



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

EFFECTOS DEL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y
DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN *Zea mays* L.
(Modalidad: Tesis de Grado)

YOLANDA MARGARITA COLÓN OLIVO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

EFFECTOS DEL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y
DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN *Zea mays* L.

APROBADO POR:

Prof. Leida Marcano
Asesora

Prof. Víctor Franco
Coasesor

Prof. Yanet Antón

Prof. José Imery

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
Material biológico	6
Diseño experimental.....	6
Bioensayo de exposición al metal	6
Pigmentos fotosintéticos	7
Azúcares totales	8
Proteínas totales	8
Tioles totales (-SH)	9
Actividad de catalasa (CAT).....	10
Análisis de Malondialdehído (MDA).....	10
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS	12
Concentración de pigmentos fotosintéticos	12
Azúcares totales solubles	13
Proteínas totales solubles	14
Tioles totales	14
Catalasa (CAT).....	15
Malondialdehído (MDA)	16
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

DEDICATORIA

A

Dios primeramente, por haberme dado salud, fé, fortaleza y paciencia para superar los obstáculos que en el camino se me presentaron, por demostrarme que todo pasa y que su tiempo es perfecto.

Mis padres, Yolanda de Colón y Julio Colón, por ser mi motor, ejemplo y fuerza en este camino. Por darme todo, apoyarme y nunca dejarme caer.

Mis hermanas Julia, Milagros y Maryolis, mis hermanos Carlos, Julio y Víctor, por ser los mejores compañeros de mi vida, por sus consejos, su apoyo; por estar conmigo siempre y en ocasiones hacer de mi camino el suyo.

Mis profesores, Leida Marcano y Víctor Franco, por su disposición, empeño, conocimientos, orientación, comprensión y ayuda en este trabajo.

Mi novio Deivid, por enseñarme a ser paciente, aguantarme, apoyarme y estar conmigo como solo nosotros sabemos estar.

Mis amigos y compañeros, Yannelys, Marilyn, Isis, Luisany, Naicelys, Nelyuris, Jeannifer y a las testosteronas del grupo, Jesús y Ángel, por hacer de este camino más divertido y llevadero. Gracias por su amistad.

Mis amigos distantes pero nunca ausentes, Anderson, Lorennys y Andriw, por sus consejos y por darme ánimos cuando lo necesite.

AGRADECIMIENTOS

A

Mis asesores, profesora Leida Marcano y profesor Víctor Franco, por abrirme las puertas de su departamento, por la confianza que me brindaron, por su paciencia y dedicación en este trabajo.

Mi compañera Noryeling Lanza, por apoyarme, acompañarme y brindarme su amistad. Mejor compañera, no pude tener.

Mi profesora Sabah Gharseddiene por su cariño y por haber puesto a la profesora Leida en mi camino. Al profesor José Imery y la profesora Elena Marcano, por su aporte y colaboración en la realización de este trabajo.

Gracias!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pigmentos (clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total y carotenoides totales) en hojas de plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) controles (0 μM Cd) y expuestas a distintas concentraciones de Cd (5, 25 y 50 μM). Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda ($\mu\text{g/g.m.h}$) más el error estándar ($n = 10$)......	12
Figura 2. Azúcares totales solubles en hojas y raíces de plantas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) controles (0 μM Cd) y sujetas a concentraciones de 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en miligramos por gramo de masa húmeda (mg/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.	13
Figura 3. Proteínas totales en hojas y raíces de <i>Zea mays</i> L. controles (0 μM Cd) y expuestas concentraciones de 5, 25 y 50 μM Cd. Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda (mg/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.	14
Figura 4. Tioles totales en hojas y raíces de <i>Zea mays</i> L. controles (0 μM Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda ($\mu\text{g/g.m.h}$) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.	15
Figura 5. Catalasa en hojas y raíces de plantas de <i>Zea mays</i> L. controles (0 μM Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en Unidades por gramo de masa húmeda (U/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). En el caso de las hojas, el valor representado se debe multiplicar por 10^2 . Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.	16
Figura 6. Malondialdehído (MDA) en hojas y raíces de <i>Zea mays</i> L., controles (0 μM Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en milimoles por gramo de masa húmeda (mM/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.	17

RESUMEN

Se evaluaron los efectos del cadmio en hojas y raíces de plantas de maíz (*Zea mays* L.) empleando los siguientes biomarcadores: concentración de pigmentos fotosintéticos (PF), azúcares totales (AT), proteínas totales (PT), grupos tioles ($-SH$), actividad de la enzima catalasa (CAT) y niveles de malondialdehído (MDA). Para el bioensayo de exposición al metal, se utilizaron plántulas obtenidas del proceso de germinación durante nueve días de las semillas de *Z. mays*; éstas fueron sembradas individualmente en envases plásticos contentivos de un sustrato orgánico mezclado con agua para el caso del tratamiento control y la solución del metal para los tratamientos con Cd (5, 25 y 50 μM). Posterior a la siembra, las unidades experimentales se colocaron aleatoriamente en un medio natural, sujetas a la temperatura del ambiente y el fotoperiodo natural (12h/12h de luz y oscuridad, respectivamente) por 30 días y, cada tres días se hicieron riegos para mantener la humedad del sistema (70-75 %). En hojas, los PF y PT no fueron afectados por los tratamientos con Cd; sin embargo, a las concentraciones más bajas se observó un aumento de los AT desde $15,32 \pm 1,95$ mg/g.m.h (control) hasta $20,76 \pm 2,02$ y $24,88 \pm 1,90$ mg/g.m.h en los tratamientos de 5 y 25 μM de Cd, respectivamente; en contraste, a la concentración más alta (50 μM Cd), los AT no variaron, pero los grupos $-SH$ aumentaron desde un valor basal de $0,65 \pm 0,06$ $\mu moles/g.m.h$ hasta $1,70 \pm 0,23$ $\mu moles/g.m.h$, al igual que CAT se estimuló hasta $7081,2 \pm 96,0 \times 10^2$ U/g.m.h con respecto al control ($6776,6 \pm 58,6 \times 10^2$ U/g.m.h.). Un patrón de respuesta distinto se observó en raíces; los AT no variaron con la exposición al metal; sin embargo, los grupos $-SH$ disminuyeron en todos los tratamientos con el metal; siendo $0,49 \pm 0,07$ $\mu moles/g.m.h$, el valor más bajo registrado a 50 μM de Cd con respecto al valor del control ($0,91 \pm 0,11$ $\mu moles/g.m.h$). Coincidente con el descenso de los grupos $-SH$, a la concentración más alta del metal, en raíces se evidenciaron aumentos en PT desde $10,92 \pm 1,94$ mg/g.m.h (control) hasta $18,57 \pm 1,59$ mg/g.m.h y en la actividad de CAT desde $6470,7 \pm 113,7$ U/g.m.h (control) hasta $7013,5 \pm 38,5$ U/g.m.h. En ambos tejidos, los niveles de MDA incrementaron solo a la concentración más alta de Cd (50 μM). En general, los resultados de la presente investigación revelaron que, 5 y 25 μM de Cd produjeron cambios diferenciales en el sistema de defensa antioxidante ($-SH$, CAT y PT) de hojas y raíces que evitaron el desarrollo de estrés oxidativo y, en el caso de las hojas, se mantuvo inalterado el proceso fotosintético y se favoreció la acumulación de sustratos energéticos (AT); sin embargo, a 50 μM de Cd se sobrepasó la capacidad de defensa antioxidante de este mecanismo de compensación bioquímico y se manifestaron daños oxidativos, evidenciados por incrementos en MDA, tanto en hojas como en raíces de *Z. mays*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo por metales pesados se ha convertido en un severo problema en muchos países del mundo, principalmente por el hecho de que estos químicos pueden ser eficientemente acumulados por las plantas y así, directa o indirectamente encontrar la vía de ingreso a los animales, incluyendo al ser humano (Song *et al.*, 2017). En este sentido, es cada vez mayor el interés por desarrollar estudios de monitoreo y análisis cuantitativo de estos contaminantes inorgánicos en el medio terrestre así como, los orientados a evaluar los efectos perjudiciales que ocasionan a los organismos; receptores finales en los ecosistemas de éstos y otros contaminantes (Aliu *et al.*, 2013).

Las plantas superiores presentan una serie de características que las convierten en biomonitores idóneos de la contaminación terrestre por metales pesados. Son organismos sedentarios, su identificación y clasificación taxonómica es conocida, son abundantes y de amplia distribución en casi todos los tipos de suelos; inclusive en los altamente contaminados, su nutrición mineral depende de las características del medio terrestre, lo que facilita la absorción y acumulación en sus tejidos de los distintos contaminantes que continuamente ingresan al suelo (Singh y Tuteja, 2011; Remon *et al.*, 2013; Ojekunle *et al.*, 2014). Además, las plantas ocupan una posición ecológicamente relevante; siendo la base de la trama trófica, son claves en la transferencia y acumulación de metales hacia eslabones superiores, proceso conocido como biomagnificación (Stankovic y Kalaba, 2014).

Muchos metales pesados absorbidos desde el suelo por las raíces de las plantas, a bajas concentraciones son nutrimentos esenciales para su metabolismo y crecimiento; cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe) y magnesio (Mg) entre ellos; sin embargo, otros como mercurio (Hg), plomo (Pb) y cadmio (Cd) no tienen función biológica conocida y, al igual que los micronutrientes, también son eficientemente absorbidos por las plantas, el transporte y acumulación de estos últimos en diferentes tejidos favorece su interferencia

con la actividad de los metales esenciales causando así, desajustes bioquímicos y fisiológicos que afectan el crecimiento y la biomasa de los cultivos (Augusto *et al.*, 2014).

El cadmio (Cd) es uno de los metales pesados con mayor potencial de toxicidad para todos los seres vivos. Naturalmente es un metal muy escaso; sin embargo, sus concentraciones en el ambiente son cada vez mayores debido principalmente, a las descargas de desechos industriales provenientes de la minería, metalúrgica, fabricación de pigmentos y la agricultura, entre otras actividades antrópicas (Lemtiri *et al.*, 2016). Este metal, al igual que la mayoría de este grupo tiene propiedades químicas que le confieren cierta resistencia a la biodegradación, lo que favorece su persistencia en el suelo por largos periodos de tiempo, aumentando así la probabilidad de ser bioacumulado y potenciar su acción perjudicial sobre los organismos (Nazar *et al.*, 2012; Kowald *et al.*, 2016).

El potencial fitotóxico del Cd ha sido ampliamente referenciado por diversos autores, sus efectos incluyen: reducción del crecimiento y desarrollo de la planta (Souza *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2012), desequilibrios en el intercambio gaseoso, balance hídrico e iónico (Hattab *et al.*, 2009; Gill *et al.*, 2012), alteración de la integridad estructural de membranas y otros organelos celulares (Rahoui *et al.*, 2010), inhibición de la absorción de micronutrientes e interferencia con su metabolismo (Bertoli *et al.*, 2012. Nazar *et al.*, 2012), cambios estructurales en los cloroplastos, clorofila y otros pigmentos, así como en enzimas que participan en la fijación del CO₂ afectando así, la fotosíntesis (Ekmekci *et al.*, 2008; Januskaitiene, 2012; Rastgoo y Alemzadeh, 2011). Efectos genotóxicos del Cd en plantas también han sido evidenciados en diversos grupos de plantas (Seth *et al.*, 2008; Kumar y Kumar, 2010).

