



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ÁCIDO
SALICÍLICO EN LOS NIVELES INTRA Y
EXTRACELULARES DE PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO EN LAS SUSPENSIONES
CELULARES DE *C. chinense* JACQ.**

Tesis que presenta

JULIETA MARÍA CHAN CAMPOS

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

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 C. Julieta María Chan Campos titulado Evaluación del efecto del ácido salicílico en los niveles intra y extracelulares de peróxido de hidrógeno en las suspensiones de *C. chinense* Jacq., fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas en el Laboratorio No. 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 30 de Octubre de 2017

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 regirán 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: _____

Nombre: IBQ Julieta María Chan Campos

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", número del proyecto 219893 bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor.

AGRADECIMIENTOS

A ti Dios por permitirme esta oportunidad

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico para continuar con mi desarrollo profesional, mediante el otorgamiento de la beca para maestría No. 588870. Así mismo, por la Beca Mixta otorgada para la realización de una estancia de investigación en el Instituto de Biotecnología, UNAM en Cuernavaca, Morelos.

Al Sistema Nacional de Investigadores SIN, por el otorgamiento del estímulo económico como ayudante de investigador Exp. No. 14914.

A la Dra. S.M. Teresa Hernández Sotomayor, por sus enseñanzas durante mi formación académica, por su paciencia e interés en para mi desarrollo profesional. Por ser mi guía y mejor ejemplo en este camino de la ciencia.

Al CICY y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), por aceptarme en su posgrado, por el uso de los salones de clases y el uso de sus instalaciones y servicios; así como a los profesores que contribuyeron con mi formación académica.

Al Comité tutorial, conformado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, la Dra. Ma de Lourdes Miranda Ham y el Dr. Luis Cárdenas Torres por sus valiosas críticas, sus comentarios oportunos y sus revisiones con la que enriquecieron el contenido de la tesis.

Agradezco a mi comité revisor integrado por la Dra. Dra. Teresa Hernández Sotomayor, la Dra. Ma de Lourdes Miranda Ham, el Dr. Luis Cárdenas Torres, el Dr. Manuel Martínez Estévez y al Dr. José Efraín Ramírez Benítez.

Agradezco al M. en C. J. Armando Muñoz Sánchez y a M. C. Ángela Kú González por su apoyo técnico e incondicional en el desarrollo de la tesis, así como de sus consejos, confianza y sobre todo, por su amistad brindada.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM por recibirme durante mi estancia y permitirme el uso de sus instalaciones, en particular al laboratorio No. 19 del Departamento de Biología Molecular de Plantas, en el edificio norte de este Instituto.

Agradezco en especial a los Drs. Marco Adán Juárez Verdayes y Yolanda Ortega Ortega, por su apoyo en la parte experimental en la construcción del biosensor HyPer (Anexos) en mi estancia en el IBT y sobre todo, por sus atenciones brindadas durante mi estadía en Cuernavaca. Gracias por su amistad.

A los compañeros del laboratorio N. 10 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas: Roberto, Laura, Jacqueline, Ibis, Normig, Yahaira, Cristina, a los posdoctorantes Maru y Víctor por compartir sus experiencias, por motivarme para continuar, por sus consejos, por sus palabras de ánimos y sobre todo por su confianza en mí para alcanzar esta meta. Gracias por hacer de esta etapa enriquecedora profesional y personalmente. ¡¡¡¡ Muchas gracias chicos!!!.

DEDICATORIAS

A mi madre Rita María, por ser mi ejemplo de superación que me inspira para continuar día a día, por enseñarme valores que me han llevado a lograr lo que soy ahora. Eres una parte importante de mi vida y siempre estaré agradecida con Dios y la vida de tenerte a ti como mi madre; Te amo mamá!!

A mis hermanos Nayelli y Jorge, que a pesar de nuestras diferencias siempre me hacen sentir que puedo mejorar para bien.

A mis sobrinos, quienes son mi motor que me impulsa a ser mejor y con su amor me hacen sentir que lo puedo lograr todo.

A mi compañero de vida Rafael César, por haber llegado en esta etapa importante de mi vida, por brindarme su apoyo incondicional, por tus palabras de aliento cuando lo necesitaba y sobre todo, por tu amor.

A mi gran amigo Josué Martín que a pesar de la distancia su amistad ha sido incondicional y por su confianza en mí para alcanzar mis sueños.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 RESPUESTAS DE LAS PLANTAS AL ÉSTRES BIÓTICO Y ABIÓTICO.....	3
1.2 PODER REDUCTOR Y OXIDANTE EN LAS CÉLULAS VEGETALES.....	4
1.3 ESTALLIDO OXIDATIVO.....	5
1.4 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	5
1.4.1 GENERACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS.....	6
1.4.2 COMPARTAMENTALIZACIÓN DE LAS ROS.....	7
1.5 EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	8
1.5.1 EL H ₂ O ₂ EN LOS ORGANISMOS CELULARES.....	8
1.5.2 EL TRANSPORTE DEL H ₂ O ₂ EN LAS CÉLULAS VEGETALES.....	10
1.5.3 EL METABOLISMO OXIDATIVO DEL H ₂ O ₂ EN LA CÉLULA.....	12
1.5.4 EL H ₂ O ₂ COMO MOLÉCULA SEÑAL.....	13
1.6 EL ÁCIDO SALICÍLICO (AS).....	14
1.6.1 METABOLISMO DEL AS.....	15
1.6.2 TRANSPORTE DEL AS EN LA CÉLULA.....	18
1.6.3 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL AS.....	19
1.6.4 EL AS EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS PLANTAS.....	21
1.6.5 PAPEL DEL AS EN LAS PLANTAS.....	23
1.7 RELACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LAS ROS CON EL AS.....	25
1.8 EL CHILE HABANERO <i>Capsicum chinense</i> Jacq.....	27
1.9 MODELO DE ESTUDIO.....	28
1.10 ESTUDIOS REALIZADOS EN EL MODELO DE ESTUDIO.....	29
JUSTIFICACIÓN.....	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
CAPÍTULO II.....	34
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 MATERIAL VEGETAL Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO.....	34

2.2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR.....	34
2.3 ETAPA DE PREACONDICIONAMIENTO.....	35
2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD.....	35
2.5 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS ROS.....	36
2.5.1 TINCIÓN DE LAS CÉLULAS DE <i>C. chinense</i> CON DIFERENTES FLUORÓFOROS.....	37
2.5.2 LOCALIZACIÓN DE LAS ROS <i>in situ</i>	39
2.6 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE H ₂ O ₂	41
CAPÍTULO III.....	43
3 RESULTADOS.....	43
3.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	43
3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DEL AS EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE <i>C. chinense</i>	45
3.3 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS ROS.....	46
CAPÍTULO IV.....	59
4 DISCUSIÓN.....	59
CAPÍTULO V.....	63
5.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	63
5.2 PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXOS.....	73

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Respuesta de las células vegetales frente a los estrés biótico y abiótico	4
Figura 1.2 Poder reductor y oxidante en las células vegetales	5
Figura 1.3 Generación de las especies reactivas de oxígeno	7
Figura 1.4 Reacciones químicas por las que el H ₂ O ₂ puede ser generado	9
Figura 1.5 Estructura molecular y arreglo estérico de la molécula de H ₂ O ₂	11
Figura 1.6 Modelo propuesto para el transporte del H ₂ O ₂	12
Figura 1.7 Estructura química del ácido salicílico (AS)	15
Figura 1.8 Vía metabólica propuesta para la biosíntesis del AS en <i>Arabidopsis</i>	16
Figura 1.9 Modificaciones químicas que sufre el AS en la célula	17
Figura 1.10 Transporte del AS a través de los compartimentos celulares	19
Figura 1.11 Proteínas de unión al AS, NPR1 Y NPR4.	21
Figura 1.12 Participación del AS en el sistema inmune de las plantas	23
Figura 1.13 Diagrama propuesto para la señalización regulatoria de la muerte celular en las plantas	26
Figura 1.14 Cultivo de <i>Capsicum chinense</i> mejor conocido como chile habanero	28
Figura 1.15 Modelo de estudio de las suspensiones celulares de <i>C. chinense</i>	28
Figura 1.16 Modelo de estudio para este trabajo	30
Figura 1.17 Diagrama de la estrategia experimental	33
Figura 2.1 Estructura química del colorante azul de Evans	35
Figura 2.2 Estructura química del DAPI	37
Figura 2.3 Estructura química del colorante blanco de calcofluor	37
Figura 2.4 Esquema de internalización del FM4-64	38
Figura 2.5 Hidrólisis del fluorocromo H ₂ DCFDA-AM	39
Figura 2.6 Reacción química del Amplex® Red	41
Figura 2.7 Curva estándar del H ₂ O ₂ utilizando el Amplex® Red	42
Figura 3.1 Curva de crecimiento de la línea celular en suspensión de <i>C. chinense</i>	43
Figura 3.2 Efecto del AS en la viabilidad de las células de <i>C. chinense</i>	45
Figura 3.3 Localización de los niveles intracelulares basales de las ROS en las células de <i>C. chinense</i>	47
Figura 3.4 Localización de los niveles intracelulares de las ROS en las células de <i>C. chinense</i> tratadas con 1 µM de AS	49
Figura 3.5 Localización de los niveles intracelulares de las ROS en las células de <i>C.</i>	51

<i>chinense</i> tratadas con 50 μ M de AS	
Figura 3.6 Localización de los niveles intracelulares de las ROS en las células de <i>C. chinense</i> tratadas con 50 μ M de AS	53
<i>chinense</i> tratadas con 100 μ M de AS	
Figura 3.7 Localización de los niveles intracelulares de las ROS en las células de <i>C. chinense</i> tratadas con 100 μ M de AS	55
<i>chinense</i> tratadas con 200 μ M de AS	
Figura 3.8 Micrografías de las células de <i>C. chinense</i> tratadas con las diferentes concentraciones de AS, a los 30 minutos de observación	56
Figura A1 Efecto del AS en la viabilidad de protoplastos	74
Figura A2 Vector de expresión en plantas pK2gw7.0	76
Figura A3 Amplificación del plásmido pENTR:HyPer3 en un gel de agarosa al 1.2%	77

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Especies reactivas de oxígeno generadas en las células vegetales	6
Cuadro 1.2 Participación de los organelos celulares en la formación de las ROS	7
Cuadro 1.3 Propiedades de las ROS en las células vegetales	10
Cuadro 2.1 Condiciones para la tinción de las diferentes estructuras celulares en las células de <i>C. chinense</i> .	40
Cuadro 3.1 Determinación de H ₂ O ₂ extracelular en el medio de cultivo de las células de <i>C. chinense</i> con diferentes tratamientos con AS.	58

LISTADO DE ABREVIATURAS

A.A	Amoniácidos
ABA	Ácido abscísico
AMP	3',5'-adenosínmonofosfato
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Ácido salicílico
ASA	Ácido acetil salicílico
ASG	Ácido salicílico orto beta glucosilado
ASGT	Ácido salicílico glucosil transferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Blanco de calcofluor
BHT	S-metil éster del ácido benzo-1,2,3-tidiazol-7-carbotiótico
DAG	Diacilglicerol
DAGK	Diacilglicerol cinasa
DCF	Diacetato de fluoresceína
DCFDA-	Acetometil éster de diacetato de 2'7-diclorodihidro fluoresceína
AM	
DHBA	2,3-dihidrobencóico, ácido gentísico
EDS5	Enhanced disease susceptibility 5
ER	Retículo endoplasmático
ET	Etileno
ETI	Effector-triggered immunity
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSC	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
HR	Respuesta hipersensible
HRP	Peroxidasa de rábano
HyPer	Peróxido de hidrógeno
ICS	Isocorismato sintasa
INA	Ácido-2,6-dicloro isonicotínico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

IPL	Isocorismato piruvato liasa
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MAP	Proteína asociada a mitógenos
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MeAS	Ácido salicílico metilado
MeJa	Metil jasmonato
NBS	Sitio de unión al nucleótido
NPR1	Genes relacionados con proteínas no expresivas
PA	Ácido fosfatídico
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PAP	Fosfoadenosina fosfato inorgánico
PAPS	Fosfoadenosina-fosfosulfato
PCD	Muerte celular programada
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
POX	Prolina oxidasa
PR	Proteínas relacionadas a la patogénesis
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SABP	Proteína de unión al ácido salicílico
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SAR	Respuesta sistémica Adquirida
SH3	Salicilato-3-hidroxilasa
SMe	Salicilato de metilo
SMeG	Salicilato de metilo orto beta glucosilado
SOD	Superóxido dismutasa
SUMO	Modificador tipo una ubiquitina pequeña
TIR	Receptor interleucina 1-/Toll
TMV	Virus del mosaico del tabaco

RESUMEN

El ácido salicílico (AS) y el H_2O_2 son moléculas importantes en las células vegetales, que participan en diferentes procesos fisiológicos y en el desarrollo de las plantas; y ante un estrés biótico y abiótico permiten la amplificación de la señal inicial percibida desde el exterior de la célula, dando lugar a las respuestas bioquímicas y fisiológicas adecuadas. Sin embargo, aún se desconoce este mecanismo que da lugar a la defensa celular.

El presente trabajo tuvo como modelo de estudio las suspensiones celulares de *C. chinense* dónde se evaluó si la respuesta del AS esta mediada por el estallido oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), en particular en los niveles intra y extracelulares de H_2O_2 . Primeramente se determinaron si los tratamientos con AS tenían un efecto en la viabilidad de las células; estos resultados demostraron que los tratamientos con AS (0- 200 μ M) aplicados en las células no afectan la viabilidad, y por lo tanto eran adecuados para conocer el estrés oxidativo en las células.

Para conocer los niveles intracelulares de las ROS se empleó como estrategia el uso de fluoróforos para la identificación y localización intracelular de estos. El análisis de las imágenes obtenidas permitió conocer los niveles intracelulares basales de las ROS, en células con estructuras celulares bien desarrolladas, los cuales se encuentran dispersos en el citosol y presentan una acumulación en el núcleo. En contraste, las células que fueron tratadas a diferentes concentraciones de AS mostraron una disminución importante en los niveles intracelulares de las ROS. Estos resultados sugieren que las células tratadas con AS pueden regular los niveles intracelulares de las ROS.

También se determinó si las células liberaban H_2O_2 al medio de cultivo. Los resultados mostraron que las suspensiones no presentaron niveles extracelulares de H_2O_2 , detectables en las condiciones de tiempo y concentraciones de AS utilizadas. Por otra parte, se llevó a cabo la construcción de la sonda molecular llamada HyPer (Peróxido de Hidrogeno), la cual permitirá la cuantificación intracelular H_2O_2 *in vivo*, en protoplastos transformados. De lo anterior, se estableció el protocolo para el aislamiento y la viabilidad de los protoplastos.

En resumen, se evidenció que las suspensiones celulares de *C. chinense* generan niveles basales de ROS y que estos disminuyeron en las células tratadas con AS; por lo que se sugiere que en estas condiciones de AS evaluadas, este tiene un efecto antioxidante.

ABSTRACT

Salicylic acid (SA) and H₂O₂ are important molecules in plant cells, they participate in different physiologic process in the development of plants and also in conditions of biotic and abiotic stress. These compounds allow the amplification of the signal and biochemical and physiological responses are generated. However, the mechanisms involved in this dual system of sensing-and response, is still unknown.

In the present work, suspension cells of *C. chinense*, were used as model, and it was evaluated whether the response to SA is mediated by the oxidative burst generated by the reactive oxygen species (ROS), analyzing the intra and extracellular levels of H₂O₂. Foremost, it was determined whether the treatments with SA affect the viability of the cells; our results show that the treatments with SA (0-200 μM), did not affect the viability, and therefore were adequate to study the oxidative stress.

In order to study the intracellular ROS levels, different fluorophores were used, for the identification as well for the intracellular localization. The results obtained, show that ROS are present in the cytosol and are accumulated at the nucleus. Also, our results indicate that the suspensions cells did not present extracellular levels of ROS, at least, they were not detectable in the conditions of time and concentrations of SA used.

A biosensor named HyPer (Hydrogen peroxide) for the quantification of intracellular levels of H₂O₂ was designed with the perspective to use it, for the transformation of protoplast obtained from suspension cells of *C. chinense*. In the present work, we report the conditions to obtained both, the probe as well as protoplasts, which viability do not affected by the AS treatment.

In summary, we evidence that suspension cells of *C. chinense* produced basal levels of ROS that were decreased by SA treatment, suggesting that the SA to the concentrations of μM function as an antioxidant, in this culture cell.

