

Marcadores de estrés oxidativo en raíces de *Allium cepa* L. expuestas a las aguas contaminadas del río Cojímar

Karel Mena-Ulecia, Dailen Guanche-Gallardo* y Heykel Hernández-Hernández.

Vicedirección de Medio Ambiente, Instituto de Geografía Tropical. Calle F No. 302 entre calles 13 y 15, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. Código Postal 10 400. Correos electrónicos: karel@geotech.cu; orula.endule@gmail.com. *Laboratorio de Biomedicina, Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 15 y 230, Reparto Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Código Postal: 12 200, Cuba.

Recibido: 26 de enero de 2010.

Aceptado: 12 de mayo de 2010.

Palabras clave: *Allium cepa* L., estrés oxidativo, contaminación del agua, ecotoxicología.
Key words: *Allium cepa* L., oxidative stress, water pollution, ecotoxicology.

RESUMEN. La determinación de marcadores de estrés oxidativo en plantas expuestas a ambientes contaminados es una práctica que viene desarrollándose desde décadas pasadas, en especial, bulbos de *Allium cepa* L. han sido empleados como modelos biológicos en la medición del impacto de la contaminación a través de marcadores pro-oxidantes y antioxidantes, que han demostrado su efectividad. Al río Cojímar se vierten residuos industriales y domésticos, lo que ha provocado una elevada contaminación demostrada en trabajos previos en el Laboratorio de Toxicología Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana. Con el objetivo de evaluar los niveles de estrés oxidativo en raíces de *A. cepa* tratadas con las aguas contaminadas del río Cojímar, se midieron 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 proteicos (GTP). La concentración de los HPT y las SRATB estuvieron elevadas en la estación-5, indicando una elevada peroxidación lipídica. La actividad de las enzimas CAT y SOD se mantuvieron bajas, al igual que el GSH y los GTP, lo que indica un elevado poder oxidante hacia la desembocadura del río Cojímar. El análisis de los resultados mostró que las aguas de este río constituyen una mezcla compleja capaz de inducir un estado redox desfavorable en los organismos expuestos, dado el elevado grado de contaminación que presenta.

ABSTRACT. The determination of oxidative stress in plants exposed to polluted environment is a practice that comes being developed from decades ago, especially, *Allium cepa* L. bulbs, has been employed as biological models in the impact assessment from pollution by means of pro-oxidant and antioxidant markers demonstrating its effectiveness. To the Cojímar River discharges industrial and domestic wastewaters, this is the cause of the high contamination demonstrated in previous works into the Genetic Toxicology Laboratory from Biology Faculty, University of Havana. With the objective of evaluating the levels of oxidative stress in *A. cepa* roots treated with the water polluted from Cojímar river, it was measured the total hidropexides (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 tiolic protein groups (GTP). The concentration of HPT and SRATB were elevated into the sampling point-5, indicating a high lipid peroxidation. The CAT and SOD activity were low, the same as GSH and GTP concentration, indicating a high oxidant power toward the Cojímar river outlet. The analysis of the these results showed that the water samples from this river constitutes a complex mixture able to an unfavourable redox status into organisms exposed, due to high pollution degree that it presents.

INTRODUCCIÓN

La medición de algunos marcadores moleculares como indicadores de la respuesta bioquímica ante los contaminantes ambientales, puede servir para mejorar la valoración de las exposiciones biológicamente importantes frente a productos químicos tóxicos y a su vez, aumentar la habilidad de tasar el riesgo de sus efectos sobre la salud de las poblaciones expuestas,¹ en tal sentido, la determinación de marcadores de estrés oxidativo en plantas expuestas a ambientes contaminados es una práctica que viene desarrollándose desde décadas pasadas.¹⁻⁴ Bulbos de *Allium cepa* L. han sido empleados como modelos biológicos en la medición del impacto de

la contaminación a través de marcadores pro-oxidantes y antioxidantes y han demostrando su efectividad para estos fines.¹⁻⁴

En Ciudad de La Habana existen varias industrias que vierten sus residuos a ríos de importancia socioeconómica como es el caso del río Cojímar, al cual vierten sus residuos industrias del tipo alimentaria, cosmética y del calzado, así como sus residuos domésticos de las comunidades Guiteras, Bahía, Alamar y Cojímar, en su mayoría sin tratamiento previo. En un estudio realizado en el Laboratorio de Toxicología Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana,⁵ fue detectada una elevada contaminación de origen orgánico y

metales pesados hacia la desembocadura de ese río. Estos contaminantes 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. Debido a estas razones, se realizó el presente trabajo el que tuvo como objetivo fundamental: evaluar los niveles de estrés oxidativo en raíces de *A. cepa* tratadas con las aguas contaminadas del río Cojímar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estaciones de muestreo