La toxicidad del Cd resulta de su acción directa sobre blancos moleculares específicos (proteínas y enzimas, por ejemplo) e indirectamente, puede estar mediada por una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (EROs) que desencadenan daños

oxidativos cuando las defensas antioxidantes celulares, se encuentran atenuadas (Sagardoy, 2011; Pérez-Chaca *et al.*, 2014). Los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo ($\bullet OH$), alcoxi ($RO\bullet$) y peroxi ($ROO\bullet$), así como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son EROs o inducen su formación (como en el caso del H_2O_2) que, dependiendo de las concentraciones, pueden inducir estrés oxidativo (Choudhury *et al.*, 2013; D'Souza y Devaraj, 2013). Niveles fisiológicamente apropiados de estos oxiradicales son mantenidos por mecanismos bioquímicos no enzimáticos que incluyen pequeños péptidos, tales como, glutatión en su forma reducida (GSH) y fitoquelatinas, aminoácidos como cisteína, homocisteína y prolina, el ascorbato, tocoferoles, flavonoides y carotenoides también forman parte de este grupo. Entre los sistemas enzimáticos destacan, la superóxido dismutasa (SOD) que metaboliza al radical superóxido, la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx); involucradas en el catabolismo del peróxido de hidrógeno (Rastgoo *et al.*, 2014).

Diversos estudios han señalado que los oxiradicales generados por la exposición al Cd pueden actuar como catalizadores de reacciones de oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, estableciéndose así el estrés oxidativo que interfiere con la homeostasis metabólica y afecta el funcionamiento normal de los organismos (Wu *et al.*, 2015). En este contexto, los lípidos de las membranas celulares son muy sensibles a la acción de las EROs y las reacciones en cadena de peroxidación de éstos, es una respuesta común en organismos sujetos al estrés por metales pesados, incluyendo al Cd (Agbadah *et al.*, 2016). El malondialdehído (MDA) es uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, razón por la cual, los cambios en el contenido de esta molécula se emplean como un marcador bioquímico (biomarcador) frecuente y útil para detectar daño oxidativo inducido por la exposición a metales pesados (Arbona *et al.*, 2008; Hossain *et al.*, 2009). Similarmente, alteraciones de los contenidos o actividades de las moléculas con roles antioxidante (GSH, ascorbato, fitoquelatinas y algunos pigmentos) se emplean como biomarcadores (BM) importantes en el diagnóstico de estrés oxidativo inducido por metales pesados (Yang *et al.*, 2012).

En distintas especies de plantas se ha evidenciado que la toxicidad del Cd está asociada con el desarrollo de una condición de estrés oxidativo que, en muchos casos se debe a un incremento en la peroxidación de lípidos de membranas (Singh *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2017), mediada por una sobreproducción de H₂O₂ u otro oxiradical (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2009; Smiri, 2011; Martínez, 2014) y alteraciones en los mecanismos de las defensas antioxidantes (Cui y Zhao, 2011; Shereefa y Kumaraswami, 2016). A pesar de que el Cd no es un metal redox-activo, indirectamente puede inducir la generación de EROs y estrés oxidativo, interfiriendo con la transferencia de electrones durante los procesos de fotofosforilación y fosforilación oxidativa de los cloroplastos y mitocondrias, respectivamente (Agbadah *et al.*, 2016).

La presencia de elevadas concentraciones de Cd en el suelo y el riesgo que implica su ingreso a la cadena alimenticia es motivo de gran preocupación en el mundo. Particularmente, en suelos destinados al desarrollo de cultivos alimenticios, el Cd que es eficientemente absorbido y acumulado por las plantas podría generar una severa problemática de salud ambiental y pública (Hernández *et al.*, 2016). Es por ello que, algunas especies de plantas de importancia agrícola; entre ellas, el maíz (*Zea mays*) se han empleado como biomonitores útiles para detectar los efectos perjudiciales de este metal y su posible impacto en ecosistemas terrestres (Dikkaya y Ergün, 2014).

En Venezuela, desde hace algunos años, los estudios sobre metales pesados y su papel en el deterioro del ambiente han tomado especial relevancia. Específicamente, la toxicidad de metales pesados ha sido evidenciada en las microalgas, *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. (Romero *et al.*, 2002), en invertebrados marinos, incluyendo el poliqueto *Eurythoe complanata* (Marcano *et al.*, 1996; 1997; Nusetti *et al.*, 1998; Zapata-Vívenes *et al.*, 2005), la ascidia *Piura vittata* (Arredondo, 2012) y el mejillón *Perna viridis* (Lemus *et al.*, 2013; Lemus *et al.*, 2014; Zapata-Vívenes *et al.*, 2014); en los vertebrados acuáticos *Colossoma macropomum* (Salazar-Lugo *et al.*, 2009) y *Abudefduf saxatilis* (Pérez, 2012). En el medio terrestre, son varios los estudios que han evidenciado la toxicidad del cobre y cadmio en lombrices de tierra (Nusetti *et al.*, 1999; Marcano, 2006;

Jiménez, 2009; Polo *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2016); sin embargo, en plantas que, al igual que las lombrices son excelentes sensores de contaminación, no se conocen estudios locales en esta área.

El maíz (*Zea mays* L.), después del trigo y el arroz, es el cereal de mayor importancia a nivel mundial y fundamental en la dieta del ser humano (Hussain *et al.*, 2015). Mecanismos de adaptación bioquímica desarrollados en esta especie la hacen tolerante a altas concentraciones de cadmio en el suelo, absorberlo y acumularlo en raíces, hojas y fruto (D'Souza y Devaraj, 2013; Song *et al.*, 2017). Conociendo la importancia de este cultivo en la dieta de animales domésticos y del humano, el desarrollo de cultivos de maíz en suelos contaminados con Cd puede causar un descenso en su biomasa y, de mayor importancia aún, poner en riesgo la salud de los ecosistemas y la población humana (Anjum *et al.*, 2015). Estas consideraciones, aunado a la escasez de estudios en Venezuela sobre la toxicidad de metales pesados en plantas, motivó el desarrollo de la presente investigación, en la que se planteó como objetivo: evaluar los efectos de distintas concentraciones de cadmio en plantas de maíz (*Z. mays*) sobre distintos parámetros bioquímicos como BMs fisiológicos, de defensas antioxidante y de estrés oxidativo.

METODOLOGÍA

Material biológico

Las semillas para obtener las plántulas de *Z. mays* fueron adquiridas en un local comercial ubicado en Cumaná, estado Sucre; mientras que el sustrato orgánico (humus sólido de lombriz de tierra) empleado en este estudio, fue donado por el vivero “Banco de germoplasma de especies suculentas (UDO-Biología)”, ubicado a 10°26’32” N, 64°09’14” O, en un bosque muy seco tropical de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Diseño experimental

Se desarrolló un bioensayo en condiciones de ambiente natural, utilizando un diseño de bloques completamente aleatorio, con cuatro tratamientos; el control y tres tratamientos con Cd (5, 25 y 50 μ M); cada uno constituido por diez réplicas.

Bioensayo de exposición al metal

Siguiendo las recomendaciones de D’Souza y Devaraj (2013), para el bioensayo se utilizaron plantas de nueve días de germinadas a partir de las semillas de *Z. mays*; éstas se sembraron individualmente en recipientes plásticos de 325 ml de capacidad y contentivos de 150 g del sustrato orgánico, mezclado con 90 ml de agua destilada en el caso del tratamiento control y volúmenes iguales de la solución del metal a concentraciones nominales de Cd de 5, 25 y 50 μ M (CdCl_2 , Sigma Co) en el caso de los tratamientos experimentales. Posterior a la siembra, los recipientes se colocaron aleatoriamente en condiciones naturales y se dejaron por 30 días. Diariamente se hicieron registros de la temperatura, la cual se mantuvo en 28 ± 3 °C y, cada tres días se hicieron riegos con agua libre del metal para tratar de mantener la humedad en 70-75 % aproximadamente. El fotoperiodo fue el natural, correspondiente a 12h/12h de luz y oscuridad, respectivamente. A los 30 días, se tomaron muestras de raíz y hojas para los respectivos análisis.

Pigmentos fotosintéticos

Para la extracción y cuantificación del contenido de pigmentos (clorofila *a* y *b*, clorofila total y carotenoides totales) se siguieron las metodologías descritas por Lichtenthaler y Wellbum (1983) y Takemoto *et al.* (1988) con ciertas modificaciones. Se tomaron muestras de 0,1 g de hoja, se colocaron en tubos de ensayo de 10,0 ml que contenían 2,5 ml de etanol 96 % y aproximadamente 1,0 mg de MgCO₃ (para neutralizar los ácidos orgánicos liberados), se taparon los tubos y se mantuvieron en el refrigerador a 4 °C protegidos de la luz durante tres días; tiempo en el cual se extrajeron completamente los pigmentos, dado que las muestras se observaron incoloras. Luego, se midió la absorbancia (A) del extracto a 665, 649 y 470 nm, usando un espectrofotómetro (UV-VIS mini-1240, SHIMADZU, Japón). La concentración de pigmentos se expresó en microgramos por gramo de masa húmeda (µg/g.m.h) del tejido, calculado a partir de las ecuaciones mostradas a continuación:

$$\text{Clorofila } a = 13,95 A_{665} - 6,88 A_{649}$$

Donde,

13,95: coeficiente de absortividad

A₆₆₅: absorbancia a 665 nm

6,88: coeficiente de absortividad

A₆₄₉: Absorbancia a 649 nm

$$\text{Clorofila } b = 24,96 A_{649} - 7,32 A_{665}$$

Donde,

24,96: coeficiente de absortividad

A₆₄₉: absorbancia a 649 nm

7,32: coeficiente de absortividad

A₆₆₅: Absorbancia a 665 nm

$$\text{Clorofila total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

$$\text{Carotenoides totales} = (1000 A_{470} - 2,05 \text{ Clorofila } a - 114,80 \text{ Clorofila } b)/245,00$$

Donde,

1000: coeficiente de absortividad

A_{470} : absorbancia a 470 nm

2,05: coeficiente de absortividad

114,80: coeficiente de absortividad

245,00: coeficiente de absortividad

Azúcares totales

Los azúcares solubles totales fueron extraídos a partir de hojas y raíces siguiendo el método de Hedge y Hofreiter (1962) con ciertas modificaciones. Muestras de 0,1 g de tejido fueron maceradas y homogenizadas en 0,9 ml de buffer fosfato pH 7,0; seguidamente se agregó un ml de etanol 95 % y se centrifugó a 4 000 rpm durante 15 minutos, el precipitado se disolvió en un ml de agua destilada. Finalmente, para la cuantificación se usó el método de Wang *et al.* (2002) que emplea la reacción de la muestra (20 μ l) con el reactivo de antrona (0,2 % en HSO₄ concentrado) a 90 °C durante 15 minutos, la absorbancia del producto de la reacción se midió a 620 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS mini-1240, SHIMADZU, Japón). Se usó una curva estándar de glucosa (0,1 mg/ml) para cuantificar la concentración de azúcares totales en las muestras, las cuales fueron expresadas en miligramos de glucosa por gramo de masa húmeda (mg/g.m.h).

Proteínas totales

La concentración de proteínas totales en hojas y raíces de *Z. mays* se estimó por el método de Biuret (Robinson y Hogden, 1940). Para ello, se pesó 0,1 g de ambos tejidos de cada una de las plantas (n = 10) de los distintos tratamientos, se lavaron con solución salina 0,9 % y, luego de macerarse previamente en un mortero, se prepararon homogeneizados en 0,9 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10,0 %, estos últimos fueron centrifugados a 10 000 rpm durante 10 minutos, al precipitado resultante se le agregó 0,8 ml de KOH 0,3 N y se incubó a 37 °C en baño de maría por 30 minutos. Seguidamente

se tomaron muestras (0,3 ml) para hacer la cuantificación con el reactivo de Biuret, luego de una incubación a temperatura ambiente por 20 minutos se midió la absorbancia a 540 nm. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA: 10 mg/ml. Sigma Chemical Co) como estándar y se preparó una curva de calibración para calcular las concentraciones de proteínas de las muestras. Los resultados fueron expresados en miligramos de proteínas totales por gramos de masa húmeda (mg/g.m.h).