INTRODUCCIÓN

Las plantas están continuamente expuestas a diversos tipos de estrés, por lo que han desarrollado mecanismos para una efectiva respuesta de defensa. Estos mecanismos pueden involucrar la activación de componentes de señalización específicos y de un conjunto de genes relacionados con la tolerancia y la resistencia a diferentes factores adversos (Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2014).

El AS es una importante fitohormona que regula diferentes respuestas al estrés, tanto en respuesta a patógenos, como a muchos otros factores ambientales y aquellos relacionados con el desarrollo de las plantas (Coego, 2006) no obstante, su amplia participación en la defensa de las plantas, aún se desconoce su mecanismo de acción. Se ha encontrado que ante un estrés biótico o abiótico, ocurre una acumulación de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bhattacharjee, 2012; Dat *et al.*, 2006).

Existe una relación entre la participación de las ROS y los fitoreguladores, principalmente el AS, que conduce a eventos de señalización intra y extracelulares que involucran respuestas de defensa a larga distancia y sistémicas en contra de patógenos o frente a cualquier otro daño. La producción de las ROS, principalmente del H₂O₂ en la pared celular y en la membrana plasmática de las células, es uno de los eventos primarios detectados durante la interacción planta-patógeno, así como durante la aplicación exógena del AS (Kawano y Bouteau, 2013).

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el efecto del AS como molécula inductora del metabolismo secundario, mediando la señalización fosfolipídica en suspensiones celulares de *Capsicum chinense* Jacq. Se ha evaluado la actividad enzimática de la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa C (PLC), así como la estimulación de la síntesis de vainillina (intermediario en la síntesis de la capsaicina). Altúzar-Molina y colaboradores (2011) demostraron que las suspensiones celulares de *C. chinense* respondieron al tratamiento con AS incrementando el contenido de vainillina, pero disminuyendo la actividad de la PLC. Cuando se aplicó el AS al mismo cultivo durante 30 minutos, se incrementaron los niveles de ácido fosfatídico (PA) hasta en 3.5 veces en comparación con las células testigo, el cual se generó preferentemente por acción de la PLD. Sin embargo, aún no se ha logrado elucidar el mecanismo por el cual el AS estaría mediando su acción.

El PA es un mensajero secundario en la transducción de señales que puede regular la actividad y función de proteínas como la NADPH oxidasa, cinasas dependientes de Ca^{2+} , cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y algunos canales iónicos (Wang, 2002). La NADPH oxidasa es una enzima involucrada en la generación de ROS que tiene una interacción directa con el PA (Kalachova et al., 2012). Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo conocer el efecto del tratamiento de un cultivo celular de *C. chinense* Jacq. con AS sobre la modulación de los niveles intra y extracelulares de H_2O_2 .

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 RESPUESTAS BIÓTICAS Y ABIÓTICAS DE LAS PLANTAS

Los cambios desfavorables en el ambiente, provocados por factores climáticos, edáficos y por la actividad del hombre generan estrés en las plantas afectando su productividad. Sunkar *et al.*, 2007). Existen varias clasificaciones de los factores de estrés, en general, pueden ser clasificados en estrés abióticos (físicos y químicos) y bióticos. Entre los factores físicos se encuentran déficit o exceso de agua, altas y bajas temperaturas y radiación UV y entre los factores químicos están la contaminación atmosférica, metales pesados, toxicidad, salinidad (Tambussi, 2004). En tanto, los factores bióticos representan a los patógenos en general.

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y tienen la capacidad de transmitir las a la maquinaria celular (Figura 1.1) como respuesta a los cambios ambientales. La respuesta puede consistir en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas, en la activación de genes de defensa (Sunkar *et al.*, 2007). También pueden responder al estrés mediante la activación de un conjunto de mecanismos de defensa que incluyen la biosíntesis de metabolitos, respuesta hipersensible y barreras de defensa estructurales, tales como es la deposición de lignina (Sabater, 2013). Otras de las respuestas de las plantas incluyen cambios en el flujo de calcio y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), posteriormente actuando como mensajeros secundarios.

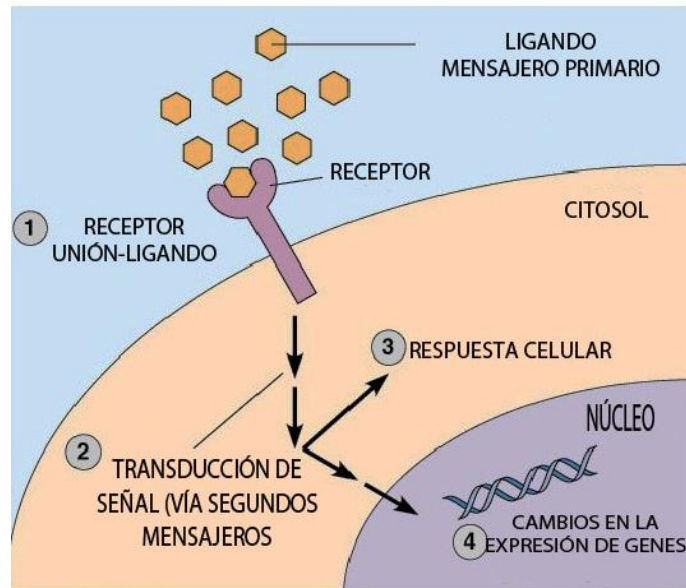


Figura 1.1 Respuestas de las células vegetales frente al estrés.

1.2 PODER REDUCTOR Y OXIDANTE EN LAS CÉLULAS

Las células vivas requieren energía para ejercer sus funciones. Las células usan la energía química almacenada en las moléculas orgánicas para generar ATP, el cual le permite llevar a cabo la biosíntesis, el transporte y las reacciones químicas. Para generar el ATP, las moléculas orgánicas (carbohidratos, ácidos grasos, proteínas, etc.) se degradan por las rutas catabólicas. La oxidación de estas moléculas va a generar cofactores reducidos: NADH, FADH₂, etc. que ceden sus equivalentes de reducción al O₂ molecular a través de la cadena transportadora mitocondrial, donde se va a generar la mayor parte del ATP celular (Figura 1.2).

El poder reductor se refiere a la capacidad de ciertas biomoléculas de actuar como donadoras de electrones o receptoras de protones en reacciones metabólicas de oxidación-reducción.

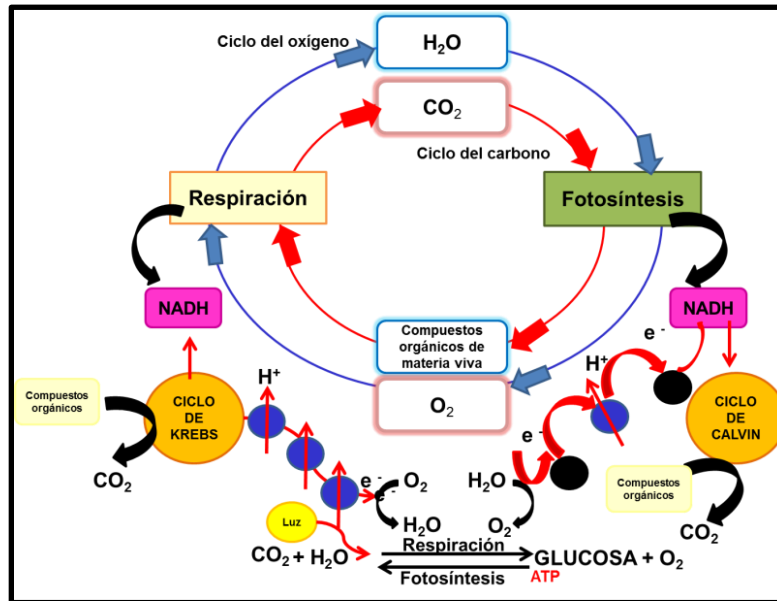


Figura 1.2 Poder reductor y oxidante en las células vegetales. Las reacciones de oxido-reducción llevadas a cabo en las células a partir del metabolismo de las moléculas orgánicas la formación de moléculas reductoras (Modificado de Diaz, 1995).

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es un estado alterado de la homeostasis de óxido-reducción intracelular, donde se presenta un desbalance entre la producción de las ROS y la capacidad que tiene un sistema para detoxificar estas especies (Velarde, 2013; Sánchez, 2010). El estallido oxidativo que se presenta en respuesta a un daño es en general de corta duración; sin embargo, cuando la célula enfrenta condiciones adversas, los cambios en el metabolismo oxidativo se prolonga, por mucho más tiempo.

El estrés oxidativo asociado con la fotosíntesis es algunas veces un problema potencial relacionado especialmente en el desbalance por el exceso en el transporte de electrones, que excede en la capacidad de reciclar el NADPH y el ATP (Cheeseman, 2007).

1.4 LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El término especies reactivas de oxígeno se refiere tanto a moléculas que son radicales libres, así como a otras moléculas que no son radicales libres (Miranda-Ham y Castro-Concha, 2010), como se muestra en el Cuadro 1.1

Cuadro 1.1 Especies reactivas de oxígeno generadas en las células vegetales. (Tomado de Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

Radicales	No radicales
Superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)	Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) forma $^1\Delta$
Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo ($\text{RO}_2\cdot$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($\text{RO}\cdot$)	Anión peroxinitrilo (ONOO^-)
Hidroperoxilo ($\text{HO}_2\cdot$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
	Ácido hipobromoso (HOBr)

El O_2^- y H_2O_2 pueden inactivar varias macromoléculas directamente; aunque el $\cdot\text{OH}$ derivado de ellos es de carácter especialmente tóxico en la célula (Inzé y Van Montagu, 1995).

Las ROS no se consideran solamente como componentes dañinos y destructivos, sino que también como moléculas señal, cruciales para la regulación de importantes respuestas y vías metabólicas (Bienert y Chaumont, 2014). Se ha demostrado que el H_2O_2 actúa como una señal para inducir un rango de respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares dentro de las células vegetales (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

1.4.1 GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ROS tienen múltiples maneras para producirse en las plantas (Figura 1.3). Una de las más comunes es la transferencia de electrones al O_2 en la cadena de transporte de electrones en los cloroplastos y las mitocondrias. Además, puede formarse durante la fotorespiración en los peroxisomas, por la actividad de las peroxidasas y de las oxidasas de la pared celular (Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008)

Se estima que el 1% del O₂ consumido por las plantas es desviado para producir ROS en diferentes compartimentos celulares; por ejemplo, la formación de H₂O₂ en cloroplasto y peroxisoma puede ser hasta 30 o 100 veces más rápida que en la mitocondria. La mayoría de las ROS se forman a partir de la dismutación del superóxido, mismo que tiende a aumentar durante la transferencia del O₂ en la cadena de transporte de electrones (Bhattacharjee, 2012).

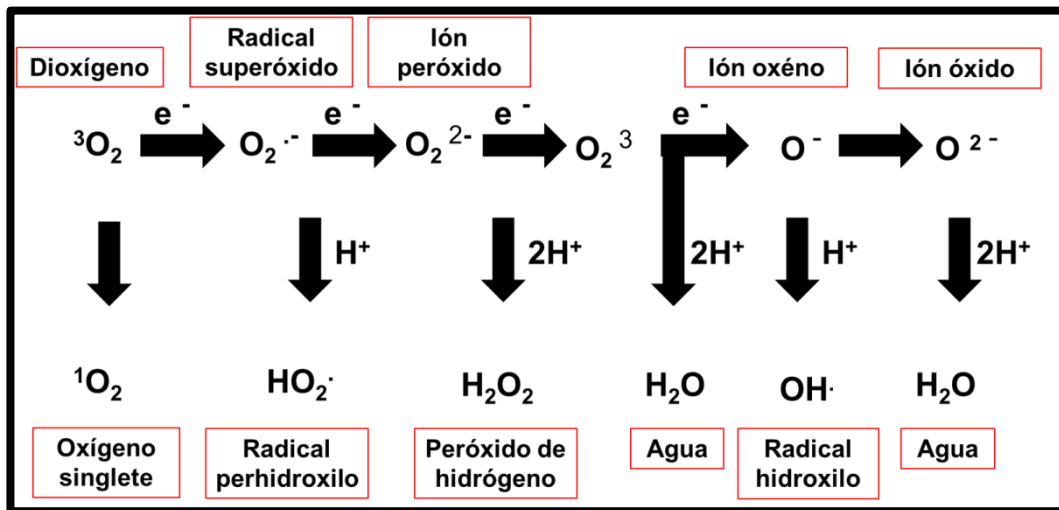


Figura 1.3 Generación de las diferentes ROS. La formación de las diferentes ROS puede tener lugar por la transferencia de energía o por la reducción secuencial univalente del estado fundamental del oxígeno triplete (Modificado de Aper y Hirt, 2004).

1.4.2 LA COMPARTAMENTALIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LAS ROS

Las ROS se encuentran en los diferentes organelos que participan en el metabolismo aerobio (Cuadro 1.2). Las ROS derivadas de la membrana plasmática participan en la señalización durante el estrés biótico y abiótico (Bhattacharjee, 2012).

Cuadro 1.2 Participación de los organelos celulares en la formación de las ROS. Modificado de Sharma, 2015.

ORGANELO	GENERACIÓN DE LAS ROS MEDIADA POR:
Cloroplastos	Cadena de transporte de electrones fotosintética-producción de ROS en el fotosistema I y II.
Peroxisoma	Fotorespiración β-oxidación de ácidos grasos, xantina oxidasa, flavin oxidasa.

Mitocondria	Cadena de transporte de electrones producción de ROS en el complejo I, II y III.
Citoplasma	Membrana plasmática asociada a al quinona oxidasa.
Apoplasto	Membrana plasmática asociada a NADPH oxidasa (ROS dentro del apoplasto) pared celular asociada a peroxidasas amino oxidasas, oxalacetato oxidasa.

La producción de las ROS es una respuesta temprana en las interacciones compatibles e incompatibles entre los patógenos y las plantas. Puede estar asociada a la activación de una NADPH oxidasa unida a la membrana. Se han propuesto varios papeles para las ROS durante la infección por patógenos, entre las cuales se encuentran: agentes antimicrobianos directos, activadores de genes de defensa, agentes para la interacción de proteínas para limitar infecciones patogénicas y generadores de la HR, de la muerte celular, de la producción de AS y de la SAR (Orozco-Cárdenas y Ryan, 1999).

1.5 EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El peróxido de hidrógeno H_2O_2 fue descubierto en 1818 por Louis Jacques Thenars, recibiendo gran atención como un producto industrial (Bienert *et al.*, 2006). El H_2O_2 se encuentra en bajas concentraciones (3-9%) en muchos productos domésticos de higiene y belleza, así como en productos medicinales. En la industria, se utiliza a concentraciones más altas (hasta el 90%) para blanquear telas y pastas de papel, como componente de combustible para fábrica, espuma de caucho y sustancias químicas orgánicas.

También se encuentra en los organismos vivos, tanto en animales como en vegetales, muchas células animales y vegetales lo producen y su presencia en humanos puede ser detectada en la orina, sangre y en el aire exhalado (Sánchez, 2010).

1.5.1 EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN LOS ORGANISMOS CELULARES

El H_2O_2 es generado en respuesta a varios estímulos (Figura 1.4). Está involucrado en la regulación de los procesos biológicos, así como en el remodelamiento vascular y activación de células inmunes en mamíferos y en el cierre de estomas en plantas (Veal, *et al.*, 2007).

En los sistemas biológicos, el H₂O₂ es el producto de la reducción incompleta del oxígeno generado en diferentes compartimentos celulares, y que tiene una diversidad de efectos fisiológicos y patológicos de acuerdo al grado, distribución y localización de su producción en las células vivas. Es ampliamente conocido como una ROS con un amplio potencial dañino en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos; aunque se ha demostrado su participación en la homeostasis celular a través de una gran variedad de vías metabólicas (Cheeseman, 2007; Bienert *et al.*, 2006;).