Se seleccionaron tres estaciones de muestreo (Estaciones 4, 5 y 6) (Fig.1) las cuales, están dentro de una red de estaciones establecidas para el control de la contaminación del río Cojímar y corresponden al tercio inferior del río, puesto que es la zona con mayores vertimientos de aguas residuales correspondientes al complejo industrial de Berroa y aguas albañales procedentes de las comunidades Guiteras, Bahía, Alamar y Cojímar y es la zona donde fue detectada la mayor contaminación por metales pesados y materia orgánica en estudios previos realizados en el Laboratorio de Toxicología Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.⁵

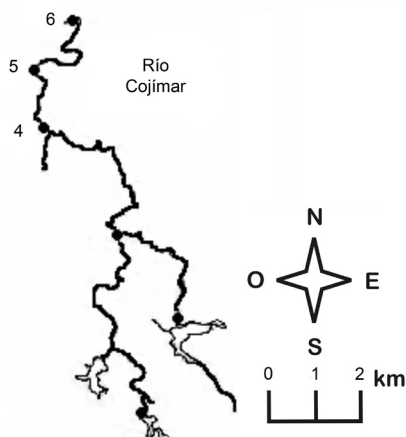


Fig. 1. Localización geográfica de las estaciones de muestreo en el río Cojímar de Ciudad de La Habana. 4) 23°08'54" latitud norte y los 82°17'44" longitud oeste, puente de la Monumental. 5) 23°08'57" latitud norte y los 82°17'42" longitud oeste, entrada del poblado de Cojímar. 6) 23°09'48" latitud norte y los 82°17'23" longitud oeste desembocadura del río Cojímar.

Toma de muestra

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, a una profundidad de 50 cm de la superficie y tan alejado de las riberas del río como fue posible. Para las mediciones de los indicadores bioquímicos, las muestras se colectaron en botellas de cristal Nansen de 1 500 mL y se trasladaron, conservadas a 4 °C, al laboratorio de análisis.

Marcadores moleculares de estrés oxidativo en *Allium cepa* L.

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. Posteriormente, el filtrado fue esterilizado mediante filtros mili-poro de 2,5 µm según lo planteado por Córdova-Pedregosa.²

Las raíces de más de 5 cm de longitud fueron cortadas en dos zonas (apical y de elongación),² se desechó la zona apical y las raíces de 2 cm fueron sometidas al análisis de los indicadores bioquímicos.

Determinaciones analíticas

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB) y la catalasa (CAT) (EC1.11.1.6) se determinaron según Mohan y cols.³ los hidroperóxidos totales (HPT) según Halliwell y Whiteman,⁶ el glutatión reducido (GSH) según Anderson,⁷ los grupos tiólicos (GT) según Ellman,⁸ la superóxido dismutasa (SOD) (EC1.15.1.1) según Beauchamp y Fridovich⁹ y las proteínas totales mediante el método de Lowry.¹⁰ Se empleó agua destilada como control negativo.

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 indicadores que cumplían las premisas del análisis de varianza (ANOVA), se sometieron a una prueba ANOVA de clasificación simple. Con el objetivo de determinar los niveles de estrés oxidativo, se empleó la prueba de Dunnett en la comparación entre los grupos con el control negativo (agua destilada). Se empleó la prueba de Tukey para la comparación entre los grupos, excluyendo el control negativo, con el objetivo de verificar las diferencias estadísticamente significativas entre zonas del río. Todas las pruebas estadísticas se realizaron para un nivel de confiabilidad de un 95 %. Los resultados fueron expresados en este trabajo como media ± desviación estándar de cinco experimentos realizados independientemente. Todo el tratamiento estadístico se realizó mediante el paquete de programas Statistica 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las determinaciones de HPT y SRATB constituyen marcadores de peroxidación lipídica.^{2,3,11,12} Ellos constituyen indicadores del daño efectuado a las estructuras, fundamentalmente en membranas celulares.

Los valores de HPT en las estaciones 4 y 6 no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Dunnett $p \leq 0,05$) con el control, sin embargo, la estación 5 mostró un incremento altamente significativo para este indicador (Fig. 2). Las SRATB, se observaron incrementadas estadísticamente (Prueba de Dunnett $p \leq 0,001$) con respecto al control experimental (-) agua destilada en las estaciones 5 y 6.

