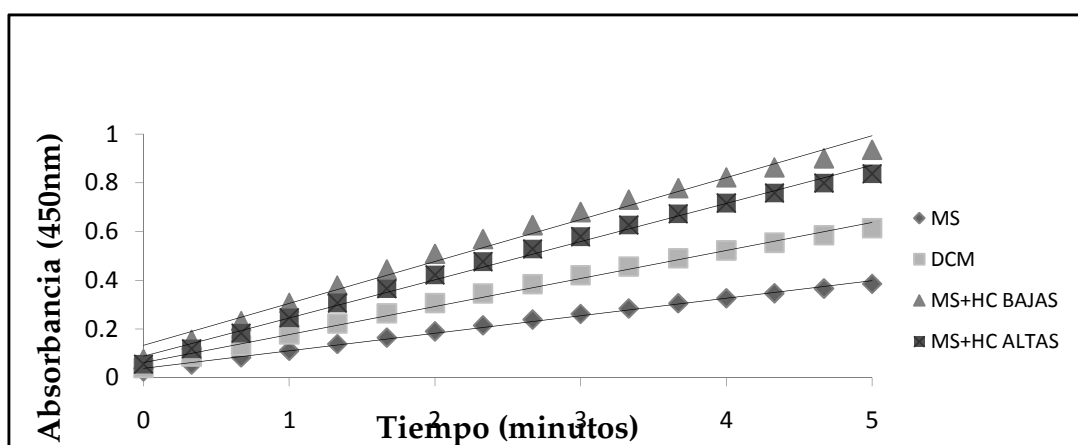


Figura 8. Incremento promedio de 12 plantas, en la absorbancia para G -POX en relación al tiempo, para los cuatro tratamientos aplicados a la raíz.

Como se puede apreciar, la absorbancia de la actividad G -POX es 2.4 veces mas alta, en plantas expuestas a hidrocarburos sin importar la concentración inicial de la mezcla de hidrocarburos y 1.6 veces mas en DCM que sin hidrocarburos. De igual manera, en la Figura 9 se muestran las variaciones equivalentes para los tejidos de la parte aérea.

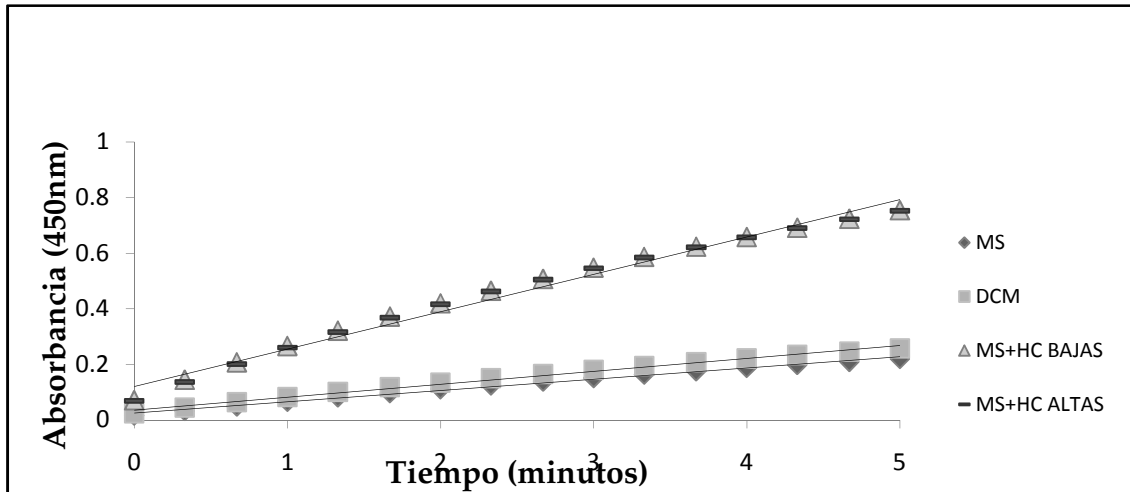


Figura 9. Incremento promedio de 12 plantas, en la absorbancia de G –POX en relación al tiempo, para los cuatro tratamientos aplicados a la parte aérea.

En la parte aérea, la absorbancia observada para la actividad G–POX es 3.4 veces mayor, en concentraciones altas, que en bajas concentraciones iniciales de la MHC, en ausencia de hidrocarburos y en la presencia de DCM. Para una mayor claridad, en la Figura 10 se muestran los valores obtenidos para la actividad de G-POX en donde se incluyen las barras de error correspondientes.

