

# Proteínas de estrés en *Lemna gibba* (Lemnaceae) expuesta al boro

## Stress proteins in *Lemna gibba* (Lemnaceae) exposed to boron

Mayra Sánchez Villavicencio,<sup>2</sup> Humberto González Márquez<sup>1</sup> y María Guadalupe Miranda Arce<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS). Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No.186 Col. Vicentina, Iztapalapa, D. F. 09340. México

<sup>2</sup> Departamento de Hidrobiología. UAM-Iztapalapa  
e-mail: wendy@xanum.uam.mx

---

Sánchez Villavicencio M., H. González Márquez y M. G. Miranda Arce. 2012. Proteínas de estrés en *Lemna gibba* (Lemnaceae) expuesta al boro. *Hidrobiológica* 22 (3): 282-289.

### RESUMEN

*Lemna gibba* Linneo, es una planta vascular acuática que vive en ambientes de agua dulce. Esta planta ha sido recomendada para estudios de contaminación debido a su crecimiento exponencial, a su pequeño tamaño que la hace de fácil manejo en el laboratorio, así como por su resistencia a la exposición de contaminantes. El boro es un micronutriente esencial para las plantas, sin embargo, en concentraciones elevadas puede limitar su crecimiento y alterar su metabolismo. El presente estudio describe los patrones electroforéticos monodimensionales y bidimensionales de las proteínas solubles totales de *L. gibba* en ausencia y presencia de boro en forma de  $H_3BO_3$ , en concentraciones de 0 a 500 ppm. Los resultados indicaron diferencias en la expresión proteínica de *L. gibba* dependiendo de la concentración de exposición al boro. Las técnicas utilizadas se modificaron para *L. gibba*, debido a que éstas eran específicas para plantas de brócoli y pueden ser empleadas como pruebas complementarias en el monitoreo ambiental.

**Palabras clave:** Boro, estrés, *Lemna gibba*, proteínas.

### ABSTRACT

*Lemna gibba* L. is a vascular aquatic plant that lives in freshwater environments. This plant has been recommended for studies of pollution due to its exponential growth, its small size that makes it easy to handle in the laboratory as well as its resistance at exposure pollutant concentrations. Boron is an essential micronutrient for plants but high concentrations may limit their growth and alter their metabolism. This study describes one and two-dimensional electrophoretic patterns of total soluble proteins of *L. gibba* in the absence and presence of boron as  $H_3BO_3$  at concentrations from 0 to 500 ppm. The results suggested that *L. gibba* has a differential protein expression in response to boron exposition. Techniques used were modified for *L. Gibba*, because these are specific to broccoli plants, and can be additional tests in environmental monitoring.

**Key words:** Boron, *Lemna gibba*, proteins, stress.

### INTRODUCCION

Las proteínas producidas por estrés han cobrado gran importancia como biomarcadores ambientales, ya que ellas tienen ciertas ventajas sobre métodos analíticos que se utilizan para calcular niveles de contaminación que afectan a poblaciones de organis-

mos expuestos. Los métodos analíticos requieren más tiempo de trabajo y en general son más costosos, además de no poder predecir eficientemente el daño causado en casos agudos de toxicidad en concentraciones altas de un contaminante. Estas pruebas tienen un grado de sensibilidad más bajo en comparación con otros biomarcadores, ya que no se obtienen respuestas en expo-

siciones crónicas en dosis más bajas (Johan, 2000). El uso de biomarcadores moleculares permite una detección más temprana que con los biomarcadores tradicionales (patología tisular, fallas reproductivas, mortalidad en masa o pérdida de la diversidad de especies). Esta nueva aproximación al monitoreo puede integrarse a las ya tradicionales pruebas físicas, biológicas y químicas para una mejor detección y manejo de cambios ambientales. Los biomarcadores proveen evidencia de los organismos que han sido expuestos, ó afectados por agentes xenobióticos, mostrando cambios bioquímicos, histológicos, morfológicos y fisiológicos en todo el organismo y se han complementado para reconocer cambios a nivel celular y molecular con biomarcadores de ácidos nucleicos y proteínas (Ryan & Hightower, 1996). Los cambios en la fisiología tanto subcelular como celular y de los organismos completos se relacionan directamente con los agentes estresantes que los inducen y se han clasificado en: respuestas adaptativas, que prevén el daño, respuestas de daño subletal y respuestas de daño letal (Ryan & Hightower, 1996). Las respuestas adaptativas y de daño subletal se pueden evaluar a través de biomarcadores de efecto y biomarcadores de exposición (Sanders, 1990). Los biomarcadores de efecto forman parte de las respuestas que previenen el daño celular mediante mecanismos de desintoxicación y revelan las lesiones subletales que se originan por la incapacidad de las defensas. Los biomarcadores de exposición valoran las dosis a las que se trata a los organismos. Por último, las respuestas letales implican efectos de necrosis o de apoptosis, cuando los mecanismos de protección y corrección fallan o bien son rebasados (Ryan & Hightower, 1996). La propuesta de utilizar proteínas de estrés como biomarcadores ambientales ha recibido atención recientemente, ya que los biomarcadores pueden utilizarse como medidas en cualquier nivel de organización, así como en poblaciones expuestas a contaminantes en su ambiente natural o bien en cultivos celulares y tejidos vegetales o animales experimentalmente expuestos a estrés físico o químico (Fossi & Leonzio, 1994) Estas medidas proporcionan un índice más sensible de exposición a efectos adversos subletales producidos por químicos tóxicos o bien a una exposición prolongada de algún químico fitotóxico, como es el caso del boro. En niveles altos de organización biológica (tejidos, órganos, o bien el organismo en general), las proteínas de estrés influyen en cambios en el metabolismo, en su fisiología, morfología, histología e inmunología. A nivel molecular y niveles subcelulares de organización, hay primordialmente cambios en ácidos nucleicos (Sanders, 1990; Huggett *et al.*, 1992). La selección apropiada de biomarcadores así como el estudio de la reparación de daño causado por tóxicos en ambientes naturales pueden generar información valiosa para la conservación de distintos ecosistemas. Entre los biomarcadores ambientales se destacan las proteínas de estrés ya que cumplen con las características que permiten realizar estudios específicos en organismos expuestos directamente a gran número de contaminantes. Las proteínas de estrés forman parte de la respuesta

