



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Participación de la enzima superóxido dismutasa y
la producción del peróxido de hidrógeno en la
tolerancia al aluminio de suspensiones celulares
de *Coffea arabica* L.**

Tesis que presenta

Laura Yamire Esquivel Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de la IBQ. Laura Yamire Esquivel Hernández titulado “Participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción del peróxido de hidrógeno en la tolerancia al aluminio de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas en la línea de investigación Interacción-Medio Ambiente en el laboratorio 10 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a _____ de _____ de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

IBQ Laura Yamire Esquivel Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Papel de los mensajeros secundarios del sistema de transducción de señales fosfolipídico, en la regulación de la respuesta al estrés abiótico en dos cultivos de interés comercial”, (CONACYT, proyecto 219893) bajo la dirección del la Dra. Soledad Maria Teresa Hernández Sotomayor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, por su apoyo incondicional, su interés por mi formación académica y por la paciencia otorgada durante mi estancia en su laboratorio

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca N° 308112 otorgada para el apoyo a mis estudios de Maestría.

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca SNI 4422.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Hago un agradecimiento especial a mi comité tutorial integrado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, la Dra. María de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Efraín Ramírez Benítez, por las aportaciones y comentarios para llegar a cumplir el objetivo de este trabajo.

A los integrantes de mi comité revisor: Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Dra. María de Lourdes Miranda Ham, Dr. Efraín Ramírez Benítez, Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco y Dr. Ignacio Islas Flores, por sus oportunas observaciones, correcciones y comentarios en la elaboración del documento de tesis.

Especialmente agradezco al Dr. Efraín Ramírez Benítez, por su colaboración durante la realización experimental de este trabajo.

De manera especial al M.en C. Armando Muñoz Sánchez y a la IBQ Yahaira Cab Guillen, por el apoyo técnico ofrecido durante mi estancia en el grupo de trabajo de la Dra. Hernández. A la M. en C. Lizbeth Castro Concha, por su apoyo técnico en la utilización del equipo de espectrofotometría, así como a la M.en C. Ángela Kú González por el apoyo técnico en el manejo del microscopio confocal.

A Julio, cuya compañía a lo largo de estos años ha sido muy importante y en esta etapa aún más. Su cariño y el de mis hijas me han dado la fuerza y la confianza necesarias para

salir adelante en la vida.

A mis compañeros del laboratorio, los que estuvieron y los que están: Bety, Will, Brenda, Carmita, Roberto, Ibis, Julieta, Jacqueline, y Víctor, por darme su apoyo, consuelo, ánimo en todo momento, así como sus críticas.

A mis compañeros de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en especial a Aaron, Dianeli, Luis y a los demás con los que he compartido muchos momentos divertidos, por su amistad y sus consejos.

DEDICATORIAS

A mis hijas Megan e Irene, por ser mis fuentes de motivación e inspiración para poder superarme cada día más.

A mi compañero en la vida Julio, por contar siempre con su apoyo constante y la confianza en mí.

A mi madre y hermana, quienes con sus palabras de aliento no me dejaban decaer para que siguiera adelante y cumpla con mis ideales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1 EL ALUMINIO.....	3
1.1 LAS ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO	3
1.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN PLANTAS.....	4
1.2.1 TOXICIDAD DEL ALUMINIO A NIVEL CELULAR.....	5
1.2.2 TRANSDUCCION DE SEÑALES BAJO ESTRÉS POR ALUMINIO EN PLANTAS	7
1.3 LA QUÍMICA DEL OXÍGENO ACTIVO	8
1.4 LA FORMACIÓN DE LAS ROS	10
1.4.1 DAÑO OXIDATIVO	11
1.4.2 LAS ROS COMO SEGUNDOS MENSAJEROS EN PLANTAS	14
1.5 MECANISMOS DE CONTROL DE LAS ROS	15
1.6 LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (EC 1.15.1.1).....	17
1.6.1 ISOENZIMAS DE LA SOD	18
1.6.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS ISOENZIMAS DE LA SODs	19
1.6.3 REGULACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE SOD	21
1.6.4 IMPORTANCIA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ..	24
1.7 MODELO DE ESTUDIO <i>Coffea arabica</i>	26
JUSTIFICACIÓN	27

HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
CAPÍTULO II.....	29
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	29
2.2 TRATAMIENTOS.....	30
2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	30
2.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD (SOD; EC 1.15.1.1).....	31
2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD SOD EN GEL.....	33
2.5.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS. ...	33
2.5.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GEL.....	33
2.6 LOCALIZACIÓN <i>in situ</i> DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	35
CAPÍTULO III.....	39
3 RESULTADOS.....	39
3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD.....	39
3.1.2 EFECTO DE $AlCl_3$ EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD EVALUADA POR ESPECTROFOTOMETRÍA.....	39
3.1.3 MÉTODO POR ZIMOGRAFÍA.....	43
3.1.4 EFECTO DEL $AlCl_3$ EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD EVALUADA POR ZIMOGRAFÍA.....	46

3.1.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE SOD POR ZIMOGRFÍA	47
3.2 LOCALIZACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL H ₂ O ₂ INTRACELULAR	51
CAPÍTULO IV	57
4.1. DISCUSIÓN.	57
CAPÍTULO V	65
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	65
5.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	65
5.2 PERSPECTIVAS.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Química de las ROS.....	9
Figura 1.2 Representación esquemática de la reacción en la oxidación lipídica debido a las ROS (Corini, 2009).....	12
Figura 1.3 Representación esquemática de la modificación de las bases nitrogenadas del ADN debido a las ROS (Bahattacharjee, 2013).	13
Figura 1.4 Representación esquemática de la modulación de ROS en plantas (Modificado de Mittler <i>et al.</i> , 2004).....	14
Figura 1.5 Representación esquemática generalizada de una célula vegetal en donde se representan las principales fuentes de generación de las ROS y las enzimas que participan en su eliminación (tomado de Jajic <i>et al.</i> , 2015).	16
Figura 1.6 Reacción enzimática catalizada por la SOD.....	17
Figura 1.7 Localización intracelular de las SODs de células vegetales (Gill <i>et al.</i> , 2015) ..	19
Figura 1.8 Representación de las estructuras tridimensionales de las SODs.....	20
Figura 1.9 Representación del sitio activo de las SODs.....	21
Figura 1.10 Sustitución de las SODs del cloroplasto en función de la disponibilidad de Cu ²⁺ en <i>Arabidopsis</i> (Piug <i>et al.</i> , 2007).	22
Figura 1.11 Inactivación de la Mn-SOD por nitración de la tirosina 34.	24
Figura 1.12 Mecanismo de defensa del sistema antioxidante enzimático en respuesta a las ROS (Malik <i>et al.</i> , 2014).	25
Figura 1.13 Estrategia experimental realizada en presente trabajo de investigación.....	28

Figura 2.1 Esquema de la reacción química del ensayo de proteína por Ácido bicinconínico (BCA).	31
Figura 2.2 Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).	31
Figura 2.3 Esquema de la reacción química del ensayo de la actividad enzimática de SOD con el paquete comercial SOD Assay Kit-WST.	32
Figura 2.4 Esquema de la reacción química del ensayo de la actividad enzimática de SOD por zimografía	34
Figura 2.5 Esquema de la formación de derivados triazólicos a partir de carboxi-H ₂ DCFDA AM en presencia de H ₂ O ₂	36
Figura 2.6 Estructura química y visualización del fluorocromo selectivo para núcleo (DAPI) en células vivas.	37
Figura 2.7 Estructura química y visualización del fluorocromo selectivo para pared celular (CFW) en células vivas.	37
Figura 2.8 Estructura química y visualización del fluorocromo selectivo para membranas (FM4-64) en células vivas.	38
Figura 3.1 Actividad enzimática total de SOD en células de las líneas L2 y LAMt de <i>C.arabica</i> L tratadas con AlCl ₃	40
Figura 3.2 Actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD en células de las líneas L2 y LAMt de <i>C. arabica</i> L tratadas con AlCl ₃	41
Figura 3.3 Actividad de la isoenzima Mn-SOD en células de las líneas L2 y LAMt de <i>C. arabica</i> L tratadas con AlCl ₃	42
Figura 3.4 Zimografía de SOD células de <i>C. arabica</i> de la línea L2.	44
Figura 3.5 Zimografía de SOD de células de <i>C. arabica</i> de la línea LAMt.	45

Figura 3.6 Efecto del tratamiento con $AlCl_3$ sobre la actividad de SOD en células de las líneas L2 y LAMt.....	47
Figura 3.7 Identificación de las isoenzimas de SOD por zimografía mediante el uso de inhibidores en la línea L2.....	49
Figura 3.8 Identificación de las isoenzimas de SOD por zimografía mediante el uso de inhibidores en la línea LAMt.....	50
Figura 3.9 Tratamiento con $AlCl_3$ durante 0.5 horas en células de las líneas L2 y LAMt, y su efecto en la generación y localización de las ROS.....	53
Figura 3.10 Tratamiento con $AlCl_3$ durante 6 horas en células de las líneas L2 y LAMt, y su efecto en la generación y localización de las ROS.....	55
Figura 4.1 Modelo conceptual de la producción y eliminación de las ROS en el mecanismo de resistencia a Al^{3+} en células de <i>C. arabica</i>	63

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Posibles blancos de la toxicidad del aluminio en plantas superiores (tomado de Acevedo-Sandoval, 2007)..... 6

Cuadro 2.1 Inhibidores de las isoenzimas de SOD (Beauchamp y Fridovich, 1971). 35

ABREVIATURAS

•O ₂ ⁻	Anión superóxido
2,4-D	Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético
6-BAP	6-Bencil aminopurina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CTE	Cadena de transporte de electrones
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
Fe-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de hierro
GPX	Glutación peroxidasa
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ DCFDA AM	6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato diacetoximetil éster
IP ₃	Inositol(1,4,5-trifosfato)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos

Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MS	Murashigue y Skoog
MSHIS	Medio de cultivo Murashigue y Skoog a la mitad de su fuerza iónica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
Pc	Plastocianina
PCD	Muerte celular programada
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
WST-1	Sal monosódica, 2-4-Iodofenil-3-4-nitrofenil-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio
XO	Xantina oxidasa
Tyr	Tirosina

RESUMEN

La toxicidad por aluminio provoca una gran cantidad de síntomas en las plantas, interfiriendo en un amplio rango de procesos fisiológicos, celulares y moleculares. En condiciones normales, las células producen especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de la reducción de oxígeno molecular, pero bajo condiciones de estrés ambiental, su producción aumenta.

Como parte del estudio de los procesos metabólicos que se producen en respuesta al aluminio, se han generado dos líneas celulares de *C. arabica*, una tolerante (LAMt) y otra sensible (L2). Sin embargo, los mecanismos de tolerancia al aluminio en la línea LAMt no son claros. En nuestro modelo de estudio, se evaluó si la actividad enzimática de las isoenzimas de la superóxido dismutasa (SOD) está siendo modificada específicamente en respuesta al estrés por aluminio, además se evaluó la acumulación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en diferentes compartimentos intracelulares. Las células de las líneas L2 y LAMt fueron tratadas en el día siete de cultivo con $AlCl_3$ (100 μM). Se encontraron diferencias en los niveles de actividad enzimática total y de las isoenzimas de la SOD, en los extractos proteicos de células de las líneas L2 y LAMt. Se observaron incrementos en la actividad enzimática de la isoenzima Mn-SOD inducidos por el tratamiento con $AlCl_3$, el cual fue más evidente en la línea L2. También se detectó la presencia de las tres isoenzimas de la SOD, diferenciadas por su sensibilidad a la inhibición con KCN y H_2O_2 . Se detectó a la Cu/Zn-SOD por su inhibición con KCN y H_2O_2 , a la Fe-SOD, por su inhibición al H_2O_2 y a la Mn-SOD, por su resistencia a ambos inhibidores.

Por otro lado, se observó que la acumulación del H_2O_2 intracelular en respuesta al tratamiento con $AlCl_3$ en células de la línea L2 es mayor comparada con células de la línea LAMt. Los resultados indican que los cambios inducidos por el Al^{3+} en la producción de las ROS y el sistema antioxidante están involucrados en el mecanismo de tolerancia en las suspensiones celulares de *C. arabica*.

ABSTRACT

Aluminum toxicity causes several symptoms in plants, modifying a wide range of physiological, cellular and molecular processes. In normal conditions, cells produce reactive oxygen species (ROS) by reducing molecular oxygen, but under conditions of environmental stress, this production increases.

As part of the study of the metabolic processes that occur in response to aluminum, two cell lines of *C. arabica*, a tolerant (LAMT) and a sensitive (L2) were previously generated. Mechanisms leading to aluminum tolerance for LAMt line are not yet understood. In this model it was evaluated whether the enzymatic activity of the different isozymes of superoxide dismutase (SOD) was being modified specifically in response to stress by aluminum. Accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) in different intracellular compartments was also evaluated. Significant differences were found in total SOD activity levels and in isoenzymes in protein extracts (day seven of the culture cycle) from L2 and LAMt cells, when treated with 100 μ M $AlCl_3$. Increases were observed in Mn-SOD activity induced by $AlCl_3$, this was more evident in the L2 line. The presence of the three SOD isoenzymes was differentiated based on their sensitivity to inhibition with KCN and H_2O_2 . Cu/Zn-SOD was detected by its sensitivity to both inhibitors; Fe-SOD by H_2O_2 and finally for Mn-SOD, its resistance to both inhibitors.

Furthermore, it was observed that the accumulation of intracellular H_2O_2 in response to treatment with $AlCl_3$ of L2 cells was higher compared to treated LAMT cells. The results indicate that changes induced by Al^{3+} in the production of ROS and the antioxidant system might be involved in the mechanism for tolerance in *C. arabica* cell suspensions.

INTRODUCCIÓN

El aluminio en condiciones normales se encuentra en estado insoluble, en forma de aluminosilicatos u óxidos de aluminio; sin embargo, cuando el pH del suelo disminuye, el aluminio se solubiliza y puede ser tomado por las plantas, siendo el Al^{3+} la forma más tóxica a pH menores a 5.5 (Liu *et al.*, 2014). La toxicidad del aluminio se manifiesta en una gran cantidad de síntomas en las plantas, interfiriendo con un gran número de procesos fisiológicos, celulares y moleculares (Bojórquez-Quintal, 2010). El aluminio puede afectar la estructura del citoesqueleto, la síntesis de callosa, los mecanismos de transducción de señales e inhibir el crecimiento de la raíz, limitando así la toma de agua y nutrimentos del suelo (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011). A concentraciones de 1 o 2 ppm, el aluminio da lugar a estrés oxidativo al incrementar de forma no controlada la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Rezaee *et al.*, 2013).

Bajo condiciones fisiológicas normales, las células producen especies reactivas de oxígeno (ROS), por medio de la reducción incompleta del oxígeno molecular. Sin embargo, bajo condiciones de estrés ambiental, su acumulación se incrementa (Vanlerberghe, 2013).

Las plantas poseen dos tipos de sistemas antioxidantes: los enzimáticos y los no enzimáticos, cuya función es proteger y minimizar los efectos dañinos de las ROS en la célula (Rezaee *et al.*, 2013). Los antioxidantes no enzimáticos incluyen a los polifenoles, el ascorbato, el glutatión, los flavonoides, los alcaloides y los carotenoides. Éstos eliminan directamente al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno por su capacidad antioxidante intrínseca (Gechev *et al.*, 2006). Los mecanismos enzimáticos comprenden a la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa (Boscolo *et al.*, 2003). La superóxido dismutasa actúa como la primera línea de defensa frente a las ROS catalizando la dismutación del $\bullet O_2^-$ en H_2O_2 . Este último es un intermediario en la señalización de la muerte celular programada y se produce principalmente en la peroxidación lipídica de la membrana (Rezaee *et al.*, 2013).

El H_2O_2 es eliminado por diferentes enzimas como la catalasa y otras peroxidases para convertirlos en moléculas menos dañinas para los sistemas biológicos.

Se ha demostrado que la permeabilidad de la membrana sufre alteraciones, esto como consecuencia de la oxidación de fosfolípidos inducida por el $\bullet\text{O}_2^-$. Por lo tanto, es crucial que la enzima superóxido dismutasa elimine al anión superóxido en los compartimientos donde se forma. Para llevar a cabo el control de ROS, existen diversas isoformas de SOD distribuidas en los distintos organelos (Greene-Alscher *et al.*, 2002).

Algunas especies vegetales que crecen en suelos ácidos presentan mecanismos metabólicos que les confieren resistencia al aluminio (Kochian *et al.*, 2004). Estas plantas parecen tener mecanismos más eficientes para hacer frente a la acumulación de ROS (Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008). Estudios recientes realizados en cultivares de *C. arabica* tratados con aluminio demostraron que existen variaciones en los mecanismos de tolerancia al aluminio entre los distintos genotipos (Bazzo *et al.*, 2013).

Como parte del estudio de los procesos metabólicos que ocurren en respuesta al aluminio, se generaron dos líneas de suspensiones celulares de café con diferentes niveles de resistencia al aluminio: una tolerante (LAMt) y otra sensible (L2) (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Éstas han sido utilizadas para investigar los diferentes efectos que la toxicidad por aluminio presenta en las plantas, como por ejemplo, el determinar los tipos de ROS que se producen o los sistemas eliminadores de éstas. En un estudio previo, se determinó la actividad enzimática total de la superóxido dismutasa (SOD) en las líneas L2 y LAMt, cuando son tratadas con 100 μM de AlCl_3 durante diferentes períodos de tiempo (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011). Estos ensayos mostraron que después de 6 horas, la actividad de esta enzima aumentó significativamente en la línea LAMt y que esta línea presentó niveles bajos de acumulación extracelular de H_2O_2 . Sin embargo, las interrogantes sobre la adquisición de un mecanismo de tolerancia al aluminio, así como la participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción del peróxido de hidrógeno en microambientes celulares, aún no han sido resueltas.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la actividad enzimática de las diferentes isoenzimas de la SOD está siendo modificada específicamente en respuesta al estrés por aluminio, así como el evaluar la acumulación del peróxido de hidrógeno en diferentes compartimentos intracelulares.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1 EL ALUMINIO

El aluminio es un elemento químico, metálico presente en grandes cantidades en la tierra (aproximadamente el 8% en peso; Delhaize y Ryan, 1995). Es un elemento sólido en condiciones normales, de color blanco plateado, dúctil, maleable y cristaliza en forma cúbica. Pertenece al grupo III A de la tabla periódica, tiene un peso atómico de 26.98 g mol^{-1} y número atómico 13. El aluminio es un metal electropositivo y muy reactivo. La química del aluminio es bastante compleja, debido a su carga iónica y su pequeño radio atómico, siendo capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble (Vardar y Ünal, 2007; Kochian *et al.*, 2004; Mossor-Pietraszewska, 2001).

1.1 LAS ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO

El aluminio está presente en los minerales del suelo y en varias formas, encontrándose como microcristales, precipitados amorfos ó complejos orgánicos e inorgánicos (Acevedo-Sandoval, 2007). También se encuentra como aluminosilicatos, y sólo en cantidades muy pequeñas en formas solubles capaces de influir en los sistemas biológicos (Kinraide, 1997).

Dependiendo del pH del suelo, el aluminio puede estar unido a metales, tales como el sodio, el potasio, el hierro, el calcio o el magnesio y se encuentra en diferentes formas, como las especies mononucleares $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, que predominan a pH 5-6. Cuando el pH es menor a 5, se encuentra en la forma de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, mejor conocida como Al^{3+} . También se forma el $\text{Al}(\text{OH})_3$ cuando el pH es neutro, es insoluble. El aluminato $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ es la especie dominante a pH alcalino ($\text{pH} > 7.0$) (Rengel, 2002). Existe otro complejo iónico que es una forma polinuclear del aluminio, el cual contiene más de un átomo de aluminio y se encuentra disponible en el suelo a pH 4-5, el $\text{Al}_{13}(\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12})^{7+}$, o mejor conocida como Al_{13} (Kinraide, 2003). El aluminio también puede formar complejos solubles con ligandos inorgánicos, tales como el sulfato y el fluoruro, es decir, AlF_2^+ , AlF_3^+ , $\text{Al}(\text{SO})_4^{1+}$ y también con una gran cantidad de compuestos orgánicos (Kumar-Panda y Matsumoto, 2007). El Al^{3+} es tóxico para las plantas y es la forma más soluble y predominante del aluminio a pH ácido. Sin embargo, se ha determinado que la forma más

tóxica es el $Al_{13}(AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12})^{7+}$ (Gupta *et al.*, 2013; Kinraide, 2003).

1.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN PLANTAS

El grado de toxicidad varía ampliamente dependiendo de la especie de la planta, las condiciones de crecimiento, las concentraciones de aluminio y el tiempo de exposición (Kochian *et al.*, 2004; Delhaize y Ryan, 1995). La inhibición del crecimiento de la raíz es el principal efecto de la toxicidad del aluminio, aunado a una simultánea inducción de la síntesis de β -1,3 glucano (callosa), que es evidente después de una exposición corta a este metal (Mossor-Pietraszewska, 2001). Este es el primer síntoma visible en las raíces, al parecer debido a la alta afinidad del aluminio con moléculas como grupos fosfatos, sulfatos y carboxilos entre otros, y que son parte integral de componentes celulares como la pared celular, las membranas y los ácidos nucleicos (Carreño y Chaparro-Giraldo, 2013).

Entre los efectos visibles de la toxicidad del aluminio, se ha observado la inhibición de la elongación de la raíz, lo que da lugar a raíces cortas y quebradizas. Las plántulas jóvenes son más susceptibles que las plantas adultas. Aparentemente, el aluminio no interfiere con la germinación de las semillas (Rengel, 2002; Mossor-Pietraszewska, 2001).

Las respuestas comunes de las semillas germinadas al aluminio incluyen: cambios celulares y ultra-estructurales en las hojas, aumento en la velocidad de resistencia de difusión, reducción de la apertura estomática, y disminución en la actividad fotosintética que lleva a una clorosis y necrosis de las hojas, lo que provoca una reducción en el número y tamaño de éstas afectando la biomasa aérea (Liang *et al.*, 2013).

Se sabe que el aluminio causa una disminución en la actividad mitótica en células vegetales, y también reduce su proliferación debido al acortamiento de la región de la división celular (Vardar y Ünal, 2007). El mecanismo responsable en la disminución de la división celular en raíces expuestas a aluminio no es muy claro, aunque las auxinas parecen tener un papel importante. La interacción con otros reguladores de crecimiento no puede ser excluida. Un ejemplo es cómo el aluminio tiene rápidos efectos en la raíz sobre las concentraciones de la citocinina y el etileno (Kumar-Panda, 2007; Massot *et al.*, 2002; Blamey, 2001).

Generalmente la inhibición en el crecimiento de la raíz tiene severas consecuencias en todas las plantas, resultando en la restricción de crecimiento de brotes y la productividad, además de disminuir la calidad del producto final (Rengel, 2002).

1.2.1 TOXICIDAD DEL ALUMINIO A NIVEL CELULAR

Varios estudios han descrito que la mayor parte del aluminio se encuentra en el apoplasto, indicando que más del 95% del aluminio asociado a las raíces de las plantas se encuentra en la pared celular de células situadas en la periferia (Liu *et al.*, 2014). La carga negativa neta de la pared celular determina su capacidad de intercambio catiónico y el grado en el cual el aluminio interactúa con ésta (Vasquez *et al.*, 2000). Específicamente, el aluminio se une a los grupos carboxilo libres en los residuos pectico-urónicos de la pared celular y a los fosfatos de la membrana.

Al parecer, el aluminio puede interactuar de forma directa o indirecta con los factores que influyen en la organización del citoesqueleto, afectando los niveles de Ca^{2+} , Mg^{2+} y calmodulina en el citosol, el potencial eléctrico de la superficie celular, la formación de callosa y la composición lipídica de la membrana plasmática (Mossor-Pietraszewska, 2001).

El aluminio afecta rápidamente a la pared celular debido a que incrementa la rigidez de éste por la reticulación de las pectinas, así como también modifica las características de la membrana plasmática, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Como el aluminio tiene mayor afinidad (500 veces) a las cargas negativas de las cabezas de los fosfolípidos (componentes de la membrana) que otros cationes (como el Ca^{2+}), éste puede desplazarlos y formar puentes entre los fosfolípidos de la bicapa lipídica, alterando la compactación de los fosfolípidos y la fluidez de la membrana (Bojórquez-Quintal, 2010; Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008). Este metal puede interferir con la absorción, el transporte, y el metabolismo de varios nutrimentos esenciales; un ejemplo de esto es la fijación del fósforo (Martínez-Estévez *et al.*, 2003c).

Cuadro 1.1 Posibles blancos de la toxicidad del aluminio en plantas superiores (tomado de Acevedo-Sandoval, 2007).

A nivel de tejidos	Efectos
Ápice de la raíz	Inhibición de la división celular de la raíz y la elongación de la zona de transición
Cofia o caliptra	Vacuolización de la cofia o caliptra
Pelos radicales	Reducción en el número de los pelos radicales
A nivel celular	
Pared celular	Incremento del contenido de pectina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular
Membrana plasmática	Inhibición del transporte de cationes
Mitocondria	Inhibición de la actividad respiratoria
Citoesqueleto y microtúbulos	Reorganización del citoesqueleto
Simplasto	Acumulación del aluminio en el núcleo
Apoplasto	Acumulación del aluminio entre las células
A nivel molecular	
ADN	Cambios en la replicación del ADN
ATP	Reducción de la producción de ATP
GTP	Reducción de las funciones de GTP
Calmodulina	Reducción de las funciones de la calmodulina
Proteínas/Enzimas	Impacto sobre las proteínas de membrana, ATPasa y NAD-cinasa
Interacción entre otros cationes y aniones inorgánicos	
Ca ²⁺	Interacción de la ruta de señalización por Ca ²⁺
H ⁺	Cambios en el pH citosólico
ROS	Daño a los lípidos de membrana

La formación de los complejos polinucleares de aluminio en el apoplasto no puede ser excluida, pues la concentración local de aluminio y/o el pH alto pueden crear condiciones

favorables para la polimerización de aluminio. A nivel celular, el daño causado por el contacto con el aluminio está principalmente asociado a su unión a la calmodulina. En el Cuadro 1.1 se describen los efectos de la toxicidad por aluminio en plantas (Schmohl y Horst, 2000).