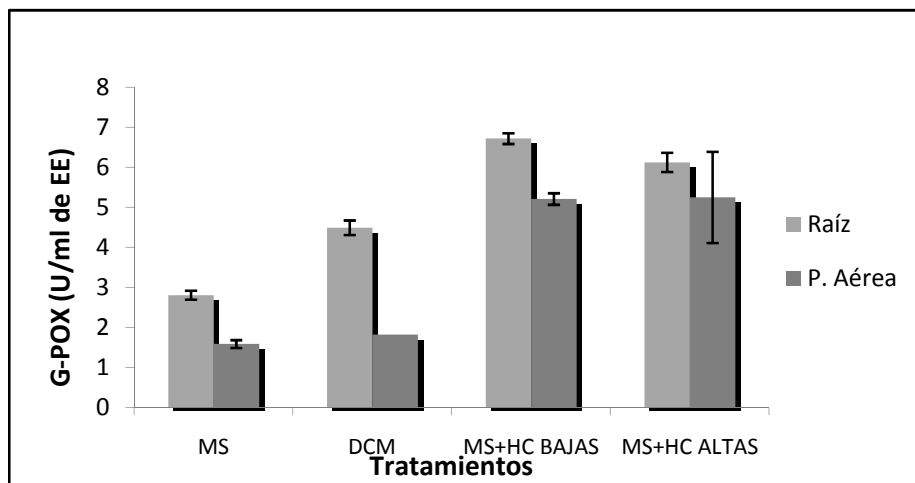


Figura 10. Actividad de G – POX, en raíz y parte aérea de *F. arundinacea*, para los diferentes tratamientos aplicados .

El hecho de que las raíces presenten mayor actividad de G–POX, en comparación a la parte aérea, puede deberse a que las raíces se encuentran en contacto directo con la mezcla de hidrocarburos. La Evaluación de la actividad de G –POX, en plantas crecidas en DCM, permitió identificar claramente un efecto estresante por este solvente en la actividad de esta enzima (Figura 10). También se pudo observar un efecto estresante sinérgico cuando las plantas fueron crecidas en la mezcla de hidrocarburos la cual esta disuelta en DCM, tanto en bajas como en altas concentraciones (Figura 10).

La actividad de G–POX es claramente mayor, en las plantas que fueron crecidas en la mezcla de hidrocarburos en comparación a la actividad de G – POX de las plantas que fueron crecidas en ausencia de hidrocarburos. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Prasad y col., (1999) donde encontraron que en plantas de *Brassica juncea* crecidas con diferentes concentraciones de zinc (factor estresante) provocaron un incremento de 4 a 12 veces en la actividad de G–POX con respecto a su testigo. De igual forma, Nilgün y Leman (2003) demuestran que en *Mentha pulegium* la actividad G-POX es significativamente mayor en células de raíz en comparación a células de parte aérea, exponiendo a la planta a un estrés dado por una alta concentración del macronutriente Ca^{2+} .

7.6 Actividad específica

7.6.1 Actividad G-POX

En la Figura 11 se muestra la actividad de G-POX en células de raíz de *F. arundinacea*. crecidas en MS y MS mas hidrocarburos. En general, se observó una mayor actividad de G-POX en las raices de las plantas crecidas con la mezcla de hidrocarburos en comparacion con las plantas crecidas solo en medio MS. Por otra parte en ambos tratamientos se observó un incremento en la actividad de G-POX durante los primeros 40 días crecimiento para posteriormente decaer. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al inicio y al final del experimento entre los tratamientos aplicados.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Fu y col. (2000), quienes observaron un incremento transitorio de la actividad G-POX durante los primeros 11 días en plantas de *F. arundinacea* y *Poa Pratensis* L, sometidas a estrés hidrico durante 32 días posteriormente esta actividad decayó hacia el final del experimento.

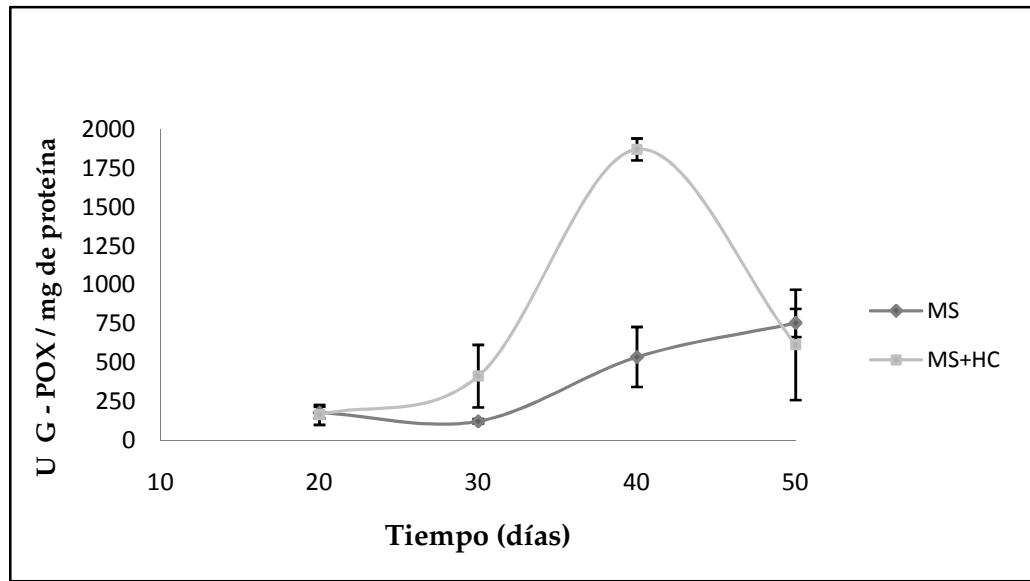


Figura 11. Actividad específica de la enzima G-POX en células de raíz de *F. arundinacea*. En presencia (MS+HC) y ausencia de hidrocarburos (MS).