celular de protección, su síntesis es inducida por la presencia de un gran número de químicos y se encuentran presentes desde bacterias hasta plantas y animales superiores. Bajo condiciones normales, la mayoría de las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHsps) no son detectables en tejidos vegetales, pero se producen rápidamente como respuesta a un choque térmico lo que indica una situación de estrés (Sun *et al.*, 2002). Todo esto depende de la temperatura y la duración del periodo de estrés (Howarth, 1990, 1994). Después de este periodo las sHsps se estabilizan llegando a tener una vida media de 30-50 h, lo que sugiere que tienen un papel importante en la recuperación (Chen *et al.*, 1990; DeRocher & Vierling, 1994; Waters *et al.*, 1995, 1996). Hasta este estudio no se encontraron antecedentes de proteínas de estrés con relación al boro.

El boro (B) es un micronutriente esencial para las plantas, necesario para la división celular, la síntesis de la pared celular, la translocación de azúcares, la síntesis proteínica y también para las funciones de las membranas (Pilbeam & Kirkby, 1983; Marshner, 1995; Blevins & Lukaszewski, 1998). Sin embargo, en concentraciones elevadas puede limitar su crecimiento y alterar su metabolismo general debido a que el nivel mínimo de boro que satisface el requerimiento esencial del mismo no está muy alejado de su umbral de toxicidad (Gupta *et al.*, 1985; Larsen, 1988; Camacho *et al.*, 2003). La fitotoxicidad asociada al boro puede manifestarse por exposiciones a suelos con elevados contenidos de sales de borato, a una fertilización excesiva con minerales de boro, a irrigación con agua de alta concentración de boro y a la reutilización de líquidos residuales provenientes de industrias que utilizan boratos para sus productos. La absorción del boro está asociada al pH (el óptimo es de 7), al contenido de materia orgánica, al intercambio iónico, a la humedad, la temperatura y la textura del suelo. Todos estos factores establecen un equilibrio entre el boro absorbido y el boro en disolución (Bundschuh, 1992). Una de las fuentes principales de boro es el agua de irrigación. El boro aplicado a través de esta fuente tarda un tiempo considerable en alcanzar el equilibrio, por lo que durante los primeros años de irrigación, la concentración de boro en agua y suelo es relativamente baja (Larsen, 1988; Martínez *et al.*, 1999). Los síntomas de toxicidad al boro en plantas se manifiestan con una clorosis, seguida por necrosis en los bordes de las hojas. Por lo tanto, el análisis foliar es utilizado para el diagnóstico de fitotoxicidad. Se ha reportado que el máximo de boro tolerado por algunos cultivos es de hasta 100 ppm (Nable *et al.*, 1997; Mass, 1984; ATSDR, 1992).

Las plantas vasculares acuáticas también llamadas macrófitas han sido utilizadas para remover distintos compuestos tóxicos del agua, como son el Cd, As, Hg, Cu, Cr, Pb (Culley & Epps, 1973; Rodgers *et al.*, 1978; Chigbo *et al.*, 1982; Charpentier *et al.*, 1987; Benda & Kouba, 1991). Entre estas plantas destacan las pertenecientes a la familia Lemnaceae por ser de fácil cosecha ya que

llegan a medir de 1.5 a 2.5 cm y crecen la mayoría de las especies sólo sobre la superficie del agua (Landolt, 1987).