Por otro lado, el aluminio provoca estrés oxidativo, incrementando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Rezaee *et al.*, 2013). El aluminio no es un metal de transición, por lo tanto sus átomos no son capaces de generar ROS directamente mediante una reacción de tipo Fenton. Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con aluminio induce su acumulación en las células de los ápices radiculares, siendo el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido las especies más abundantes, lo que podría conducir a la oxidación de biomoléculas, como por ejemplo lípidos, proteínas, y ADN, resultando en la muerte celular (Boscolo *et al.*, 2003; Olivetti y Etherton, 2001).

Se han encontrado evidencias que sugieren que las ROS podrían funcionar como importantes moléculas de señalización del sistema de defensa ante el estrés abiótico y en la adquisición de tolerancia a diferentes estreses (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011).

1.2.2 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES BAJO ESTRÉS POR ALUMINIO EN PLANTAS

El aluminio interactúa con las rutas de transducción de señales, afectando el equilibrio intracelular del calcio (Ca^{2+}), el potasio (K^+) y el pH, los cuales se han propuesto que juegan un papel crucial en la toxicidad por aluminio (Liu *et al.*, 2014). El aluminio también puede interactuar e inhibir a la enzima fosfolipasa C (PLC) de la vía de los fosfoinosítidos asociada a la señalización del Ca^{2+} (Carreño y Chaparro-Giraldo, 2013). La PLC cataliza la hidrólisis de los lípidos de la membrana, el fosfatidilinositol (PIP_2), liberándose inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) (Liu *et al.*, 2014; Vardar y Ünal, 2007). El IP_3 y el DAG actúan como segundos mensajeros, provocando la liberación del Ca^{2+} de las reservas internas y la activación de las proteínas cinasas que, a su vez activan a otras enzimas que catalizan las diferentes reacciones, dando una respuesta celular a la señal inicial (Poot-Poot y Hernández-Sotomayor, 2011).

Al internalizarse el aluminio en la célula, las interacciones del metal disminuyen la

acumulación de fosfoinosítidos, principalmente del IP₃ (Rengel y Zhang, 2003; Martínez-Estévez et al., 2003b). Además, el PIP₂ es importante para la regulación de la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y el transporte de iones un cambio en la composición de fosfolípidos puede afectar la función de las células. Estas alteraciones se reflejan en cualquiera de los cambios fisiológicos y morfológicos descritos anteriormente. El aluminio también puede tener un papel importante en la regulación de la fosforilación y/o desfosforilación de las proteínas de la ruta de señalización de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Carreño y Chaparro-Giraldo, 2013; Arroyo-Serralta *et al.*, 2005).

Se sabe que las ROS como el $\cdot\text{O}_2^-$ y el H₂O₂, que resultan de la fotosíntesis y el metabolismo oxidativo, pueden participar en una serie de respuestas a estrés. Se ha demostrado que la exposición con aluminio está asociada con un daño peroxidativo en los lípidos de membrana, debido al incremento de las ROS a niveles tóxicos, por ejemplo, la fosfatidilserina es el sustrato más susceptible a la peroxidación lipídica en presencia del aluminio (Jones *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2003). Estudios previos señalan que existe una relación estrecha entre la peroxidación lipídica y la inhibición en la velocidad de elongación de la raíz. Así, el incremento en la peroxidación lipídica debido a los radicales libres es un efecto primario del aluminio en la estructura de la membrana. Sin embargo, se ha demostrado que la inducción de la peroxidación lipídica por el aluminio no se produce lo suficientemente rápido como para ser un mecanismo inicial de toxicidad por aluminio (Apel y Hirt, 2004; Sivaguru *et al.*, 2003).

1.3 LA QUÍMICA DEL OXÍGENO ACTIVO

El oxígeno molecular (O₂) se puede considerar como un radical libre, pues tiene dos electrones no apareados, con giros paralelos y es un potente agente oxidante. Sin embargo, para poder oxidar una molécula no radical y aceptar un par de electrones, éstos deben tener el mismo giro (paralelo) para ocupar los orbitales vacantes en el oxígeno. Los electrones de un átomo o de una molécula no cumplen con este criterio, puesto que tienen giro antiparalelo (Dat *et al.*, 2000). Esta restricción de giro hace que el oxígeno acepte sólo un electrón a la vez explica por qué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales. Por el contrario, reacciona notablemente rápido con radicales por transferencia de un solo electrón (Halliwell, 2006; Grant y Loake, 2000). Así, aunque el oxígeno molecular en su estado basal es poco reactivo, su reducción parcial genera

especies reactivas de oxígeno, incluyendo el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (OH^\bullet). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar el superóxido. Este puede ser protonado a un pH bajo ($\text{pK}_a = 4.8$) para formar el radical perhidroxilo (HO_2^\bullet).

Los radicales superóxido y perhidroxilo sufren una dismutación espontánea para producir peróxido de hidrógeno (Figura 1.1). El peróxido de hidrógeno es estable y menos reactivo que el anión superóxido (Halliwell, 2006). Sin embargo, en la presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} , que pueden estar libres o formando complejos con agentes quelantes o proteínas, puede ocurrir la formación del radical hidroxilo (OH^\bullet). El radical hidroxilo es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, lo que puede llevar a la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas y degradación de ácidos nucleicos (Grant y Loake, 2000). La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical, se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena.

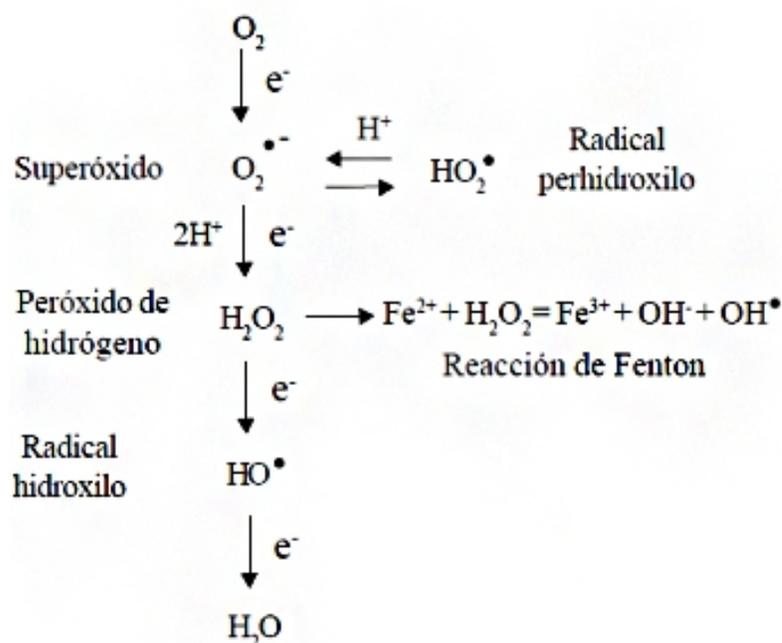


Figura 1.1 Química de las ROS. Las ROS normalmente son generadas por una reducción secuencial del oxígeno molecular (modificado de Gechev *et al.*, 2006).

1.4 LA FORMACIÓN DE LAS ROS

Específicamente, el término ROS incluye a todas las moléculas derivadas del oxígeno, tanto a los radicales como a los no radicales. El término también incluye al óxido nítrico (NO), una molécula de señalización importante en animales y plantas (Halliwell, 2006). Un radical libre es cualquier especie capaz de tener una existencia independiente que contiene uno o más electrones no apareados. Una importante característica de ROS es la conversión de un radical en otro, por ejemplo el anión superóxido puede reaccionar con el radical óxido nítrico (NO^\bullet) y formar perhidroxinitrilo (ONOO^-). El peroxinitrilo es rápidamente protonado a ácido peroxinitroso (ONOOH), el cual es un poderoso agente oxidante (Asada, 2006). Estos compuestos pueden dañar a las biomoléculas e iniciar reacciones que conducen a la formación de otras especies reactivas de radicales y no radicales destructivos.

Los múltiples sitios y fuentes de producción de ROS incrementan la complejidad de su estudio. Las ROS son productos normales del metabolismo y se producen en todos los compartimentos celulares dentro de una variedad de procesos. En general, se mantienen en niveles basales constantes en las células sanas, pero sus niveles aumentan temporalmente bajo diferentes condiciones de estrés o en respuesta a señales de desarrollo (Dat *et al.*, 2000).

Los cloroplastos son el sitio de mayor generación de ROS en plantas. La cadena de transferencia de electrones en la fotosíntesis produce al anión superóxido, especialmente en condiciones que conducen a una sobre-energización de la cadena de transporte de electrones (Airaki *et al.*, 2011). El anión superóxido se forma principalmente por la filtración de electrones de los centros Fe-S del fotosistema 1 o de la reducción de la ferredoxina a oxígeno molecular (reacción de Mehler), el cual es rápidamente metabolizado a peróxido de hidrógeno por la SOD (Moller, 2001). Aunque la producción excesiva de ROS es dañina, en este caso la capacidad del oxígeno para aceptar electrones impide la sobre-reducción de las cadenas de transporte de electrones.

Los peroxisomas y los glioxisomas son otros sitios importantes en la generación de ROS durante la oxidación de ácidos grasos y la fotorrespiración. La fotorrespiración es un proceso complejo estrechamente ligado a la fotosíntesis (del Río *et al.*, 2006). En

condiciones que deterioran la fijación de CO₂ en los cloroplastos, la actividad de la oxigenasa aumenta en la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, y el fosfoglicolato producido es hidrolizado a glicolato traslocado a los peroxisomas, donde es oxidado por la glicolato oxidasa, formando peróxido de hidrógeno (Moller, 2001). La oxidación de los ácidos grasos en los glioxisomas de semillas en germinación genera peróxido de hidrógeno como un subproducto de la enzima acil-CoA-oxidasa (del Rio *et al.*, 2006). Otro proceso metabólico que conduce a la formación del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno es la respiración mitocondrial.

Las principales fuentes de generación de ROS en la mitocondria son los complejos respiratorios. En el complejo I, las ROS son producidas por la actividad de la NADH deshidrogenasa. El ubiquinol producido por los complejos I y II es oxidado por el complejo III, generando un aumento en la producción de las ROS. Esta producción mitocondrial es mucho menor en comparación con la que se produce en los cloroplastos (Robson y Vanlerberghe, 2002; Moller, 2001). También las ROS se producen por la xantina oxidasa durante el catabolismo de las purinas, en la síntesis de los desoxirribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa y varias otras oxidasas inducidas por los estreses biótico y abiótico (Agarwal y Shaheen, 2007).

1.4.1 DAÑO OXIDATIVO

El efecto potencialmente más nocivo de ROS bajo la mayoría de las condiciones es el desencadenamiento de daños en las membranas, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, resultando al final en la muerte celular o en la aparición de lesiones necróticas (Foyer y Noctor, 2005).

Las ROS dañan los ácidos grasos polinsaturados, ya que los metilenos (CH₂) entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno. Las ROS que pueden producir la pérdida de estos hidrógenos son los radicales OH• y •HO₂⁻. También pueden dañar a las estructuras compuestas por ácidos grasos insaturados como las membranas celulares y los fosfolípidos (Devletova *et al.*, 2005). En las primeras, se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular, y en los segundos, provoca una reacción en cadena en la que los ácidos grasos al oxidarse, se convierten en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula (Figura 1.2). Este proceso es conocido como

peroxidación lipídica, generando numerosos subproductos, entre ellos el malondialdehído, que es tóxico para la célula (Foyer y Noctor, 2005).

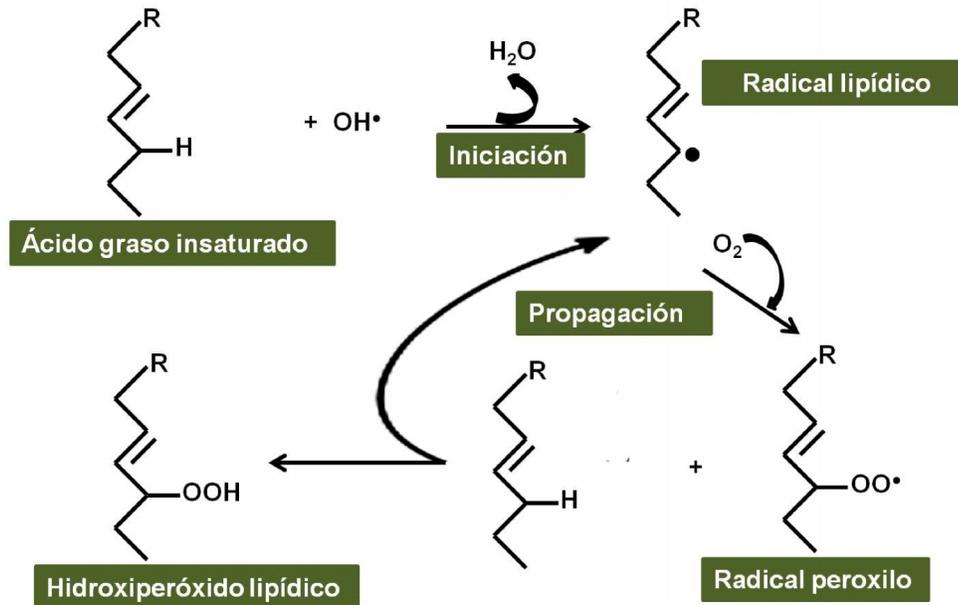


Figura 1.2 Representación esquemática de la reacción en la oxidación lipídica debido a las ROS (Coirini, 2009).

Las ROS actuando en conjunto con metales (hierro, cobre) pueden oxidar proteínas. Esta oxidación puede ser de tipo específica o no-específica. Un ejemplo de oxidación no específica es la oxidación por radiaciones que generan un número importante de radicales libres, que difunden rápida y fácilmente dentro de la célula reaccionando con distintos grupos funcionales de las proteínas (Breusegem *et al.*, 2001). En particular, las proteínas se oxidan en los aminoácidos de prolina, histidina, arginina, cisteína y metionina y como consecuencia, se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de las proteínas y formación de grupos carbonilos, impidiendo el normal desarrollo de las funciones de las proteínas afectadas (Apel y Hirt, 2004).

La oxidación específica ocurre en aquellas proteínas que tienen sitios de unión a metales (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). Estos metales pueden ser reemplazados por Cu^{2+} ó Fe^{2+} , que pueden generar ROS y tener como blanco a aminoácidos cercanos. Un ejemplo característico de

este tipo de mecanismo es la oxidación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es rápidamente inactivada de manera irreversible por concentraciones muy bajas de peróxido de hidrógeno y hierro (Apel y Hirt, 2004., Moller, 2001).

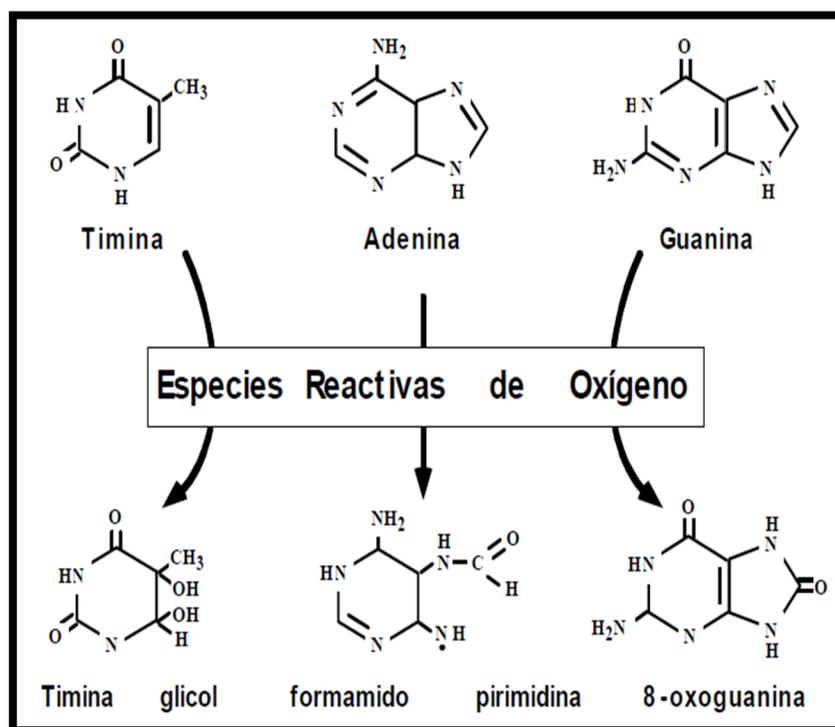


Figura 1.3 Representación esquemática de la modificación de las bases nitrogenadas del ADN debido a las ROS (Bhattacharjee, 2013).

Las ROS generan modificaciones en las bases del ADN, esto se debe en gran parte por el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Éstos pueden atacar tanto las purinas como las pirimidinas (Figura 1.3), así como a la desoxirribosa, y además generar rupturas en el ADN. Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN, por ejemplo, la 8-hidroxiguanina puede unirse a una adenina en vez de una citosina y la 8-hidroxiadenina unirse a una guanina en vez de una timina. La reacción de radicales libres con los azúcares del ADN puede traer como consecuencia la fragmentación del azúcar, la pérdida de una base con parte de este residuo hidrocarbonado y el corte de la cadena, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión de un gen

(Mittler *et al.*, 2004; Robson y Vanlerberghe, 2002).

1.4.2 LAS ROS COMO SEGUNDOS MENSAJEROS EN PLANTAS

Desde hace algunos años, se ha empezado a reconocer que las ROS tienen un papel dual en la biología de las plantas, como subproductos tóxicos del metabolismo aerobio y como moléculas de señalización, que controlan procesos fundamentales, tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medio-ambientales y la muerte celular programada (Gill y Tuteja, 2010; Apel y Hirt, 2004).

Las ROS tienen un papel central como molécula señal en la defensa de las plantas frente a patógenos, esto es por su rápida producción al aumentar las actividades de la NADPH oxidasa unida a membrana plasmática, la peroxidasa unida a la pared celular y las aminos oxidasas del apoplasto (Grant y Loake, 2000; Hammond-Kosack y Jones, 2000). A diferencia del $\cdot\text{O}_2^-$, el H_2O_2 puede difundir al interior de las células y activar los genes de defensa de las plantas, incluyendo aquellos involucrados en la muerte celular programada (PCD).

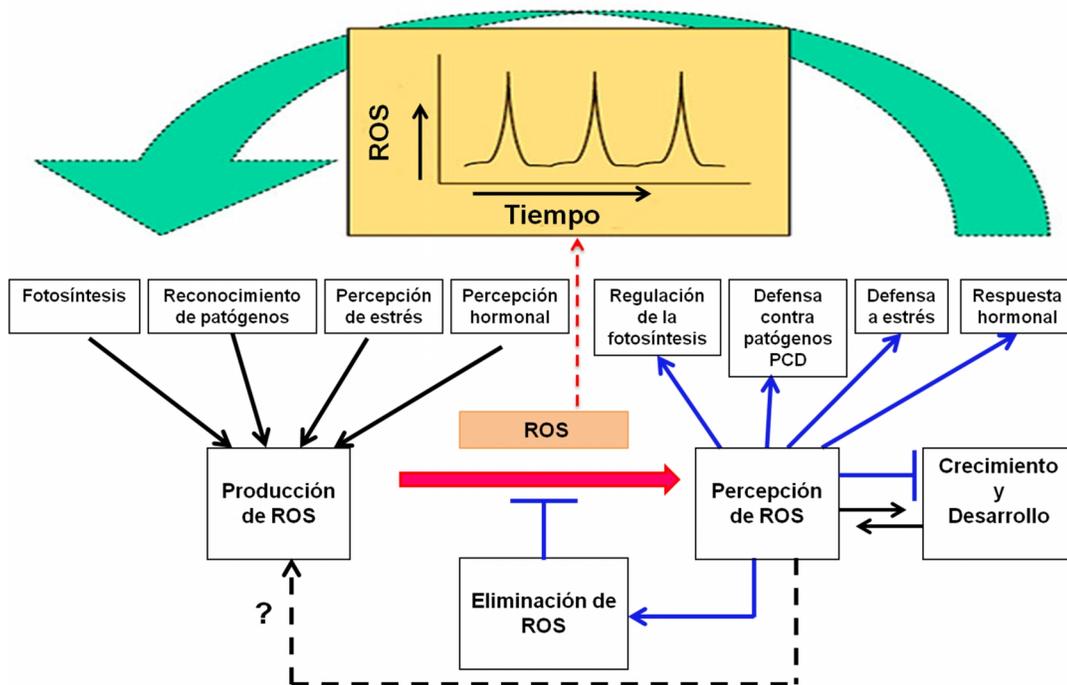


Figura 1.4 Representación esquemática de la modulación de ROS en plantas (Modificado de Mittler *et al.*, 2004). PCD: Muerte celular programada.

La inducción de la PCD limita la expansión de la enfermedad desde el punto de infección. Durante las reacciones incompatibles, cuando el patógeno es detectado y las respuestas de defensa, incluyendo la PCD, son inducidas, la producción de peróxido de hidrógeno ocurre de manera bifásica. Una acumulación muy rápida inicial es seguida de otra secundaria prolongada del mismo (Figura 1.4). Durante las interacciones compatibles, cuando el patógeno infecta sistemáticamente a la planta hospedera, sólo se produce el primer pico de acumulación de este compuesto (Apel y Hirt, 2004).

1.5 MECANISMOS DE CONTROL DE LAS ROS

Las ROS pueden ser tóxicas cuando se acumulan, por eso los organismos aerobios han desarrollado sistemas de protección, que permiten el equilibrio entre su formación y eliminación. Estos sistemas reciben el nombre de antioxidantes y pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. Su función es mantener el equilibrio en todos los compartimentos celulares y regular ajustando los niveles de las ROS de acuerdo a las necesidades de las células (Mittler *et al.*, 2004).

El sistema antioxidante enzimático está conformado por la superóxido dismutasa, única enzima capaz de eliminar al anión superóxido, mientras que el peróxido puede ser catabolizado directamente por la catalasa y otras enzimas reductoras como la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX) y la guayacol peroxidasa (del Rio *et al.*, 2006). Algunas de las enzimas eliminadoras de ROS, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la ascorbato peroxidasa tienen como principal función el mantener el equilibrio en la producción y eliminación de las ROS, mientras que otras como la guayacol peroxidasa, las tioredoxinas, las ferritinas y la glutatión S-transferasa están involucradas también en otros procesos relacionados con el desarrollo, la regulación redox de proteínas diana y las reacciones de desintoxicación (Moons, 2005; Passardi *et al.*, 2004; Rouhier *et al.*, 2004). El sistema antioxidante no enzimático también contribuye al equilibrio de las ROS y en él se agrupan moléculas como el ascorbato, el glutatión, el tocoferol y los carotenoides (Dellapenna y Pogson, 2006).

La catalasa degrada el H_2O_2 en ausencia de agente reductor. Esta enzima proporciona a las plantas una forma energética eficiente para eliminar el peróxido de hidrógeno, Sin embargo, la catalasa se activa solamente a concentraciones relativamente altas de H_2O_2 .

Cuando el peróxido de hidrógeno se encuentra en niveles bajos es eliminado por la ascorbato peroxidasa y otras peroxidasa con la ayuda de varios reductores, como el ascorbato y el glutatión (Passardi *et al.*, 2004).

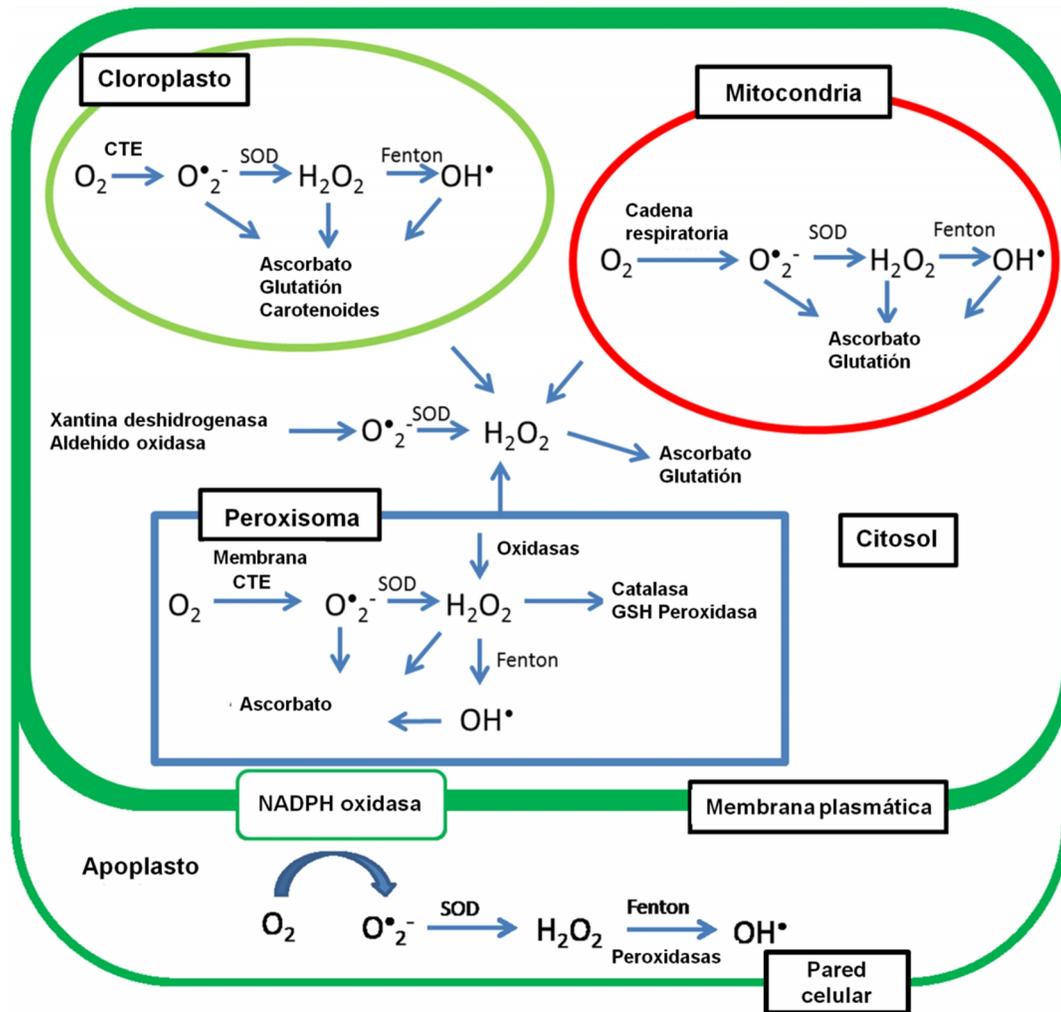


Figura 1.5 Representación esquemática generalizada de una célula vegetal en donde se representan las principales fuentes de generación de las ROS y las enzimas que participan en su eliminación (tomado de Jajic *et al.*, 2015). CTE: cadena de transporte de electrones.