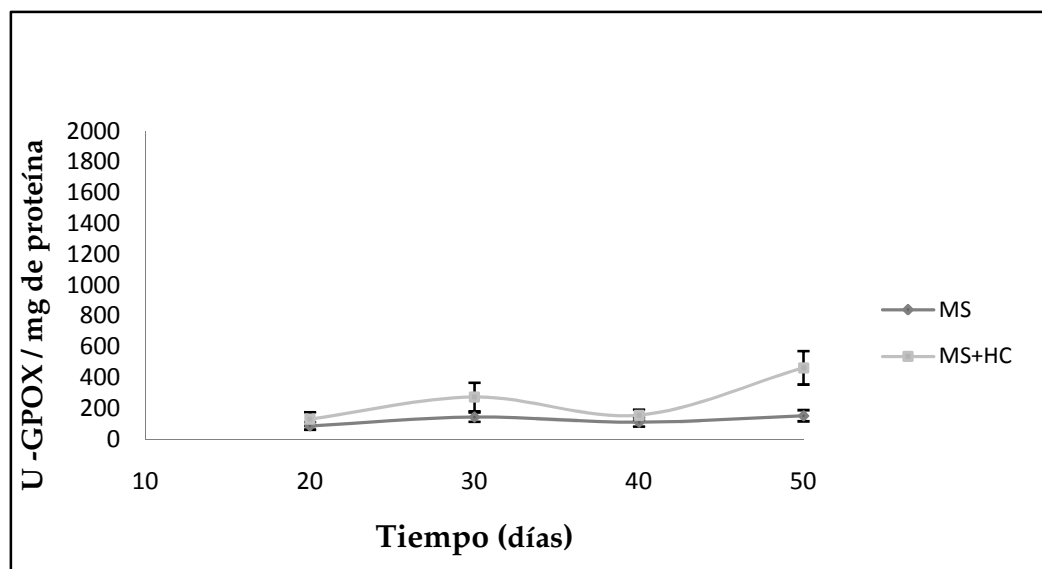


Figura 12. Actividad específica de la enzima G-POX en células de parte aérea de *F. arundinacea*. En presencia y ausencia de hidrocarburos.

En las células de la parte aérea no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, solo hasta el día 50 con hidrocarburos donde se observa un ligero incremento en la actividad

Tanto en la parte aérea como en las raíces de *F. arundinacea* no se encontraron diferencias significativas en la actividad G-POX, entre los tratamientos, únicamente hasta el día 40 en la raíz, lo que podría deberse a que la actividad determinada, sea una actividad basal propia de la planta.

7.6.2 Actividad CAT

No se observaron diferencias significativas durante los primeros días de muestreo en la actividad de CAT en células de raíz, para los dos tratamientos aplicados (Figura 13). Sin embargo, en ambos tratamientos se observó un incremento en la actividad de CAT a partir del día 30 para posteriormente decaer hacia el final del experimento (Figura 13). Por otra parte, la actividad de CAT fue mayor a los 40 días en las plantas crecidas en MS con hidrocarburos en comparación con aquellas crecidas solo en MS. Nilgün y Leman (2003) reportaron que en la raíz de plantas de *Mentha pulegium* crecidas bajo estrés por nutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) la actividad de las enzimas CAT y superóxido dismutasa (SOD) se incrementaron con respecto al testigo. Estos resultados coinciden con los observados en este experimento, donde se encontró un incremento transitorio en las actividades enzimáticas estudiadas, posiblemente debido a la inducción de los mecanismos enzimáticos antioxidantes como mecanismos de detoxificación de especies reactivas de oxígeno en respuesta a contaminación por hidrocarburos.