En la familia botánica antes mencionada se ubica *Lemna gibba* Linnaeus, que ha resultado ser un excelente modelo experimental debido a que su manejo es fácil, se encuentra ampliamente distribuida en México, es de alta productividad, tolerante a condiciones naturales adversas, fácil cosecha y tiene un ciclo de vida corto; es una planta utilizada muy frecuentemente para pruebas de toxicidad en el monitoreo de ecosistemas acuáticos, y ha llegado a ser considerada un bioindicador (Wang, 1990).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar las proteínas de estrés que *L. gibba* expresa en respuesta a la presencia de boro, a nivel de bioensayo en laboratorio, adaptando las técnicas para: proteínas solubles, perfil proteínico monodimensional y bidimensional y auto-radiografía de geles bidimensionales para proteínas marcadas radioactivamente.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Material biológico.** Los ejemplares de *Lemna gibba* se colectaron en el Canal Nacional en Xochimilco (Barrio Caltongo, D.F.) Las plantas se lavaron con agua corriente para ser liberadas de desechos. Se enjuagaron con agua destilada, y con cloro al 0.05% y se cultivaron axénicamente en medio Hoagland 1:20, en un período de aclimatación de una semana en el invernadero de la UAM-I, con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, una intensidad de luz de 210  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  y con temperatura controlada entre 25-29 °C. Posteriormente las plantas se cultivaron en vasos de precipitados de 600 ml en donde se colocó medio nutritivo antes mencionado con las concentraciones 0, 300, 400 ppm de boro ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) a pH 7. Para el perfil proteínico monodimensional solamente se usó la concentración de 500 ppm debido a que en las anteriores concentraciones no se evidenció respuesta. Se agregaron 6 g de planta a cada vaso. Para el marcaje radiactivo se usaron cajas de Petri con 5 ml de medio nutritivo con las diferentes concentraciones de B, agregando 2 g de planta a cada caja. Todos los bioensayos se hicieron por triplicado en las mismas condiciones de luz y temperatura señaladas anteriormente.

**Extracción de las proteínas del tejido vegetal.** Para cada muestra se tomó 1g de tejido fresco perfectamente libre de agua, que fue sumergido de 3 a 5 min en nitrógeno líquido y mantenido en congelación a -70 °C. Posteriormente las muestras se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta lograr un polvo fino, y en el mismo recipiente la muestra se homogeneizó con Tris-HCl 50 mM, a pH 8.0 en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma catálogo P-9599 082k4061). Los ácidos nucleicos se precipitaron con sulfato de protamina 1mg/ml a 4 °C en agitación (López & Palton, 1991). El extracto se aclaró mediante centrifugaciones a 12,000 g durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a -70 °C en alícuotas de 1 ml.

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

### Precipitación de las proteínas y preparación de la muestra.

Se tomaron 250-500  $\mu\text{l}$  de extracto de proteínas de *L. gibba* (35  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína). Se precipitó con 4 volúmenes de acetona fría y se dejó reposar durante 15 min a 4 °C. El precipitado se centrifugó a 13,000 g durante 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, el botón resultante se enjuagó con acetona al 70% hasta lograr un botón claro. Se calentó a 100 °C con 40-50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de muestra (SDS 2% p/v, glicerol 19% p/v, 2-mercaptoetanol 5% v/v, azul de bromofenol al 0.01% p/v en Tris-HCl 62.4 mM pH 6.8) durante 2 min antes de colocarse en los geles de poliacrilamida (López & Palton, 1991).

### Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

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

El gel de compactación se preparó al 4% con 1.33 ml de acrilamida al 30% p/v, 6.1 ml de agua desionizada, 2.5 ml de amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, y se desgasificó durante 15 min. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 10%, 50  $\mu\text{l}$  de APS al 10% y 10  $\mu\text{l}$  de TEMED. Los geles monodimensionales se fijaron en una solución de ácido acético al 10% v/v, etanol al 40% v/v y agua desionizada durante 1 h y se tiñeron con azul de Coomassie durante 1 a 1.5 h. Se decoloraron con ácido acético al 10% v/v. En la electroforesis monodimensional se depositaron 35 g de proteína por carril en geles al 13%. Después de la tinción y digitalización de los geles se compararon los distintos patrones obtenidos de las proteínas solubles totales de *L. gibba* en presencia de boro (Laemmli, 1970).

Cabe señalar que para esta determinación se agregó una concentración de 500 ppm de boro. Las mediciones se realizaron a las 2, 4, 8, 24, y 48 h de iniciado el bioensayo.

### Electroforesis bidimensional en gel poliacrilamida.

Para la electroforesis se siguió el método de O'Farrell, 1975; O'Farrell *et al.*, 1977 para la cual la muestra se diluyó a una concentración de 2 mg de proteína por ml con buffer de muestra urea 9 M, 0.5% p/v. CHAPS, 10 mM DTT, 0.2% v/v de anfolitas y 0.001% p/v azul de bromofenol. La primera dimensión se realizó con bandas de gradiente de pH inmovilizado de 4-7 en una cámara Protean IEF (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. La banda focalizada se equilibró con amortiguador de muestra SDS-PAGE adicionado con urea 6 M durante 10 minutos. La banda se colocó sobre un gel de acrilamida al 13% para separar las proteínas durante tres fases de isoelectroenfoque según el manual, que van desde 200-20,000 V.