Tioles totales (-SH)

El contenido de -SH se determinó por el método colorimétrico BIOXITECH® GSH-400™ (Anderson, 1989), el cual emplea un reactivo patentado; el 4-cloro-1-metil-7-trifluorometil-quinolinin metilsulfato (R1) que reacciona con todos los mercaptanos (R-SH) presentes en una muestra y forma como producto un complejo (tioéter) cromóforo que absorbe luz a 356 nm. Muestras de 0,1 g de los tejidos (hojas y raíces) fueron maceradas y luego homogeneizadas en 0,9 ml de ácido tricloroacético (TCA 10 %), seguidamente se centrifugaron a 3 000 rpm por 10 minutos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante de las muestras para el análisis, se agregó 0,8 ml de buffer y 50 µl de R1, se mezcló, se tapó e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se midió la absorbancia a 356 nm. La celda blanco estuvo constituida por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de tioles totales se expresó como micromoles por gramos de masa húmeda (µmoles/g.m.h), calculada a partir de la ecuación que se muestra a continuación:

$$[-SH_{\text{totales}}] = \{(A-A_0) / (\epsilon \times I)\} \times D$$

Donde,

A: absorbancia de la muestra

A₀: absorbancia del blanco

ε: coeficiente de extinción molar del producto medido a 356 nm

I: distancia del recorrido de la luz (cm)

D: factor de dilución

Actividad de catalasa (CAT)

Para la determinación de la actividad de la catalasa se usó el protocolo propuesto por Aebi (1984), con algunos ajustes. Tejidos de hojas y raíces (0,1 g) fueron homogenizados en frío con 0,9 ml de buffer fosfato 50 mmol/l pH 7,0 y centrifugados a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. De los sobrenadantes se tomaron alícuotas para medir la actividad de la enzima en la siguiente mezcla de reacción: 20 µl de la muestra, 930 µl de buffer fosfato 100 mmol/l y EDTA 0,1 mmol/l pH 7,0 y, 50 µl de H₂O₂ 1 % para dar inicio a la reacción, se mezcló y se midió la absorbancia a 240 nm durante un minuto en un espectrofotómetro (UV-VIS mini-1240, SHIMADZU, Japón). Se cuantificó la actividad enzimática, empleando la variación de la absorbancia debida a la degradación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el coeficiente de extinción molar (39,4 mM⁻¹ cm⁻¹), los resultados fueron expresados en unidades por gramo de masa húmeda (U/g.m.h), siendo una U, la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato (H₂O₂) en producto en un minuto.

Análisis de Malondialdehído (MDA)

La peroxidación de lípidos en el tejido vegetal, fue cuantificada por el método LPO-586TM 586TM (BIOXYTECH® LPO-586TM; OxisResearchTM); un ensayo colorimétrico basado en la reacción del reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol (R1) con MDA, uno de los productos más comunes de la lipoperoxidación, a 45 °C para formar un cromóforo estable que absorbe luz máxima a 586 nm. Para ello, se pesó 0,1 g de tejido, se homogeneizó en 0,9 ml de buffer fosfato 20 mmol/l, pH 7,4 y 10 µl de butilato hidroxitolueno (0,5 mol/l, diluido en acetonitrilo). Luego se centrifugó a 4 000 rpm a 4 °C por 15 minutos, posteriormente se tomaron 200 µl del sobrenadante y se mezclaron con R1 y HCl, después de un período de incubación de 60 minutos a 45 °C, se midió la absorbancia a 586 nm. Las determinaciones de MDA se realizaron, utilizando una curva de calibración con MDA estándar (1,1,3,3-tetrametoxipropano en Tris-HCl), y los resultados se expresaron en milimoles de MDA por gramo de masa húmeda (mM/g.m.h).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados, previa comprobación de la homogeneidad y normalidad de las varianzas, mediante ANOVA de una vía, con prueba *a posteriori* de Duncan para establecer los grupos, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.II. (Sokal y Rohlf, 2012).

RESULTADOS

Concentración de pigmentos fotosintéticos

En la Figura 1 se muestran los resultados de las concentraciones de los pigmentos en hojas de plantas de *Z. mays* controles y expuestas a distintas concentraciones de Cd durante 30 días. El análisis estadístico reveló que, los distintos tratamientos con el metal no causaron variaciones significativas ($p>0,05$) en las concentraciones de ninguno de los pigmentos fotosintéticos evaluados. Los valores de clorofila total oscilaron entre $257,18 \pm 21,92 \mu\text{g/g.m.h}$ para el grupo control y una concentración promedio de $269,38 \pm 22,14 \mu\text{g/g.m.h}$ para los tratados con Cd; siendo la clorofila *a* mayor que la clorofila *b* en todos los tratamientos. La concentración de carotenoides en controles fue de $38,88 \pm 3,97 \mu\text{g/g.m.h}$; mientras que en los distintos grupos tratados con el metal, el valor promedio de este pigmento fue de $41,89 \pm 3,98 \mu\text{g/g.m.h}$.

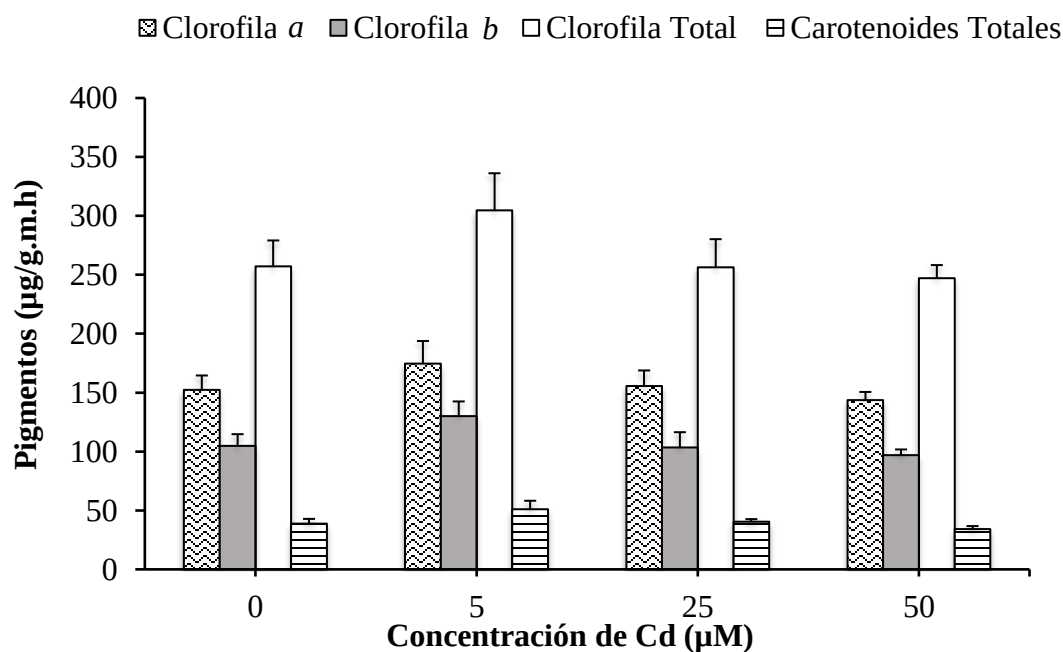


Figura 1. Pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total y carotenoides totales) en hojas de plantas de maíz (*Zea mays* L.) controles (0 μM Cd) y expuestas a distintas concentraciones de Cd (5, 25 y 50 μM). Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda ($\mu\text{g/g.m.h}$) más el error estándar ($n = 10$).

Azúcares totales solubles

La concentración de azúcares totales en hojas y raíces de plantas de maíz (*Z. mays*) controles y expuestas durante 30 días a Cd (5, 25 y 50 μM) se muestra en la Figura 2; se observó un incremento significativo en hojas ($F_s = 8,35$; $p \leq 0,001$) desde $15,32 \pm 1,95$ mg/g.m.h en controles hasta valores respectivos de $20,76 \pm 2,02$ y $24,88 \pm 1,90$ mg/g.m.h en los tratamientos con 5 y 25 μM Cd; sin embargo, esta variable no varió con respecto al control en las hojas de las plantas sujetas a la concentración más alta del metal. La concentración de azúcares en las raíces se mantuvo sin variaciones estadísticamente significativas ($F_s = 1,61$; $p > 0,05$) entre 19,38 mg/g.m.h en el grupo control y un valor promedio de 16,15 mg/g.m.h para los distintos grupos expuestos al metal.

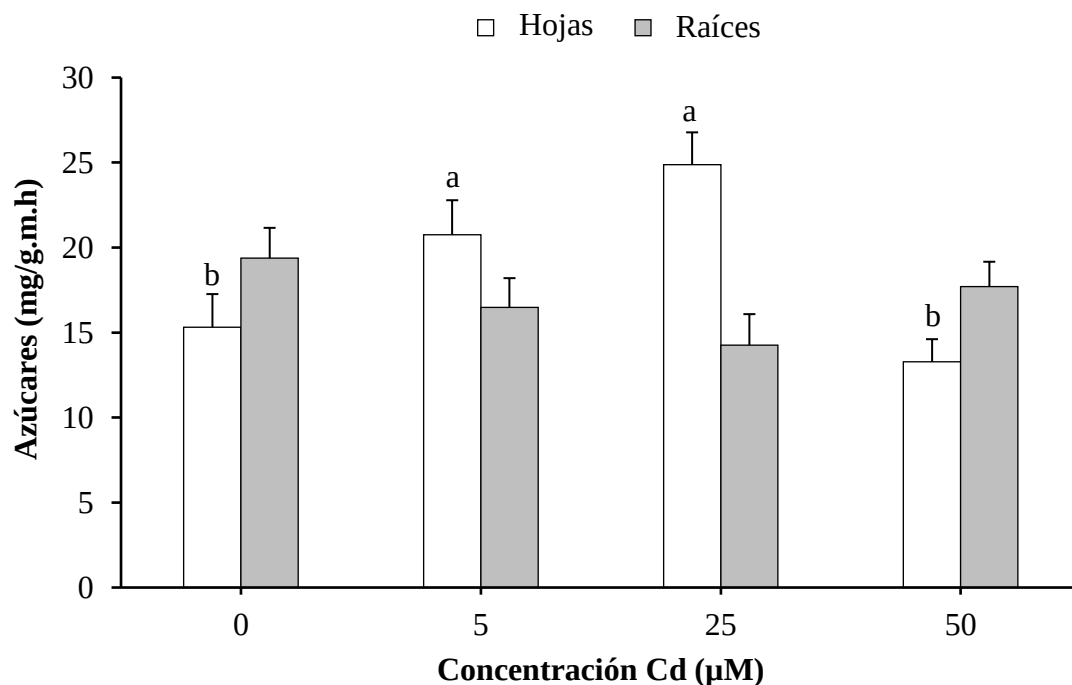


Figura 2. Azúcares totales solubles en hojas y raíces de plantas de maíz (*Zea mays* L.) controles (0 μM Cd) y sujetas a concentraciones de 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en miligramos por gramo de masa húmeda (mg/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.

Proteínas totales solubles

Los datos presentados en la Figura 3 corresponden a las variaciones de la concentración de proteínas totales en hojas y raíces de *Z. mays* controles y expuestas a distintas concentraciones de cadmio (5, 25 y 50 μM de Cd). El nivel de proteínas en las hojas no fue afectado por la exposición a Cd ($F_s = 1,58$; $p > 0,05$); los valores promedios de esta variable oscilaron entre 5,28 mg/g.m.h para el control y 4,88 mg/g.m.h para las plantas expuestas a las distintas concentraciones de Cd. En contraste, en raíz esta variable se vio afectada significativamente por la exposición a 50 μM de Cd ($F_s = 12,00$; $p \leq 0,001$) y su concentración varió de $10,92 \pm 1,94$ mg/g.m.h en raíces no expuestas al metal hasta $18,57 \pm 1,59$ mg/g.m.h.