Los elevados valores de estos marcadores revelan 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 *A. cepa*. Los resultados para las aguas de la estación 5 indican que estas son capaces de inducir un desbalance redox aparejado al aumento de la oxidación de lípidos en el que el incremento de SRATB y HPT son un indicativo de la presencia de peroxidación lipídica, el cual puede favorecerse por la presencia en el medio de metales pesados.^{1-2,10-11}

Los grupos tiólicos proteicos (GTP) comprenden varios compuestos sulfidrílicos solubles como la cisteína y la glutamilmcisteína.^{11,12} El incremento en este indicador sugiere el aumento en la concentración de compuestos tiólicos

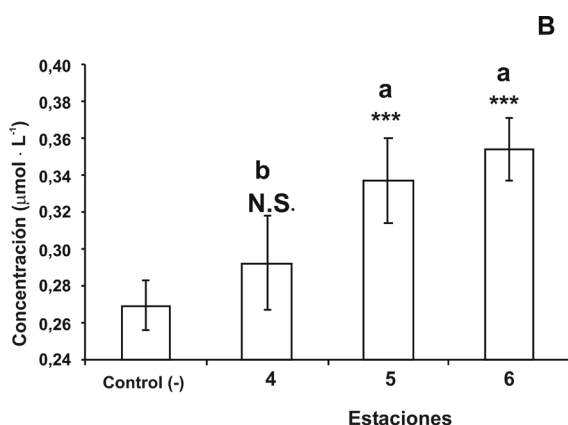
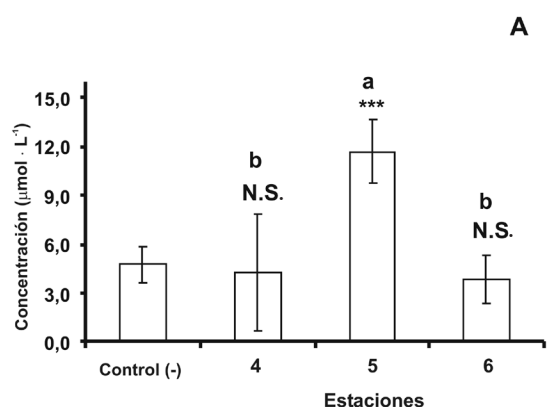


Fig. 2. Marcadores de peroxidación lipídica en las raíces de *A. cepa* expuestas a las aguas contaminadas del río Cojímar. A) Hidroperóxidos totales (HPT). B) Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB). Prueba de Dunnett. N.S. No significativa $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$. Prueba de Tukey a, b $p \leq 0,05$.

como mecanismo de defensa antioxidante. Sin embargo, su disminución apunta a un estado redox muy oxidado y por tanto, a la ocurrencia de un estrés oxidativo.^{4,11-12}

Las concentraciones de este indicador detectadas en las células de *A. cepa* expuestas a las aguas contaminadas del Río Cojímar (Fig. 3); demuestran una disminución altamente significativa (Prueba de Dunnett, $p \leq 0,001$) con relación al control negativo en todos los puntos de muestreo, siendo más acentuada la correspondiente a la estación 5, lo que evidencia un medio más oxidado en las raíces expuestas al agua de esta estación.

Este ambiente oxidado puede inactivar reversiblemente numerosas enzimas claves del ciclo de Calvin y otras vías metabólicas por oxidación de tioles funcionales.¹²⁻¹³

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.

Los valores de GSH tuvieron un comportamiento similar a los grupos tiólicos proteicos. La concentración de este indicador resultó, con respecto al control (-), muy inferior para todos los puntos de muestreo (Fig. 4); el menor valor se determinó en la estación 5, lo cual 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.

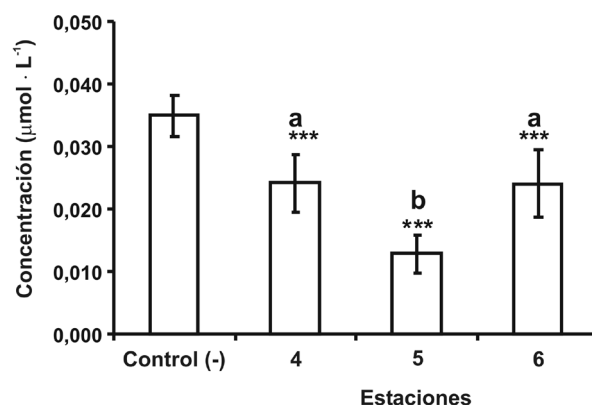


Fig. 3. Concentración de grupos tiólicos medidos en las raíces de *A. cepa*. Prueba de Dunnett *** $p \leq 0,001$. Prueba de Tukey a, b $p \leq 0,05$.