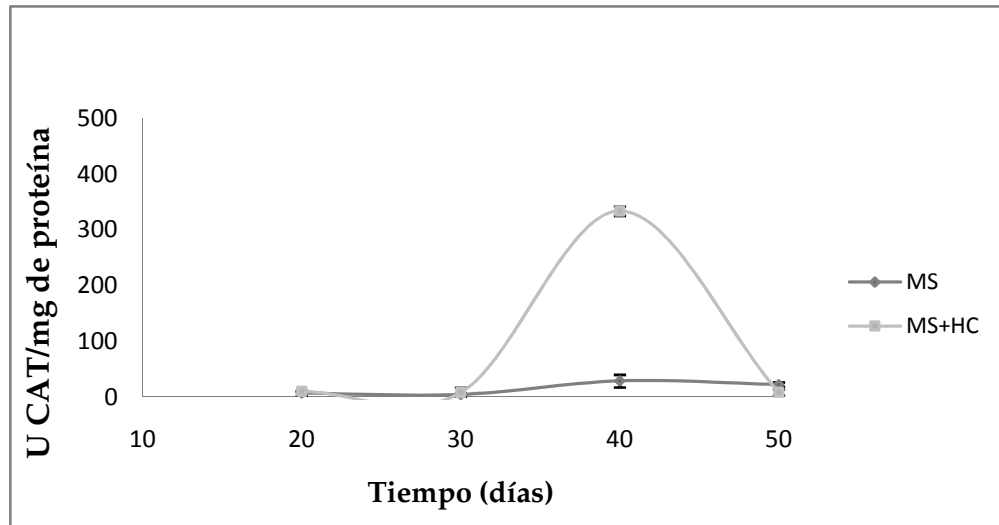


Figura 13. Actividad específica de la enzima CAT en células de raíz de *F. arundinacea*. En presencia (MS+HC) y ausencia de hidrocarburos (MS).

No se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, sin embargo entre los diferentes días de muestreo, se aprecia un incremento transitorio para el día 40 (Figura 14), que coincide con el incremento en la actividad CAT de la raíz, el aumento de la actividad G-POX en raíz, y los niveles mas bajos observados de lipoperoxidación tanto en raíz como en parte aérea.

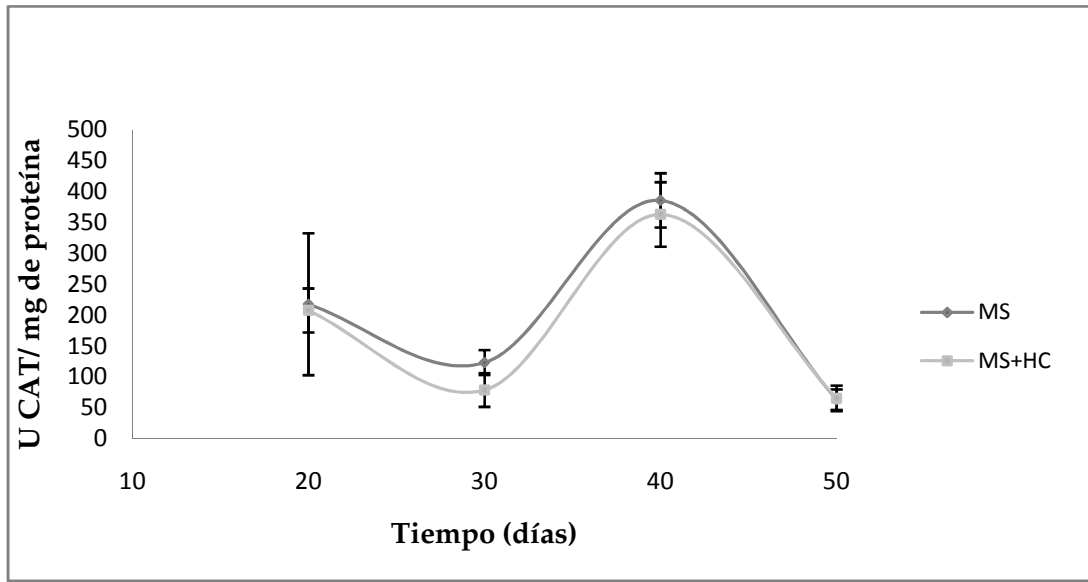


Figura 14. Actividad específica de la enzima CAT en células de parte aérea de *F. arundinacea*. En presencia (MS +HC) y ausencia de hidrocarburos (MS).

La actividad CAT en las células de la parte aérea en *F. arundinacea*, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fu y Huang (2001), donde *F. arundinacea* bajo estrés por sequía moderada o superficial no presentó cambios significativos en la actividad de la enzima CAT respecto al control, para la parte aérea; sin embargo, al comparar la actividad CAT de la planta bajo un estrés por sequía severa, la actividad al inicio del experimento fue ligeramente mas alta respecto al control, hasta el día 20 cuando la actividad CAT decayó significativamente hasta el final de tiempo de exposición.

7.7 Niveles de lipoperoxidación

En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados relacionados con las concentraciones de MDA en las células de *F. arundinacea* en las raíces y la parte aérea con respecto al tiempo de cultivo.