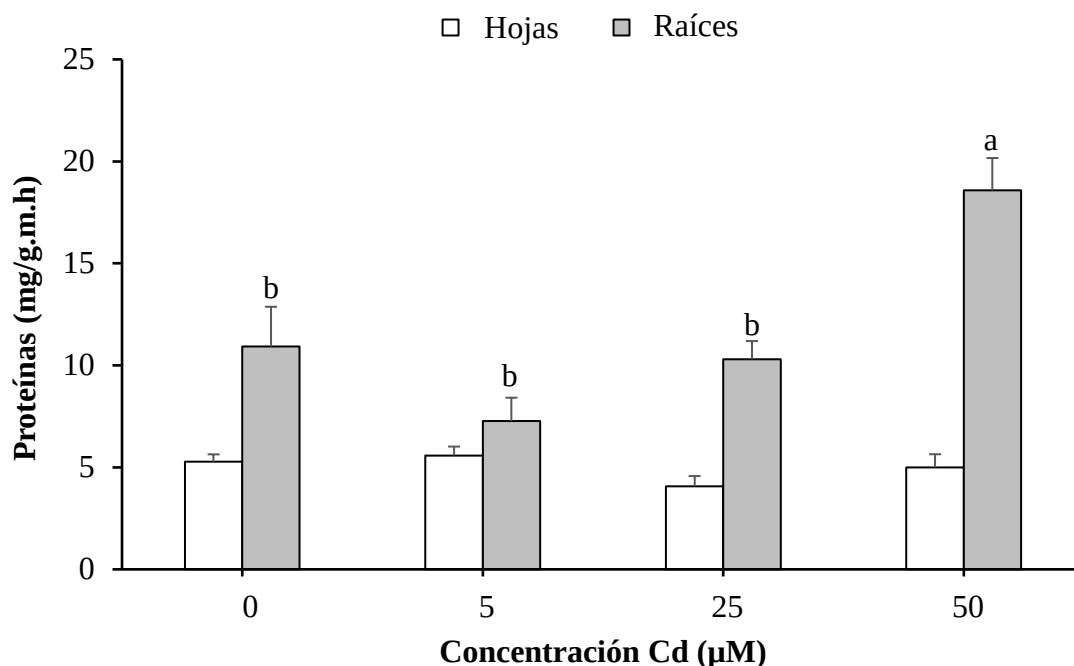


Figura 3. Proteínas totales en hojas y raíces de *Zea mays* L. controles (0 μM Cd) y expuestas concentraciones de 5, 25 y 50 μM Cd. Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda (mg/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.

Tioles totales

La concentración de grupos tioles totales en hojas de *Z. mays* mostró un incremento significativo ($F_s = 11,12$; $p \leq 0,001$) con el aumento de la concentración de exposición al

metal, desde $0,65 \pm 0,06$ $\mu\text{moles/g.m.h}$ en controles hasta $1,70 \pm 0,23$ $\mu\text{moles/g.m.h}$ en el tratamiento con 50 μM de Cd. En contraste, en raíces se observó un comportamiento contrario de esta variable, la cual disminuyó significativamente ($F_s = 6,58$; $p \leq 0,01$) desde $0,91 \pm 0,11$ $\mu\text{moles/g.m.h}$ en raíces no expuestas hasta $0,49 \pm 0,07$ $\mu\text{moles/g.m.h}$ en las tratadas con la más alta concentración de Cd (Figura 4).

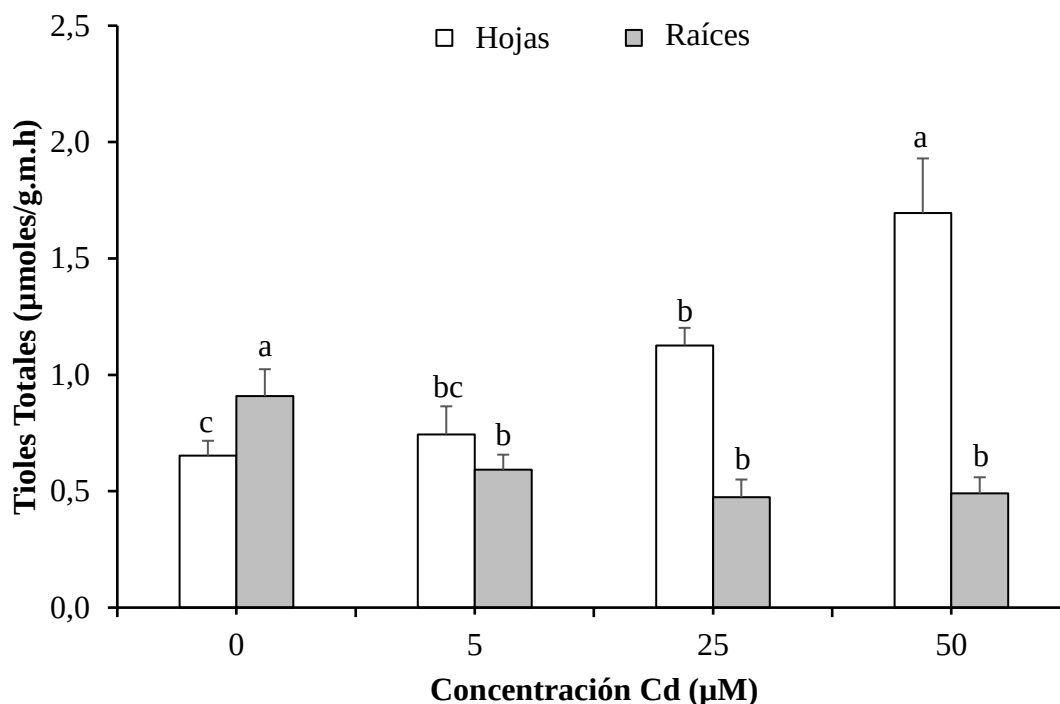


Figura 4. Tioles totales en hojas y raíces de *Zea mays* L. controles (0 μM Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en microgramos por gramo de masa húmeda ($\mu\text{g/g.m.h}$) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.

Catalasa (CAT)

La Figura 5 muestra la actividad de la enzima CAT en hojas y raíces de plantas de *Z. mays* controles y sujetas a distintas concentraciones de cadmio por 30 días; esta variable fue afectada significativamente por los tratamientos con Cd tanto en hojas ($F_s = 9,19$; $p \leq 0,001$) como en raíces ($F_s = 12,10$; $p \leq 0,001$); la mayor actividad se registró en hojas con un valor promedio de $6776,6 \pm 58,6 \times 10^2$ U/g.m.h en el grupo control, el cual

mostró un aumento significativo hasta $7081,2 \pm 96,0 \times 10^2$ U/g.m.h en el tratamiento de 50 μ M de Cd. Similarmente, en raíces la actividad de CAT aumentó desde $6470,7 \pm 113,7$ U/g.m.h en las plantas no expuestas a $7013,5 \pm 38,5$ U/g.m.h en las expuestas a la concentración más alta del metal.

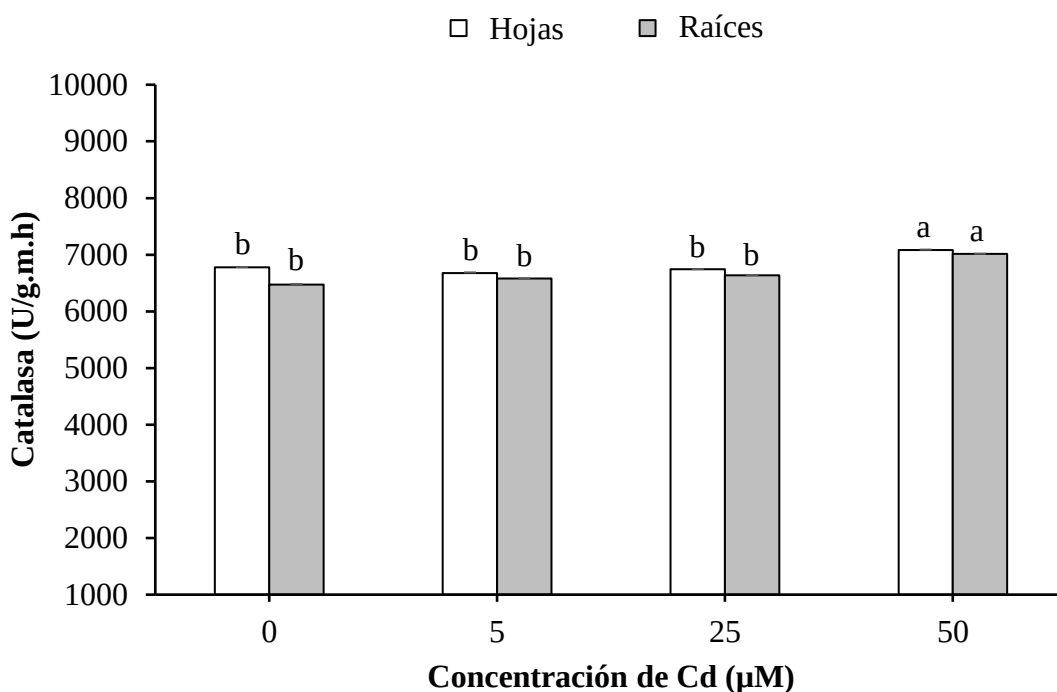


Figura 5. Catalasa en hojas y raíces de plantas de *Zea mays* L. controles (0 μ M Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μ M de cadmio. Las barras representan los promedios en Unidades por gramo de masa húmeda (U/g.m.h) más el error estándar (n = 10). En el caso de las hojas, el valor representado se debe multiplicar por 10^2 . Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.

Malondialdehído (MDA)

Los resultados de la concentración de MDA en hojas y raíces de *Z. mays* controles y tratadas con distintas concentraciones de cadmio se muestran en la Figura 6; esta variable fue afectada significativamente por la exposición al Cd, específicamente a la concentración más alta, tanto en hojas ($F_s = 3,70$; $p \leq 0,05$) como en raíces ($F_s = 7,22$; $p \leq 0,001$). En hojas de plantas controles se observaron mayores concentraciones de MDA ($0,143 \pm 0,028$ mM/g.m.h) que en raíces ($0,026 \pm 0,007$ mM/g.m.h) y, en ambos

tejidos expuestos a 50 μM de Cd se evidenció un incremento significativo hasta $0,265 \pm 0,036 \text{ mM/g.m.h}$ en el caso de las hojas y hasta $0,172 \pm 0,047 \text{ mM/g.m.h}$ en raíces.