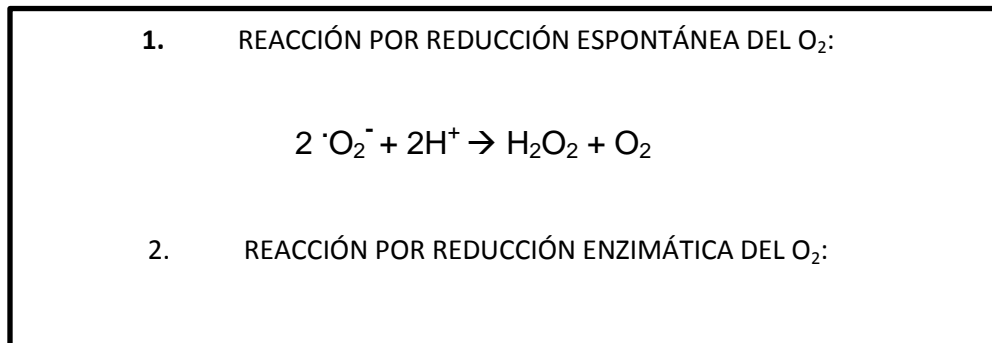


Figura 1.4 Reacciones químicas por las que el H₂O₂ puede ser generado en los organismos, ya sea de forma constitutiva o por la estimulación de diferentes factores, pueden ser: 1) espontánea y 2) catalizada enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

El H₂O₂ es la más estable y abundante de las ROS (Cuadro 1.3), que pertenece al grupo de los no radicales libres, con un número de oxidación intermedio (-1); de esta forma posee propiedades oxidantes y reductoras que son importantes para la multifuncionalidad celular. EL H₂O₂ puede ser convertido a otra ROS más reactiva por varios medios enzimáticos. No obstante, es relativamente estable *in vivo*, en comparación con las otras ROS y puede causar daño, directa o indirectamente, al ADN, a los lípidos mediante la peroxidación lipídica, a los carbohidratos a través de la carbonilación y a las proteínas por la oxidación de sus residuos, como la cisteína y derivados sulfínicos, sulfónicos y sulfénicos. Lo anterior da lugar a la modificación en un cambio del estado redox de proteínas y también activa o inactiva proteínas o altera su función (Bienert y Chaumont, 2014).

Cuadro 1.3. Propiedades de las ROS en las células (Tomado de Bienert *et al.*, 2006).

ROS	VIDA MEDIA	CAPACIDAD MIGRATORIA	DAÑO AL ADN	REACCIÓN CON PROTEÍNAS	REACCIÓN CON CARBOHIDRATOS
Superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)	1-4 μs	30 nm	No	Sí, centro Fe	Lenta
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	1 ms	1 μm	No	Sí, cisteína	Lenta
Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)	1 μs	1 nm	Rápidamente	Rápidamente	Rápidamente
Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)	1-4 μs	30 nm	Sí, glutamina	Trp, His, Try, Met, Cys	Lenta
Radicales alcoxil ($\text{RO}\cdot$)	?	1 nm	No	Sí	Lenta
Radicales peroxil ($\text{ROO}\cdot$)	?	1 nm	No	Sí	Lenta

1.5.2 EL TRANSPORTE CELULAR DEL H_2O_2

El H_2O_2 posee una gran movilidad entre los tejidos, y su utilidad va más allá de su potencial como sustrato en una variedad de reacciones, sino también como una molécula señalizadora. El H_2O_2 es una molécula no polar, capaz de difundir a través de las membranas. Cuando se añade exógenamente es menos eficaz al provocar una respuesta de señalización, en comparación con su origen endógeno (Veal *et al.*, 2007).

La disposición espacial de los átomos de H en el peróxido es similar a la que se presentan en la molécula del agua (Figura 1.5) lo que lo hace un sustrato de las aquaporinas. Estas proteínas son facilitadores de la difusión de solutos no cargados y/o parcialmente polares como el glicerol, la urea, el CO₂, purinas, pirimidinas, NH₃ y formas inorgánicas triviales de arsénico y antimonio. En contraste, el agua atravieza con una mayor facilidad, por lo cual se le ha dado una mayor relevancia. (Bienert y Chaumont, 2014; Bienert *et al.*, 2006).

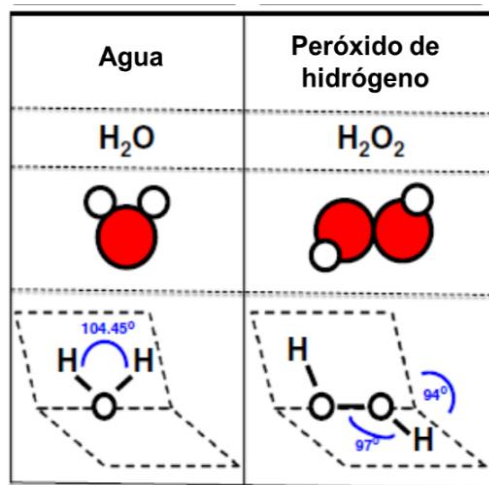


Figura 1.5 Estructura molecular y arreglo estérico de la molécula de H₂O₂. Los átomos de oxígeno y el hidrógeno se muestran en círculos rojos y blancos, respectivamente. En ambas, los pares de electrones desapareados del oxígeno se encuentran en dirección opuesta de los átomos de hidrógeno, los cuales dan lugar a la polaridad de la molécula de H₂O₂ (Bienert y Chaumont, 2014).

El transporte de H₂O₂ es de difusión libre en las membranas lipídicas; sin embargo, la forma a través de ellas depende de su composición (Figura 1.6). Las proteínas canales de membrana facilitan la difusión de H₂O₂ y la diferencia de la permeabilidad debe reflejarse de acuerdo al compartimento celular y la capacidad de este de llevar a cabo un transporte facilitado. (Bienert *et al.*, 2006).

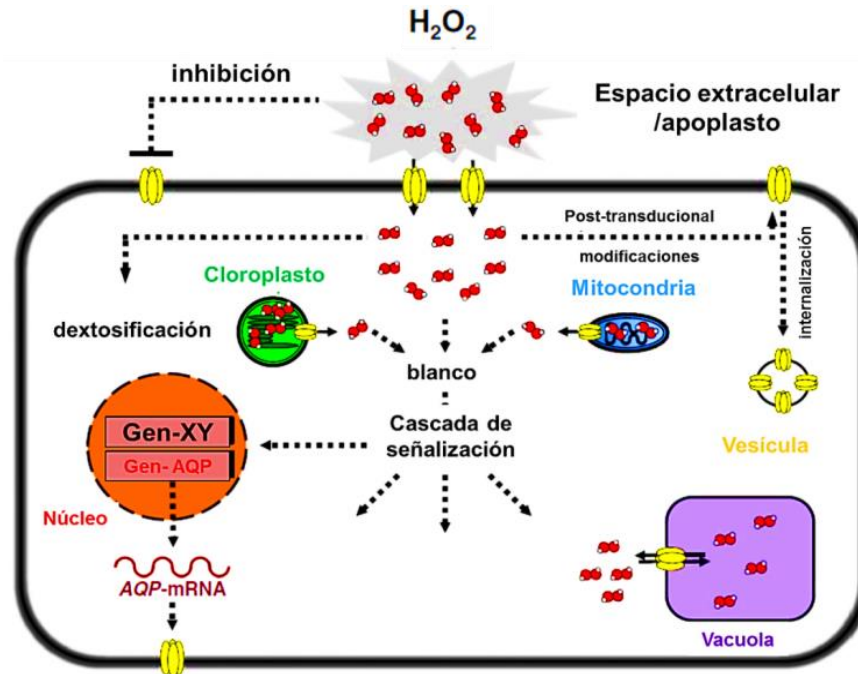


Figura 1.6 Modelo propuesto sobre el transporte del H_2O_2 desde el apoplasto hacia la membrana, por las aquaporinas, y su introducción hacia el citosol. El H_2O_2 puede difundir libremente hacia la membrana; sin embargo, las aquaporinas podrían estar participando en la difusión de esta molécula al interior de la célula. Una vez en el interior de la célula, el H_2O_2 puede dirigirse libremente hacia los compartimentos celulares (Bienert y Chaumont, 2014).

1.5.3 EL METABOLISMO OXIDATIVO DEL H_2O_2 EN LA CÉLULA

El H_2O_2 se encuentra relativamente estable bajo las condiciones fisiológicas y es menos reactivo en comparación con las otras ROS (Bienert *et al.*, 2006). Sin embargo, el H_2O_2 es muy reactivo con moléculas que contienen Fe^{2+} u otros metales de transición, a través de reacciones tipo Fenton. El resultado de estas reacciones es la homólisis del H_2O_2 a $2 \cdot OH$, esta última molécula es la especie reactiva más tóxica (Cheeseman, 2007).

El H_2O_2 tiene un efecto dependiente de su concentración sobre la conjugación de las proteínas de mamíferos, al modificar el tipo SUMO-ubiquitinación (small ubiquitin-like modifier, pequeña ubiquitina modificadora). Las concentraciones de H_2O_2 generadas por la activación por macrófagos inhiben la conjugación del SUMO, a concentraciones altas (10 mM), y la desconjugación del SUMO es inhibida causando un incremento en los niveles de sumoilación. La sumoilación es un importante regulador de la localización, actividad y estabilidad de muchas proteínas, así mismo su regulación depende de la

concentración y su modificación de las proteínas, para asegurar la respuesta biológica apropiada para incrementar los niveles del H_2O_2 (Veal *et al.*, 2007).

En los organismos una respuesta al aumento de los niveles de H_2O_2 es el incremento en la producción de antioxidantes. Estos pueden ser de tipo enzimático y no enzimáticos y limitan los efectos del H_2O_2 cerca del lugar de su producción. Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser las vitaminas C y E y los carotenoides. Por otra parte, las células contienen una gran variedad de enzimas antioxidantes que dan lugar a la reducción del H_2O_2 ; las cuales pueden ser distinguidas por su regulación catalítica, la reducción de peróxidos, catalizados por: glutatión peroxidasa y la tioredoxina peroxidasa (peroxiredoxinas).

El H_2O_2 es eliminado por las catalasas y las peroxidasas. La catalasa es una enzima altamente eficiente y ampliamente expresada en el peroxisoma, en donde los niveles de las ROS son elevados. Esta enzima también se encuentra en el citosol y la mitocondria. Se ha sugerido que la regulación por fosforilación de la tirosina en la catalasa proporciona un mecanismo fino para iniciar distintas respuestas a bajos y altos niveles de peróxido. La localización apropiada de las enzimas es importante para la compartimentalización del H_2O_2 dentro de la señalización, proporcionando un mecanismo para restringir el incremento del H_2O_2 a un compartimento celular en específico.

1.5.4 EL H_2O_2 COMO UNA MOLÉCULA SEÑAL

En años recientes, el H_2O_2 se ha establecido como un importante regulador de transducción de señales en eucariotes (Veal *et al.*, 2007). En mamíferos, el H_2O_2 es bien conocido como mensajero secundario funcionando mediante la activación de factores de transcripción, como el NF- κ B (factor nuclear kappa B) y AP-1. Sugiriendo que el H_2O_2 actúa como un transductor de la señal redox-sensible (Inzé y Van Montagu, 1995).

Houot y colaboradores (2001) demostraron que en células BY-2 que el H_2O_2 está involucrado en la HR y SAR, induciendo la PCD mediante un proceso similar a la apoptosis (contracción celular, condensación de cromatina, vesicularización de membrana nuclear y plasmática, formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN), pero de una manera dosis-dependiente. Además, induce a la PCD dependiente del flujo de Ca^{2+} y de la fosforilación de proteínas.

El H_2O_2 producido durante el estallido oxidativo actúa como una molécula señal induciendo la transcripción de genes que codifican para proteínas como la glutatión-S-transferasa, la GPX en la periferia celular, enzimas para la biosíntesis de lignina, la fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasas. También el H_2O_2 es necesario para el rápido entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular y puede provocar la muerte celular programada. Adicionalmente, el H_2O_2 puede activar vías que estimulen la proliferación celular, diferenciación, migración y apoptosis (Bienert *et al.*, 2006).

Un sistema modelo de líneas de suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana* ha sido utilizado para tratar de explicar los procesos de señalización requeridos para la generación de H_2O_2 y las respuestas celulares que induce. Con base en lo anterior, se ha encontrado que los niveles de H_2O_2 incrementan primariamente de la dismutación de $\cdot O_2^-$, el cual se forma vía una simple reducción del O_2 molecular, catalizada por una enzima similar a la NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática (Bhattacharjee, 2012).

La producción regulada y la señalización de H_2O_2 están intrínsecamente conectado a otras moléculas de señalización como el óxido nítrico (NO).en la regulación del crecimiento de las plantas, en la respuesta de defensa y en el control de asociaciones simbióticas con bacterias y hongos (Foyer y Noctor, 2013). Por otra parte, el H_2O_2 puede influir en el reciclaje del glutatión oxidado (GSSG) y del reducido (GSH) teniendo un impacto en el estado redox.

1.6 EL ÁCIDO SALICÍLICO

El ácido 2-hidroxibenzóico o ácido salicílico (AS) pertenece al grupo de los compuestos fenólicos, cuya estructura química está constituida por un anillo aromático con un grupo hidroxilo o un derivado funcional (Figura 1.7). Su fórmula molecular es $C_7H_6O_3$ con una masa molecular de 138.1 g/mol (Cuéllar *et al.*, 2008).

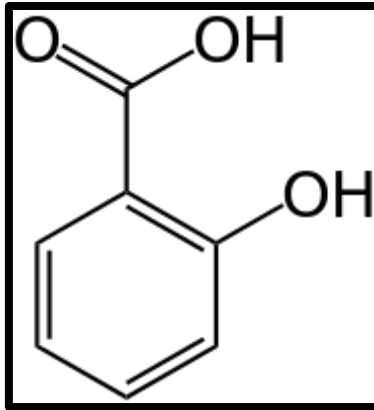


Figura 1.7 Estructura química del ácido salicílico

El AS fue extraído de la corteza del sauce (*Salix spp.*) y fue reconocido como una sustancia terapéutica, debido a su componente activo conocido como salicina (Jack, 1997; Malamy y Klessig, 1992). La síntesis de un derivado menos irritante a la mucosa gástrica el ácido acetil salicílico, fue designado aspirina por la industria farmacéutica (Jack, 1997; Bayer ® Germany, 1899).

1.6.1 METABOLISMO DEL AS

Un amplio rango de organismos procariotes y eucariotes incluyendo a las plantas producen AS. A través del uso de modernas técnicas analíticas, el AS ha sido encontrado en algunas plantas, tales como: el arroz, la cebada y la soya, donde su concentración de AS es en promedio de 1 mg/g de masa fresca (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011).

El AS puede ser biosintetizado a través de dos distintas vías que requieren como metabolito precursor al corismato (Figura 1.8). Una de las rutas de biosíntesis de este compuesto es a través de la de los fenilpropanoides, la cual inicia con el aminoácido L-fenilalanina que se convierte en ácido cinámico por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La segunda ruta de biosíntesis del AS conocida es a través del iscorismato, en un proceso que implican la participación de las enzimas isocorismato sintasa (ICS) e isocorismato piruvato liasa (IPL) (Rangel *et al.*, 2010; Hayat y Ahmad, 2007)

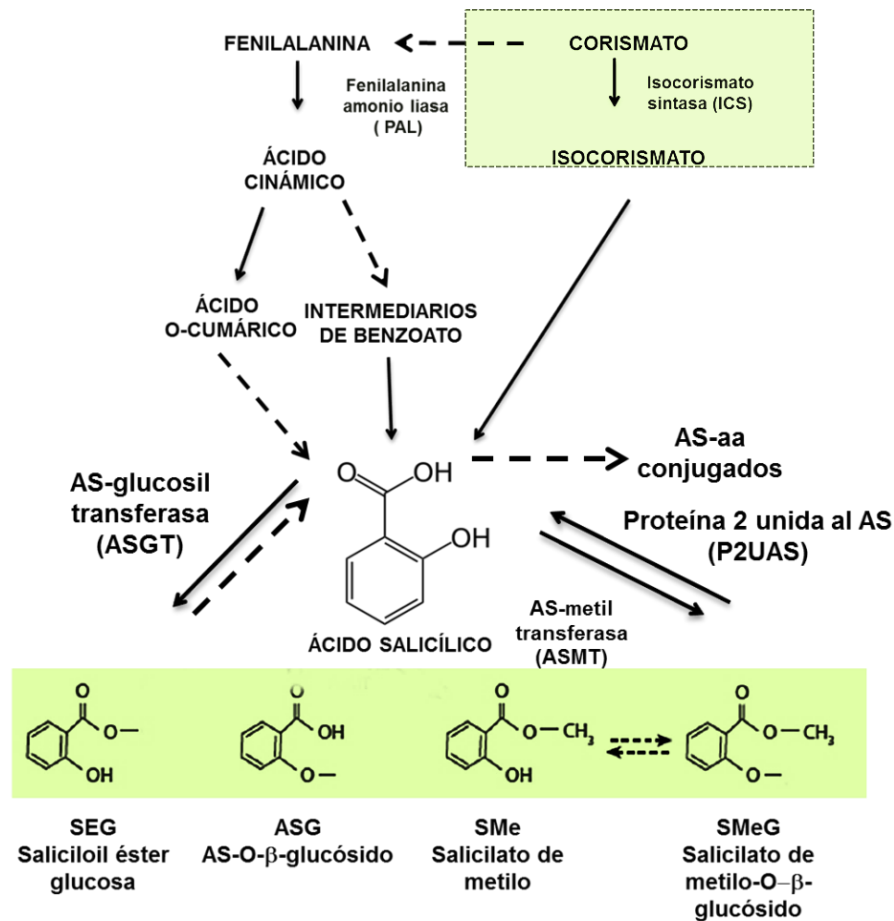


Figura 1.8 Vía metabólica propuesta en *Arabidopsis thaliana* para la biosíntesis del AS, a través de dos diferentes rutas: 1) La fenilalanina y 2) El corismato mediante la isocorismato cinasa produce isocorismato, el cual es convertido a AS y derivados (SEG, salicílico éster glucosa; ASG, AS-o-β-glucósido; SMe, salicílico de metilo; SMeG, salicilato de metilo-o-β-glucósido) del mismo, por la isocorismato piruvato liasa (IPL) (Rangel *et al.*, 2010).