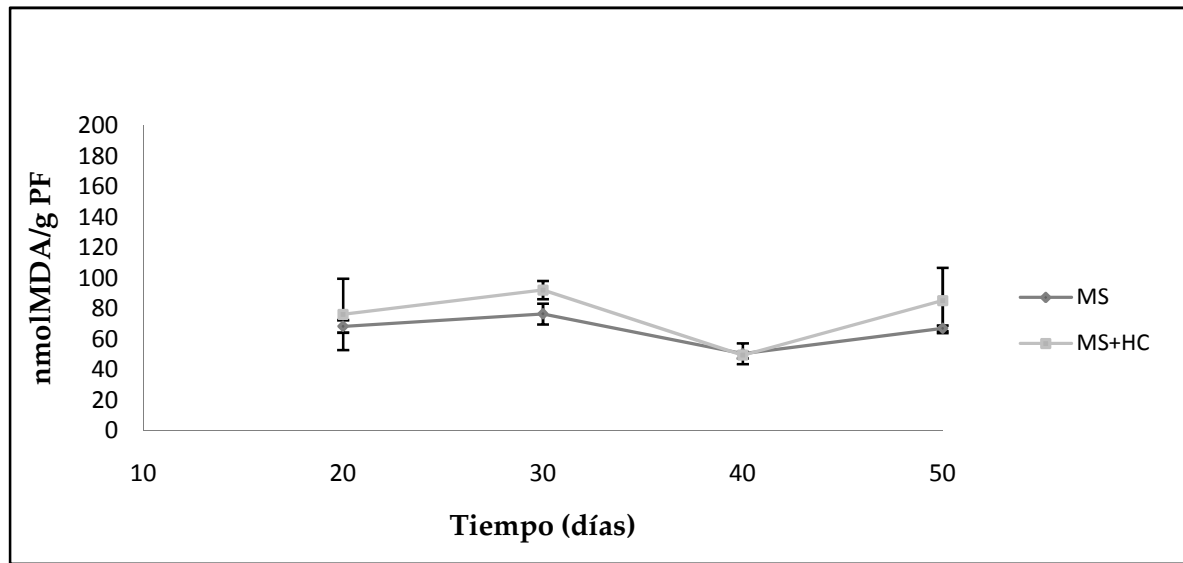


Figura 15. Concentración de malondialdehído (MDA) acumulado en la raíz. En presencia (MS+HC) y ausencia de hidrocarburos (MS).

No se aprecian diferencias significativas en las concentraciones de MDA en células de raíz de *F. arundinacea* sometidas a hidrocarburos con respecto a las plantas crecidas en MS. En contraste con Nilgün y col. (2003), quienes encontraron que al someter a *Mentha pulegium* a dos diferentes tipos de estrés: aumento en la concentración y ausencia de los micronutrientes Cu^{2+} y Mn^{2+} provocaron concentraciones de MDA significativamente más altas, respecto a las plantas que estaban bajo un régimen nutricional equilibrado, estos resultados son válidos tanto para la parte aérea como para la raíz. En contraste con este trabajo la concentración de MDA en raíz, es ligeramente menor que en la parte aérea, con valores de 60 a 100 nmoles, y de 100 a 200 nmoles, respectivamente (Figuras 15 y 16).

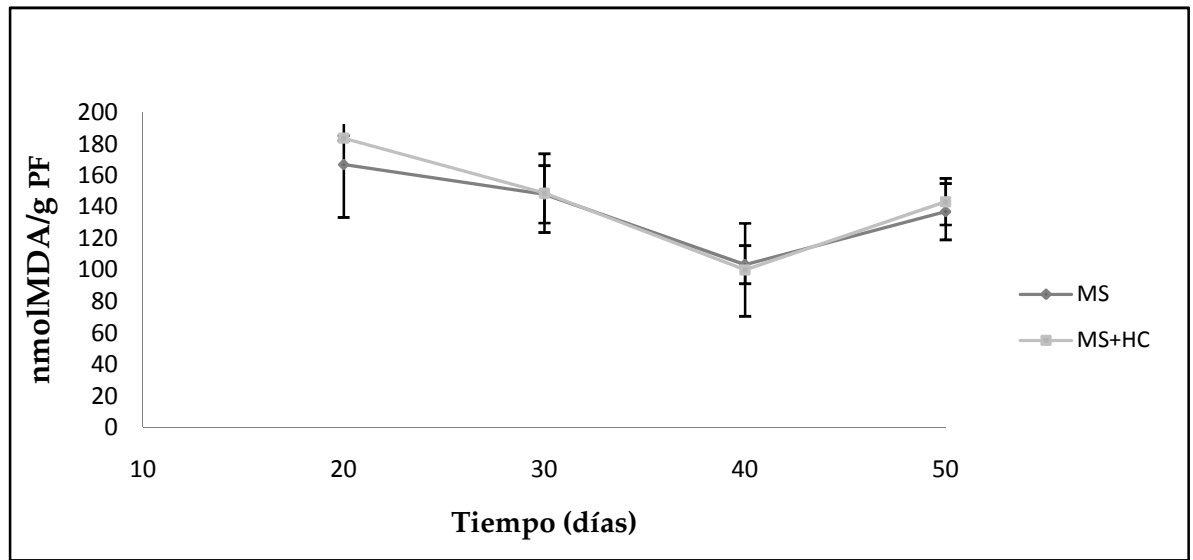


Figura 16. Concentración de malondialdehído (MDA) acumulado en la parte aérea. En presencia (MS+HC) y ausencia de hidrocarburos (MS).

