

## Peroxidación Lipídica como Marcador de Muerte Celular en Cultivos Celulares de Cempasúchil (*Tagetes erecta* L.)

### *Lipid Peroxidation as a Marker of Cell Death in Cell Cultures of Mexican Marigold (*Tagetes erecta* L.)*

**Joaquín Alejandro Qui-Zapata**, Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Av. Normalistas No. 800, Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, México. CP 44270; **Luis Manuel Peña-Rodríguez**, Unidad de Biotecnología; **Lizbeth Arianelly Castro-Concha** y **María de Lourdes Miranda-Ham**, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Merida, Yucatán, México. CP 97200. Correspondencia: mirham@cicy.mx.

(Recibido: Diciembre 18, 2009 Aceptado: Octubre 25, 2010)

Qui-Zapata, J.A., Peña-Rodríguez, L. M., Castro-Concha, L. A. y Miranda-Ham, M.L. 2010. Peroxidación Lipídica como Marcador de Muerte Celular en Cultivos Celulares de Cempasúchil (*Tagetes erecta* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 28:165-167.

Qui-Zapata, J.A., Peña-Rodríguez, L.M., Castro-Concha, L. A. and Miranda-Ham, M.L. 2010. Lipid Peroxidation as a Marker of Cell Death in Cell Cultures of Mexican Marigold (*Tagetes erecta* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 28:165-167.

**Resumen.** La peroxidación de lípidos en las plantas es una característica importante de la muerte celular hipersensible durante las interacciones incompatibles o no hospedero específicas, de las plantas con patógenos. El ensayo colorimétrico 1-metil-2-fenilindol ha sido considerado como específico en sistemas animales, pero su aplicabilidad a los tejidos de las plantas sigue siendo desconocida. En el presente estudio se reporta la utilización en cultivos celulares de *Tagetes erecta* L. (cempasúchil) tratados con peróxido de hidrógeno. Los resultados sugieren una estrecha relación entre el grado de daño de la membrana, resultante de la peroxidación lipídica y la viabilidad celular.

**Abstract.** Lipid peroxidation in plants is an important feature of hypersensitive cell death during incompatible or non-host interactions of plants with pathogens. Malondialdehyde is a marker of oxidative lipid injury. The 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay has been considered specific for the quantitation of malondialdehyde in animal systems, but its applicability to plant tissues remains unknown. In here, we report its utilization in cell cultures of *Tagetes erecta* L. (cempasúchil) treated with hydrogen peroxide. Our results suggest a close relationship between the extent of membrane damage that resulted from lipid peroxidation and cell viability.

Palabras clave adicionales: Método colorimétrico, peroxidación lipídica, malondialdehído, estrés oxidativo.

Additional Keywords: Colorimetric assay, lipid peroxidation, malondialdehyde, oxidative stress.

La per-oxidación lipídica (PL) en las plantas es una característica importante de la muerte celular hipersensible durante las interacciones, incompatibles o no de hospedero específicas de las plantas con patógenos (Göbel *et al.*, 2003). Con frecuencia, se utiliza al malondialdehído (MDA) como un marcador de daño oxidativo de lípidos y su concentración varía dependiendo el tipo de estrés al que se sometan las células. Ha sido cuantificado por diversos metodos, siendo el más utilizado el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (SRATB). Los reactivos usados en esta técnica son de venta restringida en los países que siguen los

Lipid peroxidation (LP) in plants is an important feature of hypersensitive cell death displayed during incompatible or non-host interactions of plants with pathogens (Göbel *et al.*, 2003). Malondialdehyde (MDA) is commonly used as a marker of oxidative lipid injury, and its concentration varies depending on the type of stress inflicted on cells. It has been measured by different techniques, but the most commonly used is the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. The reagents used for this assay are restricted in all countries that follow the criteria dictated by the World Health Organization, including Mexico. An improved colorimetric assay, based on the reaction of 1-methyl-2-phenylindole with