Esta última ruta ha demostrado a ser la principal vía biosintética de AS en respuesta al ataque por patógenos, bacterias, etc, contribuyendo de esta forma al 90% del AS total en respuesta al estrés (Janda y Ruelland, 2015; Kumar, 2014). En *Arabidopsis*, el AS es sintetizado probablemente en los cloroplastos, mientras que en tabaco, la enzima ASGT parece estar localizada en el citosol (Dean *et al.*, 2005).

Una vez sintetizado el AS es glucosilado, metilado o conjugado con diferentes aminoácidos (Figura 1.9) para que pueda ser transportado, metabolizado o compartimentalizado (Raskin *et al.*, 1990).

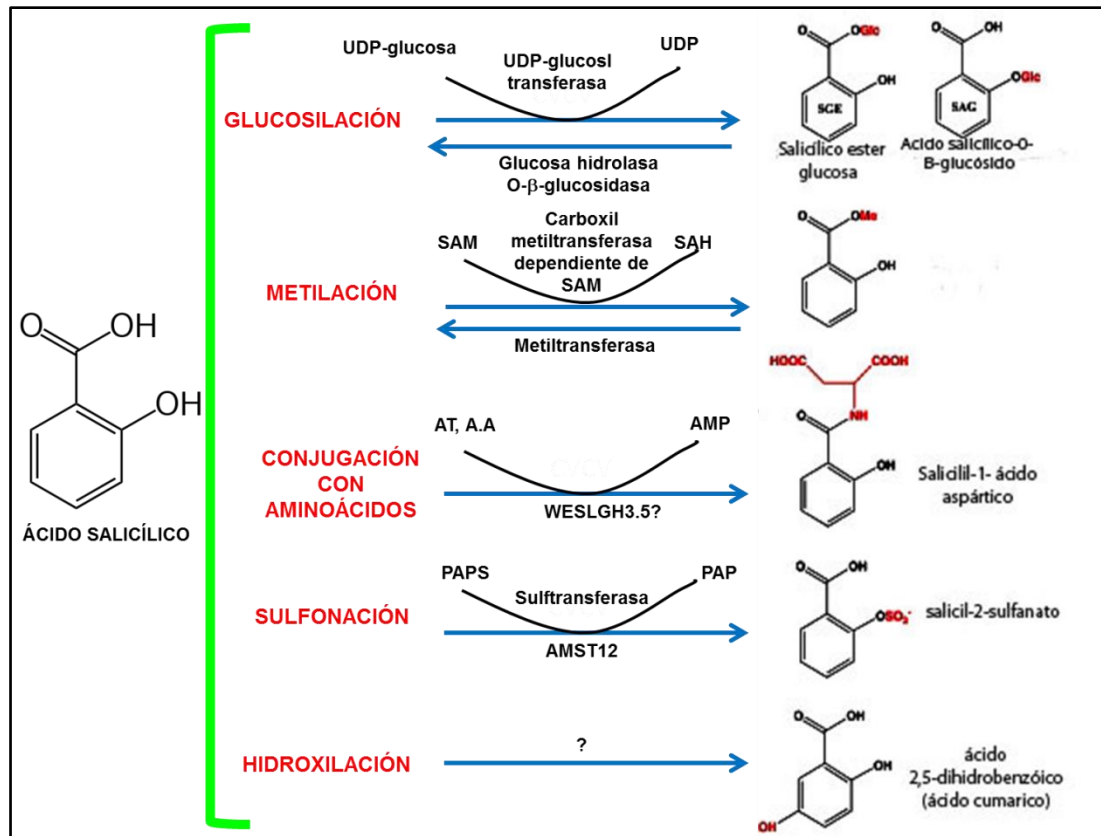


Figura 1.9 Modificaciones químicas que sufre el AS en la célula. El AS es convertido a sus moléculas conjugadas inactivas ó activas, las cuales tienen la capacidad de participar en diferentes rutas metabólicas, según sea requerida (Dempsey *et al.*, 2011).

La mayoría del AS producido en las plantas es convertido a AS-O-β-glucosilado (SAG) por una AS-glucosiltransferasa (ASGT). En *Arabidopsis*, se encuentran dos enzimas ASGT; una preferentemente convierte el AS a SAG, en tanto que la otra da lugar a un derivado de AS de menor abundancia, el éster de glucosa saliciloilo (SEG).

El AS metilado (MeAS) y su forma glucosilada (MeSAG) se acumulan en niveles elevados, en tanto que el SAG y el MeSA son biológicamente inactivos. En contraste, una forma hidrolizada del AS, el ácido 2,5-dihidrobenzóico ó ácido gentísico, se acumula en

las plantas induciendo un conjunto de genes R. A su vez, la conjugación de AS con aminoácidos afecta su acción, pues altera la expresión del gen que codifica a la enzima acil- adenilato/tioéster (GH3.5), la cual está involucrada en este proceso (Vlot *et al.*, 2009).

El AS también puede ser hidroxilado por medio de la salicilato-3-hidroxilasa (SH3) a 2,3-ácido dihidroxibenzóico (2,3-DHBA, ácido gentísico). La transcripción de la SH3 es inducida en respuesta a la acumulación de AS y regula negativamente su concentración. Finalmente, la sulfonación del AS es otro mecanismo de conjugación que se ha demostrado solamente en ensayos *in vitro* (Janda y Ruelland, 2015).

1.6.2 TRANSPORTE DEL AS EN LA CÉLULA

El AS libre es móvil y puede ser transportado dentro de la planta, principalmente vía floema. La capacidad del AS para difundir a través de la membrana depende de propiedades como el tamaño de la molécula, área superficial, número de donadores de hidrógeno, etc. (Bonnemain *et al.*, 2013).

El SAG es la forma inactiva del AS que es transportada a la vacuola donde se almacena; siendo convertida a AS en caso de ser necesario (Dean *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1993). El SAG es secuestrado en la vacuola por un mecanismo de transporte “cassett unido a ATP” o por un mecanismo antiport H^+ (Figura 1.10). En las células de soya, la acumulación de los conjugados del AS en la vacuola ocurre a través del mecanismo antes mencionado, en tanto que en células de tabaco ocurre a través del mecanismo antiporte- H^+ , el cual obtiene la energía necesaria del gradiente de protones proveniente de la bomba de H^+ del tonoplasto (Bonnemain *et al.*, 2013).

El AS endógeno también puede entrar en las células vecinas, a través de los plasmodesmo (vía simplástica) o la pared celular (vía apoplástica) yendo de la célula donadora a la célula receptora. En el compartimento apoplástico (pH 4.5-5.5), el AS puede acumularse en el citosol (pH ~7.0) bajo esta forma iónica vía el mecanismo trampa iones.

El MeAS es inactivo, pero es volátil y puede difundir rápidamente a través de la membrana. Este mecanismo permite la reducción del AS acumulado, que resultaría tóxico y potencialmente mortal (Bonnemain *et al.*, 2013).

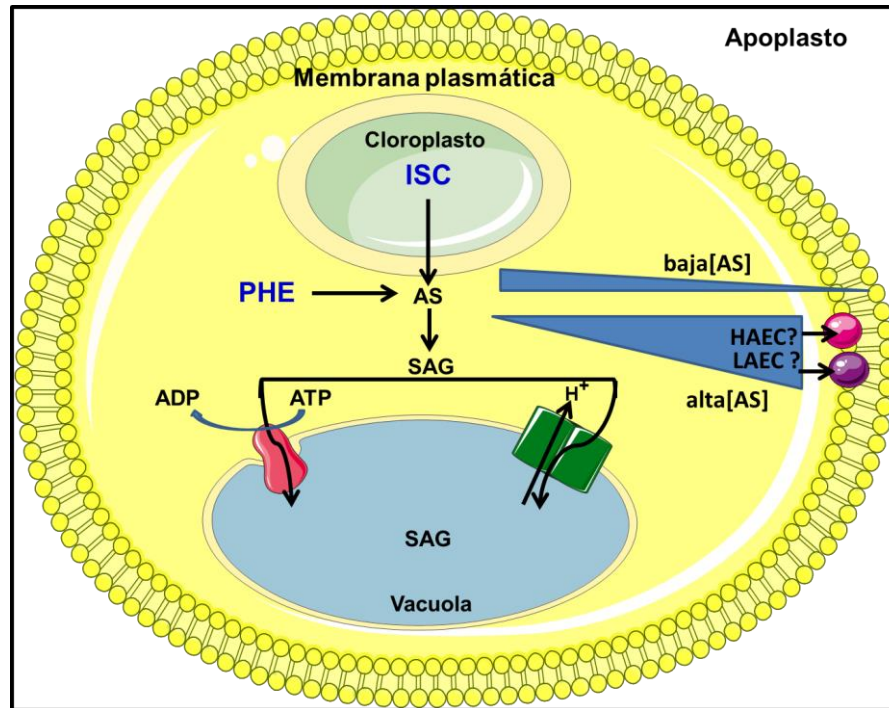


Figura 1.10 Transporte del AS a través de los compartimentos celulares. ISC: vía isocorismato; PHE: vía fenilalanina; LAEC: transportador de baja afinidad (Modificado de Bonnemain *et al.*, 2013).

Un componente importante en la biosíntesis y la señalización por el AS es el EDS5 (Enhanced Disease Susceptibility 5), un miembro de la familia de transportadores MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion), localizado en la membrana de los cloroplastos y podría transportar al AS hacia el citosol (Janda y Ruelland, 2015).

1.6.3 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL AS

El AS participa como una molécula clave en la respuesta de inmunidad innata en las plantas, es por esto que debe ser capaz de unirse a un blanco celular o receptor que active una compleja red de regulación génica involucrada en la señalización del AS (Yan y Dong, 2014; Vlot *et al.*, 2009). Algunos de esos receptores son proteínas de unión al AS que tienen un papel directo o indirecto en los procesos de señalización de defensa (Kumar, 2014).

En lo que respecta al encendido, una proteína tipo lipasa Enhanced Disease Susceptibility 1 (EDS1) actúa como señal para la activación del AS en la resistencia

a patógenos biotrópicos, reconocimiento de adaptadores en el hospedador, así como en iniciar una inmunidad mediada por el efector (ETI) y un subconjunto de genes TIR-NBS-LRR.

El mecanismo de señalización del AS que conduce a la inducción de genes de defensa para la represión de alguna señal extracelular, incluye la interacción proteína-proteína y proteína-AS. Se han identificado cuatro proteínas de unión al AS en tabaco. La primera SABP (SA-Binding Protein) fue identificada como una catalasa, la cual degrada al H_2O_2 y es específicamente inhibida por el AS y sus análogos biológicamente activos. Adicionalmente, el AS inhibe la actividad de la ascorbato peroxidasa (APX) citosólica, dando lugar al aumento en los niveles de H_2O_2 . De esta forma, el AS contribuye a la acumulación de H_2O_2 durante el estallido oxidativo, el cual es inducido por la infección por patógenos avirulentos.

La proteína SABP2 tiene una alta afinidad por el AS y dicha unión inhibe su actividad de esterasa, facilitando la acumulación de MeAS en el tejido infectado para su posterior transporte al tejido no infectado (Vlot *et al.*, 2009). Por lo anterior, se sabe que esta proteína no funciona como un receptor de AS, sino que convierte al AS en MeAS, un compuesto biológicamente inactivo, que puede ser activado durante la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Yang y Dong, 2014). Otra proteína que se une al AS es la SABP3, una anhidrasa carbónica (CA) cloroplástica en tabaco, la cual cuando es S-nitrosilada impide la unión al AS (Vlot, *et al.*, 2009).

El AS puede unirse a proteínas que contienen hierro, como la aconitasa, la lipoxidasa y la peroxidasa. Por lo tanto, estas enzimas constituyen blancos celulares del AS; sin embargo, eso no las hace ser consideradas como receptores específicos (Yan y Dong, 2014). Además, algunos reguladores transcripcionales (NPR1, TGAs) son sensores redox que pueden ser directa o indirectamente afectados por enzimas oxidoreductasas TRX/GRX en respuesta al JA ó AS y la señalización redox (Lu *et al.*, 2016; Carls *et al.*, 2015; Herrera-Vázquez *et al.*, 2015).

Posteriormente, se identificó al gen NPR1 (Non Expressor Protein Related) como un regulador clave en la vía de señalización. En ausencia de AS, NPR1 forma un oligómero en el citosol para prevenir la activación temprana de defensa. Durante la infección por un

patógeno o por el tratamiento con AS exógeno, NPR1 es reducido a monómeros como resultado de cambios redox en la célula, y es traslocado al núcleo para regular la expresión de genes de defensa. Por lo tanto, NPR1 tiene un papel como un coactivador transcripcional de la expresión de genes SAR (Yan y Dong, 2014).

Los homólogos de NPR1, NPR3 y NPR4 son candidatos a receptores del AS, dado que ambos contienen dominios BTB y aumentan la resistencia a enfermedades. Al parecer, existe una relación entre NPR3/4 y NPR1 que está regulado según los niveles de AS, en tanto, NPR3 y NPR4 deben unirse al AS para regular su interacción con NPR1 (Figura 1.11).

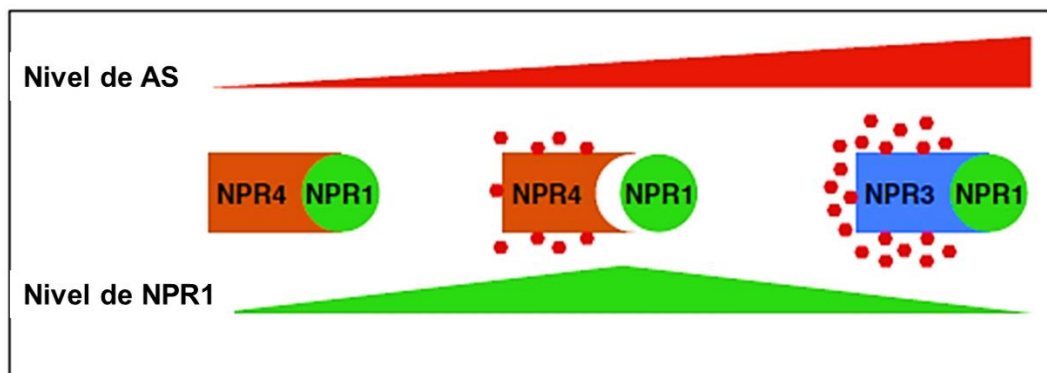


Figura 1.11 Proteínas de unión al AS, NPR3 y NPR4; controlan los niveles de NPR1.

En *Arabidopsis* se describió que el factor de transcripción WRKY70 presenta, a nivel molecular, un antagonismo entre las rutas de señalización de defensa mediadas por el AS independiente de NPR1 y reprimida por el AJ. Por otro lado, la MAP cinasa MPK4 representaría el ejemplo contrario a WRKY70 como activador de los genes de respuesta, ya que es una proteína necesaria para la expresión génica en respuesta al AJ (Rangel *et al.*, 2010).