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

**Tinción de plata.** Los geles se enjuagaron tres veces durante 20 min con agua ultra-pura. Se remojaron 30 min en solución DTT al 0.0005% p/v. Se tiñeron durante 30 min con una solución de nitrato de plata al 0.2% p/v. Se enjuagaron durante 5 min con agua ultra pura. Se revelaron de 7 a 10 min en una solución de carbonato de sodio al 3.5% p/v y formaldehído al 0.05% v/v. La reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 3% v/v. Los geles revelados se enjuagaron con agua ultra-pura y se secaron.

**Análisis de electroferogramas.** Los geles se secaron, digitalizaron y analizaron mediante el programa para geles monodimensionales (Quantity-One). Se determinó además la masa molecular y la densidad relativa, mediante comparación con estándares de Sigma 96269.

**Marcaje radioactivo** Las muestras de 0 y 300 ppm con sus duplicados se marcaron *in vivo* con [<sup>35</sup>S] metionina (30 kBq/ml; Amersham) a las 2 y 8 h. El pulso tuvo una duración de 2 h (Freireira *et al.*, 1996). Una vez que se cumplió el tiempo del pulso las muestras fueron lavadas con medio Hoagland y procesadas mediante la técnica de extracción de proteínas arriba mencionada. Del homogenizado se tomaron alícuotas de 20 µl y se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo. Del extracto claro se tomaron alícuotas de 94 µl y se precipitaron con TCA al 10% p/v. Del sobrenadante resultante se tomaron 20 µl y se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo. Todas las muestras se leyeron en un contador de centelleo. Se obtuvieron los cpm totales/mg de proteínas solubles totales para todas las muestras. A partir de estos resultados se realizaron las electroforesis monodimensionales y bidimensionales de cada muestra. Antes de secar los geles se remojaron en una solución de ácido acetilsalicílico al 5 M durante 20 min para detectar quimioluminiscencia.

Las autoradiografías de los geles secos se realizaron usando dos métodos con el fin de obtener el mejor resultado.

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

## RESULTADOS

**Extracción de proteínas del tejido vegetal.** La extracción de proteínas se realizó mediante una modificación de la técnica propuesta por López y Palton (1991). La concentración promedio de proteínas obtenida de los extractos de *L. gibba* fue de  $2.68 \pm 0.12$

mg de proteína/g de peso fresco de planta. No se presentaron diferencias significativas en el contenido de proteínas extraídas entre los tratamientos y el control.

**Separación de proteínas en electroforesis monodimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS).** A las 2 h de exposición al boro no se observaron cambios importantes en el patrón electroforético de *L. gibba*, con excepción de una banda de 97 kDa en 300 ppm (Fig. 1a). A las 4 h de exposición se observó el incremento de tres bandas, de 45, 50 y 55 kDa en las concentraciones de 300 y 500 ppm; en la concentración de 400 ppm el incremento de estas bandas fue menor (Fig. 1b). Otro cambio importante se observó a las 8 h en las concentraciones de 300 y 400 ppm, en donde se sobre-expresó una banda de 58 kDa, de 21 kDa y otra banda de 80 kDa (Fig. 1c).

Con 300 y 400 ppm de boro y 24 y 48 h de exposición, se observó que incrementaron su densidad relativa las bandas de 14, 21, 45, 55 y 80 kDa (Fig. 1d). La banda de 14 kDa se observó únicamente en la concentración de 300 ppm (Fig. 1e). Las bandas de 14 y 21 kDa que se manifestaron en las concentraciones de 300 y 400 ppm podrían tratarse de las sHsps (proteínas de choque término de bajo peso molecular). Las bandas de 45-55 podrían corresponder a la Hsp (proteína de choque térmico) 60. Finalmente la de 80 kDa podría ser una Hsp 70.

**Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en presencia de SDS (PAGE-SDS 2-D).** A las 48 h de exposición al boro se observó el incremento de proteínas de 14, 21, 25, 30 y de 40, 45, 55, 60 y 80 kDa en las concentraciones de 300 y 400 ppm respectivamente (Fig. 2b-c). En el control apareció una proteína de 97 kDa y otra de 101 kDa, que no se observaron en ninguno de los demás tratamientos (Fig. 2a). En la concentración de 300 ppm se apreció la sobreexpresión de un grupo de proteínas de 45 kDa, mientras que en la de 400 ppm, no se observó el incremento de esas proteínas.