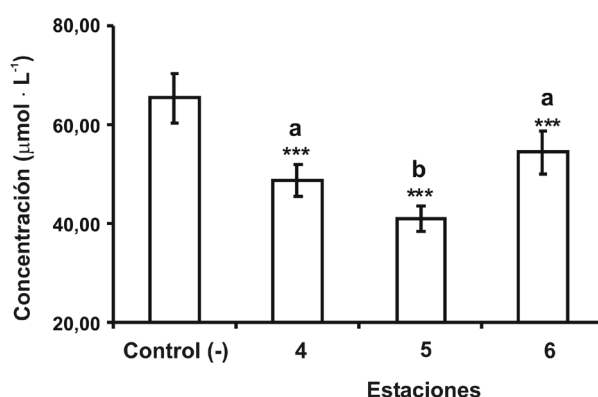


Fig. 4. Concentración del glutatión reducido medida en las raíces de *A. cepa*. Prueba de Dunnett *** $p \leq 0,001$. Prueba de Tukey a, b, c $p \leq 0,05$.

La presencia de agentes pro-oxidantes derivados de la contaminación puede provocar una disminución, por oxidación, de su forma reducida. El GSH en la célula actúa como agente estabilizador redox, actividad defensiva frente a agentes tóxicos, como suministro de grupos tiólicos o como precursor de otras moléculas como las fitoquelatinas, por citar un ejemplo.^{1,13-16}

La superóxido dismutasa (SOD) es llamada a ser la primera línea de defensa en la célula contra las especies reactivas del oxígeno (ERO),¹⁷⁻¹⁹ debido a que el radical superóxido, es el sustrato sobre quien actúa.

La actividad enzimática en las raíces expuestas a las aguas de los puntos evaluados no tuvo diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Dunnett, $p \leq 0,05$) con respecto al control negativo, ninguna de las estaciones de muestreo obtuvo significación mientras que las desviaciones estándar resultaron de amplio rango para cada una de ellas. (Fig. 5).

La actividad de la SOD, en las muestras analizadas no mostró cambios significativos en comparación con el control (Prueba de Dunnett, $p \leq 0,05$), lo que reveló la ocurrencia de su inhibición, probablemente como resultado de la propia generación de radicales o por daño severo a los organelos que la contienen.¹⁹ El exceso de H_2O_2 en la célula induce una mayor producción de $\cdot OH$ que constituye un inactivador de la enzima²⁰⁻²² y en este caso el GSH actuaría como un capturador del peróxido. Esto pudiera estar sucediendo en las muestras analizadas dadas las bajas concentraciones de GSH encontradas en este estudio.

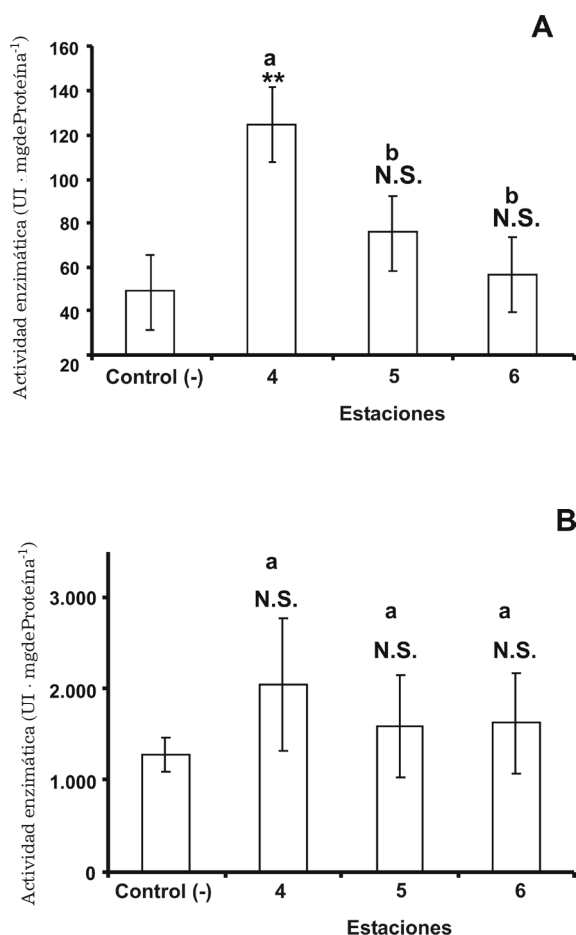


Fig. 5. Actividad de las enzimas antioxidantes medidas en las raíces de *A. cepa* expuestas a las aguas contaminadas del río Cojímar. A) Catalasa (CAT). B) Superóxido dismutasa (SOD). Prueba de Dunnett N.S. No significativo $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Prueba de Tukey a, b $p \leq 0,05$.