1.6.4 EL AS EN EL SISTEMA INMUNE DE LAS PLANTAS

La primera reacción de defensa que comúnmente se presenta en las plantas es la respuesta hipersensible (HR), caracterizada por la inducción de una rápida muerte celular en el sitio del ataque, y así como cambios a nivel fisiológicos, como son flujo de iones de Ca^{2+} , K^+ y Cl^- a través de la membrana, cambios de pH, despolarización de la membrana y un estallido oxidativo que incrementa rápidamente los niveles de especies reactivas de

oxígeno (ROS) que inducen la PCD (Kawanoy Bouteau, 2013). Además está asociada con una inducción co-ordinada de un conjunto integrado de respuestas de defensa, como son lignificación de la pared celular, síntesis de fitoalexinas y acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs) (Pieters y Van Loon, 1999). A las pocas horas de la infección, el incremento en las PRs da paso a la respuesta sistémica adquirida (SAR), la cual proporciona un amplio espectro de resistencia a patógenos (Vlot et al., 2009).

La SAR involucra distintas vías de transducción de señales, dentro de las cuales el AS es un componente clave en la señalización de defensa. Durante la SAR ocurre un incremento de la síntesis del AS endógeno, no únicamente en el sitio de infección sino de forma sistémica, es decir en los tejidos próximos no infectados (Kawano y Bouteau, 2013). De esta forma en las plantas la señal generada en el tejido infectado es transmitida vía floema/xilema a sitios distantes en la planta para que los otros tejidos puedan defenderse (Figura 1.12). La SAR puede ser suprimida por la acumulación de MeAS en los tejidos o células generadoras de la señal (Vlot *et al.*, 2009).

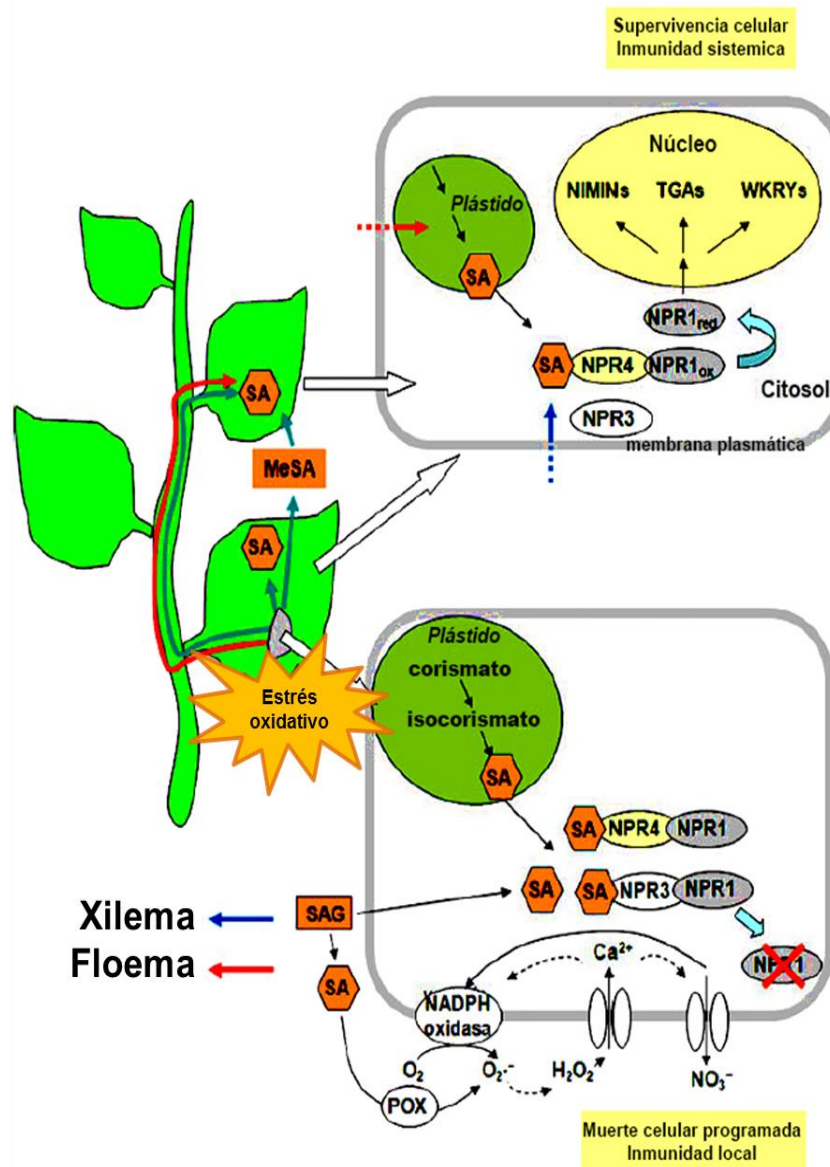


Figura 1.12 Participación del AS en el sistema inmune de las plantas (Kawano y Boteau, 2013).

1.6.5 PAPEL DEL AS EN LAS PLANTAS

En plantas, el AS regula diversos procesos fisiológicos como, por ejemplo: el crecimiento celular, la respiración, la apertura de estomas, la senescencia, el desarrollo de plántulas y la termotolerancia. Tiene un papel relevante en la respuesta a diferentes estrés de tipo abióticos, como son: bajas temperaturas, calor, toxicidad por metales pesados, sequía, estrés osmótico y salinidad (Janda y Ruelland, 2015). Además, como se ha mencionado,

está involucrado en la inmunidad en respuesta al ataque por patógenos (Vlot *et al.*, 2009; Yan y Dong, 2014).

En el caso de la función del AS, tanto endógeno como exógeno, en la termogénesis, se ha observado la inducción de la expresión de una oxidasa alternativa, que aumenta la capacidad de la vía respiratoria mitocondrial, donde el flujo de electrones y el citocromo generan ATP en un sólo paso y la energía potencial restante es liberada como calor (Vlot *et al.*, 2009; Dempsey *et al.*, 2011).

Por otra parte, el tratamiento con AS, así como con sus análogos sintéticos: el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y el S-metil éster del ácido benzo-1,2,3,-tiazol-7- carbotiólico (BHT) inducen la expresión de genes PR y/o la resistencia a diferentes patógenos como virus, bacterias y hongos. Adicional a la regulación de la expresión génica en la defensa en las plantas, se ha demostrado que los tratamientos con AS pueden inducir la generación del anión superóxido, seguido de un incremento transitorio de la concentración citosólica de calcio libre en suspensiones celulares de tabaco (Yan y Dong, 2014).

El AS ha sido aplicado a diferentes plantas para estudiar las vías de síntesis de algunos metabolitos secundarios. Por ejemplo, en cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense* Jacq., se han encontrado que el AS incrementa el contenido de capsaicinoides (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010). Por su parte, Rodas-Junco y colaboradores (2015) observaron que el tratamiento con AS de las suspensiones celulares de *C. chinense* da lugar a un incremento del AS total intracelular, así como de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), involucrada en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides que conduce a la producción de vainillina y capsaicinoides, sugiriendo que la señalización mediada por el AS podría estar involucrada en el incremento en los niveles de capsaicinoides.

Se sugiere que un efecto de la aplicación exógena de AS (0.001-10 μ M AS) para mitigar un daño celular está acompañado de una alta capacidad fotosintética y una variabilidad en el contenido de clorofila. Además, en plantas de cebada la actividad de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RUBISCO) disminuye, mientras que la de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) incrementa al aumentar el contenido de AS. En plantas de trigo bajo tratamiento con diferentes concentraciones de AS (0.05-1 mM) se estimula el flujo de

electrones asociado con los fotosistemas-I y II, con el consecuente incremento de la producción de ROS (Janda *et al.*, 2014).

En algunos casos, el efecto del AS sobre el metabolismo de las plantas puede ser indirecto al alterar la síntesis y/o la señalización de otras fitohormonas incluyendo al ácido jasmónico (JA), el etileno (ET) y las auxinas (Rangel *et al.*, 2010).

1.7 RELACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LAS ROS CON EL AS

El estudio sobre la relación entre el AS y las ROS comenzó cerca de los años 1980's, con una serie de experimentos que identificaron al AS como una molécula que tiene un papel importante en la relación planta-patógeno. Entonces, se demostró que la aplicación de ácido acetilsalicílico (ASA) protege a las plantas de tabaco de la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV), así como induce la expresión de los genes PR en los modelos de tabaco y *Arabidopsis*.

En contraste, en 1983 Doke reportó que la infección por *Phytophthora infestans* a los tubérculos de papa provoca la generación del radical anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) en la membrana plasmática de las células hospedaderas. Por lo anterior, se comenzó a sugerir que las ROS funcionan como señales químicas requeridas durante la inducción de la respuesta hipersensible (HR), liberadas en el espacio intercelular durante la muerte celular. En general, el reconocimiento de los patógenos conduce al estrés oxidativo

Algunos de los primeros estudios en relación al estrés oxidativo indicaron que el AS es un inductor de la señal oxidativa, el cual está esencialmente involucrado en el desarrollo de la SAR frente a varios patógenos (Kawano y Bouteau, 2013) y en el estrés abiótico. En línea con lo anterior, se propuso a principios de los 90's que la transducción de señales mediada por el AS que conduce a la SAR es llevada a cabo por la generación de H_2O_2 .

Desde que el AS fue reconocido como una molécula clave en respuesta de defensa para la patogénesis, diferentes grupos de investigación se interesaron en el mecanismo de acción de esta molécula. Al respecto, se sugirió que el AS inhibe a la actividad de la catalasa y de la ascorbato peroxidasa (Kawano y Bouteau, 2013) dando lugar al incremento de H_2O_2 intracelular o de otras ROS (Rangel *et al.*, 2010; Dat *et al.*, 2006).

El modelo propuesto para la inhibición enzimática mediada por el AS sugiere un mecanismo pasivo para incrementar las ROS y uno activo en donde está involucrada la peroxidasa extracelular y la NADPH oxidasa, que generan directamente ROS en presencia de AS (Kawano y Bouteau, 2013).

Por ejemplo, Wendehenne y colaboradores (1998) realizaron un estudio sobre la respuesta del AS y un análogo, el ácido-1, 2,3 tiadizol-7-carbotiólico-S-metilester sobre la actividad de las enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa. El AS en altos niveles inactiva la catalasa, produciendo a su vez altos niveles de H_2O_2 . Por el contrario, cuando el AS está presente en los niveles basales, los niveles de H_2O_2 son los adecuados para el funcionamiento de la célula vegetal (Figura 1.13).

El AS participa como una hormona en el control del estado redox de las plantas, probablemente sea mediante la regulación de la síntesis del glutatión, el cual protege a la planta contra el estrés oxidativo (Rubio *et al.*, 2009).

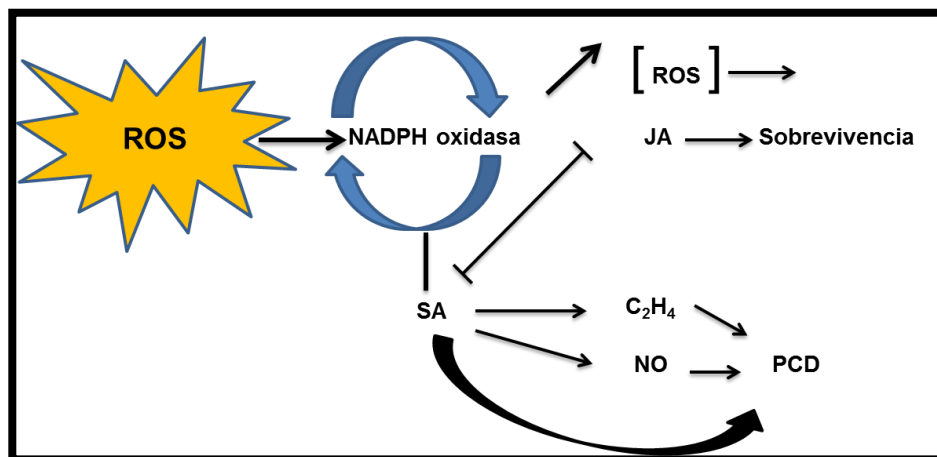


Figura 1.13 Diagrama propuesto para la señalización regulatoria de la muerte celular en plantas, que involucra a: ácido jasmónico (JA), óxido nítrico (NO), ROS y AS (Dat, *et al.*, 2006).

Dado que el H_2O_2 se produce en respuesta a una gran variedad de estímulos, es posible que sea un mediador entre diferentes vías metabólicas y una molécula señal que contribuye al fenómeno de tolerancia cruzada. La participación mejor conocida del H_2O_2 es como una molécula señal durante la respuesta hipersensible. Después del reconocimiento del patógeno ocurre la generación del H_2O_2 , el cuál produce los enlaces

cruzados de las proteínas y la unión de compuestos fenólicos en la pared celular y quizá tiene efecto microbicida. En soya, por ejemplo, el H_2O_2 induce a la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con la defensa como la glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GP). También se ha demostrado en *Arabidopsis* que se induce la expresión de GST y PAL (Camarena-Gutiérrez y de la Torre-Almaráz, 2007).

Una de las respuestas observadas después del ataque por patógenos es el estallido oxidativo, el cual involucra un incremento rápido de las ROS, como son el $\cdot O_2^-$ y el H_2O_2 en el apoplasto. El incremento inicial ocurre en respuesta a patógenos virulentos y avirulentos, y puede ser detectada en minutos. El incremento de las ROS, asociado a un estallido oxidativo, debe contribuir a la resistencia vía diferentes mecanismos incluyendo la defensa contra el patógeno invasor, causándole la muerte, así como la activación de proteínas de la pared celular y la lignificación que fortifican la pared celular y ayudan a confinar en el sitio de la infección.

El H_2O_2 dentro del estallido oxidativo pone en funcionamiento las respuestas de defensa relacionadas con la HR, la muerte celular y una baja expresión de genes para la señalización en la defensa. El aumento constitutivo de los niveles de las ROS también confiere un mejoramiento en la resistencia a enfermedades basado en el análisis en plantas de tabaco transgénico y papa. Así mismo, la relación entre el AS y las ROS es complicada, y se sugiere que el AS y el H_2O_2 forman un bucle de retroalimentación automática.

El incremento inicial de AS está acompañado con la generación de las ROS y también potencializa la producción de H_2O_2 , que a su vez aumenta la síntesis de más AS y la PCD. Se sugiere que los niveles de las ROS y la muerte celular que están controlados vía mitocondria y cloroplasto (Vlot *et al.*, 2009).

1.8 EL CHILE HABANERO *Capsicum chinense* Jacq.

El género *Capsicum chinense* pertenece a la familia de las Solanáceas (Figura 1.14), es un cultivo de gran importancia para el estado de Yucatán. Es el chile con mayor pungencia en el mercado, por encima de las 100,000 unidades Scoville (escala que mide el picor de los chiles). Los responsables de esta característica organoléptica son dos

compuestos: la capsaicina y la hidrocapsaicina, que además tienen interés farmacológico (García-Galindo *et al.*, 1995).



Figura 1.14. Cultivo de *C. chinense* Jacq. mejor conocido como chile habanero.

En el estado de Yucatán, es utilizado como suplemento culinario en diversos platillos, por lo que ha sido reconocido y cultivado principalmente en los estados de Campeche, Quintana Roo, Yucatán y Tabasco, dónde los primeros tres estados han recibido la denominación de origen del Chile Habanero de la península en el 2010 (SAGARPA, 2012).

1.9 MODELO DE ESTUDIO

El modelo empleado en el presente trabajo consistió en una suspensión de células de *C. chinense* (Figura 1.15a), generada a partir de la disgregación de callos friables (Figura 1.15b). Estos últimos se obtuvieron utilizando como explante el hipocotíleo de plantas de 20-25 días de edad del cultivar rojo de *C. chinense* Uxmal-02 (Rex), proveniente del germoplasma del INIFAP de Uxmal, Yucatán (Figura 1.15c). Para la generación de esta línea celular, se seleccionaron callos friables de 12 días de edad sin manchas oscuras posibles (Gutiérrez-Carbajal *et al.*, 2010).

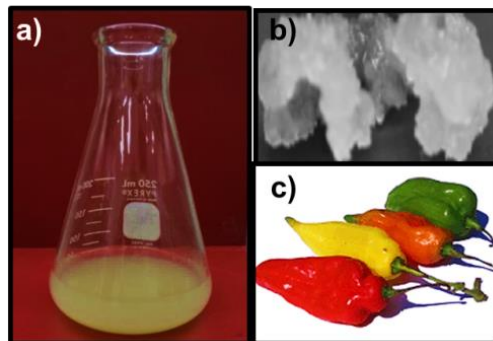


Figura 1.15 Modelo de estudio de *C. chinense*. a) se encuentran las células en suspensión en un medio líquido (Murashige y Skoog, 1962); b) callos friables que se disgregaron para formar la suspensión celular; c) el cultivo proviene de la variedad Uxmal-02 (Rex) cultivar roja.