Todos los compartimentos celulares tienen algún sistema de defensa antioxidante de naturaleza enzimática o no enzimática (Figura 1.5). Por lo tanto, las ROS se eliminan en los sitios donde se producen por medio de los antioxidantes presentes localmente. Cuando esta capacidad antioxidante local no puede hacer frente a la producción excesiva

de ROS, por ejemplo, durante el estrés o la reducción temporal en los niveles de antioxidantes debido a señales de desarrollo, el peróxido de hidrógeno puede filtrarse en el citosol y difundirse a otros compartimentos. Las plantas pueden hacer frente al exceso de peróxido transportándolo a las vacuolas para su eliminación (Bienert *et al.*, 2006). Las vacuolas son ricas en flavonoides, antioxidantes poderosos que pueden eliminar peroxinitrito y otras ROS. También contienen altos niveles de ascorbato, glutatión y peroxidasas localizadas en la superficie interna del tonoplasto (Bienert *et al.*, 2006; Moons *et al.*, 2005; Gould *et al.*, 2002).

1.6 LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (EC 1.15.1.1)

Las superóxido dismutasas (SODs) son metaloproteínas ubicuas que catalizan la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Actúan como primera línea de defensa, evitando oxidaciones biológicas indeseables por las ROS generadas durante el metabolismo celular.

Las SODs son una familia de enzimas que se agrupan según el grupo prostético metálico ligado a la enzima. Se clasifican en cuatro grupos: la hierro-SOD (Fe-SOD), la manganeso-SOD (Mn-SOD), la cobre-zinc-SOD (Cu/Zn-SOD) y la níquel SOD (Ni-SOD). Todas las SODs conocidas requieren un metal de transición redox en el sitio activo, con el fin de lograr la descomposición catalítica del anión superóxido. En la Figura 1.6, se representa el mecanismo de la reacción de las SODs.

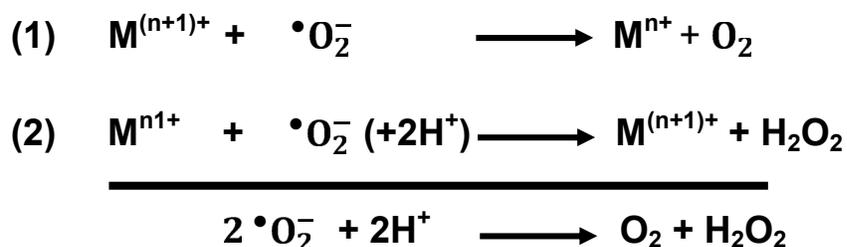


Figura 1.6 Reacción enzimática catalizada por la SOD.

El mecanismo de la reacción implica una reducción secuencial del centro metálico (Figura 1.6, primer paso) y una oxidación (Figura 1.6, segundo paso), junto con una reducción de los radicales superóxido a una velocidad de difusión controlada que generalmente se encuentra en un rango de pH 5 a 9.5 (Abreu y Cabelli, 2010). Estas reacciones típicamente no requieren ninguna fuente externa de equivalentes redox y por tanto, son auto-reguladas (Culotta *et al.*, 2006).

El anión superóxido se produce en varios lugares; su principal sitio de origen es en el fotosistema I a nivel de la ferredoxina-NADP, y por tanto, la activación del oxígeno molecular podría ocurrir en diferentes compartimentos de la célula, incluyendo las mitocondrias, los cloroplastos, los microsomas, los glioxisomas, los peroxisomas, los apoplastos, y el citosol. Siendo éste el caso, no es ninguna sorpresa encontrar a las SODs presentes en todos los compartimentos celulares. Mientras que todos los compartimentos de la célula son posibles sitios de formación del superóxido, los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas son los más importantes generadores de ROS (Landis y Tower, 2004; Grene-Alscher *et al.*, 2002).

1.6.1 ISOENZIMAS DE LA SOD

Las SODs se localizan en todos los compartimentos intracelulares susceptibles al estrés oxidativo e incluso se ha reportado SOD en el espacio extracelular. La Fe-SOD está localizada en los cloroplastos, la Mn-SOD está en la mitocondria y el peroxisoma, y la Cu/Zn-SOD está en los cloroplastos, el citosol y posiblemente, en el espacio extracelular (Figura 1.7) (Gill *et al.*, 2015).

El número y el tipo de isoenzimas de SOD varía dependiendo de la especie de la planta, edad del desarrollo, y condiciones ambientales (Corpas *et al.*, 2006). Hay algunas especies de plantas con una sola isoenzima de SOD; por ejemplo, en plantas de girasol, se ha detectado únicamente la isoenzima Cu/Zn-SOD.

Mediante el análisis filogenético de estos tres tipos de superóxido dismutasa, se observa que comparten una función catalítica; sin embargo, tienen estructuras proteicas y grupo prostético diferentes (Halliwell y Gutteridge, 2007). Se ha propuesto que la razón evolutiva para la separación de las isoenzimas de la SOD con diferentes requerimientos metálicos

es su probable relación con la disponibilidad diferencial de compuestos solubles de metales de transición en la biósfera, en relación con el contenido atmosférico de oxígeno molecular en diferentes eras geológicas (del Río *et al.*, 2002). Las isoenzimas Mn-SOD y Fe-SOD son las más antiguas y parecen haber evolucionado a partir de una misma enzima ancestral, mientras que la Cu/Zn-SOD no comparte una estructura proteica similar a las otras isoenzimas conocidas, por lo que probablemente, ésta ha evolucionado por separado.

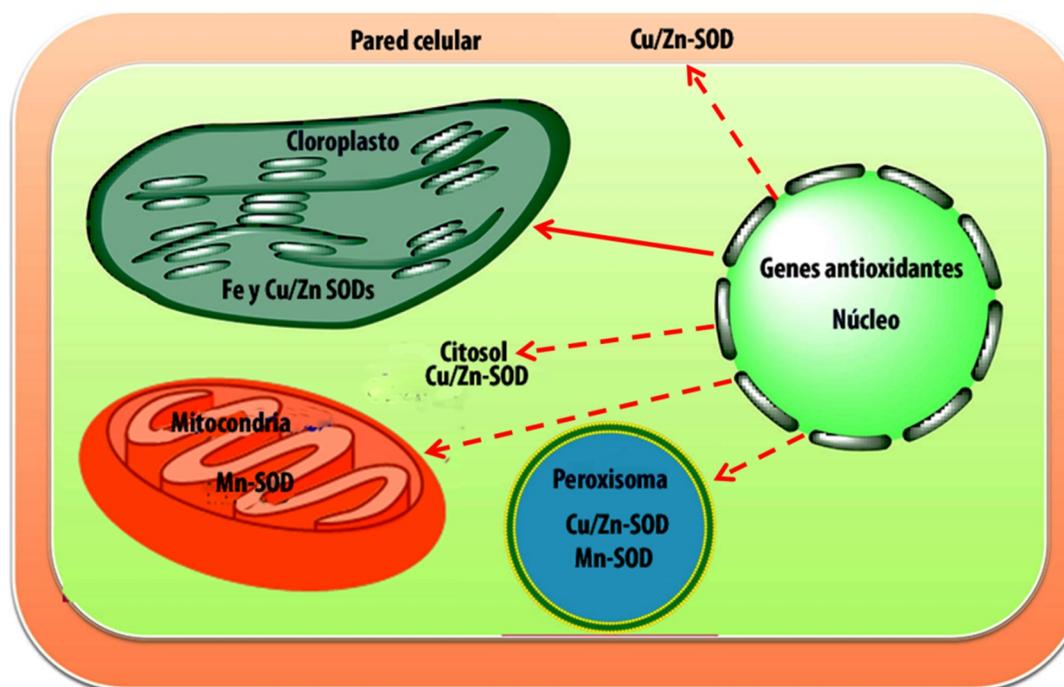


Figura 1.7 Localización intracelular de las SODs de células vegetales (Gill *et al.*, 2015).

1.6.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS ISOENZIMAS DE LAS SODs

Las SODs que se han encontrado hasta la fecha presentan una variedad de diferentes centros metálicos y estructuras proteicas; sin embargo, tienen una misma función, como se ha descrito anteriormente. Estas isoenzimas de la SOD difieren entre sí en sus características estructurales, en los requerimientos del cofactor metálico, en la compartimentalización celular y en la regulación (Dennis *et al.*, 2006; Hough y Hasnain 2003). En la Figura 1.8 se muestra un esquema de las diferentes estructuras tridimensionales de las SODs.

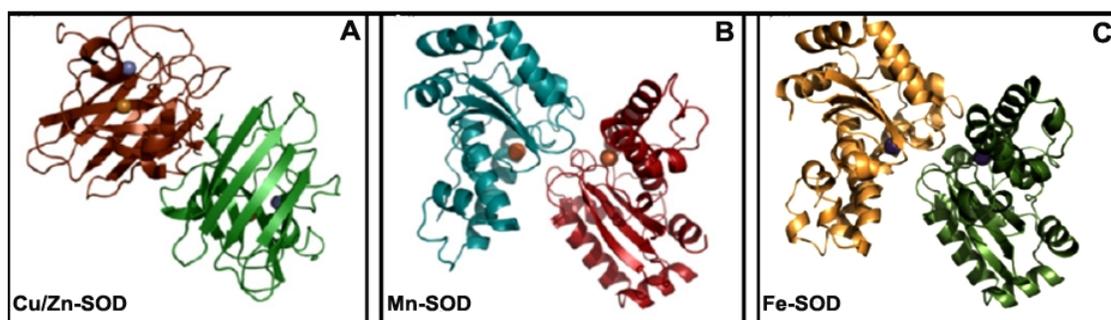


Figura 1.8 Representación de las estructuras tridimensionales de las SODs (Abreu y Cabelli, 2010).

En la Figura 1.8A se muestra la estructura de la isoenzima Cu/Zn-SOD, la cual está compuesta por dos subunidades idénticas (homodimérica; con una masa molecular aproximada de 32 kD) y cada subunidad contiene un átomo de zinc y uno de cobre, así como láminas β dispuestas antiparalelamente en forma de estructura súpersecundaria (motivo) conocida como llave griega (Greek-Key) (Perry *et al.*, 2010). Los residuos hidrofóbicos fuertemente unidos forman el centro del motivo en forma de barril beta y los bucles $\beta 3/ \beta 4$ y $\beta 6/ \beta 7$ de la hebra 3+ forman las conexiones del motivo llave griega (GK1 y GK2). Otros dos bucles externos conforman el canal del sitio activo. El primer bucle $\beta 4/ \beta 5$ se une a la interfaz del dímero con el sitio activo y el zinc en un enlace disulfuro, el cual estabiliza el pliegue de la subunidad y también la interfaz del dímero. El segundo bucle $\beta 7/ \beta 8$ o bucle electrostático guía y acelera al sustrato (anión superóxido) dentro del sitio activo (Abreu y Cabelli *et al.*, 2010).

Las estructuras tridimensionales de la Mn-SOD y Fe-SOD se muestran en la Figura 1.8B y 1.8C. Se puede observar que están compuestas por dos subunidades idénticas (homodiméricas; con una masa molecular aproximada de 21 y 20 kD, respectivamente). Cada subunidad contiene dominio N-terminal de α hélices y un dominio C-terminal de tres hojas β rodeado de α hélices. Los iones metálicos están unidos entre los dos dominios por dos aminoácidos de cada uno y una molécula de agua (Perry *et al.*, 2010).

El sitio activo de la Cu/Zn-SOD contiene un ion metálico de cobre y otro de zinc que se unen mediante un puente de imidazol de la histidina (Figura 1.9A). El cobre está unido a tres histidinas formando una estructura tetragonal distorsionada. El zinc está unido a dos histidinas y a un aspartato, además del puente de imidazol. El cobre es el metal activo

redox, el cual cambia su estado de oxidación de 2 a 3 durante la catálisis y el zinc parece tener un papel en la estabilidad global de la enzima (Hough y Hasnain, 2003). Aparte del cianuro de potasio (KCN), la Cu/Zn-SOD puede ser inhibida por el H_2O_2 (Gill *et al.*, 2015).

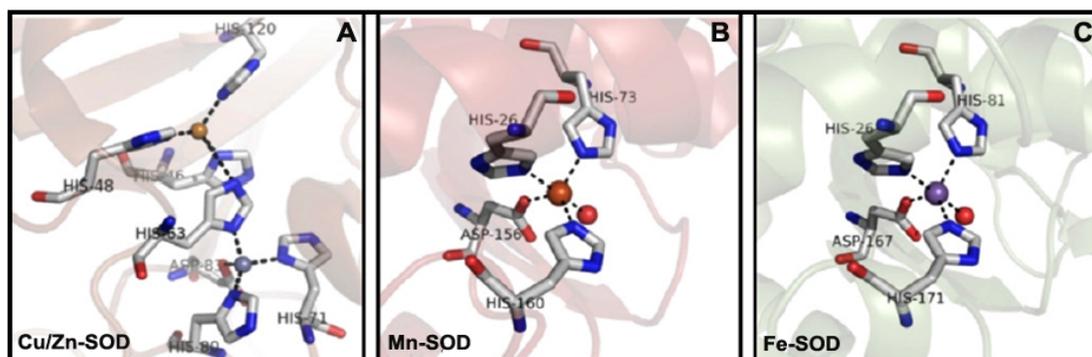


Figura 1.9 Representación del sitio activo de las SODs (Abreu y Cabelli, 2010).

Los sitios activos de la Mn-SOD y Fe-SOD (Figura 1.9B y 1.9C) están conformados por un átomo del ión metálico unido a tres histidinas, un aspartato y una molécula de agua en una estructura bipiramidal trigonal (Abreu y Cabelli, 2010). El sitio activo se encuentra localizado entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal.

La Mn-SOD puede ser homodimérica o homotetramérica con un átomo de manganeso por subunidad. Está presente tanto en procariontes como en eucariontes (Culotta *et al.*, 2006). En plantas, las isoenzimas de la SOD tienen una secuencia de similitud del 65% entre una y otra. La Fe-SOD es resistente al KCN pero es inactivada por el H_2O_2 , a diferencia de la Mn-SOD que es resistente a ambos (Gill *et al.*, 2015).

1.6.3 REGULACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE LA SOD

En las plantas, el cobre actúa como un elemento estructural en proteínas reguladoras y participa en el transporte electrónico fotosintético, la respiración mitocondrial, la respuesta al estrés oxidativo, el metabolismo de la pared celular y la señalización hormonal, entre otras (Yruela, 2005). La plastocianina (Pc) y la Cu/Zn-SOD son enzimas que tienen como cofactor metálico al Cobre; sin embargo, la Pc participa en la fotosíntesis y el 50% del contenido de Cu en el cloroplasto está unido a esta proteína. En este contexto, en cianobacterias y algunas algas se sustituye a la Pc de la cadena de transporte de

electrones por el citocromo (Cit c6) en deficiencia de Cobre, mientras que en plantas superiores no sucede esto. Las plantas superiores sustituyen la actividad enzimática de la isoenzima Cu/Zn-SOD por la Fe-SOD con el objetivo de minimizar el uso del Cobre (Figura 1.10) y así liberarlo para la plastocianina que tiene un papel en el proceso de transporte de electrones entre el fotosistema II y I del proceso de fotosíntesis, función fundamental en plantas (Abdel-Ghany *et al.*, 2005).

Se sabe que los niveles del Cobre regulan a nivel transcripcional a las Cu/Zn-SOD y Fe-SOD (Puig *et al.*, 2007), ya que se ha identificado que a concentraciones altas de Cu se induce la expresión génica de la Cu/Zn-SOD, mientras que la Fe-SOD se reprime; sin embargo, a concentraciones bajas, la Cu/Zn-SOD se reprime y la Fe-SOD se activa (Figura 1.10).

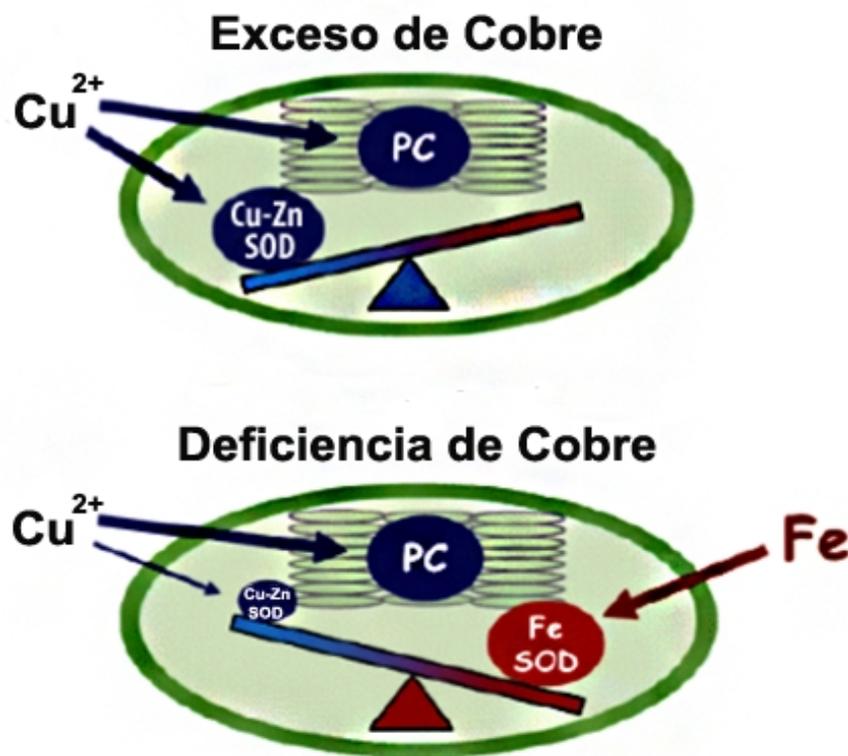


Figura 1.10 Sustitución de las SODs del cloroplasto en función de la disponibilidad de Cu^{2+} en *Arabidopsis* (Puig *et al.*, 2007). En condiciones normales, la isoenzima Cu/Zn-SOD y la Pc son los mayores receptores de Cu en el cloroplasto; sin embargo, cuando hay una deficiencia de Cobre en el cloroplasto, la actividad de la Cu/Zn-SOD se inactiva y en sustitución de ésta se activa la Fe-SOD.

De esta forma, cuando la concentración de Cu es baja, los niveles del ARNm, de la proteína y de la actividad enzimática de la isoenzima Fe-SOD aumentan notablemente, mientras que los niveles de la isoenzima Cu/Zn-SOD, que se encuentran en el cloroplasto y citosol, son prácticamente indetectables (Olivares *et al.*, 2008). Esta regulación coordinada de genes nucleares y proteínas se dirige probablemente al uso óptimo de Cu en el cloroplasto y sugiere que los niveles de Cu en el estroma regulan la expresión nuclear de la isoenzima Cu/Zn-SOD a través de vías de señalización aún desconocidas (Campbell *et al.*, 2006; Wang y Brendel, 2006).

También es importante el mecanismo catalítico, ya que se puede inhibir a la Cu/Zn-SOD y la Fe-SOD, por medio del H₂O₂ que es producto de la reacción catalizada por la SOD. Esta inhibición se da de una manera para la Cu/Zn-SOD, y de otra, para la Fe-SOD, así la desactivación del sitio activo de la Fe-SOD se produce a través de reacciones Fenton (se produce al catalizar el H₂O₂ con metales de transición, dando como resultado la generación de radicales), mientras que la inhibición para la Cu/Zn-SOD es de manera directa (el H₂O₂ oxida los residuos aminoácidos del sitio activo). Esta inhibición por producto de la SOD es importante para prevenir la sobreproducción de peróxido de hidrógeno, que es tóxico para las células (Perry *et al.*, 2010).

La actividad de la Mn-SOD puede ser regulada por la acetilación de algunos de sus residuos de lisina (la acetilación disminuye la actividad enzimática y la desacetilación la incrementa), esto se puede dar por el mecanismo de las sirtuinas que influyen en el metabolismo celular. También, los niveles de Mn-SOD pueden cambiar rápidamente en respuesta a estrés externo, por ejemplo, en respuesta a varias citocinas y factores de crecimiento. Así mismo, los niveles de Mn-SOD son sensibles a los cambios en la fisiología celular (Halliwell y Gutteridge, 2015; Guengerich y Cheng, 2011).

El peroxinitrito (ONOO⁻) es capaz de inactivar la Mn-SOD y Fe-SOD por medio de la nitración de un residuo de tirosina clave en la catálisis. A pesar de que dichas enzimas contienen nueve residuos de tirosina por monómero, su nitración dependiente de peroxinitrito ocurre de manera sitio-específica en la tirosina 34, que se ubica a 5 Å del sitio activo (Beckman *et al.*, 1992; Ischiropoulos *et al.*, 1992). La nitración de la tirosina 34 lleva a la inactivación de las isoenzimas al generar una gran barrera energética para la entrada del anión superóxido al sitio activo de la misma, debido tanto a la restricción estérica que

impone el grupo $-\text{NO}_2$ como a la carga negativa que se origina tras la disociación del OH^- fenólico de la tirosina, luego de la modificación a nitrotirosina (Souza *et al.*, 2008) (Figura 1.11).

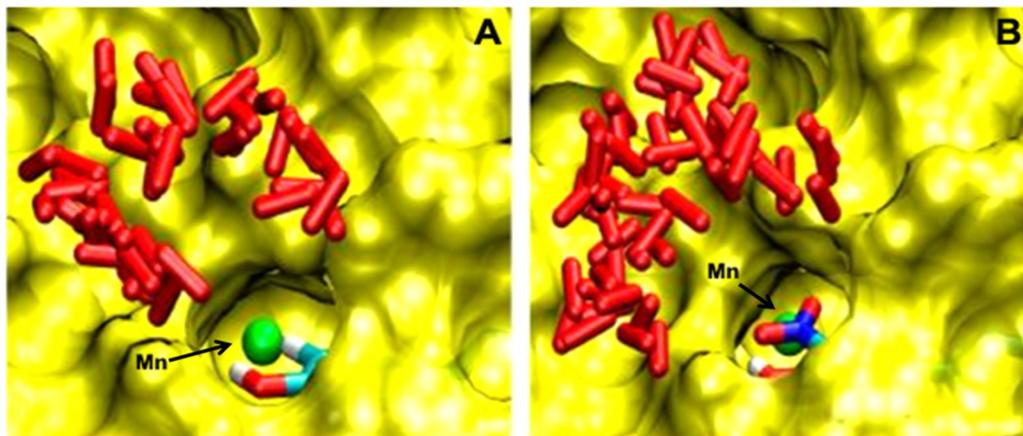


Figura 1.11 Inactivación de la Mn-SOD por nitración de la tirosina 34. La imagen representa una vista esquemática del canal de acceso del superóxido (bastones rojos) al sitio activo de la enzima, donde se ubica el átomo de Mn (verde) y la Tyr34 (representada en bastones). La superficie de la enzima se muestra en amarillo. (A) En estado nativo, el superóxido puede acceder al átomo de Mn a través del canal. (B) Cuando la Tyr34 de la Mn-SOD se encuentra nitrada, el grupo NO_2^- bloquea el canal de acceso al átomo de Mn, al tiempo que favorece la ionización del grupo hidroxilo fenólico de la tirosina a pH fisiológico; esto impide la entrada del superóxido al sitio activo por restricción estérica y repulsión electrostática (Souza *et al.*, 2008).

1.6.4 IMPORTANCIA DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE

Como se ilustra en la Figura 1.12, la SOD es la primera enzima de la cascada del sistema antioxidante enzimático y el H_2O_2 generado como producto de la reacción catalizada por esta enzima, es eliminado por la catalasa (CAT) o por la ascorbato peroxidasa (APX) en el ciclo ascorbato-glutatión y es reducido a H_2O (Malik *et al.*, 2014). En condiciones típicas la dismutación espontánea del $\bullet\text{O}_2^-$ ocurre de manera rápida (5×10^5 M/s); sin embargo, las isoenzimas de la SOD aceleran la reacción en cuatro órdenes de magnitud (Culotta *et al.*, 2006).

Las SODs en plantas superiores existen en múltiples isoenzimas que son reguladas y

altamente reactivas en respuesta a estímulos exógenos. La importancia de las SODs radica en la eficiente eliminación del $\cdot\text{O}_2^-$ que se produce en los distintos compartimentos intracelulares en respuesta a estos estímulos, esto ha sido confirmado en numerosos estudios realizados en plantas en donde se han expuesto a un estrés abiótico como la salinidad, calor, sequía y metales como el cadmio y plomo, entre otros (Gill *et al.*, 2015).

En particular, la sobreexpresión de los genes que codifican para la Cu/Zn-SOD ha sido correlacionada con la tolerancia al estrés abiótico en varias especies de plantas. Por ejemplo, Sunkar y colaboradores (2006) reportaron que la inducción postranscripcional de dos genes que codifican para esta isoenzima en *Arabidopsis* fue crítica en la tolerancia a estrés oxidativo. También, Madanala y colaboradores (2011) reportaron que en *Whitania somnifera*, la isoenzima Cu/Zn-SOD se encuentra en el cloroplasto y le confiere una mayor tolerancia a químicos exógenos, como el detergente y el etanol.