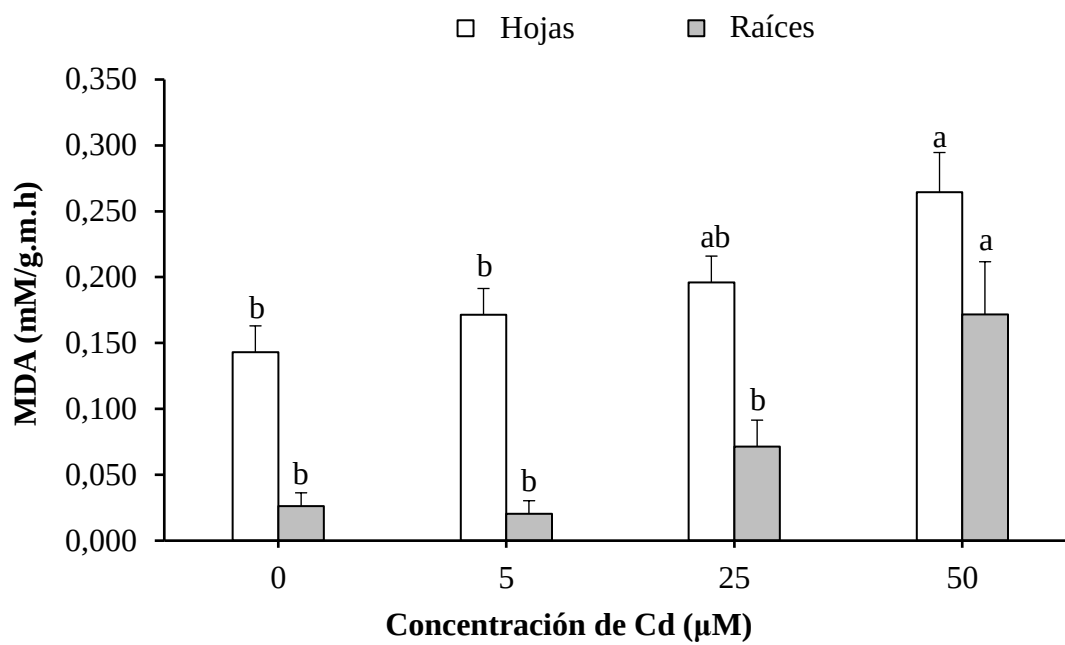


Figura 6. Malondialdehído (MDA) en hojas y raíces de *Zea mays* L., controles (0 μM Cd) y expuestas a 5, 25 y 50 μM de cadmio. Las barras representan los promedios en milimoles por gramo de masa húmeda (mM/g.m.h) más el error estándar ($n = 10$). Las letras indican diferencias entre concentración de Cd según Duncan.

DISCUSIÓN

En esta investigación se emplearon BMs fisiológicos y del sistema antioxidante, asociados con un BM de estrés oxidativo para evaluar los efectos de distintas concentraciones de Cd en hojas y raíces de *Z. mays*. En general, se evidenciaron patrones de respuestas diferentes de los BMs en ambos tejidos, dependientes de la concentración del metal, lo cual sugiere el desarrollo de estrategias bioquímicas distintas para atenuar la toxicidad del metal y controlar el desarrollo de daños oxidativos.

En relación a los BMs fisiológicos, es frecuente el uso del contenido de pigmentos fotosintéticos para evaluar el impacto de las presiones ambientales en plantas, ya que los cambios en éstos están vinculados con la productividad fotosintética y síntomas visuales de enfermedad de la planta (Anjum *et al.*, 2016). En este sentido, se han reportado datos variados sobre la acción de metales pesados en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos, dependientes en muchos casos, de la especie, del tipo y la concentración del metal, así como, del tiempo de exposición (Ling *et al.*, 2017). En el presente estudio, la exposición a Cd no afectó el contenido de los pigmentos fotosintéticos en hojas de *Z. mays*, revelando estos resultados que el metal no causó alteraciones relevantes sobre el aparato fotosintético y la producción primaria de la planta, vía fotosíntesis, no fue afectada perjudicialmente. Es probable que, el tiempo de exposición y las concentraciones de Cd empleadas, a pesar de exhibir toxicidad en otras especies (D'Souza y Devaraj, 2013) no fueron suficientes para inducir cambios en este marcador fisiológico en *Z. mays*.

Son conocidas las diferencias inter e intraespecíficas entre los mecanismos bioquímicos que pueden exhibir los distintos organismos para enfrentar las presiones ambientales; entre éstas, estresores químicos (Hochachka y Somero, 2002) y, específicamente en el caso de maíz son varios los antecedentes que revelan su elevado potencial de tolerancia a metales pesados, incluyendo el Cd (Chaffai *et al.*, 2006; Retamal-Salgado *et al.*, 2017).

En este contexto, las plantas exhiben dos tipos de estrategias que le confieren tolerancia a los metales pesados; algunas están basadas en la exclusión del metal que evitan su absorción radical y limitan así, su ingreso y distribución en tejidos aéreos y las otras, permiten la compartimentación interna del metal, su acumulación e inmovilización en forma de complejos orgánicos no tóxicos (Pál *et al.*, 2006; Emamverdian *et al.*, 2015). En este sentido, una variedad de moléculas; entre ellas, ácidos orgánicos, aminoácidos, péptidos, pigmentos, azúcares, proteínas y enzimas antioxidantes desempeñan un rol importante en la tolerancia del maíz al Cd, ya que participan como quelantes del metal y mantienen un balance entre la producción y eliminación de especies reactivas del oxígeno (Shereefa y Kumaraswami, 2016). El frijol *Lablab purpureus* por ejemplo, acumula grandes cantidades de Cd en la raíz en forma de complejos peptídicos a nivel de la pared celular y membrana plasmática, evitando su absorción y translocación a las hojas para proteger el aparato fotosintético (D'Souza y Devaraj, 2013).

Los efectos del Cd sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas han sido variados en diferentes especies (Sfaxi-Bousbih *et al.*, 2010); contrario a los resultados de esta investigación, en algunos estudios se han detectado efectos perjudiciales de este metal, evidenciados por descensos de los pigmentos fotosintéticos en plantas de maíz (Lagriffoul *et al.*, 1998), almendras (Nada *et al.*, 2007) y fresas (Martínez, 2014); mientras que, Jia *et al.* (2012) observaron un aumento en los pigmentos fotosintéticos de *Lonicera japonica* Thunb expuestas a 5 - 50 μM de Cd. Coincidente con los resultados de este estudio, Gul *et al.* (2016) no observaron cambios en el contenido de carotenoides de *Z. mays* L. expuesta a 40 μM de Cd y, Nada *et al.* (2007) tampoco observaron variación en el contenido de clorofila *a* en plantas de almendras expuestas a 25 y 50 de CdCl_2 .

La concentración de azúcares totales, otro de los BMs fisiológicos evaluados en la investigación desarrollada, no exhibió cambios en raíces de *Z. mays* sujeta a los distintos tratamientos con Cd; sin embargo, en hojas esta variable incrementó en las plantas expuestas a las concentraciones más bajas del metal (5 y 25 μM), lo cual indica un

aumento en la síntesis y/o acumulación de carbohidratos, posiblemente como consecuencia de la activación de un mecanismo bioquímico compensatorio de protección a la homeostasis celular, que garantiza una fuente de energía para sostener la operatividad de rutas anabólicas, ante las condiciones estresantes inducidas por el metal.

En el contexto anterior, se conoce el “efecto hormético” como una respuesta común en organismos expuestos a sustancias químicas; caracterizado por una estimulación de la respuesta a bajas concentraciones del químico y, un cambio posterior a la inhibición de ésta a altas concentraciones y el tiempo de exposición al estresor químico (Rattan, 2008). Por lo tanto, es frecuente encontrar que, a bajas concentraciones, los metales pesados puedan tener un efecto beneficioso y estimulante de respuestas en un organismo, el cual puede revertirse a perjudicial cuando las concentraciones del metal aumentan (Sandbichler y Höckner, 2016). En este orden de ideas, se puede inferir a partir de los resultados de este estudio, que las concentraciones de 5 y 25 μM de Cd inducen un efecto hormético en los azúcares totales de hojas de *Z. mays*, mientras que 50 μM de Cd podría representar la dosis equivalente al umbral de transición entre el mantenimiento y la alteración del equilibrio homeostático celular, según propuesto por Walker *et al.* (1996) sobre la relación dosis-repuesta en organismos expuestos a sustancias químicas. En consonancia con los resultados de esta investigación, la hormesis ha sido ampliamente documentada en plantas (Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008; Jia *et al.*, 2012).

La acumulación de metabolitos es una de las estrategias efectivas de las plantas para evitar efectos tóxicos inducidos por la exposición a metales pesados (Agrawal y Singh 2003). Específicamente, los carbohidratos en plantas desempeñan múltiples funciones; constituyen la fuente principal de energía para los procesos de biosíntesis, mantienen el balance osmótico, participan en reacciones redox, contribuyen con el mantenimiento de la estructura de macromoléculas y la estabilidad de las membranas (Nayer y Reza, 2008), median el proceso de señalización celular y actúan en la remoción de radicales libres, controlando así el balance de EROs y el desarrollo de patologías oxidativas

(Couée *et al.*, 2006; Gengmao *et al.*, 2014).

Acorde con los resultados de esta investigación, en muchas especies de plantas, se ha observado la acumulación de azúcares solubles en respuesta a diversas presiones ambientales; los carbohidratos en hojas de plantas de *Brassica juncea* aumentaron luego de ser expuestas por 90 días a 200 μM de Cd, siendo ésta una respuesta de regulación positiva para controlar la acción perjudicial del metal (Kapoor *et al.*, 2016). La exposición de plántulas de trigo a Cd produjo un aumento en la concentración de estas moléculas, el cual se asoció con una menor utilización de éstas como recurso energético para sostener el crecimiento en las plántulas (Asgharipour *et al.*, 2011). Similarmente, en plantas de caraotas *Phaseolus vulgaris* L. tratadas durante 14 días con Cd (200 mg/kg sustrato) se observó un incremento en los azúcares solubles totales, azúcares reductores y polisacáridos, el cual se asoció con rol antioxidante (Aldoobie y Beltagi, 2013).

En este estudio, los parámetros indicativos de las defensas antioxidantes en raíces de *Z. mays* L. exhibieron un patrón de respuesta diferente al de las hojas y, en ambos casos, fue dependiente de la concentración del metal. Los mayores cambios en estas variables se registraron en raíces e incluyeron, descensos en los grupos -SH en todos los tratamientos, acompañados de aumentos en las proteínas totales y CAT solo en el tratamiento con 50 μM de Cd; concentración esta última que también provocó aumentos en los grupos -SH y CAT de las hojas. Tales resultados concuerdan con lo señalado por varios autores, sobre la participación y rol diferencial que tiene la raíz en comparación con los tejidos aéreos, en el control de la absorción, translocación, acumulación y la expresión de la toxicidad de metales pesados en las plantas (Pál *et al.*, 2006; Gul *et al.*, 2016).

En el contexto anterior, Emamverdian *et al.* (2015) señala que la primera estrategia de defensa para evitar la toxicidad por metales pesados en plantas, son barreras físicas como, el desarrollo en la raíz de estructuras morfológicas; gruesas capas de cutículas, presencia de tricomas, paredes celulares y la simbiosis con micorrizas. Superada ésta primera línea de defensa, el ingreso de iones metálicos a las células y tejidos activa otros

mecanismos; entre ellos, la biosíntesis de mercaptanos como GSH, fitoquelatinas (FQs) y metalotioneinas (MTs), entre otros. Específicamente en el control de los efectos tóxicos del Cd, las FQs son de mayor importancia mientras que, las MTs tienen un rango de acción más amplio, incluyendo Cd, Zn, Cu y As (Yang y Chu, 2011). En esta investigación, el descenso observado en los grupos –SH de las raíces en todos los tratamientos con Cd, posiblemente esté asociado con una elevada demanda de este tipo de moléculas en el tejido para evitar la toxicidad del metal; bajo condiciones del estrés químico podría alterarse su tasa de recambio, observándose un descenso cuando la velocidad de utilización de los tioles supera su tasa de biosíntesis. Dentro de este contexto, Razinger *et al.* (2008) reportó inhibición por Cd (500 μ M) de la enzima glutatióna reductasa relacionado con un descenso en los niveles de GSH. Similar a los resultados encontrados en *Z. mays*, Yang *et al.* (2012) observó descensos en los tioles no proteicos de las raíces de soya expuesta a distintos tratamientos con Cd (10, 50 y 100 mg/kg). Bajo condiciones de estrés por Cd, algunas plantas exhiben descensos en los tioles libre intracelulares ya que éstos forman complejos con el metal (Cd-SH) y lo compartimentalizan dentro de vacuolas, evitando así, la dispersión del Cd a través del xilema y vasos del floema (Song *et al.*, 2017).