1.10 ESTUDIOS REALIZADOS EN EL MODELO DE ESTUDIO

Se ha estudiado el efecto de la adición exógena de AS, en suspensiones celulares, demostrándose que existe un incremento en la síntesis del metabolito secundario vainillina, el cual fue analizado a través de la señalización fosfolipídica. Ésta última también presentó cambios en las actividades enzimáticas de sus enzimas participantes, la PLC y la PLD. También se midieron los niveles del ácido fosfatídico (PA), un mensajero importante dentro de la señalización fosfolipídica, los cuales aumentaron en respuesta a la adición del AS (Rodas-Junco *et al.*, 2015; Altúzar-Molina, 2008).

Muñoz-Sánchez y colaboradores (2013) demostraron que el tratamiento con AS modifica las actividades de la PLC y de la PLD de una manera dosis dependiente, así como que estas respuestas dependen de la edad del cultivo. Además Rodas-Junco y colaboradores (2015) evaluaron la participación del AS como inductor del metabolismo secundario y observaron que existe un incremento en la actividad de la PAL, así como de los niveles de vainillina.

Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con AS en las suspensiones celulares de *C. chinense* incrementa los niveles de PA, el cual era sintetizado preferentemente por la actividad de la PLC (Rodas-Junco *et al.*, 2014; Altúzar-Molina *et al.*, 2011).

En general, se conoce que el PA es un mensajero importante en la señalización fosfolipídica, capaz de activar diferentes enzimas como las MAP quinasa, peroxidasas y NADPH oxidasa. Por su parte, la NADPH oxidasa es una enzima que cataliza la generación de las ROS a partir del oxígeno molecular (O_2) a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y este es inmediatamente convertido a H_2O_2 mediante la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 participa en la periferia celular en la defensa, así como puede fácilmente difundir al citosol y de esta forma participar como segundo mensajero en respuesta a la defensa en estrés biótico y/o abiótico.

Por lo tanto, en este trabajo se planteó evaluar el efecto del AS en los niveles intra y extracelulares de H_2O_2 de las suspensiones celulares de *C. chinense*. Para lo cual, se propuso el siguiente planeamiento de estudio (Figura 1.16) a través de un mecanismo de respuesta a la aplicación exógena del AS, en relación a la señalización fosfolipídica.

Dado que el PA activa directamente a la enzima NADPH oxidasa, la cual participa en la generación de H_2O_2 , un segundo mensajero de gran importancia.

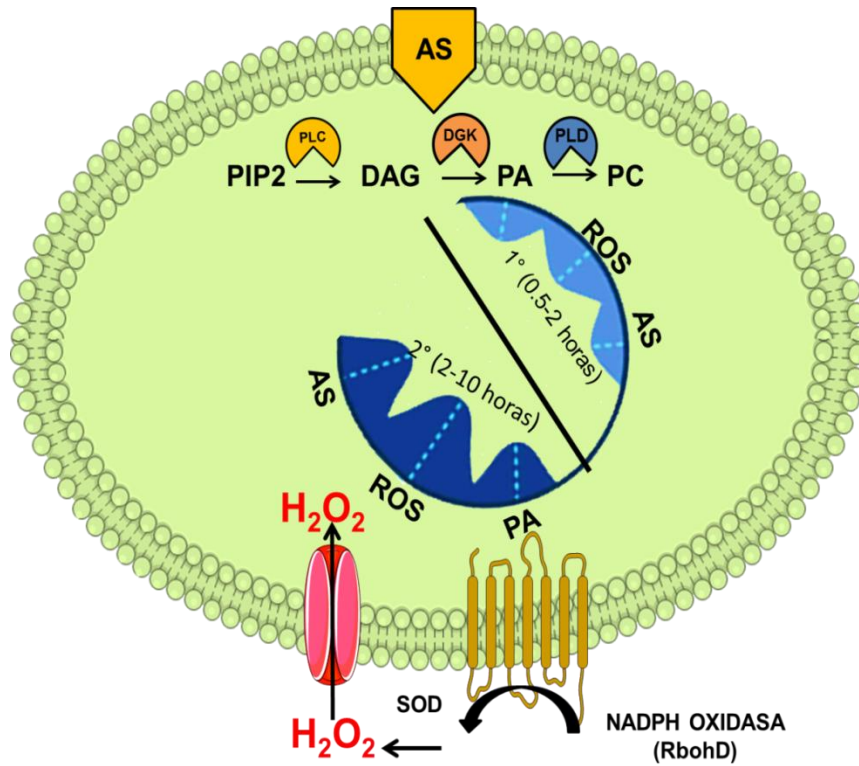


Figura 1.16 Modelo de estudio propuesto para el presente trabajo.

JUSTIFICACIÓN

El ácido salicílico es una hormona vegetal que participa en diversos procesos fisiológicos, el desarrollo en las plantas y también, está involucrado en la señalización de defensa a patógenos. En el grupo de investigación, se ha empleado al AS como un inductor del metabolismo secundario a través de la señalización fosfolipídica en suspensiones celulares de *C. chinense*; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual pudiera estar participando en estas. De manera general, se sabe que independientemente de la señal percibida ocurre un cambio en la acumulación de ROS, en particular la del H₂O₂, en repuesta al AS durante la respuesta a patógenos.

La aplicación exógena de AS incrementa los niveles de PA, un importante mensajero dentro de la señalización fosfolipídica que puede desencadenar la activación de diferentes enzimas, entre ellas la activación directa de la NADPH oxidasa, la cual genera H₂O₂ intra y extracelular. Adicionalmente, se ha determinado el papel de H₂O₂ como un segundo mensajero con una amplia respuesta de defensa.

Por lo tanto, se está interesado en conocer si la adición de AS tiene un efecto en los niveles intra y extracelulares del H₂O₂ en las suspensiones celulares de *C. chinense*.

HIPÓTESIS

Si la respuesta de AS está mediada por un estallido oxidativo, en particular mediada por el H_2O_2 como segundo mensajero, entonces la adición de AS a las suspensiones celulares de *C. chinense* modificará los niveles intra y extracelulares de H_2O_2 .

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del AS en las suspensiones celulares de *C. chinense* en los niveles intra y extracelulares de H_2O_2 .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Conocer el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de AS sobre la viabilidad de las células de *C. chinense*
2. Localizar los niveles intracelulares de H_2O_2 en respuesta a la adición del AS
3. Determinar los niveles extracelulares de H_2O_2 generados por las suspensiones celulares de *C. chinense* en respuesta al AS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

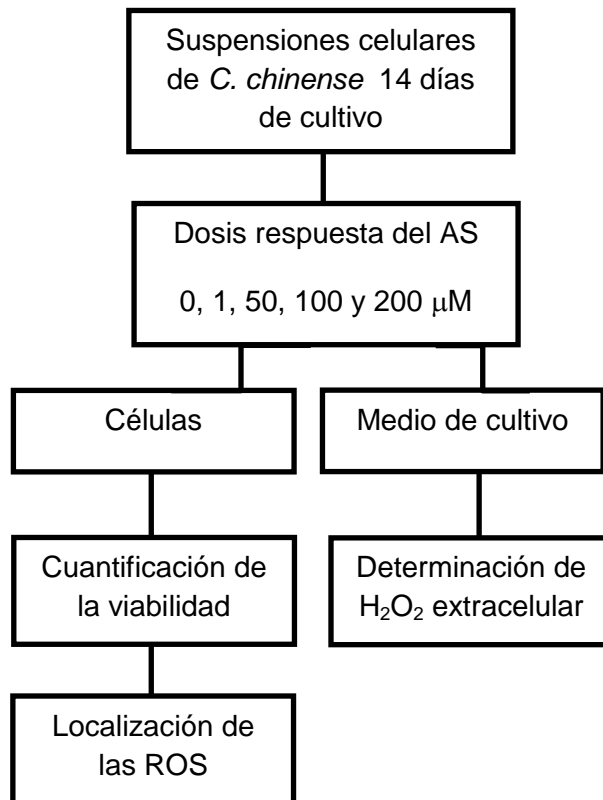


Figura 1.17 Diagrama de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

INTRODUCCIÓN

El modelo biológico que se utilizó en este trabajo fue una suspensión de células de *C. chinense* en un cultivo *in vitro* de células en suspensión de *C. chinense* Jacq. mantenida *in vitro*.

Las suspensiones celulares consisten en agregados de células distribuidas en un medio en movimiento obtenidas a partir de la incubación de callos friables en medio líquido. Algunos de los parámetros para caracterizar este tipo de cultivo son la actividad mitótica, el número de células, el peso seco, el peso fresco, la turbidez y el volumen. Otras características son su bajo grado de diferenciación celular y un crecimiento no sincronizado. Las suspensiones celulares cultivadas en medios sintéticos bien definidos y bajo condiciones ambientales controladas, representan un sistema de cultivo celular adecuado para la realización de investigación fisiológica y bioquímica (Szabados *et al.*, 2004; Mroginski y Roca, 2004).

2.1 MATERIAL VEGETAL Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO

El material vegetal empleado consistió en una línea de células en suspensión de *C. chinense*, la cual fue mantenida en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado 0.5 mM mio-inositol, 0.02 mM tiamina, 0.2 mM cisteína, 4 μ M ácido 2, 4-diclorofenoxiacético y 3% (p/v) sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.6, antes de su esterilización.

Las suspensiones se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 50 mL del medio de cultivo, en un cuarto con luz continua a una temperatura de 25°C y en agitación constante (100 rpm). Las células se subcultivaron cada 14 días para su mantenimiento.

2.2 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR

Se determinó la curva de crecimiento de la línea celular de *C. chinense*. Con este fin, se filtró y se pesó un gramo de células de 14 días de edad, que fue inoculado en matraces

con 50 mL de medio líquido (MS, pH 5.6). Los matraces fueron incubados a 25°C y en agitación continua a 100 rpm.

Se evaluó el crecimiento durante un periodo de 24 días, determinándose el peso fresco y el peso en doce puntos por duplicado. El peso fresco fue determinado filtrando la suspensión y pesando el material fresco. Para conocer el peso seco, las muestras se congelaron y posteriormente, liofilizaron (liofilizadora Labconco, Freezezone 4.5) durante 48 horas.

2.3 ETAPA DE PREACONDICIONAMIENTO

El efecto del AS en la línea de *C. chinense* se evaluó en suspensiones de 14 días de crecimiento preacondicionadas, como se describe a continuación: las células fueron filtradas y se pesó un gramo del peso fresco, el cuál fue colocado en 50 mL de medio MS a pH 5.6 fresco. Se incubó en agitación a 100 rpm durante 30 minutos. Enseguida se aplicó el tratamiento con las diferentes concentraciones finales 0, 1, 50, 100 y 200 μM AS; la aplicación de los tratamientos con AS dependiendo de cada análisis.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD

La viabilidad de las células fue determinada mediante la tinción con azul de Evans (Figura 2.1). Las células vivas no internalizan el colorante, excluyéndolo de su superficie, en tanto que las células muertas o con daño atrapan el colorante (Martín *et al.*, 2010).

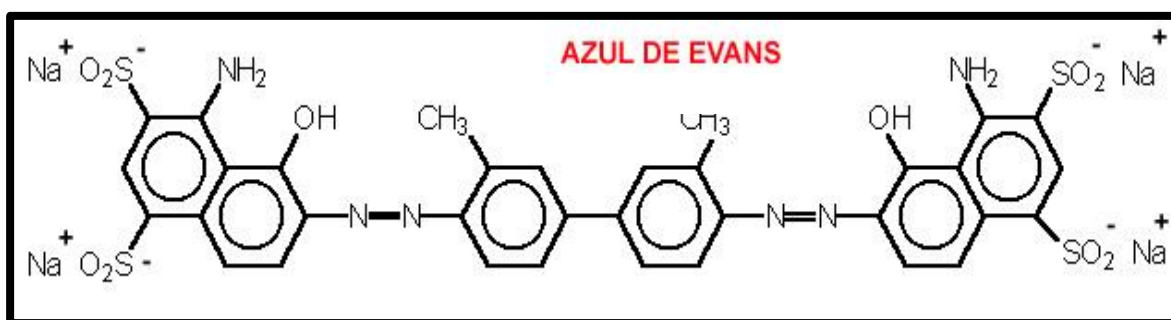


Figura 2.1 Estructura química del colorante azul de Evans. Su nomenclatura, según la IUPAC, es tetrasodio (6E,6'E)-6,6-[dimetilbifenol-4,4'-diil] di (1E) hidrazon-2-il-1-iliden] bis (4-amino-5-oxo-5,6-dihidronaftalen-1,3-disulfonato).

La cuantificación de la viabilidad con el azul de Evans se llevó a cabo en suspensiones celulares de 14 días de cultivo de acuerdo a modificaciones del método de Castro-Concha y colaboradores (2012), con algunas modificaciones. Las células fueron acondicionadas como se mencionó anteriormente y se tomaron alícuotas de 1 mL, las cuales fueron tratadas con las concentraciones finales de 0, 1, 50, 100 y 200 μ M de AS. Enseguida, se les adicionaron 10 μ l de una solución de azul de Evans al 0.25%, y se dejaron incubando durante 15 min. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 20,187 x g durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron lavadas con agua destilada hasta observar que el sobrenadante estuviera transparente. Después, el colorante se extrajo de las células con 2 mL de 50% (v/v) metanol y dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% durante 30 min y con agitación constante con el vórtex (Thermolyne TyPer 37600 Mixer). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20,187 x g durante 15 min. El sobrenadante fue colectado en tubos de 5 mL.

El testigo se preparó con una alícuota de 1 ml de la suspensión celular, que se expuso a a 70°C durante una hora; de esta forma, se aseguró tener el 100% de las células muertas. Inmediatamente, se le adicionó el azul de Evans y se realizaron los lavados correspondientes, dando lugar a un sobrenadante de un color azul intenso, aún después de los lavados. Las absorbancias de las muestras se cuantifican en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

2.5 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LAS ROS

La localización de las ROS en el interior de las células de *C. chinense* se llevó a cabo mediante el empleo de diferentes fluoróforos, los cuales permitieron la tinción de diferentes estructuras celulares: dihidroclorhidrato-4,6'-diamidino-2'-fenilindol (DAPI) para la tinción del núcleo, acetoximetil éster del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA-AM) para la identificación de las ROS, el N-(3-Trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dibutilamonio) fenil) hexatrionil) piridino (FM4-64) para endomembranas, blanco de calcofluor para la pared celular y Cell Mask para la membrana plasmática.

2.5.1 TINCIÓN DE LAS CÉLULAS DE *C. chinense* CON DIFERENTES FLUORÓFOROS

La tinción del núcleo se realizó con el fluoróforo dihidroclorhidrato 4', 6'-diamidino-2'-fenilindol (DAPI) (Figura 2.2). El DAPI es un colorante que se une selectivamente al surco menor de las regiones de adenina-timina en el ADN (Carballo, 2013). El colorante por sí solo tiene una longitud de onda de excitación/emisión de 349/488 nm, y en complejo DAPI-AT la una longitud de excitación/emisión cambio a 364/454 nm. La fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente. En contraste, también puede unirse al ARN en el complejo DAPI-AU, teniendo una longitud de emisión de ~500nm.

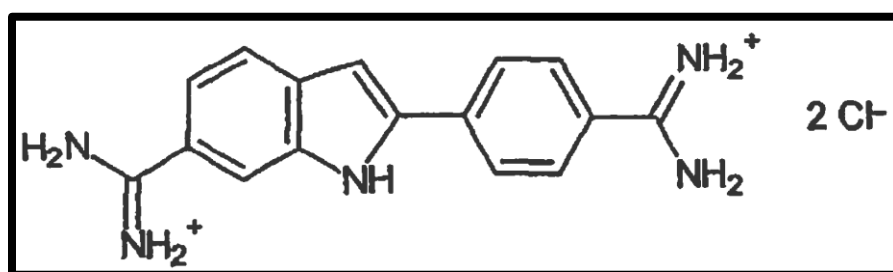


Figura 2.2 Estructura química del dihidroclorhidrato 4',6'-didiamidino-2'-fenilindol, dihidrocloruro, DAPI.