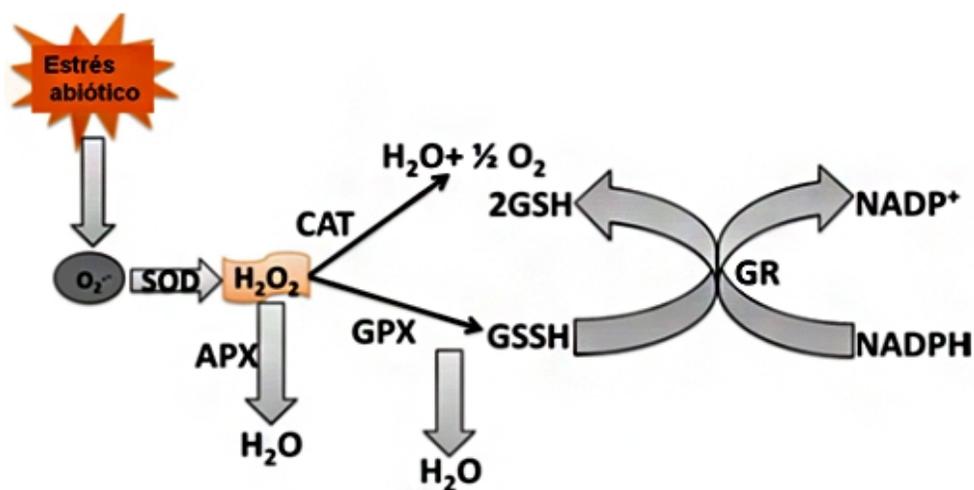


Figura 1.12 Mecanismo de defensa del sistema antioxidante enzimático en respuesta a las ROS (Malik *et al.*, 2014). La SOD está ampliamente distribuida en la célula y convierte el $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 , este es eliminado por la CAT o por la APX, que convierten al H_2O_2 en H_2O y O_2 . La GR es una flavoenzima dependiente del NADPH que cataliza la reducción del GSSH a GSH, el cual será utilizado por la GPX para la reducción del H_2O_2 y lipoperóxidos. CAT: Catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, GPX: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSH: glutatión oxidado, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido y NADP^+ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.

1.7 MODELO DE ESTUDIO *Coffea arabica*

Para este trabajo se utilizaron suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. var. Catuai que se obtuvieron de la disgregación de callos provenientes de hojas cotiledonares de plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). También, se generaron dos líneas con diferentes niveles de resistencia al aluminio: una línea tolerante (LAMt) y otra sensible (L2) (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a).

Las líneas L2 y LAMt han sido caracterizadas y se ha determinado su velocidad de crecimiento en medio de cultivo MS a la mitad de su fuerza iónica (Murashigue y Skoog, 1962). Después de trece años de subcultivo, la línea LAMt ha mantenido la tolerancia al aluminio y la línea L2, la sensibilidad a este metal (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). También se ha analizado la actividad enzimática total de la superóxido dismutasa (SOD) en células de las líneas L2 y LAMt tratadas con 100µM de AlCl₃ en diferentes períodos de tiempo (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011). Estos ensayos mostraron, que a las seis horas de tratamiento, la actividad enzimática total de la SOD en la línea LAMt presentó un incremento del 30% comparado con las células testigo. En contraste, la línea L2 no presentó cambios en la actividad enzimática total de la SOD bajo las mismas condiciones. En este mismo trabajo, se cuantificaron los niveles de peróxido de hidrógeno extracelular (excretado por la célula) en ambas líneas celulares cuando son tratadas con 100µM de AlCl₃ en diferentes períodos de tiempo. En este ensayo, la línea LAMt que fue tratada con aluminio presentó niveles extracelulares bajos de H₂O₂, comparados con los de la L2 bajo las mismas condiciones. El mecanismo de resistencia a aluminio presente en la línea LAMt aún es desconocido.

JUSTIFICACIÓN

Las isoenzimas de la SOD son importantes, ya que contrarrestan los efectos de las ROS en los sistemas biológicos. El estudio de la SOD en las suspensiones celulares de *C. arabica* ayudará a elucidar si las ROS o los sistemas eliminadores de ROS están involucrados en la toxicidad o tolerancia al aluminio. Además permitirá, no sólo tener un mayor conocimiento en el área, sino también a comprender algunos mecanismos de transducción de señales que pudieran estar involucrados o relacionados con la regulación de las isoenzimas de SOD en respuesta a la toxicidad por aluminio.

El presente trabajo tiene como finalidad determinar si la actividad enzimática de las diferentes isoenzimas de SOD está siendo modificada específicamente en respuesta al estrés por aluminio, así como el evaluar la acumulación del peróxido de hidrógeno en diferentes compartimentos intracelulares.

HIPÓTESIS

Si el tratamiento con el aluminio en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., presenta un incremento en la actividad enzimática total de SOD, entonces la actividad de alguna de las isoenzimas de SOD, así como los niveles de H₂O₂ serán afectados de manera particular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál de las isoenzimas de SOD participa en la tolerancia al aluminio y cómo varían los niveles de H₂O₂ bajo esta condición.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e identificar las isoenzimas de SOD presentes en las líneas celulares L2 y LAMt de *C. arabica* L.
- Determinar el efecto del tratamiento con AlCl₃ sobre la actividad específica de las isoenzimas de SOD en las líneas celulares L2 y LAMt.
- Determinar el efecto del tratamiento con AlCl₃ en la acumulación de H₂O₂ intracelular en ambas líneas celulares.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se llevó a cabo en el presente trabajo se ilustra en la Figura 1.13.

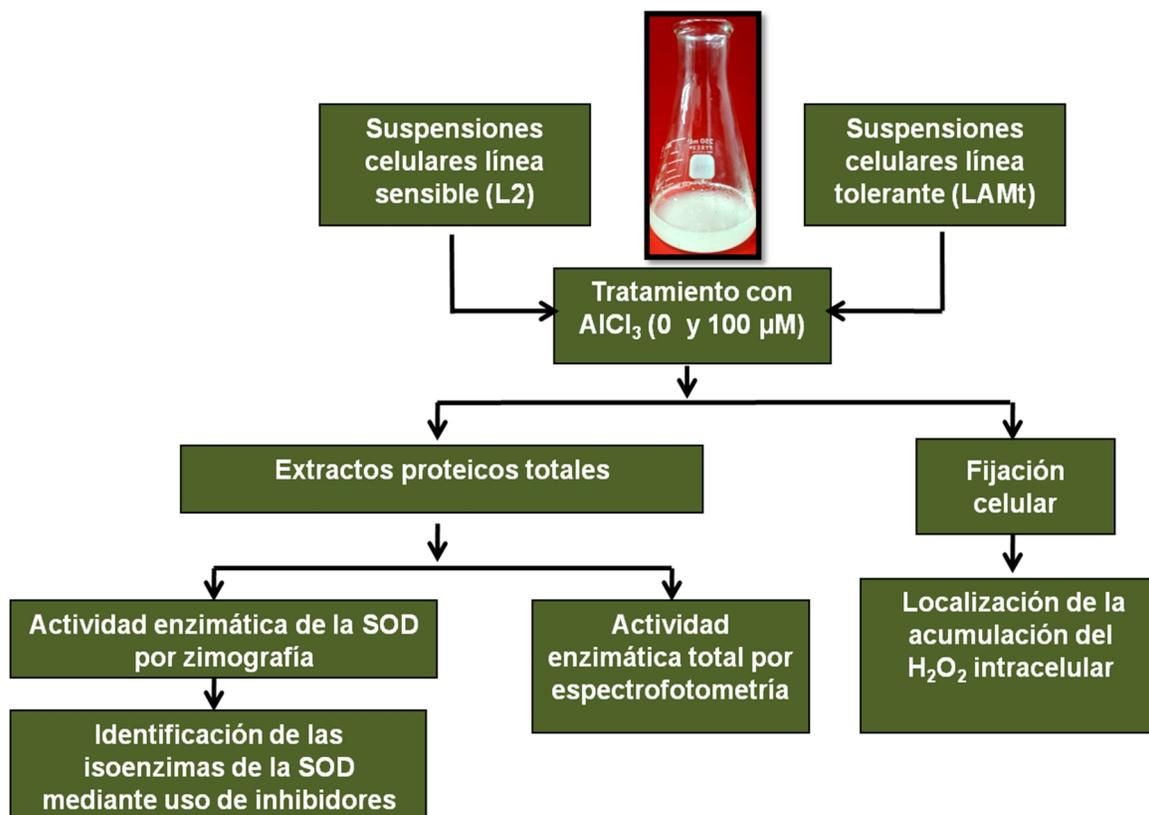


Figura 1.13 Estrategia experimental realizada en el presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo, como modelo experimental, se usaron suspensiones celulares de café (*Coffea arabica* L.). El modelo *in vitro* tiene como ventaja el hecho de que se pueden controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura, humedad controlada, nutrimentos, etc), de esta manera, se pueden estudiar diversos procesos metabólicos ya sea en conjunto o en forma individual y las respuestas que se producen ante ese factor limitante o estresante.

En el presente trabajo, se determinó la actividad enzimática total y la de las diferentes isoenzimas de la SOD, así como la detección intracelular de la acumulación del peróxido de hidrógeno en respuesta al aluminio. También se identificaron las isoenzimas de la SOD mediante el uso de inhibidores específicos (H_2O_2 y KCN).

2.1 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron suspensiones celulares de *C. arabica* L. cv Catuai, las cuales fueron obtenidas a partir de callo embriogénico proveniente de explantes foliares de plántulas *in vitro* (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). La línea celular denominada L2, es sensible a la toxicidad por aluminio. También se utilizó la línea celular denominada LAMt tolerante a la toxicidad por aluminio (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Esta línea celular se seleccionó a través de subcultivos alternados de células en suspensión en medio MS (Murashigue y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica y presencia o ausencia de $AlCl_3$ (25 μM).

Las suspensiones celulares L2 y LAMt de *C. arabica* L. se cultivaron en medio MSHIS, conteniendo sacarosa al 3%, cisteína-HCl 140 μM , myo-inositol 560 μM , tiamina-HCl 30 μM , ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético (2,4-D) 13.6 μM y 6-bencil-aminopurina (6-BAP) 4.4 μM . El pH del medio se ajustó a 4.3 antes de la esterilización. Las suspensiones celulares permanecieron en condiciones de oscuridad en agitación constante (100 rpm) y fueron subcultivadas cada 14 días para su mantenimiento.

2.2 TRATAMIENTOS

Las líneas L2 y LAMt en el día 7 del ciclo de cultivo fueron separadas del medio de cultivo por filtración al vacío. Un gramo de células de cada línea fue inoculado de manera individual en 25 mL de medio de cultivo MSHIS (pH 4.3), estas fueron mantenidas en oscuridad por 30 minutos y agitación continua (100 rpm). Transcurrido el tiempo, a cada línea se le adicionó AlCl_3 para llegar a una concentración final de 100 μM y se incubaron durante dos diferentes tiempos (0.5 y 6 horas) bajo las condiciones descritas previamente. Al concluir el tratamiento, las suspensiones celulares fueron cosechadas por filtración al vacío, congeladas con nitrógeno y conservadas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células colectadas en cada tiempo de análisis y congeladas con nitrógeno líquido, fueron trituradas con mortero de porcelana y pistilo hasta obtener un polvo fino al que se le añadió el amortiguador de extracción, en relación 1 gramo de células y 2.5 mL de amortiguador. La composición del amortiguador de extracción consistió en Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 50 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM, glicerol 10% (v/v), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y leupeptina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las células fueron homogeneizadas con un politrón durante un minuto en baño de hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. El homogenizador fue centrifugado a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Se colectó el sobrenadante o extracto crudo.

La cuantificación de proteínas en los extractos fue realizada con el método modificado del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Este método permite determinar por espectrofotometría la formación del producto de reacción BCA-Cu^{1+} , el cual se forma por la interacción de dos moléculas de BCA con un ión cuproso (Cu^{1+}), a partir de la reducción del ion cúprico (Cu^{2+}) por aminoácidos reductores de las proteínas (Figura 2.1). Se empleó el reactivo comercial de Thermo Scientific PIERCE BCA^{TM} Protein Assay Kit, midiendo la formación del complejo revelador a una longitud de onda de 562 nm y utilizando albúmina de suero bovino como estándar para preparar la curva patrón de proteínas (Figura 2.2).

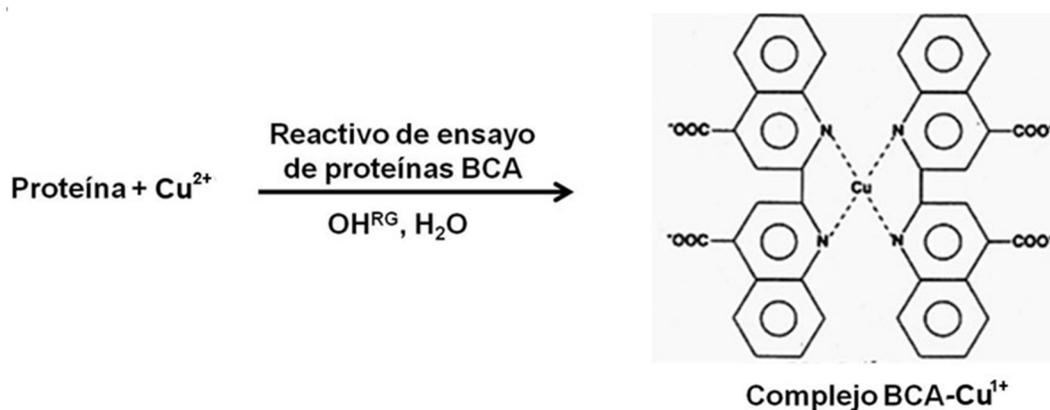


Figura 2.1 Esquema de la reacción química del ensayo de proteína por ácido bicinconínico (BCA).

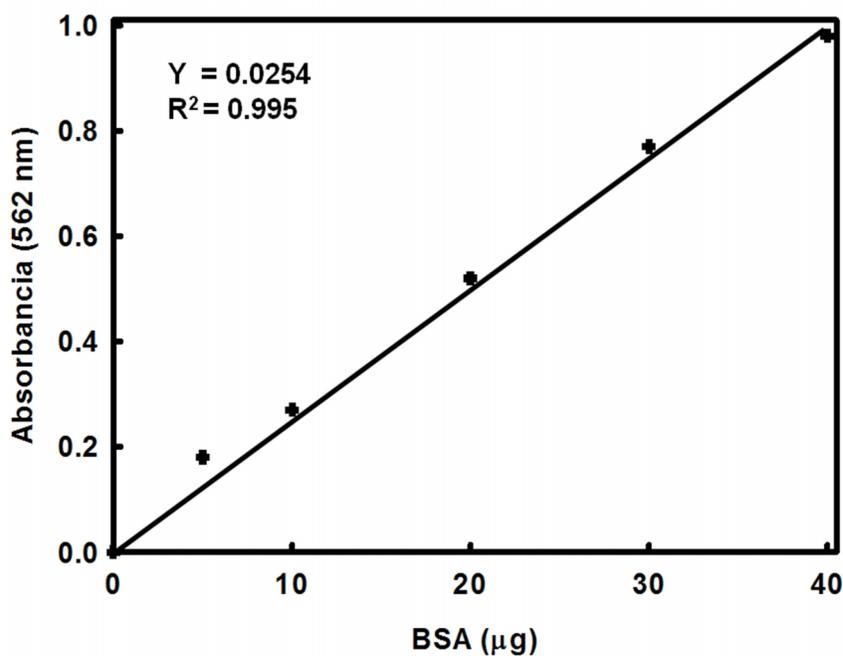


Figura 2.2 Curva estándar de albumina de suero bovino (BSA).

2.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD

La determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) se realizó utilizando un paquete comercial de Sigma-Aldrich, SOD Assay Kit-WST (Cat. 19160), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anión superóxido producido por la oxidación de la xantina a ácido úrico debido a la actividad de la xantina oxidasa (XO), reduce al sustrato cromogénico WST-1 [sal monosódica, 2-4-Iodofenil-3-4-nitrofenil-

5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio] a cristales de formazán solubles en agua, los cuales pueden ser cuantificados espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. En presencia de la SOD, el radical $\cdot\text{O}_2^-$ sufre una dismutación a O_2 y H_2O_2 , produciendo una reducción en la formación del formazán (Figura 2.3). Una unidad de actividad SOD, se define como la cantidad de la enzima en una solución de muestra que inhibe en 50% (IC_{50}) la velocidad de reducción de WST-1 (McCord y Fridovich, 1969).

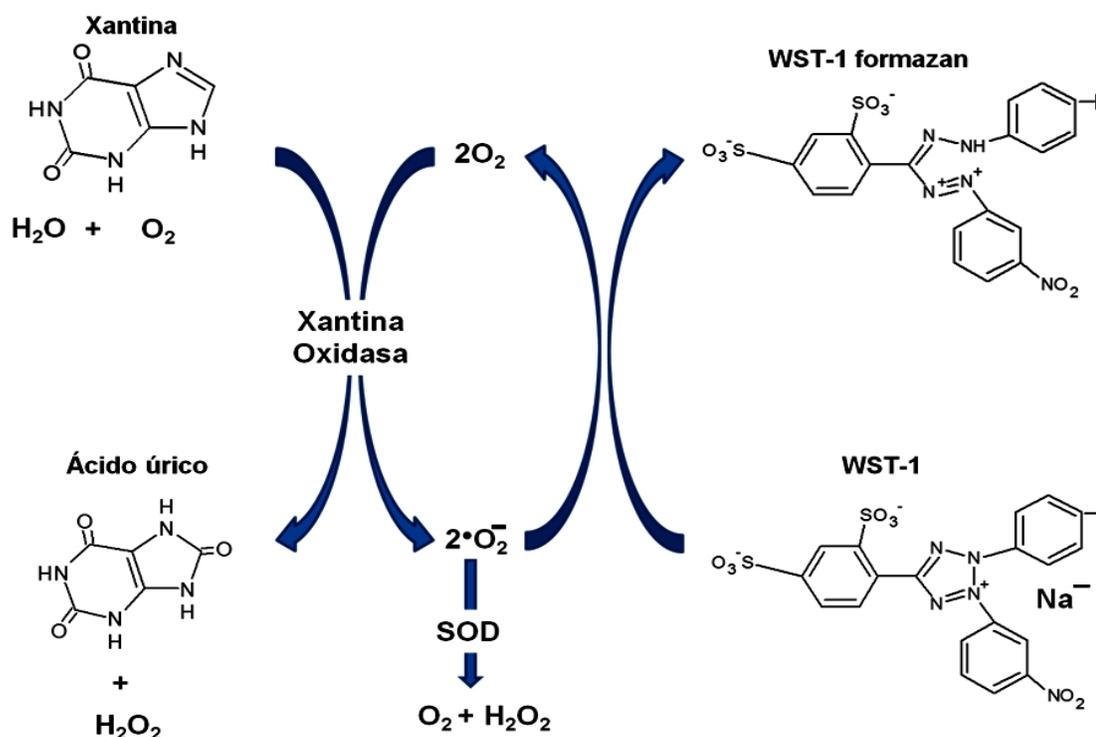


Figura 2.3 Esquema de la reacción química del ensayo de la actividad enzimática de SOD con el paquete comercial SOD Assay Kit-WST. La SOD y el sustrato cromogénico (WST-1) son reducidos por el anión superóxido producido por el sistema xantina/ xantina oxidasa (Yan-Zhou y Prognon, 2005).

Para la determinación de la actividad enzimática de la Cu/Zn-SOD y Fe-SOD, los extractos de proteína total fueron pre-incubados a 37 °C durante 30 minutos con 0.15% de SDS (inhibidor de la isoenzima Mn-SOD). Transcurrido este tiempo, se procedió a la medición de la actividad enzimática mediante el uso del paquete comercial descrito en el párrafo anterior. La actividad enzimática de la isoenzima Mn-SOD fue determinada de la diferencia de las actividades obtenidas de la actividad enzimática total de la SOD y pre-

incubada con SDS (Cu/Zn-SOD y Fe-SOD) (Paital *et al.*, 2015).

2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD SOD EN GEL

2.5.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NATIVAS

Las proteínas en los extractos crudos fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, de acuerdo a Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Para ello, se utilizó un equipo Mini-Protean III (Bio Rad), donde fueron preparados geles de poliacrilamida de 8.5 x 9 cm y 1 mm de grosor. Se utilizaron geles revolvedores al 10% (v/v) de poliacrilamida y geles concentradores al 4% (v/v) de poliacrilamida en solución amortiguadora Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8). Para llevar a cabo la separación electroforética fue utilizado el amortiguador Tris-glicina 0.33 M (pH 8.3), aplicando una corriente de intensidad de 15 mA durante 30 minutos, y después, se incrementó a 25 mA hasta terminar la corrida del gel (Airaki *et al.*, 2011).

El gel de poliacrilamida conteniendo el perfil de proteínas fue teñido con azul de Coomassie. Para ello, el gel fue incubado durante una hora en una solución 0.1% Coomassie R-250 (Bio-Rad), diluido en 50% metanol y 10% ácido acético. Transcurrido el tiempo, el gel fue sumergido en una mezcla que contenía 40% metanol y 10% ácido acético hasta obtener bandas azules sobre un fondo transparente.

2.5.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GEL

Finalizada la electroforesis, se reveló la actividad de la SOD en los geles, según se describe en Beauchamp y Fridovich (1971). Los geles se incubaron durante 20 minutos en oscuridad con una solución de NBT 2.45 mM (nitroblue tetrazolium) preparada en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8. Después, se realizaron dos lavados de un minuto cada uno con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8. Posteriormente, los geles se incubaron en una solución de riboflavina 28 μ M y TEMED 28 μ M durante 15 minutos en oscuridad. Por último, se expusieron los geles a la luz en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8 durante 10-15 minutos hasta visualizar bandas acromáticas sobre el fondo púrpura del gel. El color púrpura se debe a la reducción del NBT, mientras que las bandas acromáticas indican la presencia de alguna isoenzima de la SOD. El anión superóxido producido por la oxidación de la riboflavina a

riboflavina oxidada debido a la exposición de la luz, reduce el nitroazul de tetrazolio (NBT) a sales de formazan de color púrpura. En presencia de la SOD, el radical $\cdot\text{O}_2^-$ es eliminado evitando la reducción del NBT (Figura 2.4) (Airaki *et al.*, 2011).

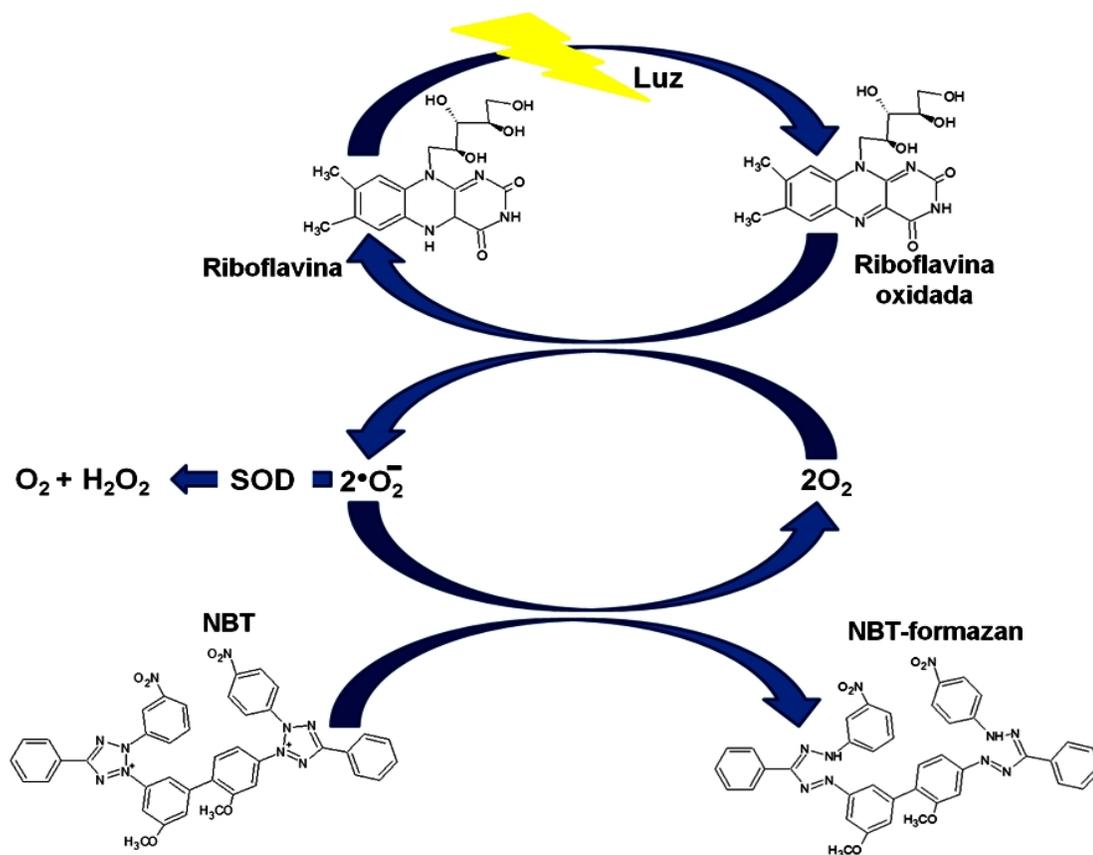


Figura 2.4 Esquema de la reacción química del ensayo de la actividad enzimática de SOD por zimografía. El NBT es reducido por el $\cdot\text{O}_2^-$ producido por la oxidación de la Riboflavina, resultando en la formación de una sal de formazan de color púrpura (Beauchamp y Fridovich, 1971). La no reducción del NBT indica actividad enzimática de la SOD.