En la Tabla 1 se presentan los pesos moleculares en kDa de cada condición, así como sus puntos isoeléctricos (P. I.) En el control se encontró mayor número de proteínas entre los 28 y 31 kDa con un intervalo de P. I. entre 5 y 6. Para la concentración de 300 ppm se presentaron proteínas desde 14 hasta 80 kDa con un intervalo de P.I. de 5 a 6.6. En la concentración de 400 ppm se presentó un gran número de proteínas que abarcaron puntos isoeléctricos desde 4.5 hasta 6.6. Las proteínas que se presentaron en cada P. I. fueron considerados como importantes debido a la ausencia o presencia de éstas en las distintas concentraciones de B.

**Marcaje y autoradiografía.** Se observó un aumento en la síntesis de proteínas a las 3 h de exposición al boro, mientras que a las 9 h de exposición, la síntesis disminuyó en los grupos experimentales con respecto al control (Fig. 3a-b). Aparentemente existe una síntesis de nuevas proteínas por presencia de boro

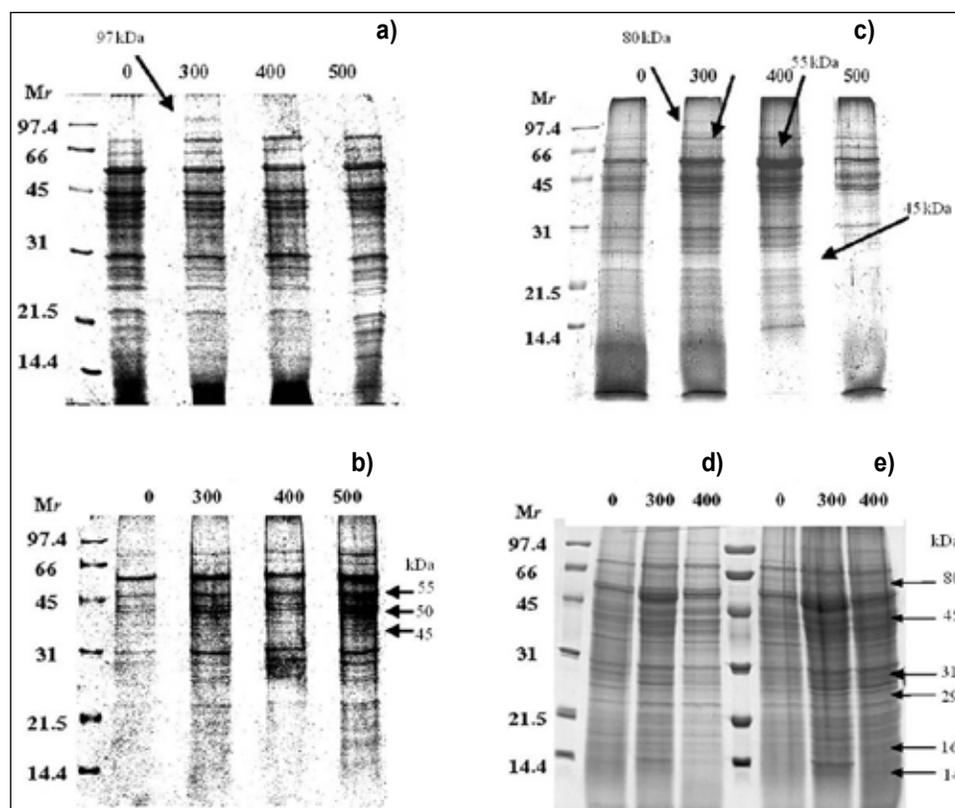


Figura 1a-e. PAGE-SDS en *Lemna gibba* expuesta a distintas concentraciones de boro en distintos tiempos a) 2 h, b) 4 h, c) 8 h, d) 24 h y e) 48 h.

al inicio del tratamiento, sin embargo, se presentaron muchas proteínas marcadas (Fig. 3b), lo que al compararse con el patrón electroforético de *L. gibba* en las mismas condiciones pero sin marca radioactiva, mostró gran similitud en la síntesis de proteínas (Fig. 3a), indicando así que muy probablemente no existe una marca selectiva. Como se observa en la Figura 3a-b, se sobreexpresaron proteínas de 55 kDa en ambas condiciones.

La Figura 4 muestra la incorporación específica de [<sup>35</sup>S]-metionina (cuentas totales por minuto entre los mg de proteínas solubles totales) para cada condición, observándose mayor incorporación en el tratamiento de 300 ppm al inicio y a las 9 horas de exposición al boro, con respecto al control.

## DISCUSIÓN

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

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

Tabla 1. Proteínas de *Lemna gibba* L. en geles bidimensionales a concentraciones 0, 300 y 400 ppm de Boro.

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

kDa- kilodaltons; P. I.-Punto Isoeléctrico.