La pared celular se tiñó mediante el colorante blanco de calcoflúor (BCF). Su fórmula química se presenta en la Figura 2.3. Este colorante es un miembro de la clase de agentes blanqueadores fluorescentes. Tiene afinidad de unión a los compuestos de celulosa y quitina presentes en la pared celular de los organismos vegetales.

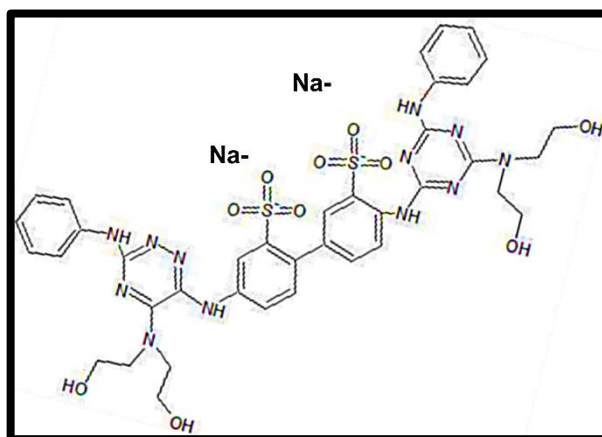


Figura 2.3 Estructura química del colorante blanco de calcoflúor

La tinción de las endomembranas se realizó con el fluorocromo N-(3-Trietilamonio)propil-4-(6-(4- dibutilamonio) fenil) hexatrionil) piridino (FM4-64). Este reactivo se utiliza en estudios de endocitosis, tráfico vesicular y la organización de organelos en células eucariotes (Figura 2.4). Este fluoróforo pertenece a una clase de colorantes estirilo anfifílico desarrollado por Betz y colaboradores (1992) y es fluorescente cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico, como las membranas celulares ricas en lípidos. En contraste, se realizó la tinción de la membrana plásmática con el fluoróforo CellMask™, el cuál está formado por moléculas anfipáticas, que contienen un motivo lipofílico y uno hidrofílico cargado negativamente, que permite su unión a ésta.

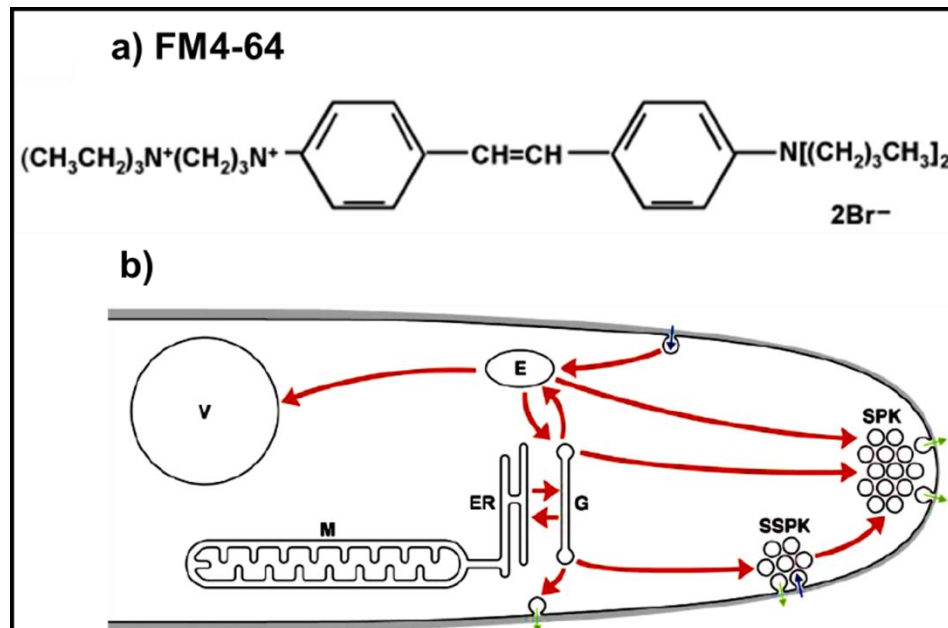


Figura 2.4 Esquema de internalización del FM4-64. a) Estructura química del N-(3-trietilamonio)propil-4-(6-(4-(dibutilamino) estiril) piridino) dibromuro FM4-64 e b) internalización del colorante dentro de la célula, que muestra la tinción de las diferentes membranas: v: vacuola, m: mitocondria, E: endosoma, ER: retículo endoplasmático, G: aparato de Golgi, SSPK y SPK: sistema de endosomas Spitzenkorper (Fisher-Partón, 2000).

La identificación intracelular de las ROS se realizó a través de la fluorescencia emitida por el fluoróforo acetoximetil éster del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA AM, Invitrogen). Este reactivo ha sido ampliamente utilizado para la detección de las ROS en las células. Los grupos carboxílicos y el acetometil éster (AM) dan lugar a una molécula sin carga, la cual es permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, los grupos lipofílicos son hidrolizados por esterasas no específicas; el producto hidrolizado es capaz de reaccionar inmediatamente con cualquiera de las ROS y de esta forma dar como resultado a la molécula fluorescente (Figura 2.5). La oxidación del producto del H₂DCFDA AM tiene una longitud de excitación/emisión de 495/529 nm.

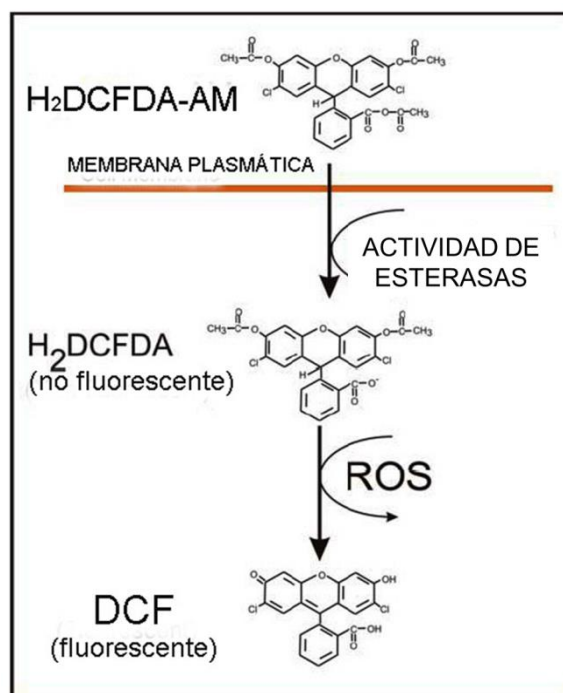


Figura 2.5 Hidrólisis del fluoróforo H₂DCFDA-AM. El grupo acetoximetil éster (AM), de este reactivo, le permite al H₂DCFDA-AM su fácil difusión en la célula. Una vez en el citoplasma es hidrolizado a H₂DCFDA, el cual es oxidado por cualquiera de las ROS, dando lugar al compuesto fluorescente DCF (Molecular Probes, Detection Technologies Invitrogen 2004).

2.5.2 LOCALIZACIÓN DE LAS ROS *in situ*

Para la localización de las ROS en las células de *C. chinense*, se utilizaron suspensiones de 14 días de cultivo, las cuales fueron acondicionadas con 1 g de células en 25 mL de Tritón X-100 al 0.1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 5.6. Se incubaron durante 30

min y luego se tomaron alícuotas de 200 μ l que fueron colocadas en tubos Eppendorf de 2 ml que contenían 800 μ l de amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 5.6. Se agregaron los colorantes en las condiciones que se muestran en el cuadro 2.1, y posteriormente, se aplicó el tratamiento con AS. Se evaluó cada muestra a los 0, 10, 20 y 30 min de tratamiento, mediante su observación en un microscopio confocal FluoView™ FV1000 (Olympus, Japan, con lámpara de mercurio).

Las muestras se prepararon en portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 10% y se cubrieron con cubreobjetos justo antes de su observación al microscopio confocal.

Cuadro 2.1 Condiciones para la tinción de las diferentes estructuras celulares en las células de *C. chinense*.

Tinción	Nombre	Concentración	Tiempo de internalización	Longitud de excitación/emisión (nm)
Núcleo	DAPI diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol	1 μ M	30 minutos	358/461
ROS	DCFDA AM- acetoximetil éster de diacetato de 2',7'diclorodihidro fluoresceína	100 μ M	30 minutos	495/527
Endo- membranas	FM4-64 dibromuro de N-(3- Trietilamoniopropil)-4- (6-(4- dibutilamino)fenil) hexatrienil) puridinio	1.74 μ M	15 minutos	558/734
Pared celular	Blanco de calcofluor	2 μ M	30 minutos	355/433
Membrana plasmática	Cell Mask™ Orange	0.1x	30 minutos	560/660

2.6 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EXTRACELULARES DE H₂O₂

La determinación de los niveles de H₂O₂ en el medio donde crecieron las células en suspensión de *C. chinense* se realizó mediante Amplex[®] (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina). El Amplex Red (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) es un compuesto no fluorescente que es empleado como una sonda para la determinación de H₂O₂ extracelular. El Amplex Red reacciona con el H₂O₂ en una relación estequiométrica 1:1 catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP), para dar lugar a la forma fluorescente: la resorufina (Figura 2.6).

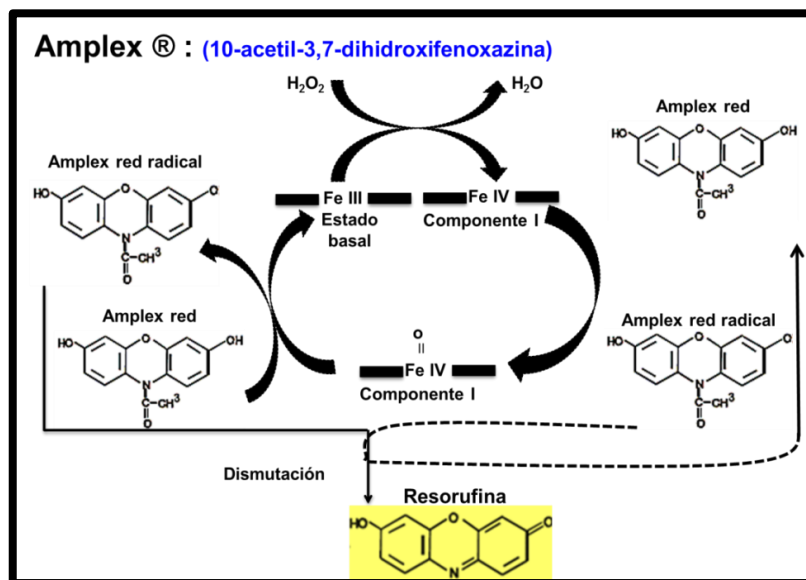


Figura 2.6 Reacción química del Amplex[®]. Este reactivo no fluorescente cambia a su forma fluorescente en presencia de H₂O₂, con la actividad de la peroxidasa de rábano (HRP).

Se elaboró una curva estándar de H₂O₂ (Figura 2.7), con una solución a 200 μM de H₂O₂ al 3% (p/p) y una solución de trabajo que contenía: 10 mM de Amplex[®] Red reagent, 0.1 U/ mL HRP y 50 mM amortiguador de fosfato de sodio a pH 7.4. La cuantificación de H₂O₂ se llevó a cabo por espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 570 nm.

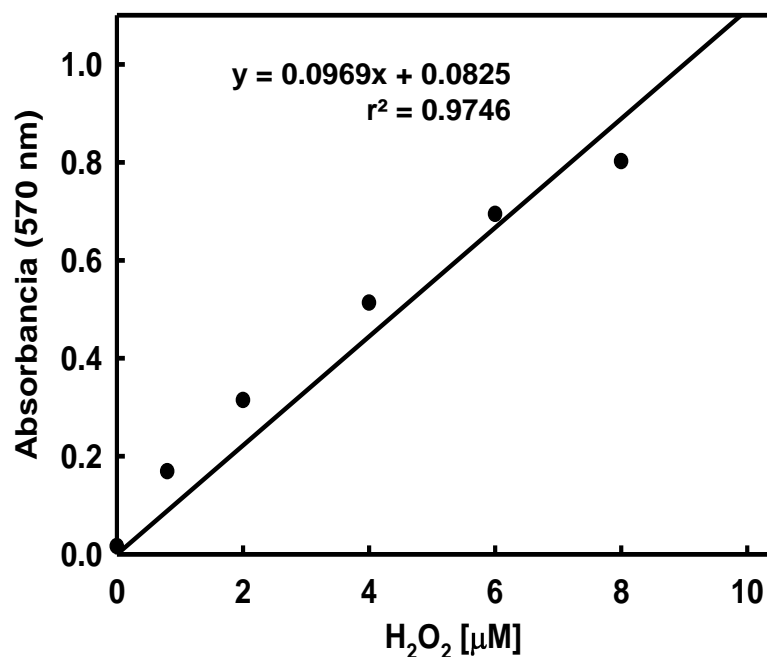


Figura 2.7 Curva estándar de H₂O₂ utilizando Amplex Red. El rango de H₂O₂ fue de 0-8 μM, concentración final.

Para la medición del H₂O₂ extracelular, las suspensiones celulares de 14 días de cultivo fueron acondicionadas en medio fresco durante 30 min. Después se tomaron alícuotas de 1 mL, que fueron colocadas en tubos Eppendorff de 1.5 mL y se les aplicó los tratamientos con AS (0, 1, 50, 100 y 200 μM) durante 30 minutos. Las muestras con tratamiento se incubaron en agitación a 60 x g a 25 °C. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 20, 187 x g durante 15 min.

El sobrenadante, que corresponde al medio de cultivo a evaluar, se colocó en tubos nuevos para su posterior medición con el Amplex ® Red reagent. Las absorbancias se determinaron a 570 nm, en un espectrofotómetro de luz visible y las concentraciones de H₂O₂ en las muestras se obtuvieron interpolando los valores de absorbancias obtenidos en la curva estándar de H₂O₂. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con sus respectivos duplicados cada uno.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1 CURVA DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA DE *C. chinense* Jacq.

Se determinó la curva de crecimiento de la línea celular de *C. chinense*, con el objetivo de confirmar si el comportamiento de ésta durante su ciclo de cultivo continua siendo similar a lo reportado anteriormente. Para esto, se utilizaron suspensiones celulares de 14 días de cultivo, cuantificando el peso fresco y el peso seco durante un periodo de 24 días.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.1. El peso fresco mostró una fase de latencia del día 1-5, continuando con la etapa exponencial del día 6 hasta el día 17 de cultivo y finalmente, se presentó la fase estacionaria del día 18 en adelante. El peso seco sigue la misma tendencia de crecimiento observada en el peso fresco. Estos resultados permitieron corroborar que el comportamiento del crecimiento fue similar a los datos obtenidos con anterioridad (Cab-Guillén, 2012).

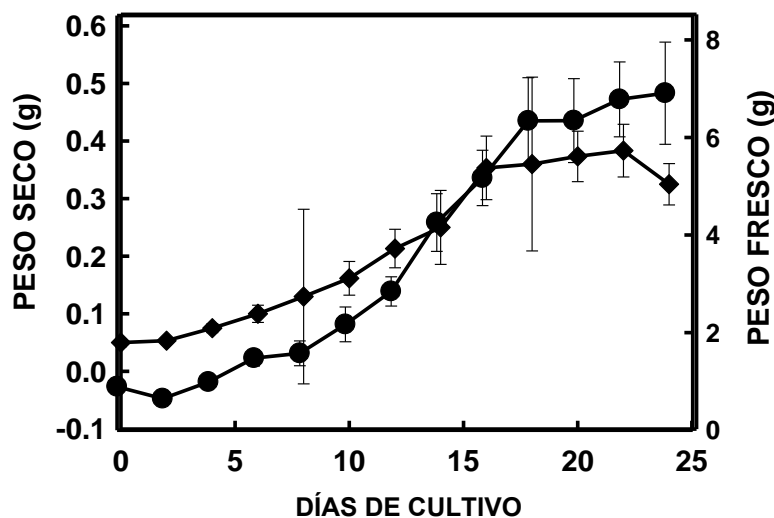


Figura 3.1. Curva de crecimiento de la línea de células en suspensión de *C. chinense*, representada en peso fresco (●) y peso seco (◆). Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno \pm el error estándar.