La catalasa (CAT), tuvo un comportamiento similar a la SOD. No hubo diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Dunnett, $p \leq 0,05$) en las estaciones 5 y 6 en comparación con el control negativo. También coincidió con los mayores valores de HPT y SRATB y las menores concentraciones de GSH y GTP. Todo lo cual evidenció un estrés oxidativo severo en la planta expuesta al agua correspondiente a esas zonas del río. También sugiere que otros sistemas atrapadores podrían haber estado actuando, como en el caso de las peroxidases, de las que se conoce que al menos la glutatión peroxidasa tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que la CAT,^{14,21-23} la cual puede encontrarse en el interior de la célula, en el espacio apoplástico, así como unido iónica y covalentemente a la pared celular²¹ y que no fue medida en este estudio.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados muestra que el agua del río Cojímar constituye 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 resultados relacionados con las enzimas antioxidantes, catalasa y superóxido dismutasa, así como el glutatión reducido y los grupos tiólicos proteicos, evidencian un estado redox perjudicial en las raíces expuestas al agua del río Cojímar, lo que indica que el

agua de este río en el área estudiada constituye una mezcla compleja capaz de inducir estrés oxidativo en los organismos expuestos a ella.

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fatima R, Ahmad M. Certain antioxidant enzymes of *A. cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*. 2005;346:256-273.
2. Córdova-Pedroza MC, Villalba JM, Córdova F, González-Reyes J.A. Changes in intracellular and apoplasmic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*. 2005;56(42):685-694.
3. Mohan MA, Jena S, Panda KK, Panda BB. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008; 70:300-310.
4. Zhang PL, Metha KS, Liu PZ, Yang MZ. Copper-Induced Proline Synthesis is Associated with Nitric Oxide Generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiology*. 2008;49(3):411-419.
5. Mena-Ulecia K. Evaluación física, química y genotóxica de la contaminación en las aguas del río Cojímar. [Tesis en opción del título de Máster en Análisis y Tecnologías Ambientales]. Ciudad de La Habana, Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías Aplicadas. 2006; febrero.
6. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brazilian Journal of Pharmacology*. 2004;142:231-255.
7. Anderson ME. Determining of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Methods of Enzymology*. 1958;113:548-555.
8. Ellman GT, Anderson, M.E. Determining of glutathione and glutathione disulphide in biological samples. *Methods of Enzymology*. 1959;113:548-555.
9. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971;44:276-287.
10. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall AL. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
11. Surapaneni KM, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *Indian Journal of Medical Science*. 2007;61(1):9-14.
12. Andresen M, Regueira T, Bruhn A, Perez D, Strobel P, Dougnac A, Marshall G, Leighton F. Lipoperoxidation and protein oxidative damage exhibit different kinetics during septic shock. *Mediators Inflamm*. 2008;8:168-652.
13. Vajpayee P, Rai UN, Ali MB, Tripathi RD, Yadav V, Sinha S, Singh SN. Chromium - induced physiologic changes in *Valisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluents. *Bull. Environ. Cont. Toxicol*. 2001;67:246-256.
14. Ahmad I, María VL, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to naphthoflavone. *Mutation Research*. 2006;608:16-28.
15. Wang SH, Yang ZM, Yang H, Lu B, Li QS, Lu YP. Copper-induced stress and antioxidant responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot Bull Acad Sin*. 2004;42:203-212.
16. Du Plessis L, Laubscher P, Jooste J, du Plessis J, Franken A, van Aarde N, et al. Flow cytometric analysis of the oxidative status in human peripheral blood mononuclear cells of workers exposed to welding fumes. *J Occup Environ Hyg*. 2010;7(6):367-74.
17. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*. 2002;53:1331-1341.

18. Sharma P, Dubey RS. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.* 2007;26:2027-2038.
19. Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld DL, Godbold DL, *et al.* Cadmium induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scot's pine roots. *Plant Physiol.* 2001;127:889-98.
20. Liskay A, Kenk B, Schopfer P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta.* 2003;217:658-667
21. Panda SK, Choudhury S. Toxic metals in plants: Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* 2005;17(1):1-16.
22. Ma B, Wan J, Shen Z. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. *Plant Growth Regul.* 2007;52:91-100.
23. Panda SK, Singha LB, Khan MH. Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in green gram (*Vigna radiata*)? *J Plant Physiol.* 2003;29:77-86.