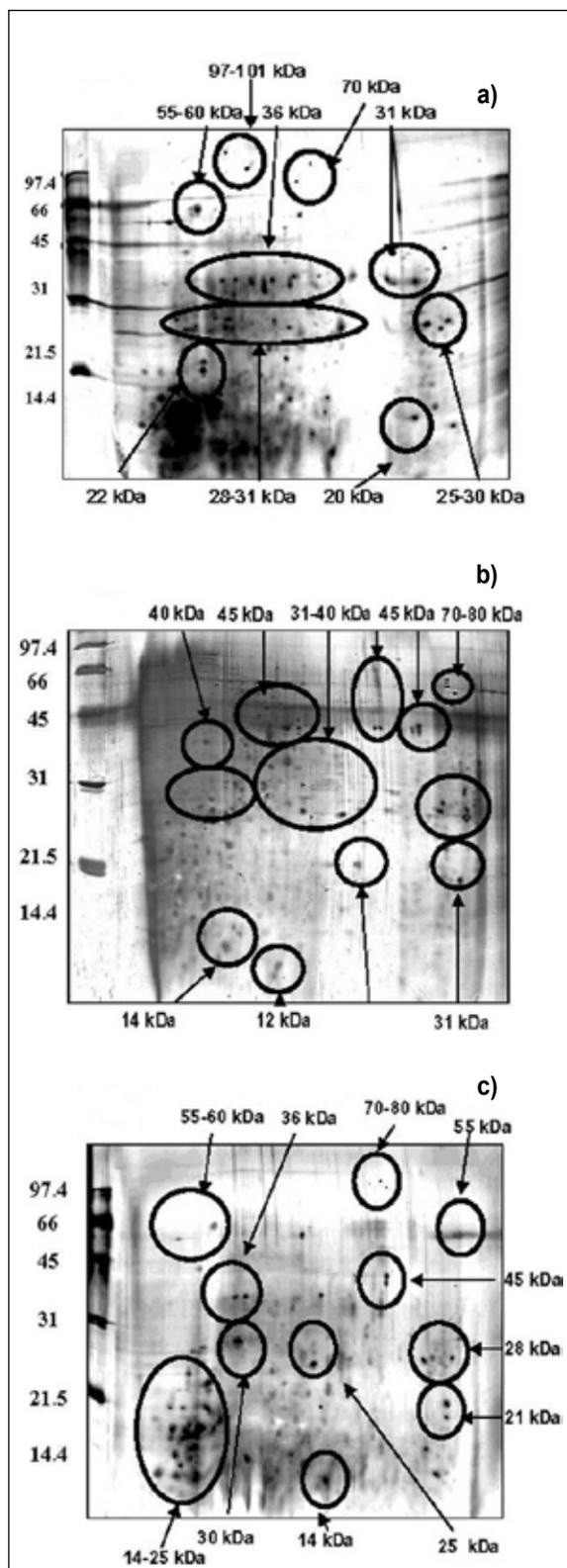


Figura 2a-c. Efecto del boro en los patrones bidimensionales de *Lemna gibba* a las 48 hr de exposición. a) (plantas sin tratamiento,) b-c) plantas con tratamiento a 300 y 400 ppm de Boro respectivamente.

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

*L. gibba* es una planta útil en la remoción de contaminantes que se acumulan en el agua. El conocer las proteínas que expresa en situaciones de exposición a elementos tóxicos, podría ser una prueba complementaria para el monitoreo ambiental. No hay una técnica totalmente adecuada para la extracción de las proteínas del tejido de *L. gibba*, por otro lado las referencias más actualizadas no reportan la técnica de manera específica (Oughman & Howarth, 1988).

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

**Electroforesis monodimensional de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS).** Una respuesta interesante en *L. gibba* ante la presencia del boro fue que repetidas veces presentó la expresión de las mismas proteínas cuando fue expuesta a 300 ppm, lo cual indica que su nivel de tolerancia a la presencia de boro es alto.

**Marcaje y autorradiografía de proteínas recién sintetizadas.** Se ha observado que 1 h de marcaje de [<sup>35</sup>S] metionina no es suficiente para producir la síntesis de polipéptidos de novo (Ferreira *et al.*, 1996), por lo que en las condiciones experimentales de este bioensayo la marca fue de 2 h y se observaron cambios en el patrón general de proteínas, sin embargo, la cantidad de proteínas marcadas no fue muy selectiva en el tiempo analizado. Aunque en las tres primeras horas de exposición al boro, se observó una mayor síntesis de proteínas en los tratamientos que en el control, a las nueve horas de exposición cuando finalizó el tiempo de marcaje, la tendencia en la síntesis de proteínas, tanto de los controles como de los tratamientos, fue muy similar (Fig. 3b).

Las técnicas de extracción de proteínas fueron modificadas para adecuarlas a la planta acuática *L. gibba* con buenos resultados. Dado que hubo expresión de proteínas al exponer a *L. gibba* a un elemento en concentraciones de toxicidad, estas pueden ser consideradas como herramientas adicionales en estudios de monitoreo ambiental.