Coincidente con el descenso de los grupos –SH en raíz de *Z. mays*, en el tratamiento con 50 μ M de Cd, se registraron aumentos en la concentración de proteínas totales y la actividad de la enzima CAT, lo cual sugiere que, a altas concentraciones del metal se requiere de la participación y cooperación de varias moléculas antioxidantes para neutralizar la toxicidad del metal. La utilización de GSH en raíces, uno de los principales y más abundantes tioles en las células (Xinde *et al.*, 2004), como precursor para la síntesis de otros péptidos, proteínas y enzimas antioxidantes, así como, su participación directa como agente quelante del Cd, podría explicar el descenso de los grupos –SH, asociado con el aumento de las proteínas totales y CAT en la dosis más alta de Cd empleada en este estudio.

En concordancia con lo anterior, ha sido bien documentado la inducción de la biosíntesis

de FQs y de enzimas antioxidantes para neutralizar los efectos perjudiciales de Cd tanto en raíces como en hojas; sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que las FQs tienden primero a sintetizarse y acumularse en raíces (Chen *et al.*, 2008). Acorde con esta aseveración, Heiss *et al.* (2003) reveló que plantas de girasoles expuestas a Cd acumularon concentraciones de FQs en raíces dos veces más elevadas que en hojas. La variedad de funciones que tienen las moléculas tioladas, principalmente GSH, actuando como ligando de metales pesados, precursor en la síntesis de FQs con una alta afinidad por Cd, en la regulación del ciclo GSH-Ascorbato involucrado en la destoxificación del H₂O₂ y actuando como coenzima de otras enzimas antioxidantes, justifica cualquier descenso observado en este tipo de moléculas en plantas sujetas al tratamiento con Cd (Pérez-Chaca *et al.*, 2014).

Acorde con lo observado en el presente estudio, Xu *et al.* (2014) evidenciaron la excepcional tolerancia y potencial de adaptación que tiene *Z. mays* a bajas concentraciones de Cd, mediada por una alta utilización de GSH que produce descensos en su concentración en raíces, acompañado de aumentos en las actividades de SOD y CAT. En otro estudio con la misma especie, la respuesta al tratamiento con el mismo metal involucró también moléculas tioladas; a una concentración baja de Cd (6 µM), cuando los grupos -SH en raíces no variaron, las FQs aumentaron como principal defensa al estrés metálico; sin embargo, a una concentración más alta (30 µM) cuando las FQs bajan, los grupos tioles aumentaron (Rellán-Álvarez *et al.*, 2006). Similar a este último estudio, en *Cucumis sativus* la exposición por 20 días a 10 y 50 µM Cd no afectó la actividad de CAT, pero 500 µM de Cd inhibieron la enzima en raíces, limitando así, su rol en la eliminación de radicales libres (Sun *et al.*, 2015). Una respuesta contraria y dependiente de la concentración fue observada por Gowthami y Vasantha (2015) en la actividad de CAT y otra enzima antioxidante (SOD) en *Vigna radiata* Linn. expuesta por 15 días a 10 y 50 µM de CdCl₂.

Según Nadgórska-Socha *et al.* (2013), moléculas como GSH, FQs y cisteína forman complejos estables con metales pesados y una inducción en estas moléculas ha sido bien

documentada en plantas; no obstante, los cambios en moléculas con grupos –SH dependen de la concentración del metal y del tejido. Así, Rellán-Álvarez *et al.* (2006) encontró que el contenido de GSH en hojas de maíz solo aumentó a la concentración más alta de Cd (30 μ M), mientras que en raíz, se observó una respuesta contraria, siendo la concentración más baja (6 μ M de Cd) la que propició un aumento en GSH y la más alta (30 μ M) produjo un descenso. Acorde con esta propuesta, en el presente estudio, los grupos tioles en las hojas de *Z. mays* exhibieron una respuesta contraria a la de raíces en el tratamiento de 50 μ M Cd. Uzunova *et al.* (2008) también en *Z. mays* reportaron un aumento en la actividad de CAT en hojas y raíces tratadas con 50 μ M Cd, enzima que no cambió a una dosis más bajas del metal. Similarmente, en un estudio en Polonia, la misma concentración de Cd (50 μ M Cd) estimuló la síntesis de FQs en raíz de *Z. mays* (Wójcik y Tukiendorf, 2005) y, 40 μ M Cd aumentó la síntesis de CAT en raíces de sorgo (Pérez-Chaca *et al.*, 2014).

En el presente estudio, coincidente con los aumentos en la actividad de CAT, el contenido de MDA, usado como indicador de estrés oxidativo, también incrementó en raíces y hojas de *Z. mays* solo en el tratamiento con 50 μ M de Cd; siendo al final de los 30 días de exposición, las concentraciones de MDA dos veces mayores en raíces que en las hojas. Tales aumentos en MDA corroboran la presencia de lipoperoxidación (LPO) en las membranas celulares que alteran su integridad estructural y funcionamiento, evidenciándose una condición de estrés oxidativo mediada, posiblemente, por una sobreproducción de H_2O_2 que demandó una estimulación de la actividad de CAT. Si bien es cierto que el H_2O_2 es poco reactivo a nivel intracelular, su potencial perjudicial radica en ser el precursor del radical hidroxilo ($\bullet OH$), uno de los más potentes oxiradicales, catalizador de reacciones de oxidación de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) e inductor de lipoperoxidación (Shah *et al.*, 2001; Pérez-Chaca *et al.*, 2014).

Sustentando la idea expuesta en el párrafo anterior, algunos investigadores han demostrado que tanto el H_2O_2 como otros peróxidos orgánicos inducen estrés oxidativo.

Así, Siddique *et al.* (2012) demostraron que el tratamiento experimental de linfocitos humanos con H₂O₂ potenció la LPO de membranas. En el mismo contexto, Romero-Puertas *et al.* (2004) evidenciaron que, 50 µM Cd propició un aumento seis veces mayor en la concentración de H₂O₂ en hojas de *Pisum sativum* en comparación con plantas control.

Muchos antecedentes apoyan la propuesta de que el estrés oxidativo manifestado por incrementos en LPO, es uno de los principales efectos del tratamiento con Cd en plantas; no obstante, se han publicado algunos datos contrarios a esta propuesta, sugiriendo que la respuesta depende en gran medida de la especie, la concentración y el tiempo de exposición al metal (Romero-Puertas *et al.*, 2012). En raíces de *Glycine max* L. y *Brassica juncea* expuestas, respectivamente por 48 horas y siete días, a altas concentraciones de Cd no se observaron cambios en LPO (Mohamed *et al.*, 2012); sin embargo, en raíces de esta última especie y en *Arabidopsis* sp. expuesta por 24 horas a una concentración más baja del metal (10 µM), la lipoperoxidación aumentó (Cuypers *et al.*, 2011).

En muchas especies de plantas se ha revelado que el Cd es un potente inductor de reacciones de peroxidación lipídica y de estrés oxidativo (Gallego *et al.*, 2012). Similar a lo encontrado en este estudio, en plantas de *Lemna minor* L. sujetas a distintas concentraciones de Cd, se evidenció un aumento en las concentraciones de MDA solo a concentraciones mayores de 10 µM, incluyendo 50 µM Cd; el estrés oxidativo inducido a estas dosis del metal se asoció con un descenso del pool de GSH en la planta (Razinger *et al.*, 2008). También en alfalfa (*Medicago sativa*), el aumento de MDA en hojas y raíces fue proporcional al aumento de la concentración de Cd (Flores-Cáceres, 2013). La acción inductora de estrés oxidativo por Cd incluye además, plantas de leguminosas (Chaoui y El Ferjani, 2005), tomate (Dong *et al.*, 2006; Smeets *et al.*, 2009), en *Arabidopsis thaliana* (Smeets *et al.*, 2009), en *Medicago sativa* (Cui *et al.*, 2013) y *Medicago truncatula* (Xu *et al.*, 2009). Del mismo modo, Rellán-Álvarez *et al.* (2006) y

Sun *et al.* (2015), encontraron una inducción de peroxidación lipídica y estrés oxidativo causado por Cd en *Z. mays* y *C. sativus*, respectivamente.

En general, los resultados de la presente investigación revelaron que, 5 y 25 μM de Cd produjeron cambios diferenciales en el sistema de defensa antioxidante (-SH, CAT y PT) de hojas y raíces que evitaron el desarrollo de estrés oxidativo y, en el caso de las hojas se mantuvo inalterado el proceso fotosintético y se favoreció la acumulación de sustratos energéticos (AT); sin embargo, a 50 μM de Cd se sobrepasó la capacidad de defensa de este mecanismo de compensación bioquímica y se manifestaron daños oxidativos, evidenciados por incrementos en MDA, tanto en hojas como en raíces de *Z. mays*.

CONCLUSIONES

Los efectos del Cd sobre los distintos biomarcadores evaluados en hojas y raíces de *Z. mays* fueron diferentes y dependientes de la concentración.

Los pigmentos fotosintéticos de las hojas de *Z. mays* no se alteraron con la exposición al Cd.

Bajas concentraciones de Cd (5 y 25 μM) estimularon la producción de azúcares totales en hojas de *Z. mays*.

Las proteínas totales de la raíces de *Z. mays* aumentaron con la exposición a 50 μM de Cd.

Los grupos tioles y la enzima catalasa en hojas *Z. mays* se activaron como mecanismos de defensas antioxidantes ante la exposición a 50 μM de Cd, mientras que en las raíces, solo los grupos tioles variaron.

En hojas y raíces de *Z. mays*, el Cd a 50 μM causó incrementos en el contenido de malondialdehído y estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105: 121–126.
- Agbadah, E.; Nwachukwu, K. y Okoh, M. 2016. Biochemical effects of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) on cadmium treated maize (*Zea mays* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.) *African Journal of Biotechnology*, 15(15): 503-600.
- Agrawal, M. y Singh, D. 2003. Physiological and biochemical and SO₂, singly and in combination. *Environmental Pollution*, 121: 189–197.
- Aldoobie, N. y Beltagi, M. 2013. Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *African Journal of Biotechnology*, 12(29): 4614-4622.
- Aliu, S.; Gashi, B.; Rusinovci, I.; Fetahu, S. y Vataj, R. 2013. Effects of some heavy metals in some morpho-physiological parameters in maize seedlings. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 9(1): 27-33.
- Anderson, D. 1989. Determination of the lower limit of detection. *Clinical Chemistry*, 35(10): 2152-2153.
- Anjum, S.; Tanveer, M.; Hussain, S.; Bao, M.; Wang, L. y Khan, I. 2015. Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Resear International*, 22: 17022–17030.
- Anjum, N.; Duarte, B.; Caçador, I.; Sleimi, N.; Duarte, A. y Pereira, E. 2016. Biophysical and biochemical markers of metal/metalloid-impacts in salt marsh halophytes and their implications. *Frontiers In Environmental Science*, 4(24).
- Arredondo, L.; Benítez, R. y Lemus, M. 2012. Efecto del cadmio sobre la respuesta celular celómica de *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). *Revista de Toxicología en Línea*. 1-16.
- Arbona, V.; Hossain, Z.; López-Climent, M.; Pérez-Clemente, R. y Gómez-Cadenas, A. 2008. Antioxidant enzymatic activity is linked to water logging stress tolerance in citrus. *Physiologia Planarum*, 132: 452-66.