Se identificaron las isoenzimas de la SOD presentes en las suspensiones celulares utilizando geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Los geles fueron pre-incubados separadamente a temperatura ambiente durante 30 minutos en presencia o ausencia de KCN 5 mM ó H_2O_2 5 mM preparados en fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8. Después, los geles fueron teñidos para revelar actividad SOD como se describió en el párrafo anterior. La Cu/Zn-SOD es sensible a ambos inhibidores; la Fe-SOD es sensible al H_2O_2 pero es resistente al KCN, mientras que la Mn-SOD es resistente a ambos inhibidores (Cuadro

2.1) (Beauchamp y Fridovich, 1971).

Cuadro 2.1 Inhibidores de las isoenzimas de SOD (Beauchamp y Fridovich, 1971).

Isoenzima	5 mM H ₂ O ₂	5 mM KCN
Cu/Zn-SOD	inhibición	inhibición
Fe-SOD	inhibición	no inhibición
Mn-SOD	no inhibición	no inhibición

2.6 LOCALIZACIÓN *in situ* DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Mediante el uso de la microscopia de epifluorescencia, se detectó la producción intracelular *in situ* de H₂O₂ en las células de *C. arabica* L. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss Axioplan III (Carl Zeiss Microimaging Inc, Thornwood, NY, USA). Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital AxioCam MRm acoplada al instrumento y procesadas con el software AXIOVISION SE64.

La producción interna del H₂O₂ se detectó utilizando el fluorocromo 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato diacetoximetil éster (H₂DCFDA AM, Invitrogen). Este compuesto puede atravesar la membrana plasmática y, una vez dentro de la célula, es hidrolizado por las esterasas citosólicas para dar lugar al carboxi-DCFH, el cual se queda en el interior de la célula debido a su fuerte carga negativa. En presencia de H₂O₂, el carboxi-DCFH, que es poco fluorescente, se convierte en su forma triazólica, que es fotoestable y fluorescente (Breeuwer *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995). De este modo, la fluorescencia emitida resulta directamente proporcional a la acumulación del H₂O₂ (Figura 2.5) (Airaki, 2012).

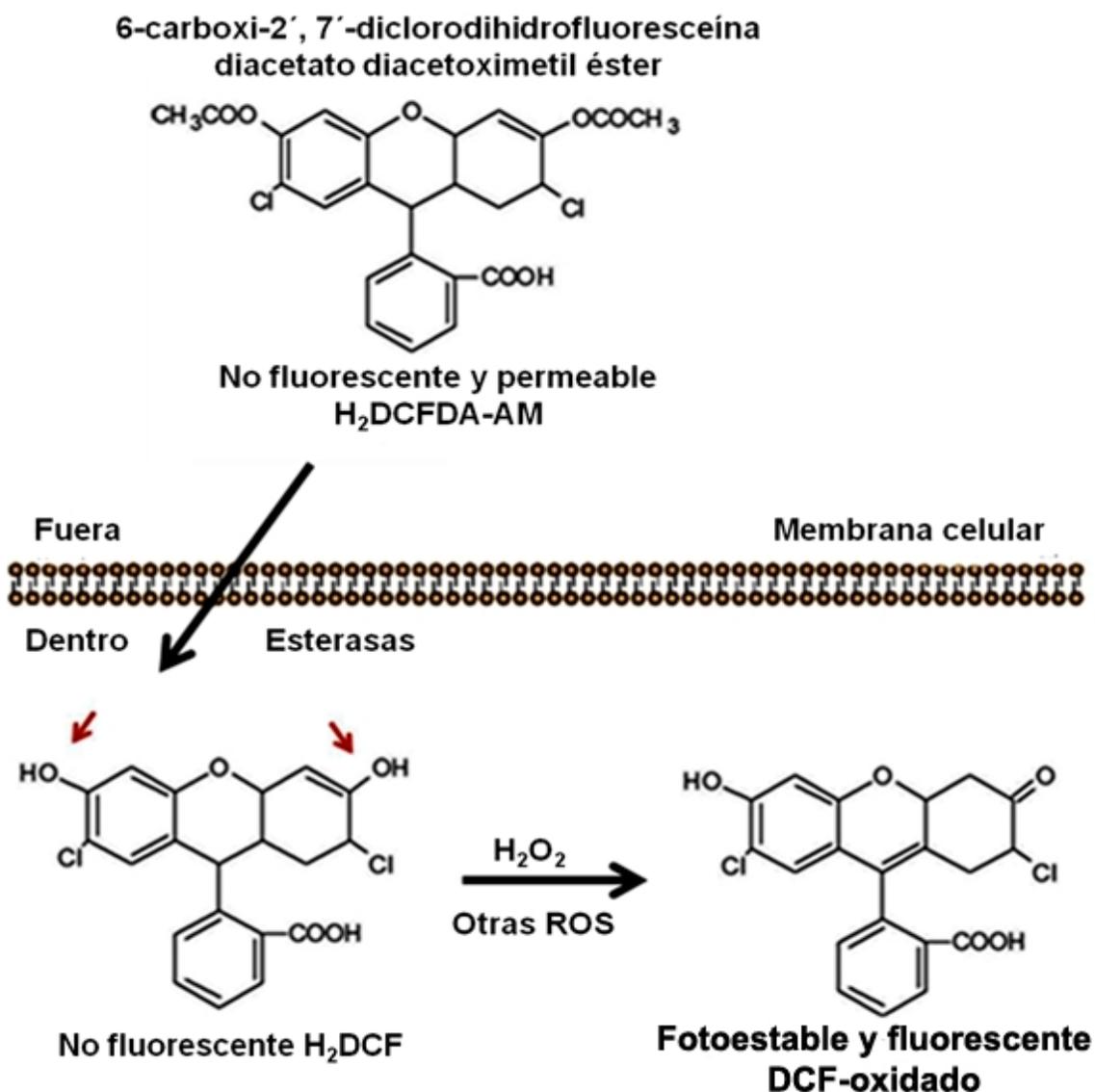


Figura 2.5 Esquema de la formación de derivados triazólicos a partir de carboxi-H₂DCFDA AM en presencia de H₂O₂. El carboxi-H₂DCFDA-AM se difunde dentro de las células y es desacetilado por esterasas intracelulares, el compuesto formado H₂DCF es estable y altamente oxidable por las ROS, incluyendo el H₂O₂ (Rhee *et al.*, 2010).

La aplicación del fluorocromo H₂DCFDA AM a células de las líneas L2 y LAMt se llevó a cabo en diluciones en una proporción 1:5 en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.0, en células tratadas o no con AlCl₃ 100 μM durante dos diferentes periodos (0.5 y 6 horas). Las muestras fueron colocadas en portaobjetos lavados con una solución fijadora al 10% poli-L-lisina y se sellaron con esmalte. Posteriormente, las

muestras fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia, utilizando una longitud de onda de excitación de 500 nm y una de emisión de 600 nm. Las imágenes se analizaron a través del software Axiovision SE64.

Con el fin de poder localizar el H_2O_2 en los diferentes compartimentos celulares, se utilizaron tres fluorocromos que permiten la visualización de los diferentes organelos: el 4,6-diamidido-2-fenilindol (DAPI), el blanco de calcofluor (CFW), el [N-(3-trietilamonio)propil]-4-(6-(4-dibutilamonio) fenil) hexatrienil)piridino dibromuro] (FM4-64).

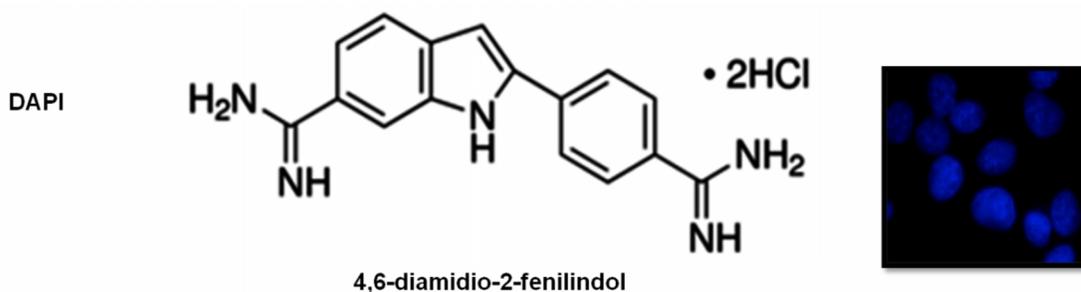


Figura 2.6 Estructura química y visualización del fluorocromo selectivo para núcleo (DAPI) en células vivas.

El DAPI es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia y permite visualizar el ADN en el núcleo de la célula, debido a que se une fuertemente a las regiones ricas en adenina y timina (Figura 2.6). El DAPI se excita con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul / cian y tiene una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de emisión de 405 nm.

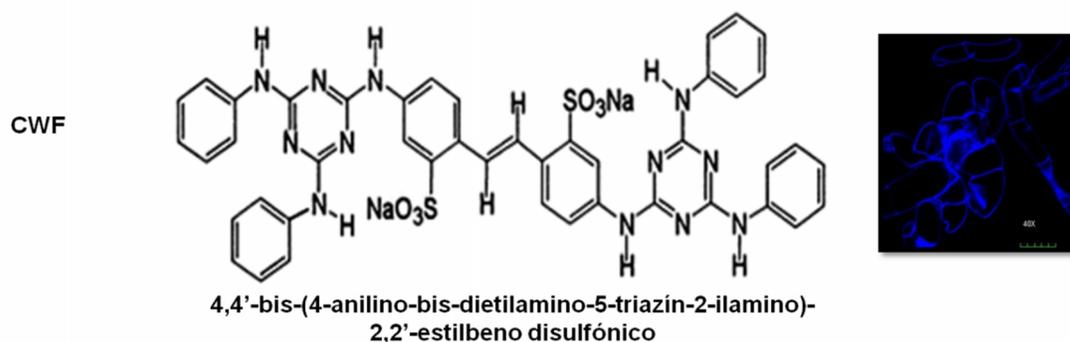


Figura 2.7 Estructura química y visualización del fluorocromo selectivo para pared celular (CFW) en células vivas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Teniendo como base estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, en los que se evaluó el efecto del aluminio sobre la actividad enzimática de la SOD a diferentes tiempos de tratamiento en líneas celulares sensibles y tolerantes a este elemento (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011); en el presente estudio se analizó el efecto del aluminio sobre la actividad enzimática de las isoenzimas de la SOD, así como sobre la acumulación interna del H₂O₂ en las células de las líneas L2 y LAMt. Los resultados se presentan en este capítulo.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD

3.1.2 EFECTO DEL AlCl₃ EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD EVALUADA POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Con el objetivo de poder confirmar si la actividad enzimática de las isoenzimas de SOD se ve afectada por un tratamiento con aluminio, se realizó la cuantificación de la actividad total de la SOD y de sus isoenzimas por el método espectrofotométrico y con el uso de diferentes inhibidores. Para estos experimentos, las suspensiones celulares de siete días de las líneas L2 y LAMt fueron tratadas con AlCl₃ 100 µM durante dos periodos de tiempo (0.5 y 6 horas). Transcurrido el tiempo, se obtuvieron los extractos de proteína total y se realizó la medición de la actividad de SOD, como se describió en la sección 2.4.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad total de la SOD, se muestran en la Figura 3.1, en donde se puede observar que esta actividad aumenta en la línea L2 en un 40% en extractos de proteína total de células de la línea L2 tratadas con aluminio tanto a las 0.5 como a las 6 horas comparadas con los extractos de las células no tratadas (Figura 3.1A). Estos resultados mostraron que el tratamiento con AlCl₃ 100 µM en células de la línea L2 tiene un efecto de incremento sobre la actividad enzimática total de la SOD.

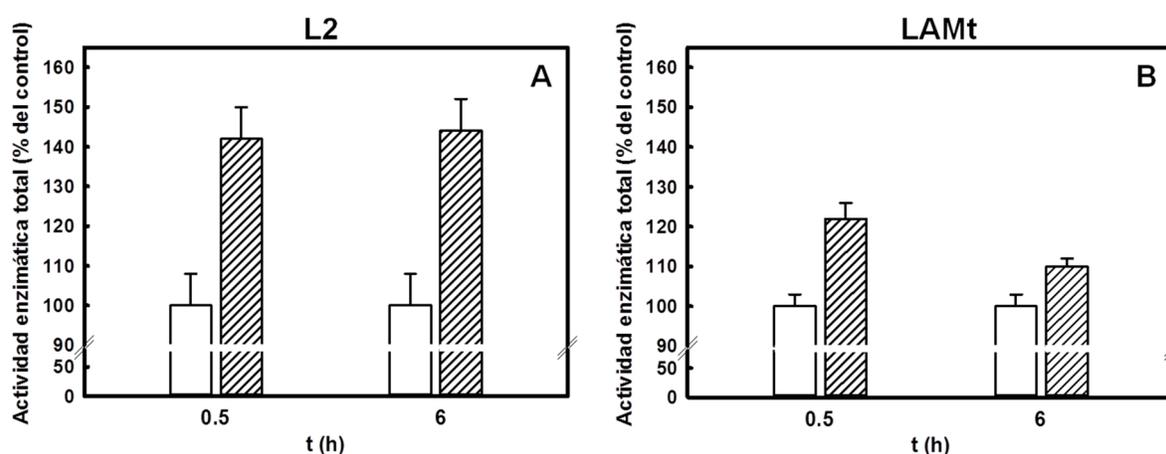


Figura 3.1 Actividad total de SOD en células de las líneas L2 y LAMt de *C. arabica* L. tratadas con AlCl_3 . Las células fueron tratadas (▨) o no (□) con AlCl_3 a $100 \mu\text{M}$ durante 0.5 y 6 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad específica tomando como 100% la actividad determinada en los extractos de células no tratadas con aluminio (testigo), cuya actividad en la línea L2 fue de $2.9 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína y la actividad en la línea LAMt fue de $0.75 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína. Cada valor representa la media de cuatro experimentos independientes con dos réplicas \pm DE.

La actividad enzimática total de SOD en la línea LAMt (Figura 3.1B) al ser tratada con aluminio durante treinta minutos presentó un incremento del 20% comparada con la de células no tratadas. En contraste, el aumento en las células tratadas con aluminio durante seis horas fue sólo del 10% comparado con el testigo (Figura 3.1B). El tratamiento en las suspensiones celulares de la línea LAMt de *C. arabica* L. con AlCl_3 a $100 \mu\text{M}$ estimula la actividad enzimática total de la SOD.

Por otra parte, es importante resaltar que la actividad total de SOD en la línea L2 sin tratar fue de $2.9 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína, dicha actividad fue tres veces mayor al de la línea LAMt ($0.75 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína). Del mismo modo la estimulación de la actividad enzimática total de SOD en células de la línea L2 tratadas con aluminio, se mantuvo en el mismo nivel en ambos tiempos (0.5 y 6 horas). Sin embargo, la actividad total de SOD en la línea LAMt presentó una disminución a las seis horas.

Se determinó la actividad enzimática de cada una de las isoenzimas de SOD, con el

objetivo de conocer cuánto están contribuyendo a la actividad total de SOD. Como se mencionó en la Sección 2.4, se usó el SDS para inhibir a la isoenzima Mn-SOD y por lo tanto al usar este inhibidor y determinar la actividad total, se está midiendo la actividad de Cu/Zn-SOD y Fe-SOD.

Como se puede observar en la Figura 3.2A, en células tratadas con aluminio de la línea L2, el nivel de la actividad de Cu/Zn-SOD y Fe-SOD no presenta cambios y esto se observa tanto a las 0.5 como a las 6 horas comparadas con sus respectivos testigos (células no tratadas con aluminio). La actividad de Cu/Zn-SOD y Fe-SOD no se ve afectada por el tratamiento con AlCl_3 a $100\mu\text{M}$ durante 0.5 y 6 horas.

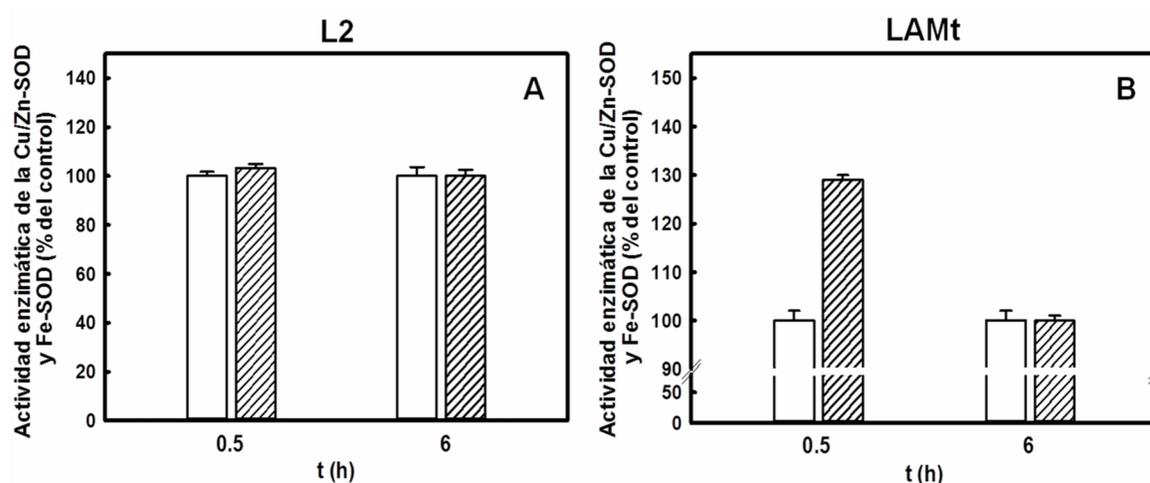


Figura 3.2 Actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD en células de las líneas L2 y LAMt de *C. arabica* L tratadas con AlCl_3 . Las células fueron tratadas (▨) o no (□) con $100\mu\text{M}$ de AlCl_3 durante 0.5 y 6 horas. Los resultados son expresados como porcentaje de la actividad específica tomando como 100% la actividad determinada en los extractos de células no tratadas con aluminio (testigo), cuya actividad en la línea L2 fue de $0.6\mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína y en la línea LAMt fue de $0.13\mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína. Cada valor representa la media de cuatro experimentos independientes con dos réplicas \pm DE.

La actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD (Figura 3.2B) mostró un incremento del 29%, en extractos de células de la línea LAMt tratadas con aluminio durante 0.5 horas comparadas con la de células no tratadas (testigo). Sin embargo, el incremento en la

actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD no se mantuvo, puesto que a las 6 horas presentaron niveles de actividad similares a las obtenidas en extractos de células no tratadas con aluminio (testigo). Por lo tanto, el tratamiento con aluminio a las células de la línea LAMt de *C. arabica* L. afecta la actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD estimulándola a tiempos cortos de exposición.

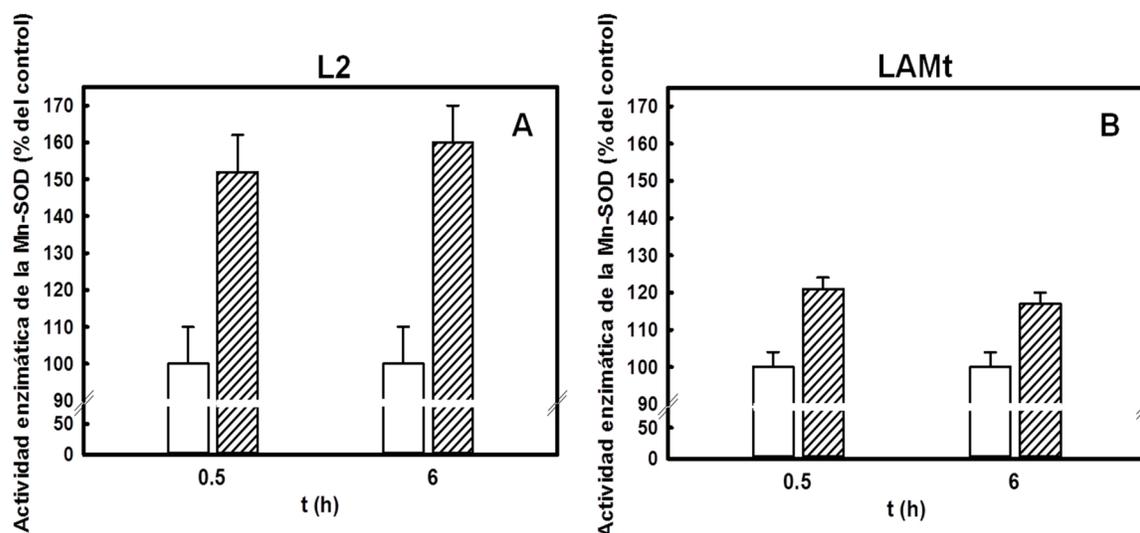


Figura 3.3 Actividad de la isoenzima Mn-SOD en células de las líneas L2 y LAMt de *C. arabica* L tratadas con AlCl_3 . Las células fueron tratadas (▨) o no (□) con $100 \mu\text{M}$ de AlCl_3 durante 0.5 y 6 horas. Los resultados son expresados como porcentaje de la actividad específica tomando como 100% la actividad determinada en los extractos de células no tratadas con aluminio (testigo), cuya actividad en la línea L2 fue de $2.3 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína. y en la línea LAMt fue de $0.62 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína. Cada valor representa la media de cuatro experimentos independientes con dos réplicas \pm DE.

La actividad correspondiente a la isoenzima Mn-SOD fue determinada por la diferencia de los niveles de actividad total de SOD y aquella determinada después de pre-incubar con SDS (Cu/Zn-SOD y Fe-SOD). La actividad de la isoenzima Mn-SOD en las células de la línea L2 tratadas con AlCl_3 durante treinta minutos presentó un aumento del 50% comparada con el testigo (Figura 3.3A). Este aumento en la actividad de la isoenzima Mn-SOD, también se observó en células tratadas con AlCl_3 durante seis horas, siendo el incremento un 10% mayor que a las 0.5 horas (Figura 3.3A).

La Figura 3.3B, muestra que la actividad de la isoenzima Mn-SOD en las células de la línea LAMt tratadas con 100 μM AlCl_3 durante treinta minutos, aumentó un 20% comparada con el testigo. Este incremento en la actividad también se mantuvo a las 6 horas de tratamiento con AlCl_3 (Figura 3.3B).

Las células de las líneas L2 y LAMt responden al ser tratadas con 100 μM AlCl_3 , incrementando la actividad de la isoenzima Mn-SOD. Este aumento en la actividad fue más evidente en la línea L2 que en la línea LAMt (Figura 3.3).

3.1.3 MÉTODO POR ZIMOGRAFÍA

Una vez que se cuantificó la actividad total de SOD y sus isoenzimas, el siguiente paso fue determinar cuántas de estas isoenzimas están presentes en las células de las líneas L2 y LAMt. Por lo cual fue necesario establecer las condiciones para obtener una adecuada separación de las proteínas mediante electroforesis bajo condiciones nativas, paso indispensable para la determinación de la actividad enzimática por zimografía. Para esto, se usaron geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones (7, 8, 9 y 10%) para su separación. Estos ensayos permitieron determinar que en la concentración del 10% de poliacrilamida permitía una adecuada separación de las proteínas. Después de establecer las condiciones de separación de las proteínas, se realizó el análisis del patrón isoenzimático de SOD en extractos crudos de las líneas L2 y LAMt de siete días de cultivo.

En primera instancia, se determinó la concentración óptima de proteína para visualizar la actividad enzimática de la SOD, por lo cual se realizaron ensayos en donde las células de la línea L2 fueron puestas en un medio MS de cultivo fresco (sin tratamiento con aluminio) (ver Sección 2.2.3).