En la Figura 16, en el transcurso del tiempo experimental se observa una ligera disminución en la concentración de MDA en el día 40 para ambos tratamientos, sin embargo la disminución no es significativamente diferente con respecto a los otros tiempos de muestreo. A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, Fu y Huang (2001) reportaron que el contenido de MDA en *F. arundinacea* y *Poa pratensis* fue 1.5 y 2 veces respectivamente, mas alto en condiciones de sequía extrema (factor de estrés), en relación a un suelo bien irrigado (testigo).

De igual manera, la presencia de zinc en altas concentraciones mostró un aumento de la concentración de MDA (de 2.5 veces) en la parte aérea de *Brassica juncea* en comparación con el testigo (Prasad y col., 1999).

En síntesis, la principal manifestación molecular del incremento en el estrés oxidativo, es la peroxidación de lípidos de membrana (lipoperoxidación), que se ha propuesto como punto de confluencia de diversos tipos de estrés (Shewfelt y del Rosario 2000). Los niveles de lipoperoxidación observados en las plantas crecidas en los tratamientos MS y MS+HC

podrían indicar que el tratamiento con hidrocarburos no actuó como un factor estresante, ya que no se observaron diferencias significativas en los niveles de lipoperoxidación para ambos tratamientos. Sin embargo, la disminución de la lipoperoxidación coincidió con un incremento transitorio en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y G-POX (Figuras 11, 13, 14, 15 y 16).

En este estudio no se encontró una evidencia contundente, que pudiera indicar, que el tratamiento con hidrocarburos actuó como un factor estresante, por lo que sería importante considerar en estudios posteriores la aplicación de tratamientos con concentraciones mayores de hidrocarburos. Por otra parte, el estrés oxidativo celular es un mecanismo complejo y difícil de integrar por lo que es importante profundizar en el estudio de otras enzimas tales como: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidada (APX), Glutación reductasa (GR) entre otras y moléculas antioxidantes como: glutación oxidado y reducido, ascorbato, carotenoides, flavónas por mencionar algunas.

8. CONCLUSIONES

Para *Festuca arundinacea* bajo condiciones de cultivo *in vitro*, expuesta a una mezcla hidrocarburos de concentraciones 0 y 500 ppm.

Actividad Guiacol Peroxidasa.

- ✓ No se observaron diferencias significativas con respecto al control (en ausencia de hidrocarburos) tanto en la parte aérea como en las raíces. Excepto para el día 40.

Actividad Catalasa

- ✓ En los dos tratamientos, la actividad fue significativamente mayor en la parte aérea, que en las raíces; sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos, excepto por el incremento transitorio de la actividad en el día 40.

Lipoperoxidación

- ✓ No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA que se vieran reflejadas en los niveles de lipoperoxidación entre los tratamientos utilizados.
- ✓ La disminución de los niveles de lipoperoxidación observados a los 40 días en ambos tratamientos, podría ser explicada por el incremento transitorio en las actividades de G-POX y CAT en el día 40 para ambos tratamientos.

Crecimiento de *F. arundinacea*

- ✓ La mezcla de hidrocarburos a la concentración utilizada, reduce el crecimiento de la parte aérea y la biomasa de *F. arundinacea* en cultivos *in vitro*. Estas condiciones reducen la tasa de crecimiento de esta planta.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bowler, C., Montagu, M.V. y Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **43**: 83-116.
- Buege J.A. y Aust S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzimology*. **52**: 302 -310.
- Bradley, D. G. y Min, D. B. 1992. Singlet oxygen oxidation of foods. *Critics on Review Food Science Nutrition*. **31**: 211-236.
- Chakraborty, N. y Tripathy, B.C. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplast. *Plant Physiology*. **98**: 7-11.
- Collins C. D. 2007. Implementing Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons: *Methods in Biotecnology*, Phytoremediation: Methods and Reviews. Edited by: N. Willey. **23**: 99-106
- Chen, Y. C., Banks, M. K. y Schwab, A. P. 2003. Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environmental and Science Technology*. **37**: 5778-5782.
- Cruz H., A. 2008. Remoción de hidrocarburos por la interacción Planta-Hongo filamentoso bajo condiciones *in vitro*. Tesis Maestría en Biotecnología. UAM-Iztapalapa, México 45pp
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. y Zollner, H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radicals Biology Medicine*. **11**: 81-128.
- Freí B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanism of action. *American Journal of Medicine*. **3**: 5-13.
- Fu J. y Huang B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Enviromental and experimetal botany*. **45**: 105-104