- Asgharipour, M.; Khatamipour, M. y Razavi-Omrani, M. 2011. Phytotoxicity of cadmium on seed germination, early growth, proline and carbohydrate content in two wheat varieties. *Advances in Environmental Biology*, 5: 559-565.
- Augusto, A.; Bertoli, A.; Cannata, M.; Carvalho, R. y Bastos, A. 2014. Bioacumulação de metais pesados em *Brassica juncea*: relação de toxicidade com elementos essenciais. *Revista Virtual Química*, 6(5): 1221-1236.
- Bertoli, A.; Cannata, M.; Carvalho, R.; Ribeiro, A.; Freitas, M. y Augusto, A. 2012. *Lycopersicum esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86: 176–181.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.; Kudsk, P.; Mathiassen, S. y Duke, S. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *International Dose-Response Society*, 5: 150–162.
- Cedergreen, N. 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained overtime. *Environmental Pollution*, 156:1099-1104.
- Chaffai, R.; Tekitek, A. y El Ferjani, E. 2006. A comparative study on the organic acid content and exudation in maiza (*Zea mays* L.) seedlings under conditions of copper and cadmium stress. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(4): 598-606.
- Chaoui, A. y El Ferjani, E. 2005. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedling. *Comptes Rendus Biologies*, 328: 23-31.
- Chen, L.; Guo, Y.; Yang, L. y Wang, Q. 2008. “Synergistic defensive mechanism of phytochelatins and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L. against Cd stress,” *Chinese Science Bulletin*, 53(10): 1503–1511.
- Choudhury, S.; Panda, P.; Sahoo, L. y Panda, S. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling and behavior*, 8: 4.
- Couée, I.; Sulmon, C.; Gouesbet, G. y El Amrani, A. 2006. Involvement of soluble sugar in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57: 449-459.
- Cui, Y. y Zhao, N. 2011. El estrés oxidativo y el cambio en el metabolismo de la planta del maíz (*Zea mays* L.) que crece en el suelo contaminado con azufre elemental y efecto tóxico de zinc. *Planta Suelo Environmental*, 57(1): 34-39.
- Cui, W.; Gao, C.; Fang, P.; Lin, G. y Shen, W. 2013. Alleviation of cadmium toxicity in *Medicago sativa* by hydrogen-rich water. *Journal Hazardous Materials*, 260: 715-724.

Cuypers, A.; Smeets, K.; Ruytinx, J.; Opdenakker, K.; Keunen, E.; Remans, T. y Vangronsveld, J. 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 168: 309–316.

Dikkaya, E. y Ergün, N. 2014. Effects of cadmium and zinc interactions on growth parameters and activities of ascorbate peroxidase on maize (*Zea mays* L. MAT 97). *European Journal of Experimental Biology*, 4(1): 288-295.

Dong, J.; Wu, F. y Zhang, G. 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere*, 64(10): 1659-1666.

D'Souza, M. y Devaraj, V. 2013. Oxidative stress biomarkers and metabolic changes associated with cadmium stress in hyacinth bean (*Lablab purpureus*). *African Journal of Biotechnology*, 12(29): 4670-4682.

Ekmekci, Y.; Tanyolac, D. y Ayhan, B. 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal Plant Physiology*, 165: 600 – 611.

Emamverdian, A.; Ding, Y.; Mokhberdoran, F. y Xie, Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*. 1-18.

Flores-Cáceres, M. 2013. Caracterización de los mecanismos de respuesta antioxidante de *Medicago sativa* a metales pesados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Gallego, S.; Pena, L.; Barcia, R.; Azpilicueta, C.; Iannone, M.; Rosales, E. y Benavides, M. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83: 33-46.

Gengmao, Z.; Quanmei, S.; Yu, H.; Shihui, L. y Wang, C. 2014. The physiological and biochemical responses of a medicinal plant (*Salvia miltiorrhiza* L.) to Stress Caused by Various Concentrations of NaCl. *Public Library of Science*, 9(2):e89624.

Gill, S.; Khan, N. y Tuteja, N. 2012. Cadmium at high dose pertubs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science*, 182: 112-120.

Gowthami, N. y Vasantha, S. 2015. Cadmiun induces chages in the growth and oxidative metabolism of green gram- *Vigna radiata* LINN. *Journal of Global Biosciences*, 4(7): 2944-2946.

Gul, S.; Nawaz, M.; Azeem, M. y Sabir; M. 2016. Interactive Effects Of Salinity And

Heavy Metal Stress On Ecophysiological Responses Of Two Maize (*Zea Mays* L.) cultivars. *Fuuast Journal of Biology*, 6(1): 81-87.

Hattab, S.; Dridi, B.; Chouba, L.; Kheder, M. y Bousetta, H. 2009. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21(11): 1552–1556.

Hedge, J. y Hofreiter, B. 1962. Estimation of carbohydrate. En: *Carbohydrate chemistry*. Whistler, R. and Be Miller, J. (eds.). Academic Press, New York, USA. Págs. 17-22.

Heiss, S.; Wachter, A.; Bogs, J.; Cobbett, C. y Rausch, T. 2003. “Phytochelatase synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure,” *Journal of Experimental Botany*, 54(389): 1833–1839.

Hernández, J.; Zapata-Vívenes, E.; Marcano, L.; Marcano, E. y Nusetti, O. 2016. Respuestas bioquímicas en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuesta a cadmio. *Saber*, 28(3): 536-545.

Hochachka, P. y Somero, G. 2002. *Biochemical Adaptations: Mechanism and process in physiological evolution*. Segunda Edición. Oxford University Press. New york. USA. Pág. 466.

Hossain, Z.; López-Climent, M.; Arbona, V.; Pérez-Clemente, R.; Gómez-Cadenas, A. 2009. Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, 166(13): 1391-1404.

Hussain, A.; Arshad, F.; Abbas, N.; Khan, Z.; Mansha, M.; Ahmad, K.; Huma, Z.; Mustafa, I. y Seidavi, A. 2015. Effect of heavy metal (Zn) on different growth attributes of *Zea Mays* L. In Punjab, Pakistan: A Case Study. *Biología*, 61(1): 157-162

Januskaitiene, I. 2012. The effect of cadmium on several photosynthetic parameters of pea (*Pisum sativum* L.) at two growth stages. *Zemdirbyste-Agriculture*, 99(1): 71-76.

Jia, L.; Liu, Z.; Chen, w. y He, X. 2012. Stimulative effect induced by low-concentration Cadmium in *Lonicera japonica* Thunb. *African Journal of Microbiology Research*, 6(4): 826-833.

Jiménez, Z. 2009. Respuestas inmunológicas y peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia* spp. (annelida: oligochaeta) Expuesta a cadmio. Tesis para optar al título de: Licenciada en Biología. Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Oriente.

Kapoor, D.; Rattan, A.; Bhardwaj, R. y Kaur, S. 2016. Photosynthetic efficiency, ion analysis and carbohydrate metabolism in *Brassica juncea* Plants under cadmium stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(3): 279-286.

- Kowald, G.; Sturzenbaum, S. y Blindauer, C. 2016. Earthworm *Lumbricus rubellus* MT-2: metalbinding and protein folding of a true cadmium-MT. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 1-16.
- Kumar, P. y Kumar, G. 2010. The genotoxic potencial of two heavy metals in inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Turkish Journal of Botany*, 34: 39-46.
- Lagriffoul, A.; Mocquot, B.; Mench, M. y Vangronsveld, J. 1998 Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 200: 241–250.
- Lemtiri, A.; Liénarda, A.; Alabib, T.; Brostauxc, Y.; Cluzeaud, D.; Francisb, F. y Colinet, G. 2016. Earthworms *Eisenia fetida* affect the uptake of heavy metals by plants *Vicia faba* and *Zea mays* in metal-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 104: 67–78.
- Lemus, M.; Rojas, N.; Rojas-Astudillo, L. Chung, K. 2013. Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva. *Revista de Biología Tropical*, 61(2): 701-709.
- Lemus, M.; Evaristo, E.; Salazar-Lugo, R. y Chung, K. 2014. Modulación de la Síntesis de Metalotioninas en *Perna viridis* preexpuestos a cobre y expuestos a cadmio. *Saber*, 26(1): 10-17.
- Lichtenthaler H. y Wellburn A. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603: 591-592.
- Ling, T.; Gao, Q.; Du, H.; Zhao, Q. y Ren, J. 2017. Growing, physiological responses and Cd uptake of Corn (*Zea mays* L.) under different Cd supply. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 29(1): 216–221.
- Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodriguez-Grau, J. y Vila, J. 1996. Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polichaete *Eurythoe complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114(3): 179-184.
- Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodriguez-Grau, J. y Vila, J. 1997. Celomic fluid lisozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 22-28.
- Marcano, E. 2006. Efectos del cadmio sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y actividades de enzimas antioxidantes en relación con la peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. Cumaná, Venezuela. Tesis para optar al título de: Licenciado en Biología. Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Oriente.

Martínez, R. 2014. Caracterización de parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) variedad Albión, sometidas a diferentes concentraciones de Cadmio. Tesis para optar al título de: Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fisiología de Cultivos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Mohamed, A.; Castagna, A.; Ranieri, A. Sanitá, L. 2012. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 15-22.

Nada, E.; Ferjani, B., Ali, R.; Bechir, B.; Imed, M. y Makki, B. 2007. Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 57-62

Nadgórska-Socha, A.; Kafel, A.; Kandziora-Ciupa, M.; Gospodarek, J. y Zawisza-Raszka, A. 2013. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 1124-1134.

Nayer, M. y Reza, H. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3(3): 448-453.

Nazar, R.; Iqbal, N.; Masood, A.; Khan, M.; Syeed, S. y Khan, N. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 1476-1489.

Nusetti, O.; Salazar-Lugo, R.; Rodríguez-Grau, J. y Vilas, J. 1998. Immune and biochemical responses of the polychaeta *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119: 177-183.

Nusetti, O.; Parejo, E.; Esclapés, M.; Rodríguez-Grau, J. y Marcano, L. 1999. Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 350-356.

Ojekunle, Z.; Adeboje, M.; Taiwo, A.; Sangowusi, R.; Taiwo, A. y Ojekunle, V. 2014. Tree leaves as bioindicator of heavy metal pollution in mechanic village, ogun state. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 18(4): 649-644.

Pál, M.; Horváth, E.; Janda, T.; Paldi, E. y Szalai, G. 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 239-246.

Pérez, O. 2012. Metales pesados en *Abudofduf saxatilis* del Parque Nacional Mochima e Isla La Tortuga, Venezuela. Tesis para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Venezuela.

- Pérez-Chaca, M.; Rodríguez-Serrano, M.; Molina, S.; Pedranzani, H.; Zirulnik, F.; Sandalio, L. y Romero-Puertas, M. 2014. Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant, Cell and Environment*, 37: 1672–1687.
- Polo, A.; Marcano, L.; Granadillo, M.; Marcano, E.; Cortesía, C. y Hernández, J. 2011. Crecimiento y reproducción de la roja californiana (*Eisenia andrei*) en sustratos con cadmio. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(2): 119-130.
- Rahoui, S.; Chaoui, A. y El Ferjani, E. 2010. Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *Journal of Hazardous Materials*, 178: 1128 – 1131.
- Rastgoo, L. y Alemzadeh, H. 2011. Biochemical responses of gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 375-383.
- Rastgoo, L.; Alemzadeh, A., Mohammad, A.; Esmaeili, S. y Eslamzadeh, T. 2014. Effects of copper, nickel and zinc on biochemical parameters and metal accumulation in gouan, *Aeluropus littoralis*. *Plant Knowledge Journal*, 3(1): 31-38.
- Rattan, S. 2008. Hormesis in aging. *Ageing Research Reviews*, 2: 63-78.
- Razinger, J.; Dermastia, M.; Dolenc, J. y Zrimec, A. 2008. Cadmium induced oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.). *Environmental Pollution*, 153: 687–694.
- Rellán-Álvarez, R.; Ortega-Villasante, C.; Álvarez-Fernández, A.; Campo, F. y Hernández, L. 2006. “Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury,”. *Plant and Soil*, 279(1): 41-50.
- Remon, E.; Bouchardon, J.; Le Guédard, M.; Bessoule, J.; Conord, C. y Faure, O. 2013. Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability?. *Environmental Pollution, Elsevier*, 175: 1-7.
- Retamal-Salgado, J.; Hirzel, J.; Walter, I. y Matus, I. 2017. Bioabsorption and bioaccumulation of cadmium in the straw and grain of maize (*Zea Mays* L.) In growing soils contaminated with cadmium in different environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14: 1399.
- Robinson, H. y Hogden, C. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein. *Journal of Biological Chemistry*, 135: 707-710.
- Rodríguez-Serrano, M.; Romero-Puertas, M.; Pazmiño, D.; Testillano, P.; Risueño, M.; Del Río, L. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: crosstalk between reactive oxygen species, nitric oxide and calcium. *Plant Physiology*, 150: 229-43.