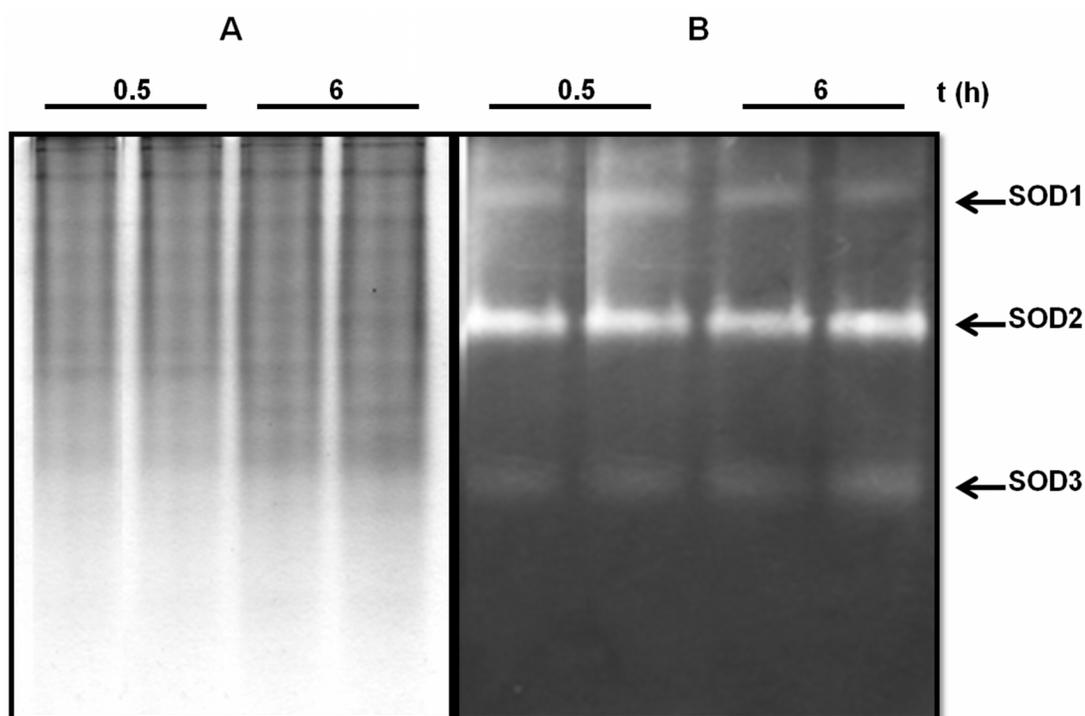
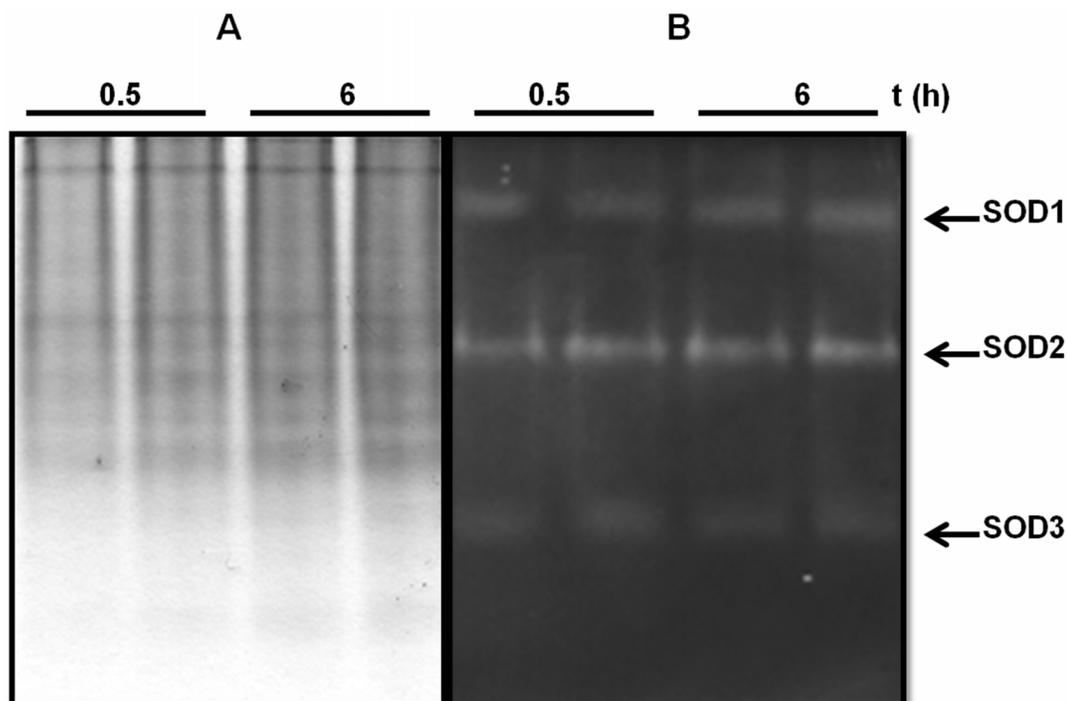


Figura 3.4. Zimografía de SOD en células de *C. arabica* de la línea L2. Se utilizaron 40 μg de proteína para ser separados en geles de poliacrilamida al 10%. Finalizada la electroforesis se determinó la actividad enzimática de las isoenzimas. A, perfil proteico en condiciones nativas teñido con azul de Coomassie. B, perfil isoenzimático de SOD. En la imagen se indican con flechas negras las bandas acromáticas formadas por la actividad de las isoenzimas de SOD. t(h): tiempo en horas. Imagen representativa de cinco repeticiones independientes.

Los resultados obtenidos utilizando concentraciones crecientes de proteína total provenientes de la línea L2 indicaron que 40 μg de proteína fue adecuada para la visualización de la actividad enzimática de SOD. Bajo estas condiciones se realizó tanto el análisis del perfil proteico como del isoenzimático de la línea L2 (Figura 3.4).

En la Figura 3.4A, se muestra el perfil de proteínas de la línea L2, en donde se destaca una abundancia de bandas, cuyas movilidades electroforéticas están entre 0.048 y 0.51. Es importante señalar que no se observaron cambios en el perfil proteico tanto a las 0.5 como a las 6 horas de haber puesto a las células en medio de cultivo fresco (pH 4.3). En la línea L2 se encontraron tres bandas con actividad enzimática de SOD (Figura 3.4B), denominadas de acuerdo a su migración electroforética como SOD1, SOD2 y SOD3. La

banda denominada SOD1 tiene una movilidad electroforética aproximada de 0.16, la segunda banda SOD2 de 0.38 y por último la banda SOD3 tiene una movilidad electroforética de 0.69. La banda denominada SOD2 es la que presentó mayor intensidad, indicando mayor actividad que la SOD1 y SOD3 bajo condiciones basales.



Se determinó entonces el perfil proteico e isoenzimático de las células de la línea LAMt y el resultado se muestra en la figura 3.5. En la Figura 3.5A, se observa una gran cantidad de bandas, la mayoría tiene una movilidad electroforética entre 0.06 y 0.55. Tampoco se observaron cambios en el perfil proteico al cambiar las células a medio fresco (pH 4.3), durante 0.5 y 6 horas.

En la línea LAMt (Figura 3.5B), se observaron tres bandas acromáticas con actividad de SOD. Estas bandas fueron denominadas de acuerdo a su migración electroforética como SOD1, SOD2 y SOD3. Estas bandas presentaron movilidades electroforéticas muy similares a las obtenidas en la línea L2. La SOD1 fue de 0.13, la SOD2 fue de 0.34 y por último la SOD3 fue de 0.65. También se observó que la banda denominada SOD2 presentó mayor intensidad, indicando mayor actividad que las otras dos bandas, bajo condiciones basales

3.1.4 EFECTO DEL AlCl_3 EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD EVALUADA POR ZIMOGRAFÍA

Una vez establecidas las condiciones para la determinación de la actividad enzimática de la SOD por zimografía, el siguiente paso fue determinar si la actividad de las isoenzimas de la SOD era afectada al ser tratadas las células con AlCl_3 .

Las suspensiones celulares de las líneas L2 y LAMt fueron tratadas con o sin 100 μM de AlCl_3 durante 0.5 y 6 horas. Los extractos de proteína total fueron separados en geles de 10% de poliacrilamida en condiciones nativas, un gel fue teñido con azul de Coomasie, mientras que el otro fue usado para determinar la actividad enzimática de la SOD por zimografía.

En la Figura 3.6A, se puede apreciar que no hay cambios detectables en el perfil de proteínas en extractos de células de las líneas L2 y LAMt, sin tratamiento con AlCl_3 . Sin embargo, al comparar los perfiles de células que fueron tratadas con AlCl_3 , se observan cambios importantes siendo el más destacado, el incremento en la intensidad de la banda de una proteína, cuya movilidad electroforética es de 0.2.

En la Figura 3.6B, se muestra la actividad de SOD por zimografía y como ya se mencionó, se detectaron tres bandas acromáticas (SOD1, SOD2, SOD3). En los extractos de células que no fueron tratadas con aluminio, tanto en la línea L2 como en la LAMt, las bandas presentaron una menor intensidad comparadas con las bandas de las células que si fueron tratadas con AlCl_3 .

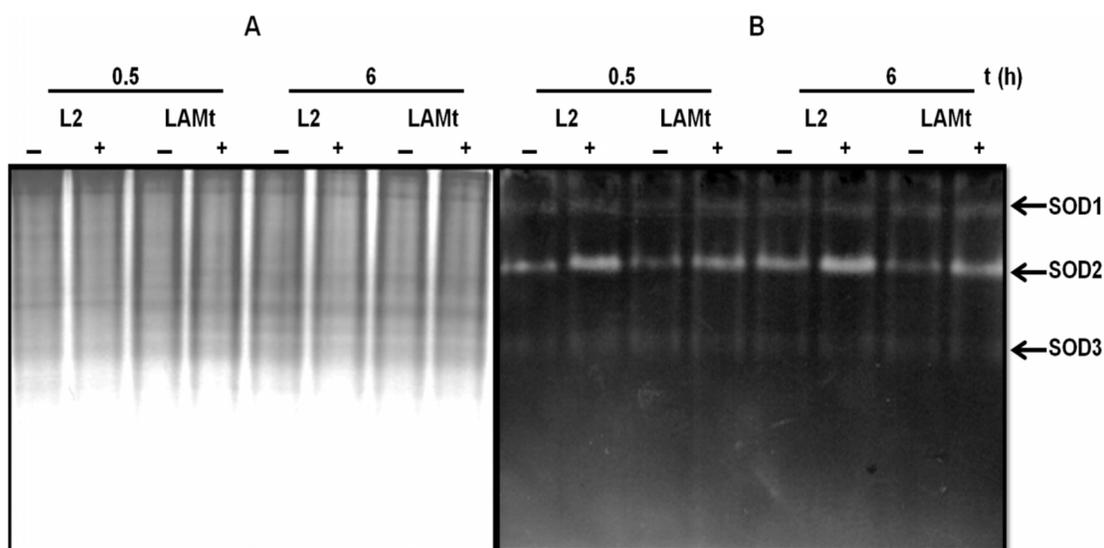


Figura 3.6 Efecto del tratamiento con AlCl₃ sobre la actividad enzimática de SOD en células de las Líneas L2 y LAMt. Las células fueron tratadas (+) o no (-) con 100 μ M de AlCl₃ durante 0.5 y 6 horas. A, perfil de proteínas teñido con azul de Coomassie; B, perfil isoenzimático de SOD. En la imagen se indican con flechas las bandas acromáticas formadas por la actividad de las isoenzimas de la SOD. t (h): tiempo en horas. Imagen representativa de cinco repeticiones independientes.

El tratamiento con aluminio tuvo un efecto sobre la actividad de las isoenzimas de SOD en las líneas L2 y LAMt, ya que se observó una mayor intensidad de las bandas, en extractos de células tratadas con 100 μ M de AlCl₃ tanto a las 0.5 como a las 6 horas, comparadas con el testigo (Figura 3.6B). Cabe resaltar que de las tres bandas detectadas (SOD1, SOD2, SOD3), la banda señalada como SOD2 que se encontró en ambas líneas de suspensiones celulares, presentó una mayor intensidad (mayor actividad) en respuesta al tratamiento con AlCl₃.

3.1.5 IDENTIFICACIÓN DE LAS ISOENZIMAS DE SOD POR ZIMOGRAFÍA

Para identificar a las isoenzimas de la SOD presentes en las suspensiones celulares de las líneas L2 y LAMt, se emplearon diferentes inhibidores de las mismas: el cianuro de potasio (KCN) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El H₂O₂ a concentraciones altas (en el orden milimolar) reduce rápidamente al cobre o al hierro que se encuentra en el sitio activo de la enzima, generando oxidantes fuertes (CuO, Cu₂OH, FeO), los cuales pueden oxidar

a la proteína en los residuos de histidina y así inactivar a la Cu/Zn-SOD o Fe-SOD. El KCN se une a los hidrógenos de los residuos de histidina presentes en el sitio activo de la isoenzima Cu/Zn-SOD, así como también interacciona hidrofóbicamente con los residuos de prolina, dando lugar a la inhibición de la Cu/Zn-SOD.

Una vez que se realizaron los tratamientos con aluminio en células de la línea L2 de *C. arabica* L., se separaron las proteínas en 4 geles de poliacrilamida. Un gel fue teñido con azul de Coomassie (Figura 3.7A), otro fue incubado en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.4 (Figura 3.7B), mientras que otros dos fueron incubados con KCN 5 mM y H₂O₂ 5 mM (Figura 3.7C y 3.7D) durante treinta minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se reveló la actividad enzimática de SOD como se describió en la sección 2.5.2.

En la Figura 3.7A, se observa el perfil de proteínas totales teñidas con azul de Coomassie, sin diferencias entre la presencia o ausencia del tratamiento con AlCl₃ a 0.5 y 6 horas. Así mismo, en la figura 3.7B, se observó el perfil isoenzimático de SOD, en donde los extractos de células tratadas con AlCl₃ durante 0.5 y 6 horas, presentan mayor intensidad en las bandas acromáticas indicando mayor actividad, comparado con el testigo, sugiriendo que tal comportamiento isoenzimático fue un efecto provocado por el tratamiento de las células con AlCl₃ ya que estos resultados se han observado en las determinaciones espectrofotométricas y a lo largo de las repeticiones realizadas (Figura 3.7B).

En la Figura 3.7B, la primera banda (en orden de migración electroforética) la cual fue denominada SOD1, es sensible tanto a la inhibición por KCN como por el H₂O₂, ya que no está presente en la figura 3.7C y 3.7D, lo que nos sugiere que se trata de una isoenzima SOD dependiente de Cu y Zn. La segunda banda denominada SOD2, es la más intensa y probablemente una isoenzima SOD dependiente de manganeso, debido a su insensibilidad a ambos inhibidores empleados (Figura 3.7C y 3.7D). La tercera banda denominada SOD3 y la más tenue, es probablemente una SOD dependiente de hierro por su inhibición en presencia de H₂O₂ (Figura 3.7C) e insensibilidad a la inhibición con KCN (Figura 3.7D).

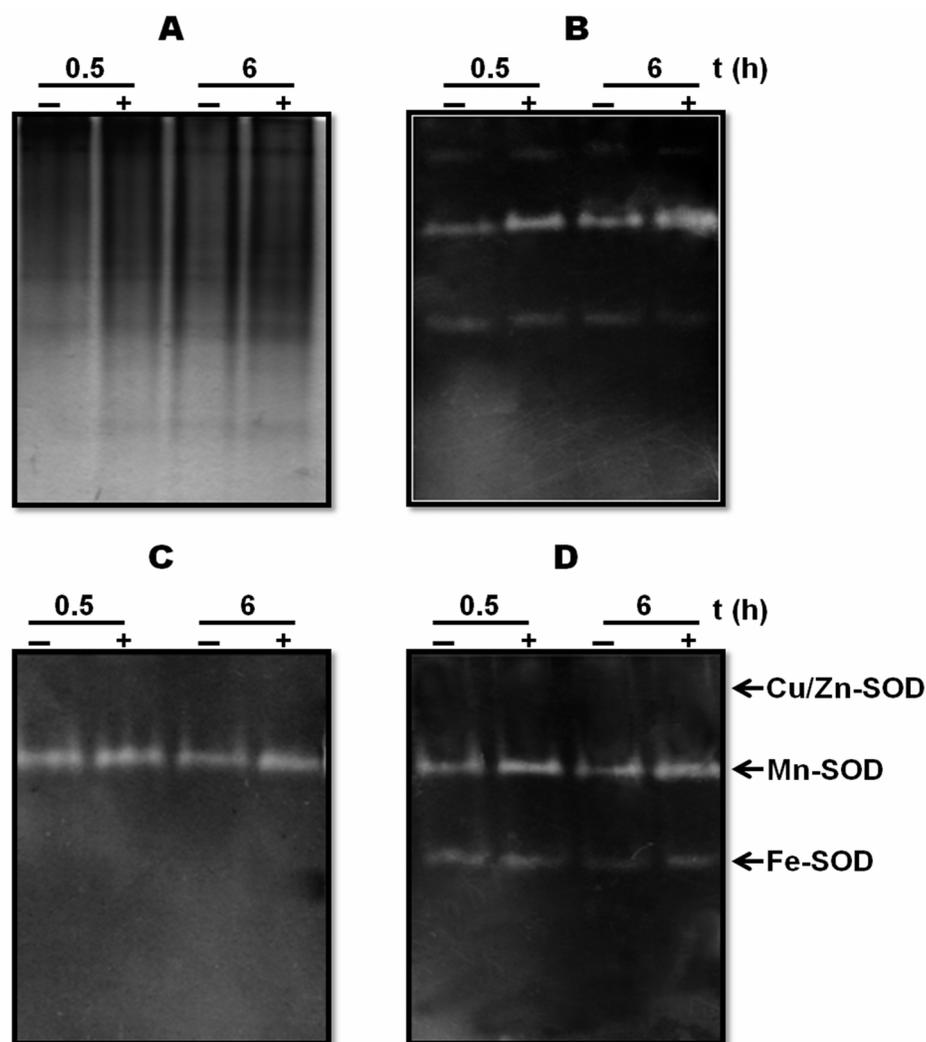


Figura 3.7 Identificación de las isoenzimas de SOD por zimografía mediante el uso de inhibidores en la línea L2. Las células de la línea L2 fueron tratadas (+) o no (-) con 100 μ M de AlCl_3 durante 0.5 y 6 horas. A, perfil de proteínas teñido con azul de Coomassie; B, perfil isoenzimático de SOD; C, gel incubado con 5 mM H_2O_2 y D, gel incubado con 5 mM KCN ambos durante 30 minutos. Los gels en C y D fueron teñidos para revelar la actividad de las isoenzimas de SOD como se describió en la Sección 2.5.2. En la imagen se indican con flechas las bandas acromáticas formadas por la actividad de las isoenzimas de la SOD. t (h): tiempo en horas. Imagen representativa de cinco repeticiones independientes.

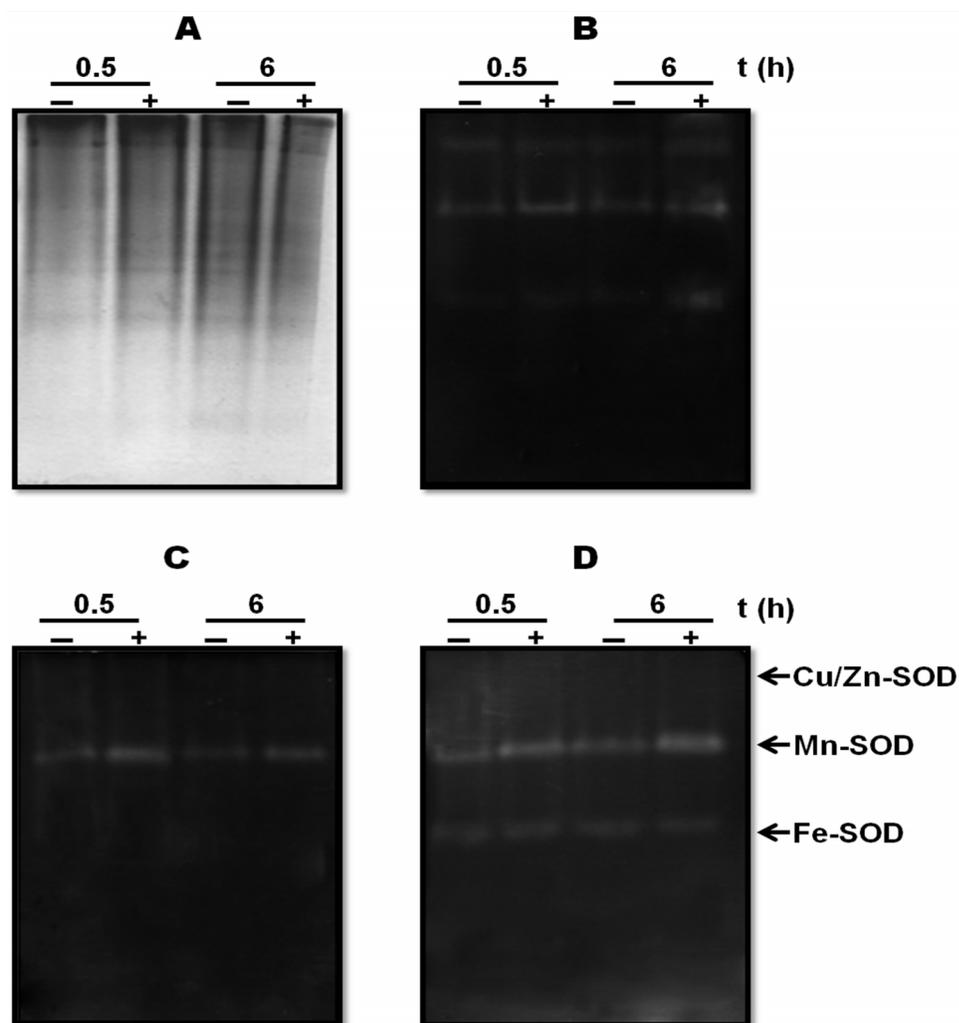


Figura 3.8 Identificación de las isoenzimas de SOD por zimografía mediante el uso de inhibidores en la línea LAMt. Las células de la línea LAMt fueron tratadas (+) o no (-) con 100 μM de AlCl_3 durante 0.5 y 6 horas. A, perfil de proteínas teñido con azul de Coomassie; B, perfil isoenzimático de SOD; C, gel incubado con 5 mM H_2O_2 y D, gel incubado con 5 mM KCN ambos durante 30 minutos. Los geles en C y D fueron teñidos para revelar la actividad de las isoenzimas de SOD como se describió en la Sección 2.5.2. En la imagen se indican con flechas las bandas acromáticas formadas por la actividad de las isoenzimas de la SOD. t (h): tiempo en horas. Imagen representativa de cinco repeticiones independientes.

En la Figura 3.8A, se observó que el perfil proteico es muy similar al observado en la línea L2. Del mismo modo, ocurrió con los perfiles isoenzimáticos, donde se presentaron tres bandas con actividad SOD que corresponden en distribución y movilidad electroforética a las encontradas en la línea L2.

Cabe mencionar que al principio las bandas acromáticas fueron denominadas SOD1, SOD2 y SOD3 de acuerdo a su migración electroforética, sin embargo una vez utilizado los inhibidores se sugiere que SOD1 es una Cu/Zn-SOD, SOD2 una Mn-SOD y la SOD3 una Fe-SOD.

La actividad de SOD determinada tanto por zimografía como por espectrofotometría en células tratadas o no con AlCl_3 de la línea LAMt, fue menor que en la determinada en células de la línea L2 (tratadas o no con AlCl_3). Por otra parte la actividad de Mn-SOD tanto en la línea L2 como en la LAMt, es la que presenta mayor actividad, esto fue observado tanto en la determinación por zimografía como por espectrofotometría.

3.2 LOCALIZACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DEL H_2O_2 INTRACELULAR

La visualización de la acumulación del H_2O_2 *in vivo* se realizó en células de las líneas L2 y LAMt de 7 días de cultivo tratadas o no con AlCl_3 durante dos diferentes tiempos, mediante el uso de fluorocromos específicos (Carboxi-DCFDA-AM, CFW, DAPI, FM4-64) y por observación en microscopio de epifluorescencia (Axioplan III, Germany).

En este trabajo, se establecieron las condiciones adecuadas para la observación de la acumulación del H_2O_2 . La dilución adecuada para la realización de los ensayos fue 1:5 (relación células: volumen), ya que permitió observar células aisladas y definidas. También se establecieron las concentraciones y tiempos de incubación de los diferentes fluorocromos utilizados para la observación de la distribución del H_2O_2 en la célula.

En la Figura 3.9, se muestran las micrografías de las células de las líneas L2 y LAMt tratadas o no con AlCl_3 100 μM durante 0.5 horas. Se observa la morfología celular en campo claro de las líneas L2 y LAMt. Estas células son cilíndricas alargadas y se desarrollan en forma agrupada (Figura 3.9A). En las células de la línea L2 tratadas con aluminio no se aprecian cambios estructurales en el citoplasma con respecto al control. En cuanto a las células tratadas de la línea LAMt, se observó un citoplasma

aparentemente fragmentado y múltiples vacuolas (Figura 3.9A).

Para detectar la presencia de H_2O_2 intracelular en las células de las líneas L2 y LAMt se utilizó el carboxi-DCFDA-AM. Las células de la línea L2 tratadas con aluminio, presentaron una señal muy intensa cerca de la membrana plasmática (Figura 3.9B, lado izquierdo), indicando una mayor acumulación de H_2O_2 comparadas con las células no tratadas con aluminio (testigo). Cabe resaltar que también se detectó una señal difusa en células tratadas indicando la acumulación del H_2O_2 dentro de un compartimento celular que en las células testigo no se apreció (Figura 3.9C, lado izquierdo). De esta forma, se observó que el tratamiento con aluminio en células de la línea L2 produce un efecto incrementando los niveles de producción intracelular del H_2O_2 .

La señal detectada (Figura 3.9D) indica que la acumulación de H_2O_2 en células de la línea LAMt tratadas con aluminio es muy similar a la detectada en las células control (testigo). Sin embargo, la señal se concentra en un sitio específico dentro de la célula, probablemente alrededor de la membrana plasmática (Figura 3.9C). Este patrón de comportamiento se observó en todas las células presentes en el campo de observación. Estos resultados mostraron que el tratamiento con $100 \mu M AlCl_3$ en la línea LAMt, no produce un efecto sobre la producción intracelular del H_2O_2 .

Se utilizó el FM4-64, el cual permite observar las membranas de los compartimentos en toda la vía endocítica (membrana plasmática, membrana vacuolar, membrana endosomal) dependiendo del tiempo de exposición. Sin embargo, en este trabajo se observó la membrana plasmática de las células de las líneas L2 y LAMt. En la Figura 3.9C se observa la señal en la membrana plasmática y se destaca que la membrana se encuentra completa y sin rupturas, tanto en las células tratadas como en las no tratadas con aluminio.

Se utilizó el blanco de calcoflúor (CFW) para identificar la pared celular de las células de las líneas L2 y LAMt. En la Figura 3.9D, se puede observar que las células tratadas y no tratadas con aluminio son alargadas provistas de pared celular y morfológicamente similares.