- Hannaway D., S. Fransen S., Cropper J., Chaney M. y Griggs T. 1999 Festuca Alta (*Festuca arundinacea* Sherb.) PNW 504. Disponible en: <http://forages.oregonstate.edu/organizations/seed/osc/tech-pubs/tf-span.pdf>
- Hansberg W. 1999. La biología del dioxígeno en singulete. TIP. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. FES Zaragoza, UNAM. **2**: 47-55.
- Iturbe R., Flores C., Chávez C. y Roldán A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Investigación y Tecnología III*. Instituto de Ingeniería, UNAM. **1**: 25-35.
- Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. **193**: 265-275.
- Macek, T., Macková M. y Kás J. 2000. Research review paper: Explotation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*. **18**: 23-34.
- Meagher, R. B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**: 153-162.
- Nilgün C. y Leman T. 2003. The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs Brown in Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ stress conditions. *Plant Science*. **165**: 769-776.
- Parrish, Z. D., M. K. y Schwab, A. P. 2005. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of Bellow sweet clover and Tall fescue. *Journal of Environmental Quality*. **34**: 207-216.
- Peraza R., 2008. Catalasa: En Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas (Konisberg M) Manual Moderno 183 -199.
- Prasad K., Sharadhi P. y Sharamila P. 1999 Concerted action of antioxidante enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Enviromental and Experimental Botany*. **42**: 1-10.

- Reynoso-Cuevas L., Gallegos-Martínez M. E., Cruz-Sosa F. y Gutiérrez-Rojas M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology* **99**: 6379-6385.
- Rivera F., Buentello B., Díaz de León F. y Pérez F., 2008 Especies reactivas de oxígeno en las plantas: En Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones medicas (Konisberg M) Manual Moderno 501– 517 pp.
- Scandalios, J. G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. **101**: 7-12
- Shewfelt, R. L. y Purvis, A. C. 1995. Toward a comprehensive model for lipoperoxidation in plant tissue disorders. *HortScience*. **30**: 213-218.
- Shewfelt, R. L. y del Rosario, B.A. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortScience*. **35**: 575-579
- Snaich, K. M. 1992. Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. *Lipids*. **27**: 209-218.
- Sminorff, N., 1993. The role of active in the response of plants to water status deficit and desiccation. *New Phytology*. **125**: 27-58.
- Susarla S., Medina. V. F. y McCutcheon S.C. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*. **18**: 647-658.
- Van Deuren, J.; Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3^a Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Winston, G.W. y Cederbaum, A.I. 1983. Oxyradical production by purified components of the liver microsomal mixed-funtion oxidase system 1: Oxidation of hidroxyyl radical scavenging agents. *Journal of Biology Chemistry*. **258**: 1508-1513.

- Zenteno T. y Saldaña Y. 2008. Daño a lípidos: En Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. (Konigsber M.) Manual Moderno 135 -146

EFFECT OF HYDROCARBONS ON THE ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND THE LIPID PEROXIDATION LEVELS IN TALL FESCUE (*Festuca arundinacea*) GROWN IN VITRO

Nava-Fernández C¹, Rivera-Cabrera, F², Gutiérrez M-Rojas¹

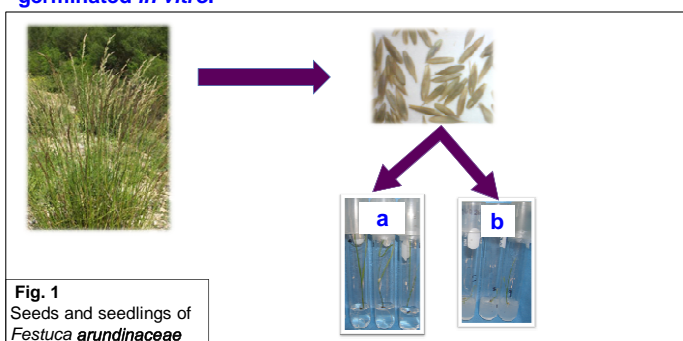
¹Departments of Biotechnology and ²Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, Iztapalapa México, D. F., 09340. (0155) 58 0465 05, fax (0155) 58 04 64 07 * cinthyax_21@yahoo.com.mx