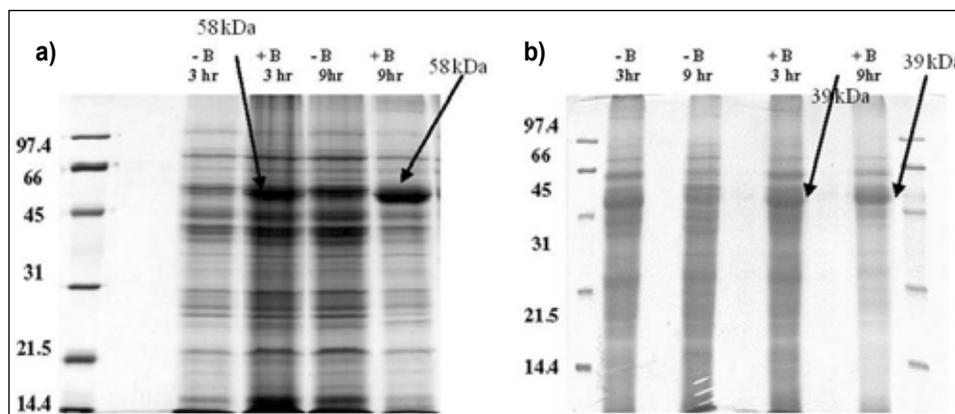


Figura 3a-b. a) Electroforesis monodimensional de proteínas no marcadas, b) Proteínas marcadas con  $[^{35}\text{S}]$  metionina indicado con flechas de *Lemna gibba*. expuesta a 300 ppm de Boro.

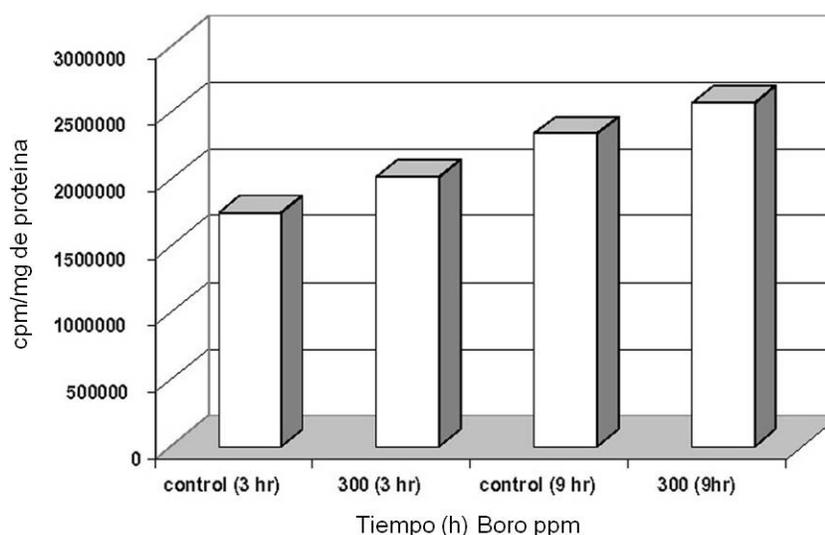


Figura 4. Incorporación específica de  $[^{35}\text{S}]$  metionina indicado con flechas de *Lemna gibba* en presencia y ausencia de Boro.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Hidrobiól. Lauraceli Romero Ortíz por la ayuda en la edición del manuscrito.

## REFERENCIAS

- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). 1992. *Toxicological profile for boron*. Atlanta, GA: United States Department of Health and Human Services, Public Health Service. 325 p.
- BECKER, W., L. KLEINSMITH & J. HARDIN. 2000. *The world of the cell*. Addison Wesley Longman Publishers (4th edition). San Francisco, CA. United States. 923 p.
- BENDA, F. & J. KOUBA. 1991. Chemical speciation and bioavailability of Cu (II) study of ionic copper (II) and Bis (glycinate)- copper (II) accumulation by *Lemna* species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 466-472.
- BLEVINS, G. D. & M. K. LUKASZWESKI. 1998. Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Physiology* 49: 481-500.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding. *Annual Review of Biochemistry* 72: 248-254.
- BUNDSCHUH, J. 1992. Boron contamination of the ground and surface waters of Lerma Valley, Argentina. *Journal of Water Supply Research and Technology Aqua* 41 (1): 13-17.
- CHARPENTIER, S., J. GARNIER & R. FLAUGNATTI. 1987. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in experimental cultures of duckweed, *Lemna polyrrhiza* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 38: 1055-1061.