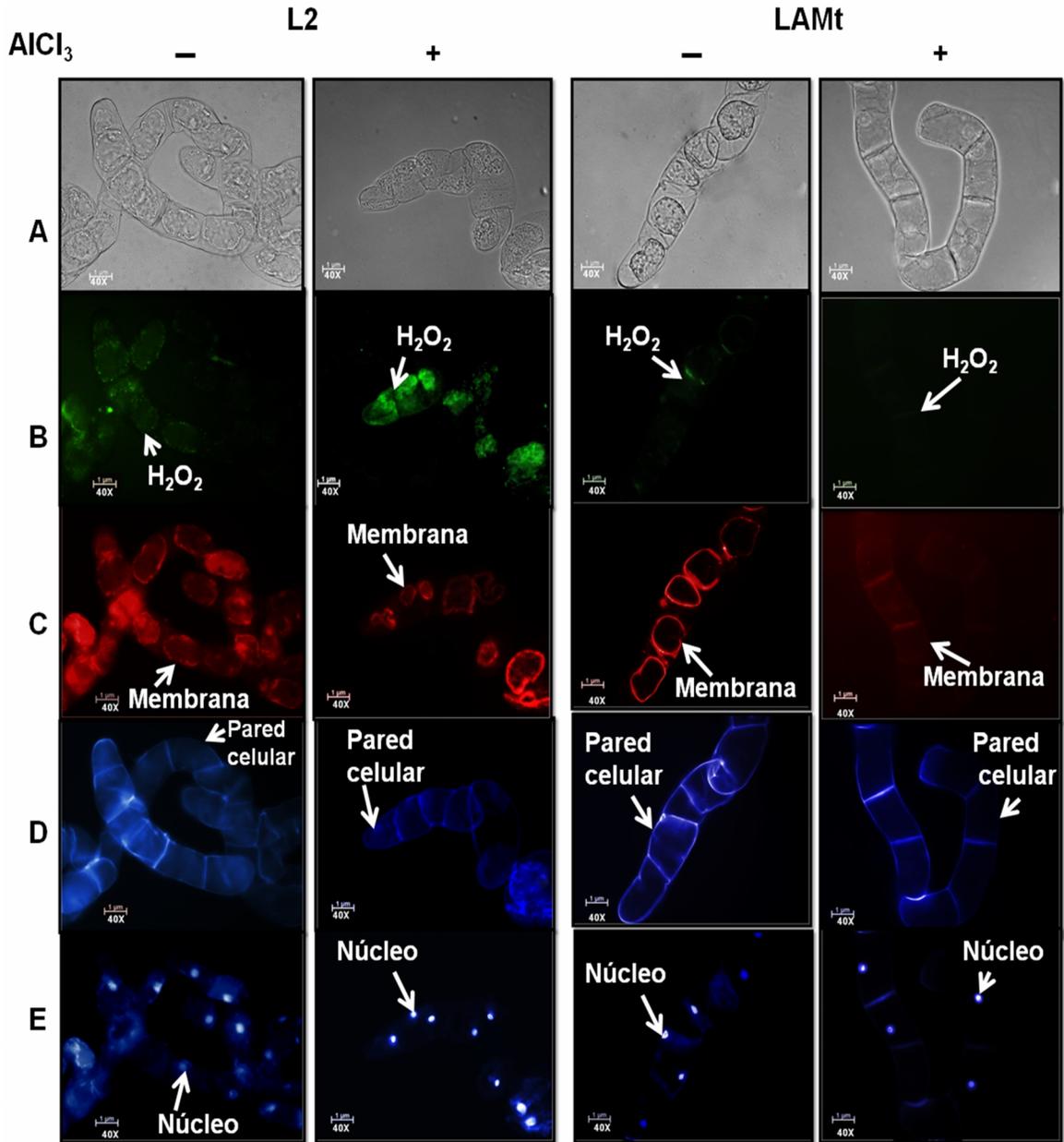


Figura 3.9 Tratamiento con AICl₃ durante 0.5 horas en células de las líneas L2 y LAMt y su efecto en generación y localización de las ROS. Las células fueron tratadas (+) o no (-) con 100 μM AICl₃ durante 0.5 horas. A, morfología de las células en campo visible; B, células incubadas con Carboxi-H₂DCFDA AM específico para detectar H₂O₂ C, células incubadas con FM4-64 para observar membranas, D, células incubadas con CFW para identificar pared celular y E, células incubadas con DAPI para observar morfología nuclear.

En la Figura 3.9E, se visualizaron a los núcleos de las células de las líneas L2 y LAMt mediante tinción con DAPI. Los núcleos de las células tratadas y no tratadas (testigo) se observaron íntegros, sin rupturas o daños.

En la Figura 3.10, se muestran las micrografías de las líneas L2 y LAMt tratadas o no con AlCl_3 100 μM durante seis horas. En 3.10A, se observa la morfología celular en campo claro de las líneas L2 y LAMt. Las células de la línea L2 tratadas con aluminio presentan cambios internos, ya que se observó una disminución en el volumen de las membranas (Figura 3.10C). Por otra parte, la morfología celular visualizada en células de la línea L2 tratadas durante 0.5 horas con AlCl_3 difiere de la observada en células tratadas con dicho metal durante 6 horas, estas últimas tienen el citoplasma comprimido (Figura 3.9A). En cuanto a la línea LAMt, se observó que en las células tratadas con AlCl_3 , se aprecia un citoplasma de estructura única en forma de saco, mientras que en las células que no fueron tratadas, se pudo observar claramente un citoplasma fragmentado y múltiples vacuolas (Figura 3.10 A).

En la Figura 3.10B, las células de la línea L2 tratadas con aluminio presentaron una señal muy intensa indicando una mayor acumulación de H_2O_2 comparadas con las células no tratadas con aluminio (testigo). Cabe señalar que la acumulación de H_2O_2 en las células tratadas fue delimitada y localizada alrededor de la membrana plasmática y en todo el interior de la célula (Figura 3.10B).

Por otra parte, la acumulación de H_2O_2 detectada en células de la línea L2 tratadas con AlCl_3 durante seis horas fue superior a la detectada a las 0.5 horas (Figura 3.9B). Estos resultados indicaron que el aluminio en la línea L2 produce un efecto de incremento en los niveles de producción y en localización intracelular del H_2O_2 .

En la Figura 3.10B (lado derecho), se muestra las micrografías de las células de la línea LAMt tratadas con AlCl_3 durante seis horas, en donde, esta señal fue mayor comparada con el testigo (Figura 3.10B). Es importante resaltar que esta señal fue delimitada alrededor y dentro de la membrana plasmática de las células (Figura 3.10B y C). Por otro lado la localización de la acumulación del H_2O_2 en células tratadas con AlCl_3 durante seis horas difiere de la detectada en células tratadas con dicho metal durante 0.5 horas, en ésta última se observó cerca de la membrana plasmática (Figura 3.9B).

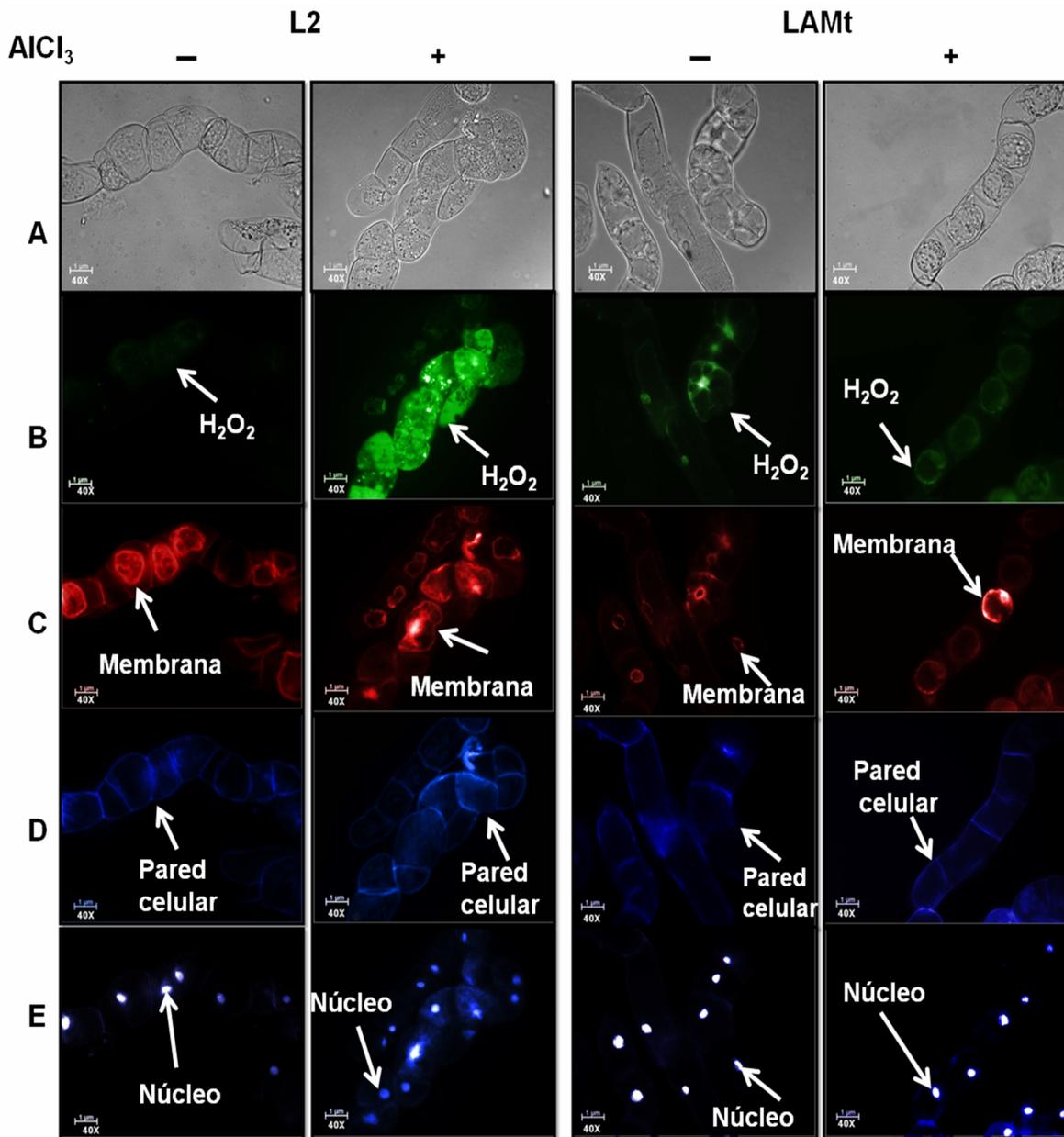


Figura 3.10 Tratamiento con AICl₃ durante 6 horas en células de las líneas L2 y LAMt y su efecto en generación y localización de las ROS. Las células fueron tratadas (+) o no (-) con 100 μ M AICl₃ durante 0.5 horas. A, morfología de las células en campo visible; B, células incubadas con Carboxi-H₂DCFDA AM específico para detectar H₂O₂ C, células incubadas con FM4-64 para observar membranas, D, células incubadas con CFW para identificar pared celular y E, células incubadas con DAPI para observar morfología nuclear.

Estos resultados indicaron que el tratamiento durante 6 horas con 100 μM de AlCl_3 en las suspensiones celulares de la línea LAMt incrementó a largo plazo la producción intracelular del H_2O_2 .

Como se mencionó anteriormente, el FM4-64 permite observar las membranas de los compartimentos en toda la vía endocítica. En la Figura 3.10C, en las células de la línea LAMt no presenta cambios visibles en la membrana plasmática tanto en las células tratadas como en las no tratadas con aluminio durante 6 horas, esta misma morfología se observó en células de la línea LAMt tratadas durante 0.5 horas (Figura 3.9C). Cabe resaltar que la membrana plasmática se aprecia una disminución en su volumen en células tratadas durante 6 horas con aluminio de la línea L2, que las células tratadas durante 0.5 horas no presentaron (Figura 3.10C y Figura 3.9C).

Como se observó en la Figura 3.9D, las células de las líneas L2 y LAMt, están provistas de pared celular y está se encuentra sin daños visibles tanto en células tratadas como en las no tratadas con aluminio durante 6 horas (Figura 3.10D).

La figura 3.10E, muestra los núcleos de las células de las líneas L2 y LAMt, estos se observaron sin cambios en los núcleos de las células tratadas y no tratadas (testigo), tampoco se visualizaron rupturas o daños en el núcleo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran, que la estrategia experimental permitió cumplir con los objetivos planteados. Esta metodología es específica y sensible para la determinación de las actividades enzimáticas de SOD así como la detección del H_2O_2 intracelular.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN

El aluminio no es un metal de transición; sin embargo, actúa como un pro-oxidante por la formación del radical de superóxido de aluminio semi-reducido, el cual es potencialmente más oxidante que el $\cdot\text{O}_2^-$ y promueve la formación del H_2O_2 y $\cdot\text{O}_2^-$ que contribuyen a un ambiente oxidante en las células de las plantas (Exley, 2004). Existen evidencias en varios modelos de estudio que sugieren que la exposición al aluminio causa estrés oxidativo por el incremento en la producción de las ROS (Matsumoto y Motoda 2012; Giannakoula *et al.*, 2010; Sharma y Dubey 2008; Yamamoto *et al.*, 2002). Por lo tanto, una mejor capacidad antioxidante puede ayudar a las plantas en la tolerancia, a la toxicidad causada por aluminio.

En estudios previos realizados con las líneas L2 y LAMt de suspensiones celulares de *C. arabica* L, se evaluó la actividad total de SOD en células tratadas con AlCl_3 durante diferentes tiempos (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011). Estos ensayos mostraron que la actividad total de SOD en la línea L2 en células tratadas con AlCl_3 durante diferentes tiempos no presentó cambios, comparada con el testigo. Sin embargo, en este trabajo la actividad total en las células de la línea L2 aumentó en un 40% al ser tratadas con AlCl_3 comparada con el testigo (Figura 3.1A) tanto a las 0.5 como a las 6 horas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en las variedades de maíz, tabaco y arroz sensibles al aluminio (Bhoomika *et al.*, 2013; Bottcher *et al.*, 2012; Boscolo *et al.*, 2003; Rama *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2002), los cuales sugieren que la exposición al AlCl_3 induce la formación de radicales $\cdot\text{O}_2^-$ en las variedades sensibles, en cantidades mayores que las SOD no pueden dismutar, lo que podría indicar que dicho metal induce en la célula a la síntesis de las isoenzimas de SOD (Bottcher *et al.*, 2012). Se puede inferir que en las células de la línea L2 cuando son expuestas a AlCl_3 , se induce la formación de las ROS, principalmente de $\cdot\text{O}_2^-$ y de H_2O_2 .

Por lo que respecta a las células de la línea LAMt, se ha reportado (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011), que cuando fueron tratadas con AlCl_3 durante seis horas presentaron, un incremento del 30% en la actividad enzimática de SOD comparada con el testigo. En este

trabajo se reportó que la actividad de SOD en células tratadas con AlCl_3 durante 30 minutos, presentó un incremento del 20%, mientras que a las seis horas sólo fue del 10% (Figura 3.1B). Estos resultados sugieren que el anión superóxido no es la fuente primaria en la acumulación de ROS en respuesta al tratamiento con aluminio, sugiriendo que las células de la línea LAMt, pueden responder más eficientemente a la exposición por aluminio que las células de la línea L2 (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011).

Las células de la línea L2 tratadas con aluminio tuvieron tres veces mayor actividad total que las de la línea LAMt (Figura 3.1). Estos resultados sugieren que en las células de la línea L2, el aluminio induce la producción del radical $\cdot\text{O}_2^-$ y como consecuencia, el incremento en la actividad de la SOD. De manera que en las células de la línea L2, la cantidad de radicales generados exceden la capacidad antioxidante del sistema de defensa, mientras que en la línea LAMt, las ROS fueron eliminados por un mecanismo de defensa de la célula, el cual podría participar en la tolerancia de la línea LAMt al aluminio (Rama *et al.*, 2003).

Las isoenzimas de SOD tienen un papel crucial en las plantas bajo condiciones extremas, confiriéndoles tolerancia por la remoción del $\cdot\text{O}_2^-$. Se sabe que hay tres tipos de isoenzimas presentes en plantas, dependiendo del cofactor metálico unido al sitio activo, la Cu/Zn-SOD, la Mn-SOD y la Fe-SOD. La actividad de estas isoenzimas puede ser diferenciada por su inhibición al aplicar KCN y H_2O_2 . La Cu/Zn-SOD es sensible a ambos inhibidores; la Fe-SOD es sensible al H_2O_2 , mientras que la Mn-SOD es resistente a ambos inhibidores (Fernández-Ocaña *et al.*, 2011).

Para saber si una isoenzima en particular está involucrada en la tolerancia al aluminio en las líneas celulares L2 y LAMt, se analizaron las actividades de las diferentes isoenzimas de la SOD. Las actividades de las Cu/Zn-SOD y Fe-SOD (Figura 3.2) no mostraron cambios en células de ambas líneas celulares tratadas con AlCl_3 . De igual modo, se ha reportado que en otras especies como el maíz, el arroz y el tabaco (Bhoomika *et al.*, 2013; Boscolo *et al.*, 2003; Rama *et al.*, 2003), la actividad de las isoenzimas Cu/Zn-SOD y Fe-SOD, no se modifica en presencia de AlCl_3 , sugiriendo que estas isoenzimas no participan en el mecanismo de tolerancia al aluminio.

Bazzo y colaboradores (2013) analizaron los niveles de expresión de genes relacionados

a estrés con aluminio en la germinación de plántulas de *C. arabica* (Catuaí e Icatu) y encontraron que la variedad Catuaí se presentaba un incremento en los niveles de expresión del gene que codifica la Mn-SOD después de una hora de exposición al aluminio, pero disminuía dramáticamente a las doce horas de exposición a dicho metal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo en donde la actividad de Mn-SOD presentó un incremento mayor al 50%, tanto a los treinta minutos como a las seis horas de tratamiento con aluminio en células de la línea L2 (Figura 3.3A).

El papel de Mn-SOD en la tolerancia a varios estreses abióticos ha sido demostrado usando plantas transgénicas. Plantas de *Brassica napus* transformadas con el gen que codifica a la Mn-SOD de trigo y expuestas a concentraciones elevadas de aluminio (200 mM), mostraron menor inhibición en el crecimiento de la raíz, así como bajos niveles de malondialdeído (MDA, un indicador de peroxidación lipídica) comparadas con plantas silvestres bajo las mismas condiciones (Basu *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, en plantas de arroz transformadas con el gen que codifica a la Mn-SOD de chícharo que fueron expuestas a metil viológeno, presentaron niveles de ROS menores a los obtenidos en las plantas silvestres (Wang *et al.*, 2006). En la línea LAMt, las células tratadas con aluminio presentaron un ligero incremento en la actividad de la isoenzima Mn-SOD; sin embargo, dicha actividad fue cuatro veces menor a la obtenida en la línea L2 (Figura 3.3). Estos resultados se relacionan con trabajos realizados en suspensiones celulares de tabaco en donde las células de la línea sensible tratadas con aluminio, desencadenaron la producción de ROS y disfunción mitocondrial (Yamamoto *et al.*, 2002).

Estudios previos, así como en el presente trabajo, indican un aumento simultáneo de tres procesos activados por el aluminio, como son el aumento en la producción de $\cdot\text{O}_2^-$, el aumento en la actividad de la isoenzima Mn-SOD y la pérdida de la capacidad de crecimiento (Ramírez-Benítez *et al.*, 2011; Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Estos resultados coinciden con Rama y colaboradores (2003), donde la isoenzima Mn-SOD confiere tolerancia contra el aluminio a células de tabaco de la línea ALT301, y que esto posiblemente se deba a los niveles bajos de $\cdot\text{O}_2^-$ en la mitocondria. Sin embargo, la tolerancia al aluminio en las células de la línea LAMt no se debe únicamente al incremento en la actividad de Mn-SOD.

Por otra parte, también se realizaron ensayos para determinar la actividad de las

isoenzimas de la SOD por zimografía en células de las líneas L2 y LAMt de *C. arabica* L., tratadas o no con AlCl_3 100 μM , en donde se observaron tres bandas con actividad SOD correspondientes a las tres isoenzimas de SOD (Figuras 3.4 y 3.5). Estos resultados son similares a los reportados por Daza y colaboradores (1993) para la variedad Caturra (*C. arabica* L.) en hojas provenientes de plantas adultas (cinco años de edad), donde se identificó la presencia de tres bandas con actividad SOD correspondientes a las tres isoenzimas de SOD, la primera banda (por orden de migración electroforética) correspondía a la Mn-SOD la banda más intensa, la banda intermedia identificada como Cu/Zn-SOD y la banda menos visible fue una Fe-SOD. Así mismo, se encontró que las hojas de plántulas jóvenes (año y medio de edad) sólo poseen dos isoenzimas careciendo de la Cu/Zn-SOD (Daza *et al.*, 1993).

Se ha reportado la detección de isoenzimas de la SOD por zimografía, basado en su sensibilidad a inhibidores como el KCN y el H_2O_2 en plántulas de 14 días de *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Konieczny *et al.*, 2014) y en los frutos de *Olea europaea* L. (Huertas-López y del Río, 2014). En ambos trabajos se identificaron a la Mn-SOD, la Fe-SOD y la Cu/Zn-SOD. La identificación de las diferentes isoenzimas de SOD, basados en su sensibilidad a inhibidores como el KCN y el H_2O_2 , fue reportada en 1973 por Yost y Fridovich y además, determinaron el metal presente en las isoenzimas, usando espectroscopia de absorción atómica a partir de muestras de enzimas purificadas.

En las líneas L2 y LAMt de *C. arabica* se identificaron las tres isoenzimas de la SOD, utilizando dichos inhibidores y se encontró que la banda más intensa corresponde a la isoenzima Mn-SOD (Figura 3.7), lo que coincide con lo encontrado en hojas de plantas adultas de la variedad Caturra (*C. arabica* L.) (Daza *et al.*, 1993). Sin embargo, hubo diferencia en el orden de migración electroforética, quizás debido a que el número y tipo de isoenzimas SOD varía dependiendo de la especie, edad del desarrollo y las condiciones ambientales de la planta (Corpas *et al.*, 2006). Hay algunas especies de plantas con una sola isoenzima de SOD; por ejemplo, en plantas de girasol se ha detectado únicamente la Cu/Zn-SOD (Corpas *et al.*, 1998).

Es importante resaltar que la Fe-SOD se encuentra tanto en organismos procariotes como en eucariotes (Fink y Scandalios, 2002; Grene-Alscher *et al.*, 2002). En plantas, la Fe-SOD se consideraba por lo general localizada exclusivamente en los cloroplastos, pero

también ha sido reportada en mitocondrias, peroxisomas y citosol (Kanematsu *et al.*, 2013; Fernandez-Ocaña *et al.*, 2011). En este trabajo se detectó la presencia de la isoenzima Fe-SOD, tanto en células de la línea L2 como de la LAMt. Se ha sugerido que la presencia de Fe-SOD en cultivos tolerantes al aluminio es muy importante desde el punto de vista que, confiere mayor protección contra el estrés oxidativo inducido por el aluminio (Boomika *et al.*, 2013).

En plantas transgénicas de tabaco se ha reportado que la sobreexpresión de la Fe-SOD les confiere más tolerancia al estrés oxidativo causado por aluminio comparado con plantas que sobreexpresan Mn-SOD (Van-Camp *et al.*, 1996). Camejo y colaboradores (2007), reportaron que la sobreexpresión de Fe-SOD en plántulas de *Lycopersicon esculentum*, pudiera ayudar en el desarrollo de la tolerancia al calor.

Cartes y colaboradores (2012), demostraron que la sobreexpresión del gen que codifica para la Fe-SOD fue inducida significativamente durante las primeras cuatro horas de tratamiento con aluminio en raíces de cultivares de centeno sensibles y tolerantes al aluminio. Sin embargo, en el cultivar sensible, la actividad de Fe-SOD declinó a niveles basales a las ocho horas de tratamiento, mientras que en el cultivar tolerante, la actividad de Fe-SOD se mantuvo hasta las doce horas. Se sugiere que el papel de la enzima Fe-SOD es dar protección a las raíces en tiempos cortos contra los efectos tóxicos del aluminio. Sin embargo, en este trabajo no se determinó la actividad enzimática de la Fe-SOD por el método espectrofotométrico pero si se detectó en los experimentos de la zimografía, tanto en la línea L2 como en la LAMt, sugiriendo su participación en el mecanismo de tolerancia al aluminio.

En células vegetales, el $\bullet\text{O}_2^-$ se produce principalmente en la mitocondria en la vía de la respiración y en el cloroplasto en la fotosíntesis (Scandalios, 1993). Dado que las suspensiones celulares usadas en el presente trabajo fueron cultivadas en condiciones de oscuridad y no poseen clorofila, se supone que el principal organelo involucrado como fuente primaria de producción de $\bullet\text{O}_2^-$ podría ser la mitocondria. Yamamoto y Colaboradores (2003), reportaron en cultivos celulares (en condiciones de oscuridad) de tabaco sensibles al aluminio una disfunción mitocondrial al ser tratadas con AlCl_3 , sugiriendo que el aluminio afecta inicialmente a las membranas mitocondriales internas por el impedimento del flujo de electrones. Esta disfunción mitocondrial podría estar

ocurriendo en las células de la línea L2 tratada con AlCl_3 .

Altas concentraciones del H_2O_2 pueden dañar a la célula, pero cuando se encuentra en concentraciones bajas puede ayudar a la planta en la tolerancia en condiciones extremas, ya que el H_2O_2 actúa como molécula señal que puede desencadenar la respuesta de defensa en la planta (Gill y Tujeta, 2010). El H_2O_2 es un regulador clave en varios procesos fisiológicos, como la fotorrespiración, la fotosíntesis, el ciclo celular, la respuesta de defensa y la muerte celular programada.

En este trabajo fueron localizados intracelularmente los sitios de la acumulación del H_2O_2 mediante el uso del fluorocromo específico para ROS (DCF-DA AM) en las dos líneas celulares de *C. arabica*. La señal emitida dentro de las células de la línea L2 tratadas durante treinta minutos con AlCl_3 es mayor comparada con células de la línea LAMt (tratadas) y esto es más evidente a las seis horas de tratamiento (Figuras 3.9 y 3.10). Estas observaciones claramente indican que el tratamiento con AlCl_3 induce la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ en células de la línea L2, lo cual está correlacionado con la pérdida de la capacidad de crecimiento y al incremento en la actividad enzimática de la SOD (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a; Yamamoto *et al.*, 2003).