INTRODUCTION

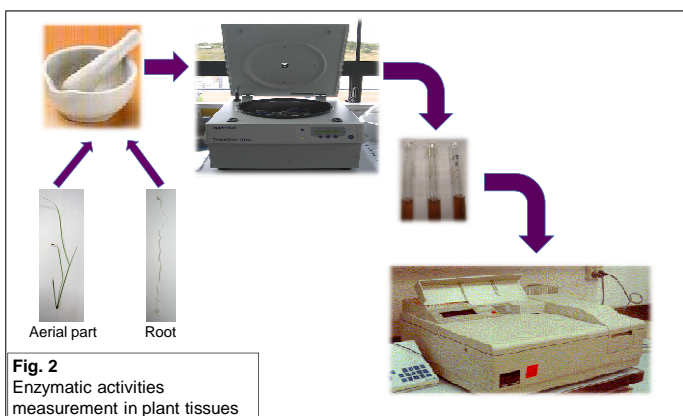
Festuca arundinacea Schreb is commonly used as fodder. However, there are reports of the use of *Festuca* as a tolerant plant to biotic and abiotic stresses, such as high temperatures, drought, saltiness and contamination by hydrocarbons. Biotic or abiotic stresses may induce an excessive production of reactive oxygen species (ROS) in the plant. Due to their high reactivity, ROS, such as hydrogen peroxide and superoxide and hydroxyl radicals, alter the function of biomolecules, including lipids, proteins and nucleic acids, giving as a result lipoperoxidation and eventually leading to loss of membrane integrity. To mitigate the oxidative damage caused by biotic or abiotic stresses, plants have evolved complex anti-oxidative defense mechanisms, which involve the action of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (G-POX). The objective of this study was to determine the CAT and G-POX antioxidant enzyme activities and the lipid peroxidation levels in grown *in vitro* *Festuca arundinacea* exposed to a hydrocarbons mixture.

MATERIALS AND METHODS

Seeds of *Festuca* were manually scarified, disinfested and germinated *in vitro*.



Two treatments were applied to plant: (a) Murashige and Skoog (MS) medium as a control; (b) MS plus a hydrocarbon mixture (pyrene, phenantrene and hexadecane; 1:1:2 w/w/w) up to 500 mg of mixture (kg of gel)⁻¹. The seedlings were grown for 50 days for both treatments. The experimental unit was 10 homogenous seedlings (see Fig 1).



Samples from aerial part and root were collected at 20, 30, 40 and 50 days of growing. G-POX and CAT enzyme activities and lipoperoxidation levels were quantified in crude extracts obtained from each sample (see Fig 2).

RESULTS AND DISCUSSION

No significant differences were observed between treatments in G-POX activity, except for the day forty in roots (see Fig 3). G-POX activity in *Festuca* under hydrocarbon stress increased thirteen times with respect to drought stress (150 G-POX units); in both cases the activity increased transiently and then decreased (Fu J., Huang B. 2001).

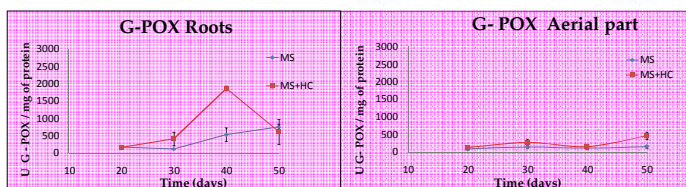


Fig. 3 Activity of G-POX in roots and aerial part, for both treatments

No significant differences were observed between treatments in CAT activity, except for day forty in roots (see Fig 4). In the same species prolonged drought reduced CAT activity (Elstner, 1982) resulting in H₂O₂ accumulation (Bowler et al., 1992).

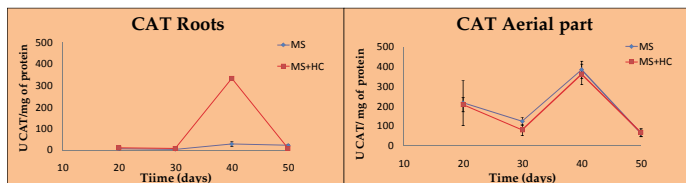


Fig. 4 Activity of CAT in roots and aerial part, for both treatments

No significant differences were observed between treatments in lipoperoxidation levels (see Fig 5). The slight decrease observed in lipoperoxidation (day 40) independently on treatment in both, aerial and root, might be explained by a transitory increase in G-POX and CAT activities observed at the same sampling time. Apparently, there was not a direct effect of the hydrocarbons at the used concentration 500 mg of mixture (kg of gel)⁻¹ neither in lipoperoxidation levels nor enzyme activities; probably because concentrations above 5 000 mg of hydrocarbon mixture (kg of gel)⁻¹ provoke damage in *Festuca arundinacea* (Reynoso-Cuevas et al., 2008)

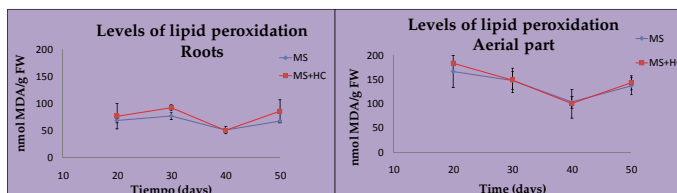


Fig. 5 Levels of lipid peroxidation in roots and aerial part, for both treatments

CONCLUSION

In our work, it is possible that the hydrocarbon concentration could not be high enough (stressing factor) to cause an increase in the antioxidant enzymatic mechanisms.

References

- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116
- Elstner, E. F., 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 73-96.
- Fu J., Huang B 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and experimental botany* 45 105-104
- Reynoso-Cuevas L. et al., 2008 In vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *ScienceDirect* 99: 6379-6385