- CHEN, Q., L. M. LAUZON, A. E. DEROCHE & E. VIERLING. 1990. Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat shock protein. *The Journal of Cell Biology* 10: 1873-1883.
- CHIGBO, F. E., R. W. SMITH & F. L. SHORE. 1982. Uptake of arsenic, cadmium, lead and mercury from polluted waters by the water hyacinth *Eichhornia crassipes*. *Environmental Pollution* 27: 31-36.
- CULLEY, D. D. & E. A. EPPS. 1973. Use of duckweed for water treatment and animal feed. *Journal Water Pollution* 45: 337-347.
- DEROCHE, A. E. & E. VIERLING. 1994. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *The Plant Journal* 5: 93-102.
- FERREIRA, R., E. FRANCO & A. TEIXEIRA. 1996. Covalent dimerization of ribulose biphosphate carboxylase subunits by UV radiation. *Biochemistry Journal* 318: 227-234.
- FOSSI M. C. & C. LEONZIO (Eds.). 1993. *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, United States. pp. 313-324.
- GUPTA, U. C., Y. W. JAME, A. J. CAMBELL & W. NICHOLAICHUK. 1985. Boron toxicity and deficiency: A review. *Canadian Journal of Soil Science* 65: 381-409.
- HELM, K. W., P. R. LAFAYETTE, R. T. NAGAO, J. L. KEY & E. VIERLING. 1993. Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. *Molecular Cell Biology* 13 (1): 238-247.
- HOWARTH, C. 1990. Heat shock proteins in *Sorghum bicolor* and *Pennisetum americanum*. II. Stored RNA in sorghum seed and relationship to heat shock protein synthesis during germination. *Plant Cell Environmental* 13: 51-64.
- HOWARTH, D. J. & K. P. SKOT. 1994. Detailed characterization of heat shock protein synthesis and induce thermotolerance in seedling of *Sorghum bicolor* L. *Journal Experimental Botany* 45: 1353-1363.
- HUGGETT, R. J., R. A. KIMERLE, P. M. MEHRLE & H. L. BERGMAN. 1992. *Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis Publisher, Boca Raton, FL., 344 p.
- SOCIETY OF ECOTOXICOLOGY A. C. Special Publication, Lewis, Boca Raton, Florida, United States. 347 p.
- JOHAN, G. E. A. 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153: 61-72.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANDOLT, E. 1987. Biosystematic investigations in the family of duckweed (Lemnaceae) *Veröff. Geobot. Inst. ETH. Stiftung Rübel, Zürich* 4: 131-133.
- LARSEN, L. A. 1988. Boron. In: Seiler, H. G. & H. Sigel (Eds.). *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York, United States. pp. 129-141.
- LÓPEZ, M. F. & W. F. PATTON. 1991. Preparative 2-D electrophoresis, MCLC purification and amino acid sequencing of plant proteins. In: Dunn, M. J. (Ed.). *Proceedings of the International Meeting on 2-D Electrophoresis*. London, England, pp. 313-316.
- MARSCHNER, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. U.S.A, Academic Press. Cambridge, England. 889 p.
- MARTÍNEZ, J. L, M. M. DE LA FUENTE & E. MUÑOZ. 1999. El boro en los vertidos industriales. *Ingeniería Química* 9: 163-169.
- MASS, E. V. 1984. Salt tolerance of plants. In: *Handbook of plant science*. B. R. Christie (Ed.) CRC Press Inc. Boca Raton. Florida, United States, pp. 67-96.
- NABLE, R. O., G. S. BAÑUELOS & J. G. PAULL. 1997. Boron toxicity. *Plant and Soil* 193: 181-198.
- O'FARRELL, P. H. 1975. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal Biological Chemistry* 250: 4007-4021.
- O'FARRELL, P. Z., H. M. GOODMAN & P. H. O'FARRELL. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12: 1133-1142.
- OUGHAM, H. J. & C. J. HOWARTH. 1988. Temperature shock proteins in plants. *Symposium Society of Experimental Biology* 42: 259-280.
- PÉREZ, L., R. AGUILAR, A. PÉREZ-MÉNDEZ & E. SÁNCHEZ. 1990. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues. *Plant Physiology* 94: 1270-1275.
- PILBEAM, D. J. & E. A. KIRKBY. 1983. The physiological role of boron in plants. *Journal of Plant Nutrition* 6: 563-582.
- RODGERS, J., D. CHERRY & R. GUTHRIE. 1978. Cycling of elements in duckweed (*Lemna perpusilla*) in an ash settling basin and swamp drainage system. *Water Research* 12: 765-770.
- RODRÍGUEZ M. J., M. M. DE LA FUENTE & E. MUÑOZ. 2002. Toxicidad del boro en las plantas. *Encuentros en la Biología* 82: 324-345
- RYAN J. A. & L. E. HIGHTOWER. 1996. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. In: Feige U, R. I. Morimoto, I. Yahara & B. S. Polla (Eds.). *Stress-inducible cellular responses*. Basel. Birkhäuser Verlag, pp. 411-424.
- SANDERS, B. 1990. Stress proteins: potencial multitiered biomarkers. In: McCarty, J. F. & L. R. Shugart (Eds.). *Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, United States, pp. 165-192.
- SUN, W., V. MONTAGU & N. VERBRUGGEN. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577: 1-9.
- WANG, W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 52: 7-22.
- WATERS, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* 141(2): 785-95.
- WATERS, E. R., G. J. LEE & E. VIERLING. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Biology* 47: 325-338.

Recibido: 31 de mayo del 2011.

Aceptado: 27 de julio del 2012.