Romero, Y.; Lodeiros, C.; Esclapés, M.; Marín, N.; Guevara, M. y Morales, E. 2002. Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia*, 27(3): 104-109.

Romero-Puertas, M.; Rodríguez-Serrano, M.; Corpas, F.; Gómez, M. y Del Rio, L. 2004. Cadmium induced subcellular accumulation of O_2^{2-} and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1122-1134.

Romero-Puertas, M.; Ortega-Galisteo, A.; Rodríguez-Serrano, M. y Sandalio, L. 2012. Insights into cadmium toxicity: reactive oxygen and nitrogen species function. En: *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation*. Gupta, D. and Sandalio, L. (eds). Págs. 91–117.

Sagardoy, R. 2011. Estudio de la homeostasis de Zn y Cd en plantas superiores. Tesis para optar al grado de: Doctor en Ciencias. Grupo de Fisiología de Estrés Abiótico en Plantas, Departamento de Nutrición Vegetal, Universidad de Zaragoza.

Salazar-Lugo, R.; Pérez, R.; León, A.; Lemus, M. y Rojas, L. 2009. Determinación de tioles totales y tioles solubles en ácido en el pez *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818) expuesto a cadmio. *Revista Científica*, 19(4): 414-420.

Sandbichler, A. y Höckner, M. 2016. Cadmium Protection Strategies-A Hidden Trade-Off?. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 139.

Seth, C.; Chaturvedi, P. y Misra, V. 2008. The role of phytochelatins and Antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 76-85.

Sfafi-Bousbih, A.; Chaoui, A. y El Ferjani, E. 2010. Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1123-1129.

Shah, K.; Kumar, R.; Verma, S. y Dubey, R. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161: 1135-1144.

Shereefa, L. y Kumaraswami, M. 2016. Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses in *Sesamum orientale* L. against *Alternaria sesami* (Kawamura) Mohanty and Behera. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15: 48-56.

Siddique, Y.; Ara, G. y Afzal, M. 2012. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *International Dose-Response Society*, 10:1–10.

Singh, S.; Eapen, S. y D'Souza, S. 2006. Cadmium accumulation and its influence on

lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62: 233-246.

Singh, S. y Tuteja, N. 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants Probing the role of sulfur. *Plant Signaling & Behavior*, 6(2): 215-222.

Smeets, K.; Opdenakker, K.; Remans, T.; Van Sanden, S.; Van Belleghem, F.; Semane, B. y Cuypers, A. 2009. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in multipollution context. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1982–1992.

Smiri, M. 2011. Effect of cadmium on germination, growth, redox and oxidative properties in *Pisum sativum* seeds. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(3): 52-59.

Sokal, R. y Rohlf, F. 2012. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. Cuarta edición. W. H. Freeman and Co.: New York. Pág 937.

Song, J.; Feng, S.; Chen, J.; Zhao, W. y Yang, Z. 2017. A cadmium stress-responsive gene *AtFC1* confers plant tolerance to cadmium toxicity. *BMC Plant Biology*, 17: 187.

Souza, V.; De Almeida, A.; Lima, S.; Cascardo, J.; Silva, D.; Mangabeira, P. y Gomes, F. 2011. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Biometals*, 24: 59-71.

Stankovic, S. y Kalaba, P. 2014. Biota as toxic metal indicators. *Environmental Chemistry letters*, 12: 63-84

Sun, S.; Li, M.; Zuo, J.; Jiang, W. y Liu, D. 2015. Cadmium effects on mineral accumulation, antioxidant defence system and gas exchange in cucumber. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(2): 193-200.

Takemoto, B.; Bytnerowicz, A. y Olszyk, D. 1988. Depression of photosynthesis, growth, and yield in field-grown green pepper (*Capsicum annum* L.) exposed to acidic fog and ambient ozone. *Plant Physiology*, 88: 477-482.

Uzunova, A.; Chaneva, G. y Nachev, I. 2008. Antioxidant defense in the leaves of maize plants (*Zea mays* L.) under cadmium and paraquat stress. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 9(3):592-597.

Walker, C.; Sibly, R.; Hopkin, S. y Peakall, D. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis Ltd. Great Britian.

Wang Y.; Khoo, K.; Chen, S.; Lin, C.; Wonga, C. y Lin, C. 2002. Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein

fraction responsible for the activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10: 1057-1062.

Wójcik, M. y Tukiendorf, A. 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biologia plantarum*, 49(2): 237-245.

Wu, Q.; Su, N.; Chen, Q.; Shen, W.; Shen, Z.; Xia, Y. y Cui, J. 2015. Cadmium-Induced Hydrogen Accumulation Is Involved in Cadmium Tolerance in *Brassica campestris* by Reestablishment of Reduced Glutathione Homeostasis. *Public Library of Science*, 10(10): 1-21.

Xinde, C.; Lena, Q. y Cong, T. 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). *Environmental Pollution*, 128: 317-325.

Xu, J.; Yin, H. y Li, X. 2009. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Reports*, 28: 325-333.

Xu, X.; Liu, C.; Zhao, X.; Li, R. y Deng, W. 2014. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to cadmium in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93: 618-624.

Yang, Z. y Chu, C. 2011. "Towards understanding plant response to heavymetal stress," in Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. *InTech, Shanghai*: 59-78.

Yang, S.; Xie, J. y Li, Q. 2012. Oxidative response and antioxidative mechanism in germinating soybean seeds exposed to cadmium. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9: 2827-2838.

Yue, R.; Lu, C.; Qi, J.; Han, X.; Yan, S.; Guo, S.; Liu, L.; Fu, X.; Chen, N.; Yin, H.; Chi, H. y Tie, S. 2016. Transcriptome analysis of cadmium-treated roots in maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7: 1298.

Zapata-Vívenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Escaplés, M. y Arredondo, L. 2005. Immunological responses and wound healing in the polychaeta *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomididae) exposed to cooper. *Ciencias Marinas*, 31: 1-9.

Zapata-Vívenes, E.; Tovar-Sánchez.; Nusetti, O.; Lemus, M. y Sánchez, G. 2014. Tolerancia a la anoxia y defensas antioxidantes en el mejillón verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) bajo exposición aguda al cadmio. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(3): 514-522.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	EFFECTOS DEL CADMIO SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN <i>Zea mays</i> L.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Colón Olivo Yolanda Margarita	CVLAC	24594542
	e-mail	ymco0212@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biomarcadores, cadmio, estrés oxidativo

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluaron los efectos del cadmio en hojas y raíces de plantas de maíz (*Zea mays* L.) empleando los siguientes biomarcadores: concentración de pigmentos fotosintéticos (PF), azúcares totales (AT), proteínas totales (PT), grupos tioles (-SH), actividad de la enzima catalasa (CAT) y niveles de malondialdehído (MDA). Para el bioensayo de exposición al metal, se utilizaron plántulas obtenidas del proceso de germinación durante nueve días de las semillas de *Z. mays*; éstas fueron sembradas individualmente en envases plásticos contentivos de un sustrato orgánico mezclado con agua para el caso del tratamiento control y la solución del metal para los tratamientos con Cd (5, 25 y 50 μM). Posterior a la siembra, las unidades experimentales se colocaron aleatoriamente en un medio natural, sujetas a la temperatura del ambiente y el fotoperiodo natural (12h/12h de luz y oscuridad, respectivamente) por 30 días y, cada tres días se hicieron riegos para mantener la humedad del sistema (70-75 %). En hojas, los PF y PT no fueron afectados por los tratamientos con Cd; sin embargo, a las concentraciones más bajas se observó un aumento de los AT desde $15,32 \pm 1,95$ mg/g.m.h (control) hasta $20,76 \pm 2,02$ y $24,88 \pm 1,90$ mg/g.m.h en los tratamientos de 5 y 25 μM de Cd, respectivamente; en contraste, a la concentración más alta (50 μM Cd), los AT no variaron, pero los grupos -SH aumentaron desde un valor basal de $0,65 \pm 0,06$ $\mu\text{moles/g.m.h}$ hasta $1,70 \pm 0,23$ $\mu\text{moles/g.m.h}$, al igual que CAT se estimuló hasta $7081,2 \pm 96,0 \times 10^2$ U/g.m.h con respecto al control ($6776,6 \pm 58,6 \times 10^2$ U/g.m.h.). Un patrón de respuesta distinto se observó en raíces; los AT no variaron con la exposición al metal; sin embargo, los grupos -SH disminuyeron en todos los tratamientos con el metal; siendo $0,49 \pm 0,07$ $\mu\text{moles/g.m.h}$, el valor más bajo registrado a 50 μM de Cd con respecto al valor del control ($0,91 \pm 0,11$ $\mu\text{moles/g.m.h}$). Coincidente con el descenso de los grupos -SH, a la concentración más alta del metal, en raíces se evidenciaron aumentos en PT desde $10,92 \pm 1,94$ mg/g.m.h (control) hasta $18,57 \pm 1,59$ mg/g.m.h y en la actividad de CAT desde $6470,7 \pm 113,7$ U/g.m.h (control) hasta $7013,5 \pm 38,5$ U/g.m.h. En ambos tejidos, los niveles de MDA incrementaron solo a la concentración más alta de Cd (50 μM). En general, los resultados de la presente investigación revelaron que, 5 y 25 μM de Cd produjeron cambios diferenciales en el sistema de defensa antioxidante (-SH, CAT y PT) de hojas y raíces que evitaron el desarrollo de estrés oxidativo y, en el caso de las hojas, se mantuvo inalterado el proceso fotosintético y se favoreció la acumulación de sustratos energéticos (AT); sin embargo, a 50 μM de Cd se sobrepasó la capacidad de defensa antioxidante de este mecanismo de compensación bioquímico y se manifestaron daños oxidativos, evidenciados por incrementos en MDA, tanto en hojas como en raíces de *Z. mays*.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Prof. Leida Marcano	ROL	C ☐ A ☐ A ☒ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☐
	CVLAC	8219437
	e-mail	leimar0501@gmail.com
	e-mail	
Prof. Víctor Franco	ROL	C ☐ A ☒ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☐
	CVLAC	12660201
	e-mail	vafrancos@gmail.com
	e-mail	
Prof. Yanet Antón	ROL	C ☐ A ☐ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☒
	CVLAC	8439227
	e-mail	yanton@udo.edu.ve
	e-mail	
Prof. José Imery	ROL	C ☐ A ☐ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☒
	CVLAC	8650956
	e-mail	joseimery@gmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

Colocar fecha de discusión y aprobación:

2018	07	18
------	----	----

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-colón.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: _____ **(Opcional)**

Temporal: _____ **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciada en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciada

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

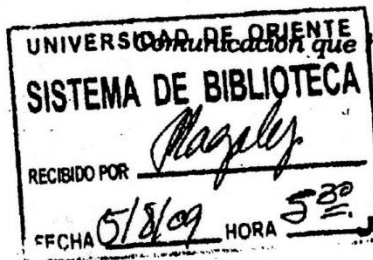
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUAPELO
Secretario

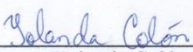


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

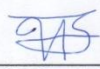
JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.


Yolanda Colón
Autor


Prof: Leida Marcano
Asesor


Prof: Víctor Franco
Coasesor