critérios dictados por la Organización Mundial de la Salud, incluyendo México. Un método colorimétrico mejorado, basado en la reacción de 1-metil-2-fenilindol con el MDA, para producir un cromóforo azul/púrpura con un máximo de absorbancia a 586 nm, fue desarrollada para las células de mamíferos (Gerard-Monnier *et al.*, 1998), y ahora está siendo aplicado a los sistemas vegetales (Johnston *et al.*, 2007). El presente trabajo se enfoca en reportar su uso para medir el MDA producido en cultivos celulares de *Tagetes erecta* tratados con peróxido de hidrógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos utilizados para la inducción de cultivos celulares, así como el análisis de viabilidad celular están descritos en Qui *et al.*, (2010). Las muestras para la cuantificación de MDA se prepararon de la siguiente manera: Las células tratadas con peróxido fueron filtradas y se tomó una muestra de 0.5 g. Ésta fue congelada y pulverizada en nitrógeno líquido. Se añadieron diez mililitros de 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) y la mezcla fue transferida a tubos Corex. Después se agregaron 100 µl de 0.5 M hidroxitolueno butilado y centrifugados a 10,000 x g por 20 min a 4°C, hasta que el sobrenadante se aclaró. Las alícuotas (200 µl) del sobrenadante se transfirieron a micro-tubos. Una solución de N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo: metanol (3:1; v/v) se preparó en fresco para el ensayo. Para el testigo ( $A_0$ ), 200 µl de 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) se agregaron a 650 µl de N-metil-2-fenilindol, y fue procesado de la misma manera que las muestras (adición de 150 µl HCl, seguido de incubación). A cada tubo de 200 µl de la muestra tratada, se le agregaron 650 µl de N-metil-2-fenilindol y se mezclaron en un vortex. Después de esto, se agregaron 150 µl de HCl y se mezcló de nuevo. Los tubos se incubaron a 45°C por 60 minutos y fueron centrifugados hasta obtener un sobrenadante claro. Su absorbancia se determinó a 586 nm. Se preparó una curva estándar por medio de la dilución de 20 µl de 10 mM 1, 1, 3, 3,-tetrametoxipropano (TMOP) en 10 ml de agua milliQ. Se prepararon una serie de diluciones correspondientes a 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 µM de TMOP y los tubos se trataron como ya se mencionó anteriormente. Los datos de absorbancia fueron utilizados para obtener una ecuación de la curva estándar ( $y = 0.113x - 0.002$ ). La observancia neta ( $A_{586}$ ) se calculó restando la absorbancia del control ( $A_0$ ) de cada uno de los valores de absorbancia de las muestras. La concentración de MDA de las muestras se determinó utilizando la ecuación siguiente:

$$[\text{MDA}] = \frac{A_{586} - b}{a} \times df$$

[MDA], concentración en la muestra (µM);  $A_{586}$ , absorbancia neta de la muestra;  $a$ , pendiente de la curva estándar (0.113);  $b$ , intercepto de la curva estándar (0.002);  $df$ , factor de dilución. Con el fin de determinar los parámetros de inducción, se determinó la variabilidad celular en diferentes períodos de tiempo (0, 6 y 12 h; Figura 1) después de un tratamiento de 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Después de 6 horas, la muerte celular en los cultivos tratadas fue de 30% en comparación con el testigo; mientras que a las 12 horas, todas las células que habían recibido el tratamiento estaban muertas. A partir

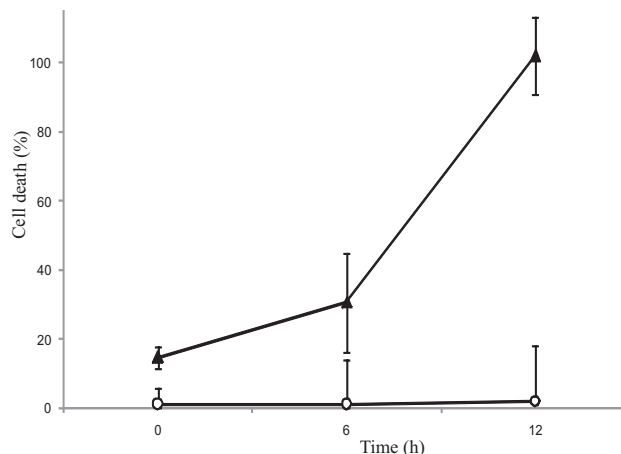


Figure 1. Cell viability in *Tagetes erecta* cells under oxidative stress for 6 and 12 hours. (O) Control cells, (▲) Cells treated with hydrogen peroxide (50 mM).

Figura 1. Viabilidad celular en células *Tagetes erecta* bajo estrés oxidativo durante 6 y 12 horas. (O) Células control, (▲) Células tratadas con peróxido de hidrógeno (50 mM).

MDA to produce a blue/purple chromophore with a maximum absorbance at 586 nm, was originally developed for mammalian cells (Gerard-Monnier *et al.*, 1998) and is now being applied to plant systems (Johnston *et al.*, 2007). In here, we report its utilization to measure MDA in cell cultures of *Tagetes erecta* treated with hydrogen peroxide.

## MATERIALS AND METHODS

Procedures regarding the induction of cell cultures, as well as the cell viability assay are described in Qui *et al.* (2010). For MDA quantitation, samples were prepared as follows: Cells treated with the peroxide were filtered and a 0.5 g sample was taken. This was frozen and pulverized under liquid nitrogen. Ten milliliters of 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) were added and the slurry was transferred to Corex tubes. Next, 100 µl of 0.5 M butylated hydroxytoluene were added and centrifuged at 10,000 x g for 20 min at 4°C, until the supernatant was clear. Aliquots (200 µl) from the supernatant were transferred to microfuge tubes. For the colorimetric assay, a 10.3 mM solution of N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile:methanol (3:1; v/v) was prepared fresh. For control tube ( $A_0$ ), 200 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) were added to 650 µl of N-methyl-2-phenylindole, and processed in the same way as the samples (addition of 150 µl HCl followed by incubation). To each tube containing 200 µl of the treated sample, 650 µl of N-methyl-2-phenylindole were added and mixed in a vortex. Then, 150 µl of fuming HCl were added and mixed again. Tubes were incubated at 45°C for 60 minutes and centrifuged until a clear supernatant was obtained. Its absorbance was determined at 586 nm. A standard curve was prepared by diluting 20 µl of 10 mM 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (TMOP) in 10 ml milliQ water. A series of dilutions corresponding to 0, 0.5, 1, 2, 3 and 4 µM of TMOP was prepared and tubes were treated as stated before. Absorbance data were used to obtain a standard curve