El aluminio en altas concentraciones inhibe el crecimiento al interferir con los eventos metabólicos celulares normales, también puede afectar la estructura del citoesqueleto, la síntesis de callosa, los mecanismos de traducción de señales e inhibir el crecimiento de la raíz (Kaya *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 1999). Sin embargo, a bajas concentraciones, en algunas especies puede ser benéfico debido a la activación del sistema antioxidante (Ghanati *et al.*, 2005). Existen reportes en donde se ha sugerido la inducción del estrés oxidativo como resultado de la toxicidad por aluminio, debido a que la mayor parte de los genes expresados están relacionados con genes que codifican proteínas del sistema antioxidante (Rezaee *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el aluminio puede ser un elemento benéfico en plantas y células de té mediante el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (Ghanati *et al.*, 2005). En este trabajo se obtuvo que la actividad total SOD, en células de las líneas L2 y LAMt, presentó un aumento al ser tratadas con AlCl_3 100 μM . Estos resultados sugieren un posible mecanismo similar a los reportados (Rezaee *et al.*, 2013; Ghanati *et al.*, 2005) por lo cual el efecto del aluminio pudiera estar mejorando la actividad de las enzimas antioxidantes.

Como se mencionó anteriormente, el efecto del aluminio en la acumulación del H_2O_2 fue menor en las células de la línea LAMt comparado con las células de la línea L2, por lo que es posible que el control del H_2O_2 sea más eficiente en la línea LAMt. En consideración a lo anterior, es posible que en el mecanismo de tolerancia en las células de la línea LAMt, estén involucrados otros compuestos como los fenólicos, los flavonoides, los alcaloides y los terpenos, en la exclusión y/o compartimentalización interna del aluminio ya que se ha reportado, en otras especies como el maíz, el arroz y el tabaco que estos compuestos pueden formar complejos con el aluminio a pH neutro (Bhoomika *et al.*, 2013; Kochian *et al.*, 2004; Boscolo *et al.*, 2003; Rama *et al.*, 2003).

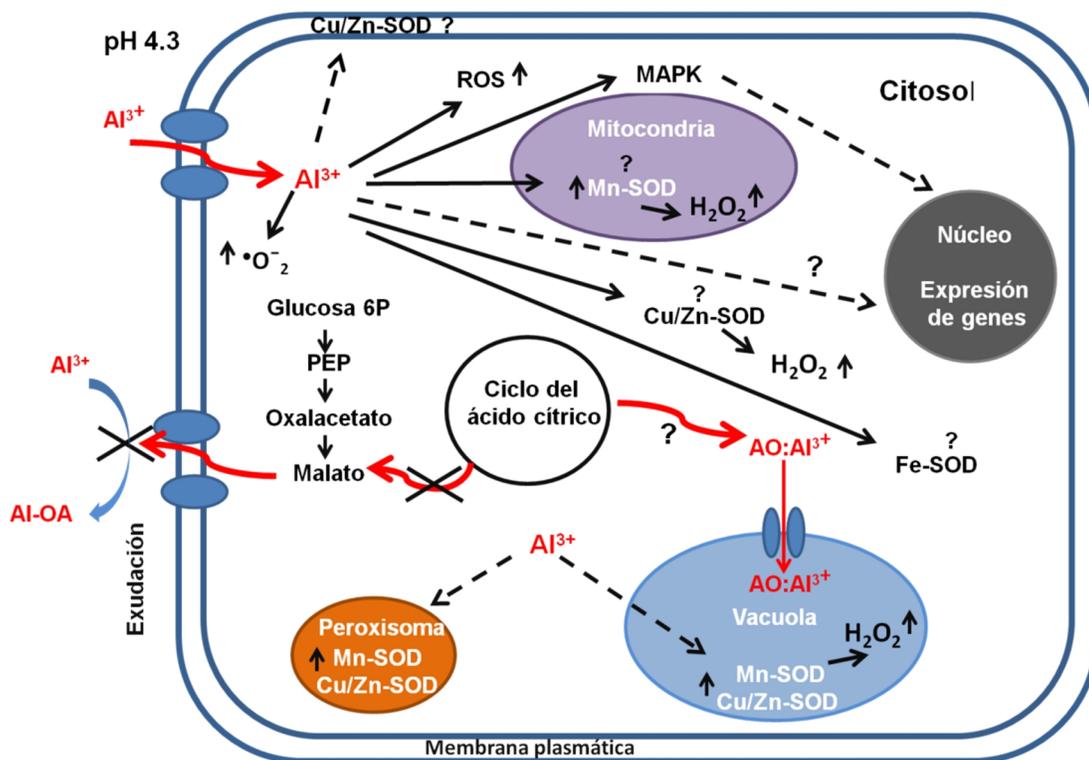


Figura 4.1 Modelo propuesto de la producción y eliminación de las ROS en el mecanismo de tolerancia a Al^{3+} en células de *C. arabica*. El Al^{3+} dentro de la célula puede inducir la sobreproducción de las ROS y en consecuencia, estimular la actividad enzimática de las isoenzimas de SOD y otras enzimas del sistema antioxidante. La acumulación de H_2O_2 pudiera conducir a una cascada de señalización para la tolerancia por toxicidad al Al^{3+} que involucra la señalización de las MAPK. PEP: fosfoenolpiruvato; MAPK: cinasa de proteínas activada por mitógenos.

Los resultados obtenidos se integraron en un modelo (Figura 4.1) donde se muestra que el estallido oxidativo relacionado con la percepción del aluminio induce rutas de transducción de señales para el establecimiento de los mecanismos de tolerancia. En consecuencia, se observa que la acumulación del H_2O_2 disminuye considerablemente, debido al incremento de la actividad de las isoenzimas de SOD y otras enzimas del sistema antioxidante. El aumento en la actividad de las isoenzimas de SOD, estaría generando que los niveles del $\cdot O_2^-$ intracelulares disminuyeran lo cual en consecuencia, generaría cambios en los niveles de H_2O_2 .

Por otro lado, el H_2O_2 podría estar afectando procesos regulados por cinasas como la activación de factores de transcripción para la expresión de genes que codifican enzimas del sistema antioxidante así como la activación de rutas de señalización inducidas por el estrés oxidativo. Por lo tanto, la señalización mediada por el H_2O_2 estaría involucrada en el proceso de estrés causado por el aluminio en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo, utilizando como modelo las suspensiones celulares de *C.arabica* L, se planteó determinar cuál de las isoenzimas de SOD participa en la tolerancia al aluminio y cómo varían los niveles de H_2O_2 bajo estas condiciones. Tomando como base los resultados obtenidos en este trabajo, las principales conclusiones son las siguientes:

- ❖ La actividad enzimática de las isoenzimas de la SOD son parte de un mecanismo de detoxificación interna del Al^{3+} en suspensiones celulares de café tolerantes a este metal.
- ❖ Las células de las líneas L2 y LAMt tienen las tres isoenzimas de la SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD.
- ❖ La Mn-SOD presenta mayor actividad que las otras dos isoenzimas, tanto en la línea L2 como en la LAMt.
- ❖ El tratamiento de las células en las líneas L2 y LAMt con $AlCl_3$ permitió determinar que hubo un incremento en la actividad enzimática de Mn-SOD.
- ❖ El tratamiento con $AlCl_3$ produce un estrés oxidativo en células de la línea L2 y LAMt caracterizado por un incremento en la acumulación de H_2O_2 .

5.2 PERSPECTIVAS

En este trabajo, se determinó que la actividad de SOD y sus isoenzimas son parte de un mecanismo de detoxificación interna al aluminio en suspensiones celulares de la línea LAMt; sin embargo, quedan muchas preguntas importantes por responder. En los siguientes enunciados se describen varios experimentos que a futuro ayudarían a entender el mecanismo de tolerancia al aluminio de la línea celular LAMt.

- ❖ Localizar a las isoenzimas de SOD, para establecer relaciones cuantitativas más exactas entre el sitio de generación de las especies reactivas de oxígeno y la presencia de las enzimas antioxidantes. Para esto, se sugiere utilizar anticuerpos contra las isoenzimas de SOD.
- ❖ Determinar cuantitativamente la acumulación del H₂O₂ intracelular en respuesta al aluminio. Se sugiere medirlo por medio de fluorometría y microscopía confocal, usando fluorocromos que se unan de manera específica.
- ❖ Evaluar si la actividad de otras enzimas del sistema antioxidante como la ascorbato peroxidasa, se encuentran involucradas en la tolerancia al aluminio en las suspensiones celulares.
- ❖ Evaluar el efecto del aluminio en los niveles de ascorbato, glutatión reducido y glutatión oxidado, ya que son elementos importantes del sistema eliminador de las ROS.
- ❖ Estudiar los genes que codifican la SOD en *C. arabica*, así como también a aquellos que codifican a enzimas del sistema antioxidante para entender mejor el funcionamiento del mecanismo de respuesta a la toxicidad por aluminio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Ghany, S.E., J.L. Burkhead, K.A. Gogolin, N. Andres-Colas, J.R. Bodecker, S. Puig, L. Peñarrubia y M. Pilon (2005). AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone CCS1/Lys7. *FEBS Letters*, 579, 2307-2312.
- Abreu, I.A. y D.E. Cabelli (2010). Superoxide dismutases- a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 263-274.
- Acevedo-Sandoval, O.A. (2007). Aluminio, un indicador de calidad en suelos de carga variable. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Hidalgo. México. pp. 20-25.
- Agarwal, S. y R. Shaheen (2007). Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. *Brazil Journal Plant Physiology*, 19, 149-161.
- Airaki, M. (2012). Role of reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS and RNS) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants during development and under low temperature stress. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. España pp. 76-77.
- Airaki, M., M. Leterrier, R. Mateos, Valderrama R, M. Chaki, J. Barroso, J. Palma y F. Corpas (2011). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell and Environment*, 61, 1-15.
- Ali, G., P.S. Srivastava y M. Iqbal (1999). Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monniera* cultures to zinc toxicity. *Plant Science*, 139, 1-7.
- Apel, K. y H. Hirt (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55, 373-399.
- Arrollo-Serralta, G.A., A. Kú-González, S.M.T. Hernández-Sotomayor y J.J. Zuñiga-Aguilar (2005). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 27-35.

- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141, 391-396.
- Basu, U., A.G. Good y G.J. Taylor (2001). Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell Environment*, 24, 1269-1278.
- Bazzo, R.B., A. de L. Eiras, D.M. DeLaat, W.J. Siqueira, J.M. Costa Mondego y C.A. Colombo (2013). Gene expression analysis suggests temporal differential response to aluminum in *Coffea arabica* cultivars. *Tropical Plant Biology*, 6, 191-198.
- Beauchamp, C.H. y I. Fridovich (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Beckman, J.S., H. Ischiropoulos, L. Zhu, V. Woerd, C. Smith, J. Chen, J. Harrison y M. Tsai (1992). Kinetics of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Archives Biochemistry Biophysics*, 298, 438-445.
- Bhattacharjee, S. (2013). The language of reactive oxygen species in plants. *Journal Botany*, 12, 488-508.
- Bhoomika, K., S. Pyngrupe y R.S. Dubey (2013). Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe-SOD and enhanced activities of Mn-SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. *Plant Growth Regulation*, 71, 235- 252.
- Bienert, G.P., J.K. Schjoerring y T.P. Jahn (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochemistry Biophys Acta*, 1758, 994–1003.
- Blamey, F.P.C. (2001). The role of the root cell wall in aluminum toxicity. *New Perspectives*, 6, 201-226.
- Bojorques-Quintal, J.E. (2010). Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 18-21.

- Boscolo, P.R.S., M. Menossi y R.A. Jorge (2003). Aluminum induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62, 181-189.
- Bottcher, A., P. Macedo, P. Fabiane, F. Frangiotti, R.A. Acevedo y P. Mazzefera (2012). Antioxidative responses of cell suspension cultures of two *Coffea arabica* varieties to low aluminum levels at pH 5.8. *Hoehnea*, 39, 1-10.
- Breeuwer, P., J.L. Drocourt, N. Bunschoten, M.H. Zwietering, F.M. Rombouts y T. Abee (1995). Characterisation of uptake and hydrolysis of fluorescein and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae* which result in accumulation of fluorescent product. *Applied Environment Microbiology*, 61, 1614-1619.
- Breusegem, F.V., E. Vranová, J.F. Dat y D.Inzé (2001). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Camejo, D., M.C. Martí, E. Nicolás, J.J. Alarcón, A. Jiménez y F. Sevilla (2007). Response of superoxide dismutase isoenzymes in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) during thermo-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Physiologia Plantarum*, 131, 367-377.
- Campbell, M.A., B.J. Haas, J.P. Hamilton, Mount S.M y Buell C.R. (2006). Comprehensive analysis of alternative splicing in rice and comparative analyses with *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, 7, 327.
- Carreño, A. y A. Chaparro-Giraldo (2013). Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes. *Universitas Scientiarum*, 18, 283-310.
- Cartes, P., M. McManus, C. Wulff-Zottele, S. Leung, A. Gutiérrez-Moraga y M.L. Mora (2012). Differential superoxide dismutase expression in ryegrass cultivars in response to short term aluminum stress. *Plant Soil*, 350, 353-363.
- Coirini, H. (2009). Toxicidad del oxígeno y radicales libres. *Revista Cuadernos de Ciencia y Técnicas, Ciencias Médicas* 12, 1-27.

- Corpas, F.J., L.M. Sandalio, L.A Del Rio y R.N. Trelease (1998). Copper-zinc superoxide dismutase is constituen enzyme of matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytologist*, 138, 307-314.
- Corpas, F.J., A. Fernandez-Ocana, A. Carreras, R. Valderrama, F.J. Esteban, M. Rodríguez-Serrano, M. Chaki, J.R. Pedrajas, L.M. Sandalio, L.A del Río y J.B. Barroso (2006). The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiology*, 47, 984-994.
- Culotta, V.C., M. Yang y T.V. O'Halloran (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 747-758.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M.V. Montagu y D. Inzé (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science*, 57, 779-795.
- Davletova, S., L. Rizhsky, H.J. Liang, S.Q. Zhong y D.J. Oliver (2005). Cytosolic ascorbat peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 268-281.
- Daza, M., V. Montes, M. Quijano y L.A. del Río. (1993). Perfiles isoenzimáticos de superóxido dismutasa en cafeto. *Revista Academica Colombiana*, 18, 403-408.
- del Río, L.A., F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, M. Gómez y J.B. Barroso (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal Experimental Botany*, 53, 1255-1272.
- del Río, L.A., L.M. Sandalio, F.J. Corpas y J.B. Barroso (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes production and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141, 330-335.
- Delhaize, E. y P.R. Ryan (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107, 515-321.
- Dellapenna, D. y B.J. Pogson (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review Plant Biology*, 57, 711-738.

- Dennis, R.J., E. Micossi, J. McCarthy, E. Moe, E.J. Gordon, S. Kozielski-Stuhrmann, G.A. Leonard y S. McSweeney (2006). Structure of the manganese superoxide dismutase from *Deinococcus radiodurans* in two crystal forms. *Acta Crystallographica F*, 62, 325–329.
- Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 380-387.
- Fernández-Ocaña, A., M. Chaki, F. Luque, M.V. Gómez-Rodríguez, A. Carreras, R. Valderrama, J.C. Begara-Morales, L.E. Hernández, F.J. Corpas y J.B. Barroso (2011). Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal Plant Physiology*, 168, 1303-1308.
- Fink, R.C. y J.G. Scandalios (2002). Molecular evolution and structure-function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives Biochemistry Biophysics*, 399, 19-36.
- Foyer, C.H. y G. Noctor (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866-1875.
- Gechev, T.S., F.V. Breusegem, J.M. Stone, I. Denev y C. Laloi (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Ghanati, F., A. Moritam y H. Yokota (2005). Effects aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil*, 276, 133-141.
- Giannakoula, A., M. Moustakas, T. Syros y T. Yupsanis (2010). Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany*, 67,487-494.
- Gill, S.S. y N. Tuteja (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

- Gill, S.S., N.A. Anjum, R. Gill, S. Yadav, M. Hasanuzzaman, M. Fujita, P. Mishra, C.S. Sabat y N. Tujeta (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10375-10394.
- Gould, K.S., J. McKelvie y K.R. Markham (2002). Do anthocyanins function as antioxidants in leaves, imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environment*, 25, 1261–1269.
- Grant, J.J. y G.J. Loake (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, 124, 21-29.
- Greene-Alscher, R., N. Erturk y L.S. Heath (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 372, 1331-1341.
- Guengerich, F.P. y Q. Cheng (2011). Orphans in the human cytochrome P450 superfamily: approaches to discovering functions and relevance in pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 63, 684-673.
- Gupta, N., S. Singh Gaurav y A. Kumar (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants. *Review American Journal of Plant Sciences*, 4, 21-37.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge (2007). *Free radicals in biology and medicine*. University Press, Oxford. pp. 123-126.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge (2015). *Free radicals in biology and medicine*. University Press, Oxford. pp 80-87.
- Hammond-Kosack, K.E. y J.D. Jones (2000). Responses to plant pathogens. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 23, 1102-1156.
- Hough, M.A. y S.S. Hasnain (2003). Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.15 Å. *Structure*, 11, 937–946.

- Huertas-López, E. y A. del Río (2014). Characterization of antioxidant enzymes and peroxisomes of olive (*Olea europaea* L.) fruits. *Journal Plant Physiology*, 171, 1463-1471.
- Ischiropoulos, H., L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J.C. Martin, C.D. Smith y J.S. Beckman (1992). Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives Biochemistry Biophysics*, 298, 431-437.
- Jajic, I., T. Sarna y K. Strzalka (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plant*, 4, 393-411.
- Jones, D., E. Blancaflor, L. Kochian y S. Gilroy (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell and Environment*, 29, 1309-1318.
- Kanematsu, S., M. Okayasu y S. Ueno (2013). Atypical cytosol-localized Fe-superoxide dismutase in the moss *Pogonatum inflexum*. *Bull Minami-kyushu University*, 43A, 23-31.
- Kaya, C., D. Higgs y A. Burton (2000). Plant growth phosphorus nutrition and acid phosphatase enzyme activity in three tomato cultures grown hydroponically at different zinc concentrations. *Journal Plant Nutriology*, 23, 569-579.
- Kinraide, T.B. (1997). Reconsidering the rhizo-toxicity of hydroxyl, sulphate and fluoride complex of aluminum. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1115-1124.
- Kinraide, T.B. (2003). Toxicity factors in acidic forest soils: Attempts to evaluate separately the toxic effects of exclusive Al^{3+} and H^+ and insufficient Ca^{2+} and Mg^{2+} upon root elongation. *European Journal of Soil Science*, 54, 323-333.
- Kochian, L.V., O.A. Hoekenga y M.A. Piñeros (2004). Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review Plant Biology*, 55, 459-493.

- Konieczny, R., K. Agnieszka, E. Surówka, M. Zaneta, M. Zbigniew y L. Konieczny (2014). Pattern of antioxidant enzyme activities and hydrogen peroxide content during developmental stages of rhizogenesis from hypocotyl explants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell*, 33,165-177.
- Kumar-Panda, S. y H. Matsumoto (2007). Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73, 326-347.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Landis, G.N. y J. Tower (2004). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 365-379.
- Liang, C., A.M. Piñeros, J. Tian, Z. Yao, L. Sun, J. Liu, J. Shaff, A. Coluccio, V.L. Kochian y H. Liao (2013). Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through GmALMT1 to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiology*, 161, 1347-1361.
- Liu, J., M.A Piñeros y L.V. Kochian (2014). The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, 221-230.
- Madanala, R., V. Gupta, F. Deeba, S.K. Upadhyay, V. Pandey, P.K. Singh y R. Tuli (2011). Highly stable Cu/Zn superoxide dismutase from *Withania somnifera* plant: gene cloning, expression and characterization of the recombinant protein. *Biotechnology Letters*, 33, 2057-2063.
- Malik, B., B.P. Tanveer, T. Inayatullah, U.I.R. Reiaz, R.H. Khalid y M.Z. Abdin (2014). Response to reactive oxygen species. *Plant signalling*, 1, 1-37.
- Martínez-Estévez, M., J.A. Muñoz-Sánchez, V.M. Loyola Vargas y S.M.T. Hernández Sotomayor (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 469-474.

- Martínez-Estévez, M., A. Ku-González, J.A. Muñoz-Sánchez, V.M. Loyola-Vargas, D. Pérez-Brito, R. Tapia Tussell, J.A. Escamilla-Bencomo y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2003a). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *Journal Inorganic Biochemistry*, 97, 69-78.
- Martínez-Estévez, M., G. Racagni-Di Palma, J.A. Muñoz-Sánchez, L. Brito-Argaez, V.M. Loyola-Vargas y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2003b). Aluminum differentially modifies lipid metabolism from signal transduction pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal Plant Physiology*, 160, 1297-1303.
- Martínez-Estévez, M., I. Echeverría-Machado y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2003c). Aluminum toxicity and plant signal transduction. *Recent Research Developments in Plant Molecular Biology*, 3, 15-29.
- Massot, N., B. Nicander, J. Barcelo, L. Poschenrider y E. Tillberg (2002). A rapid increase in cytokinin levels enhanced ethylene evolution precede Al³⁺ induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Growth Regulation*, 37, 105-112.
- Matsumoto, H. y H. Motoda (2012). Aluminum toxicity recovery processes in root tapices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science*, 185, 1-8.
- McCord, J.M. y I. Fridovich (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery y F.V. Breusegem (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.
- Moller, I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review Plant Physiology*, 52, 561-591.
- Moons, A. (2005). Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs). *Vitamins and Hormones*, 72, 155-202.

- Mossor-Pietraszewska, T. (2001). Effect of aluminum on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 673-686.
- Murashigue, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Olivares, M., M.A. Méndez, P.A. Astudillo y F. Pizarro (2008). Present situation of biomarkers for copper status. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 859-862.
- Olivetti, G.P. y B. Etherton (2001). Aluminum interactions with corn root plasma membrane. *Plant Physiology*, 96, 142-143.
- Paital, B., G. Sablok, S. Kumar, S.K. Singh y G.B. Chainy (2015). Investigating the conformational structure and potential site interactions of SOD inhibitors on EC-SOD in marine mud crab *Scylla serrata*: a molecular modeling approach. *Interdisciplinary Sciences Computational Life Sciences*, 7, 325-331.
- Passardi, F., C. Penel y C. Dunand (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9, 534-540.
- Perry, J.J.P., D.S. Shin, E.D. Getzoff y J.A. Tainer (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 245-262.
- Poot-Poot, W. y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2011). Aluminum stress and its role in the phospholipid signaling pathway in plants and possible biotechnological applications. *IUBMB Life*, 63, 864-872.
- Puig, S., N. Andrés-Colás, A. García-Molina y L. Peñarrubia (2007). Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment*, 30, 271-290.
- Rama, S.D., Y. Yamamoto y H. Matsumoto (2003). An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal Inorganic Biochemistry*, 97, 59-68.

- Ramírez-Benítez, J.E. y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2008). Role of reactive oxygen species (ROS) in aluminum-induced signaling and aluminum resistance in plants. *Current Topics Biochemical Research*, 10, 79-89.
- Ramírez-Benítez, J.E., J.A. Muñoz-Sánchez, K.M. Becerril-Chi, M.L. Miranda-Ham, L.A. Castro-Concha y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2011). Aluminum induces changes in oxidative burst scavenging enzymes in *Coffea arabica* L. suspension cells with differential Al tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1523-1528.
- Rengel, Z. (2002). Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytologist*, 121, 499-513.
- Rengel, Z. y W.H. Zhang (2003). Role of Dynamics of intra- cellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159, 295-314.
- Rezaee, F., F. Ghanati y M. Behmanesh (2013). Antioxidant activity expression of catalase gene of (*Eustoma grandiflorum* L) in response to boron and aluminum. *South African Journal of Botany*, 84, 13-18.
- Rhee, S.G., T.S. Chang, W. Jeong y D. Kang (2010). Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells*, 29, 539-549.
- Robson, C.A. y G.C. Vanlerberghe (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria dependent and independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology*, 129, 1908-1920.
- Rouhier, N., E. Gelhaye y J.P. Jacquot (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Molecular Life Science*, 61, 1266-1277.
- Scandalios, J.G. (1993). Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 101, 7-12.
- Schmohl, N. y W.J. Horst (2000). Cell wall pectin content modulates aluminum sensitivity in *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell Environment*, 23, 735-742.

- Sharma, P. y R.S. Dubey (2008). Mechanism of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. In: Hemantaranjan A (ed) advances in plant physiology. Scientific Publishers (India), Jodhpur. pp. 145-179.
- Sivaguru, M., S. Pike, W. Gassmann y T. Baskin (2003). Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant and Cell Physiology*, 44, 667-675.
- Smith, P.K., G.T. Krhon, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson y D.C. Klenk (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Souza, J.M., G. Peluffo y R. Radi (2008). Protein tyrosine nitration-functional alteration or just a biomarker?. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 357-366.
- Sunkar, R., A. Kapoor y J.K. Zhu (2006). Postranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18, 2051-2065.
- Van-Camp, W., K. Capiou, M. Van-Montagu, D. Inze y L. Slooten (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology*, 112, 1703-1714.
- Vanlerberghe, G.C. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6805-6847.
- Vardar, F. y M. Ünal (2007). Aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Advances in Molecular Biology*, 1, 1-12.
- Vasquez, M.D., C. Poschenrieder, I. Corrales y J. Barcelo (2000). Change in apoplastic aluminum during initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology*, 119, 435-444.

- Wang, B.B. y V. Brendel (2006). Genome wide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 7175-7180.
- Wang, J., R. Harsh, G. Zhang, N. Mendham y M. Zhou (2006). Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms genetics and screening methods. *Journal Zhejiang University*, 7, 769-787.
- Yamamoto, Y., Y. Kobayashi, S. Devi, S. Rikiishi y H. Matsumoto (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 128, 63-72.
- Yamamoto, Y., Y. Kobayashi, S. Devi, S. Rikiishi y H. Matsumoto (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255, 239-243.
- Yang, H.C., Y. Nemoto, T. Homma, H. Matsuoka, S. Yamada, O. Sumita, K. Takatori y H. Kurata (1995). Rapid viability assessment of spores of several fungi by an ionic intensified fluorescein diacetate method. *Current Microbiology*, 30, 173-176.
- Yan-Zhou, J. y P. Prognon (2005). Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods-the example of superoxide dismutase (SOD). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 1143-1148.
- Yost, F. y I. Fridovich (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Journal Biology Chemistry*, 248, 4905-4914.
- Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156.