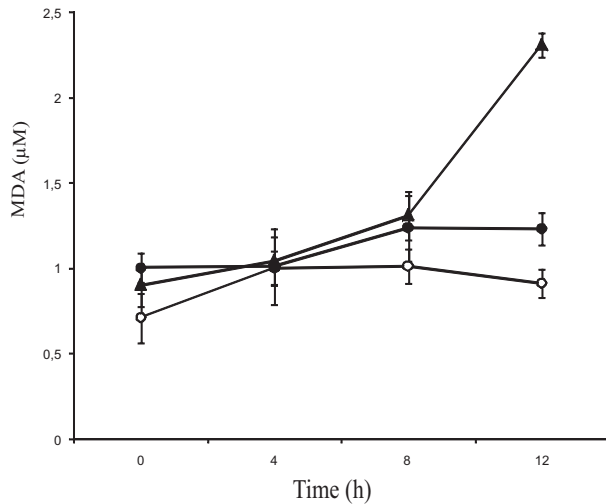


Figure 2. Malondialdehyde concentration in *Tagetes* cells under oxidative stress, induced by addition of hydrogen peroxide. (O) 0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (●) 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (▲) 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Figura 2. Concentración de malondialdehído en células *Tagetes* bajo estrés oxidativo, inducido por la adición de peróxido de hidrógeno. (O) 0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (●) 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (▲) 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

de estos resultados, se eligieron tiempos de muestreo de 0, 4, 8 y 12 h, y concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 25 y 50 mM para inducir estrés oxidativo en las suspensiones, con el fin de medir la concentración de MDA, resultante de la PL. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento con 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultó en bajos niveles de MDA, lo cual no difirió mucho de los del testigo después de 8 horas de tratamiento. Empeoró, cuando se utilizó la concentración más alta, la acumulación de MDA fue significativa después de 8 horas, alcanzando su nivel máximo a las 12 horas de tratamiento. La disminución en las tasas de supervivencia de las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 1) se correlacionó positivamente con un incremento en la concentración de MDA (Figura 2) como un marcador de PL. Este resultado sugiere una relación estrecha entre el daño a las membranas, resultante de la PL y la viabilidad celular. Es importante señalar que este ensayo representa un sustituto viable de las SRATB en cultivos celulares de *Tagetes erecta* para evaluar los niveles de MDA, y representa una herramienta adecuada en la búsqueda de marcadores de muerte celular.

J.A.Q. fue apoyada por una beca del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) (183263).

## I

### LITERATURA CITADA

Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C., and Chaudiere, J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology* 11:1176-1183.

equation ( $y = 0.113x - 0.002$ ). Net absorbance ( $A_{586}$ ) was calculated by subtracting the control's absorbance ( $A_0$ ) from each of the samples' absorbance values. MDA concentration in the samples was determined using the following equation:

$$[\text{MDA}] = \frac{A_{586} - b}{a} \times df$$

[MDA], MDA concentration in the sample (µM);  $A_{586}$ , net absorbance of the sample;  $a$ , slope obtained from the standard curve;  $b$ , intercept of the standard curve;  $df$ , dilution factor. In order to determine the induction parameters, cell viability was evaluated at different periods of time (0, 6 and 12 h; Figure 1) following a 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. After six hours, cell death in the treated cells was 30% compared to the control, while six hours later, all of the cells that had been treated with the peroxide were dead. From these results, sampling times of 0, 4, 8 and 12 h, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of 25 and 50 mM to induce oxidative stress in the suspensions were chosen to measure the level of MDA resulting from lipid peroxidation. As shown in Figure 2, treatment with 25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in low MDA levels, not so different from the control after 8 hours of treatment. Whereas when the higher concentration was used, MDA accumulation was significant after 8 hours, and a maximum concentration was reached after 12 hours of treatment. The decrease in the survival rates of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated cells (Figure 1) was positively correlated with an increase in the MDA concentration (Figure 2) as an index of lipid peroxidation. This result suggests a close relationship between membrane damage resulting from lipid peroxidation and cell viability. It is important to note that this assay represents a viable substitute to TBARS in *Tagetes erecta* cell cultures to assess MDA levels and represents an adequate tool in the search for cell death markers.

J.A.Q. was supported by a scholarship from the National Council for Science and Technology (CONACYT, México) (183263).

Göbel, C., Feussner, I., and Rosahl, S. 2003. Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry* 278:52834-52840.

Johnston, J.W., Horne, S., Hardong, K., and Benson, E. 2007. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:108-112.

Qui, J.A., Castro-Concha, L.A., García-Sosa, K., Miranda-Ham, M.L., and Peña-Rodríguez, L.M. 2010. Is zinniol a true phytotoxin? Evaluation of its activity at the cellular level against *Tagetes erecta*. *Journal of General Plant Pathology* 76:94-101.