Adicionalmente, se calculó el tiempo de duplicación con los datos obtenidos en el peso fresco inicial y final, y peso seco inicial y final, con las siguientes formulas:

Tasa de crecimiento específica (u):

$$u = \frac{\ln x_f - \ln x_o}{t}$$

x_o = peso inicial

x_f = peso final

t = tiempo de cultivo transcurrido

Tiempo de duplicación (dt):

$$dt = \frac{\ln 2}{u}$$

Los resultados obtenidos indicaron que la línea celular de *C. chinense* presentó una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.09 gramos/ día de cultivo y un tiempo de duplicación (dt) de 7.70 días obtenidos a partir del peso fresco. Utilizando los datos de peso seco, se obtuvo una tasa de crecimiento de 0.10 gramos/día y un tiempo de duplicación (dt) de 6.9 días. Los resultados obtenidos corroboraron que el incremento de la masa fue similar, tanto en el peso fresco como en el peso seco. También con este parámetro se concluyó que las células a los 14 días de cultivo continúan estando en la fase exponencial (con una $u= 0.13$ y un $dt= 5.5$).

De esta forma, se planteó que la línea celular de *C. chinense* a los 14 días de cultivo se encontraba a la mitad de la fase exponencial donde el metabolismo primario es más activo. Lo anterior, es de importancia para el estudio del sistema de transducción de señales.

3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO DEL AS EN LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE *C. chinense*

Como parte de este estudio fue necesario evaluar si los diferentes tratamientos con AS modifican la viabilidad celular; por lo que se establecieron las condiciones para la cuantificación de este parámetro de las suspensiones celulares de *C. chinense* por espectrofotometría.

Como se observa en la figura 3.2, la viabilidad de las células testigo (sin tratamiento) fue 81%; mientras que las células tratadas con 1, 100 y 200 μM AS presentaron una reducción de alrededor del 14% de viabilidad, en comparación con el testigo. Las células que fueron tratadas con 50 μM AS disminuyeron su viabilidad en un 17%, comparado con el testigo.

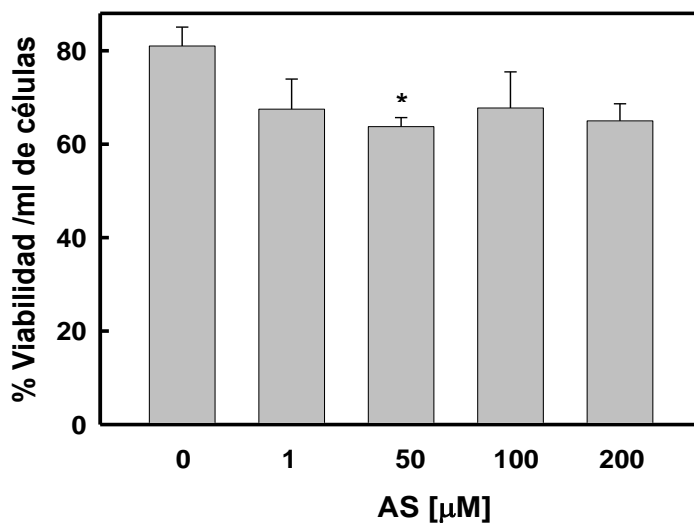


Figura 3.2 Efecto del AS en la viabilidad de las células de *C. chinense*. Las células de 14 días de cultivo fueron tratadas con diferentes concentraciones de AS durante 30 minutos. Los datos son expresados en porcentaje de viabilidad y representan el promedio de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno, \pm ES. * $p \leq 0.01$.

Por lo tanto, estos resultados indican que el AS no generó una modificación importante en la viabilidad en las células tratadas con 1, 100 y 200 μM . Sin embargo, las células que fueron tratadas con 50 μM AS mostraron un cambio significativo en la misma.

3.3 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE ROS

Un objetivo de este estudio fue analizar el efecto del AS en la localización intracelular de H_2O_2 . En este trabajo, se estandarizaron las condiciones para la localización de los niveles intracelulares de H_2O_2 . Las observaciones se llevaron a cabo en células de 14 días de cultivo y se utilizaron diferentes fluorocromos para la localización de los diferentes compartimentos celulares, como DAPI (núcleo), BCF (pared celular) y el carboxi-DCFDA-AM (H_2O_2). Una vez aplicados los fluorocromos, las células fueron tratadas con AS durante un curso temporal de 30 min.

En la figura 3.3 se observan las micrografías de las células de *C. chinense* testigo durante un curso temporal de 30 minutos. La figura 3.3A se observa a las células testigo en el campo claro. Estas células son alargadas, cilíndricas y están organizadas en forma de cadena. Esta misma agrupación y forma fue constante durante el tiempo de observación. La figura 3.3B muestran la fluorescencia verde indicativo de la localización intracelular de H_2O_2 en las células testigo de *C. chinense*, analizados durante el curso temporal. Se observó señal correspondiente a ROS en el citosol, así como en el núcleo. Todas las células analizadas en el campo de observación mostraron el mismo comportamiento.

En la figura 3.3C se señalan el núcleo y la pared celular de las células sin tratamiento. El núcleo se encontraba en el centro de cada célula, inmerso en el citosol delimitado por la pared celular, la cual no presentó algún daño. Tanto el núcleo como la pared celular se modificaron durante el tiempo de observación.

Finalmente, la figura 3.3D muestra la superposición de las imágenes descritas anteriormente. En esta, se indica donde se encontraron las señales correspondientes a las ROS en las células en el núcleo (especialmente en los nucleólos), así como una distribución abundante en el citosol. En ambos compartimentos celulares, los niveles de las señales de las ROS fueron constantes durante el curso temporal evaluado.

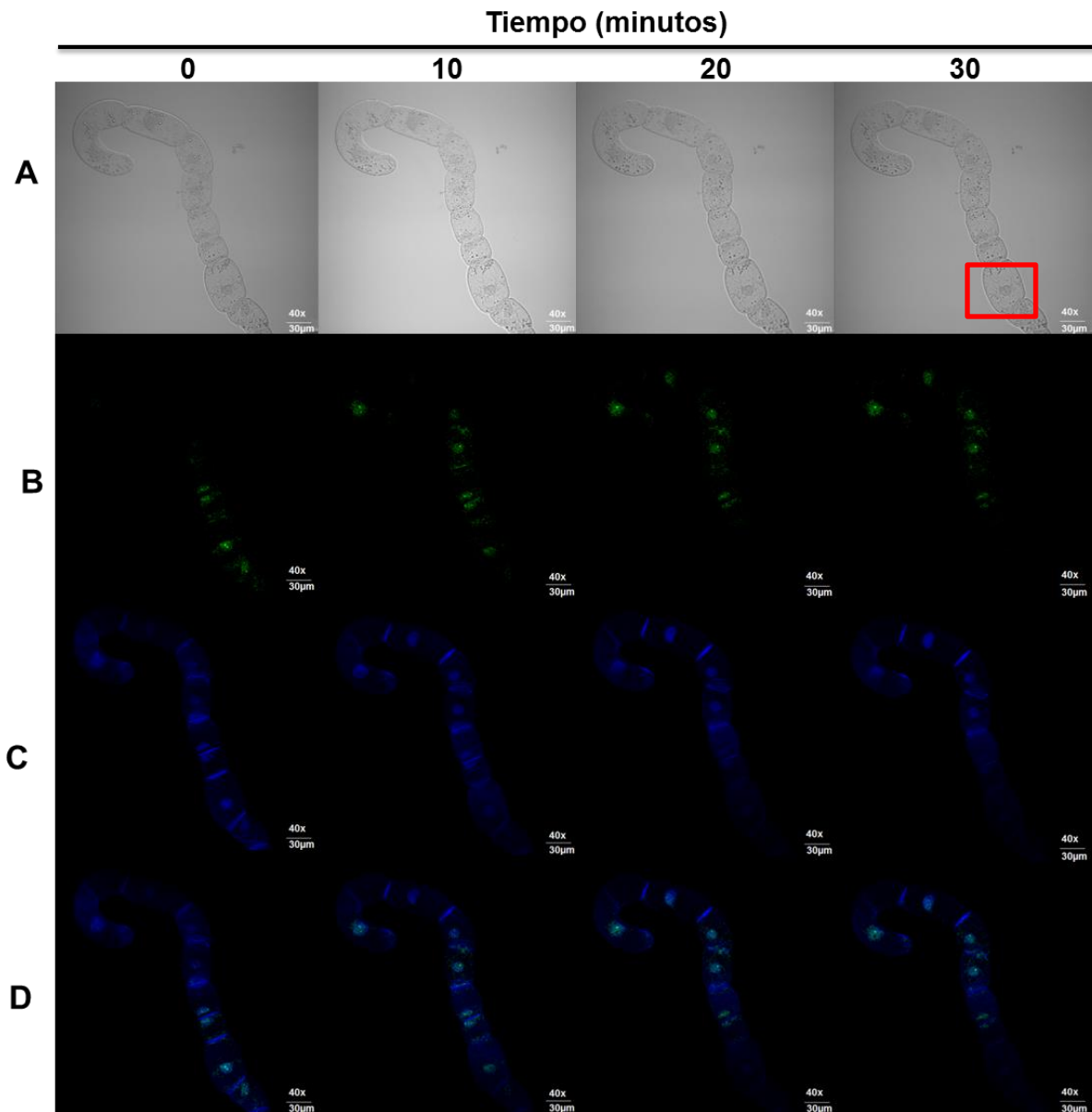


Figura 3.3 Localización de las ROS en las células testigo de *C. chinense*. Las imágenes fueron obtenidas con un del microscopio confocal. A) células observadas en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de las ROS en las células. El cuadro rojo representa la célula que se mostrará en una ampliación en la figura 3.8.

Las micrografías presentadas en la figura 3.4 representan células que fueron tratadas con 1 μM AS y observadas durante un curso temporal de 30 min. La figura 3.4A muestra la morfología de las células observadas en el campo claro: 1) las células cilíndricas y alargadas, agrupadas en forma de cadena como se mostró en las células testigo y 2) aglomerados celulares. Cabe mencionar que las células se encontraban turgentes e íntegras a pesar del tratamiento con AS; sin embargo, se observó la presencia de cuerpos membranosos abundantes en el citosol, la pared celular más gruesa y las células estaban hiperhidratadas en comparación con las células testigo.

En la Figura 3.4B se muestra la localización de las ROS presentes en las células tratadas con 1 μM AS, durante un curso temporal de 30 min. Las ROS se encontraron solamente en las células aglomeradas; donde la señal de estas incrementó a los 20 y 30 min de tratamiento. En contraste, las células agrupadas en forma de cadena no presentaron señales de ROS bajo este tratamiento.

Los núcleos observados eran redondos y estaban bien formados, algunos en la parte central de la célula y otros en el extremo inferior de la misma célula (Figura 3.4C). En este caso, es interesante mencionar que se observaron diferentes nucléolos en todos los núcleos de las células tanto en las células aglomeradas como en las células agrupadas en forma de cadena.

La figura 3.4D permitió conocer el efecto del tratamiento (1 μM AS) en la localización de las ROS durante el curso temporal analizado. Como se mencionó anteriormente, las ROS se encontraron sólo en las células aglomeradas, distribuidas en el citosol. Además, un aumento en la intensidad de la señal de ROS se observó en el conjunto de células más aglomeradas, el cual se incrementó durante el tiempo de observación.

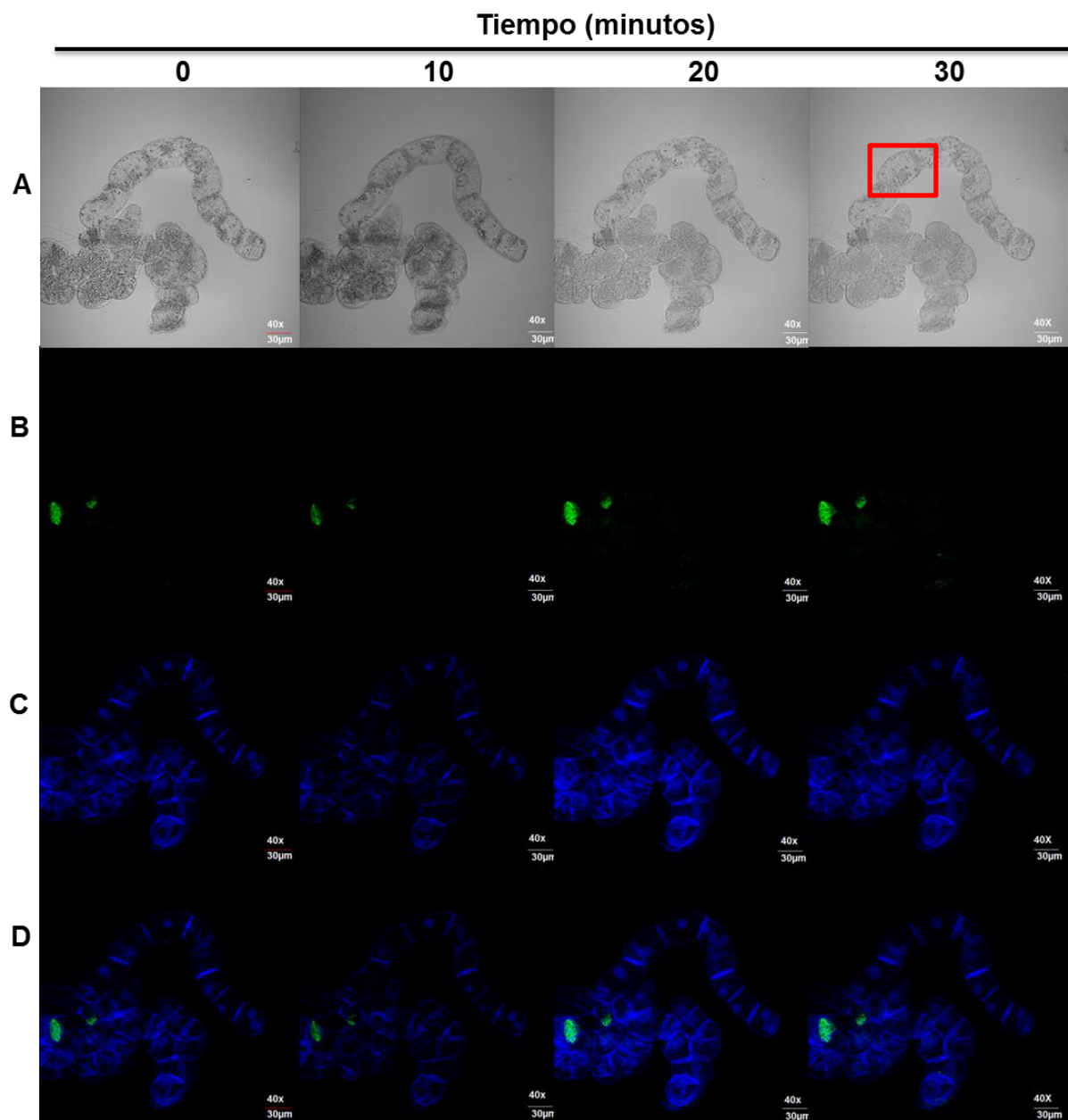


Figura 3.4 Localización de las ROS en las células de *C. chinense* tratadas con $1 \mu\text{M}$ de AS. Las imágenes fueron obtenidas con un del microscopio confocal. A) células en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de las ROS en las células. El cuadro rojo representa la célula que se mostrará en una ampliación en la figura 3.8.

La morfología de las células tratadas con 50 μM AS se muestran en la figura 3.5A observadas en el campo claro durante un curso temporal de 30 min. En estas micrografías se observaron tanto células aglomeradas como células agrupadas en cadena. En ambos casos, las células mostraron una menor turgencia, hiperhidratadas e incluso algunas estaban plasmolizadas. Adicionalmente, se observó la formación de estructuras membranosas más abundantes en comparación con las células tratadas con 1 μM AS y las células testigo. Tanto el núcleo como la pared celular se encontraron íntegros.

En la figura 3.5B se observa la localización de las ROS bajo estas condiciones, ellas estuvieron presentes en las células aglomeradas y ausentes en las células agrupadas en cadena. Adicionalmente, es interesante mencionar que las señales correspondientes a las ROS se incrementaron a partir de los 10 min de observación.

La figura 3.5C muestran las micrografías que señalan el núcleo y la pared celular. La pared celular se observó más delgada en comparación con la pared de las células testigo y los núcleos de las células se mostraron redondos e íntegros, excepto los de las células plasmolizadas. Además, los núcleos presentaron de uno a dos nucléolos en todas las células observadas.

Finalmente, la figura 3.5D representa la superposición de las micrografías 3.5B y 3.5C para localizar las ROS en las células tratadas con 50 μM AS. Las señales se encuentran dispersas en las células aglomeradas, mientras que en algunos núcleos en particular mostraron acumulaciones. La señal de la presencia de ROS en los núcleos marcados se observó más intensa en la membrana nuclear y en el nucleoplasma.

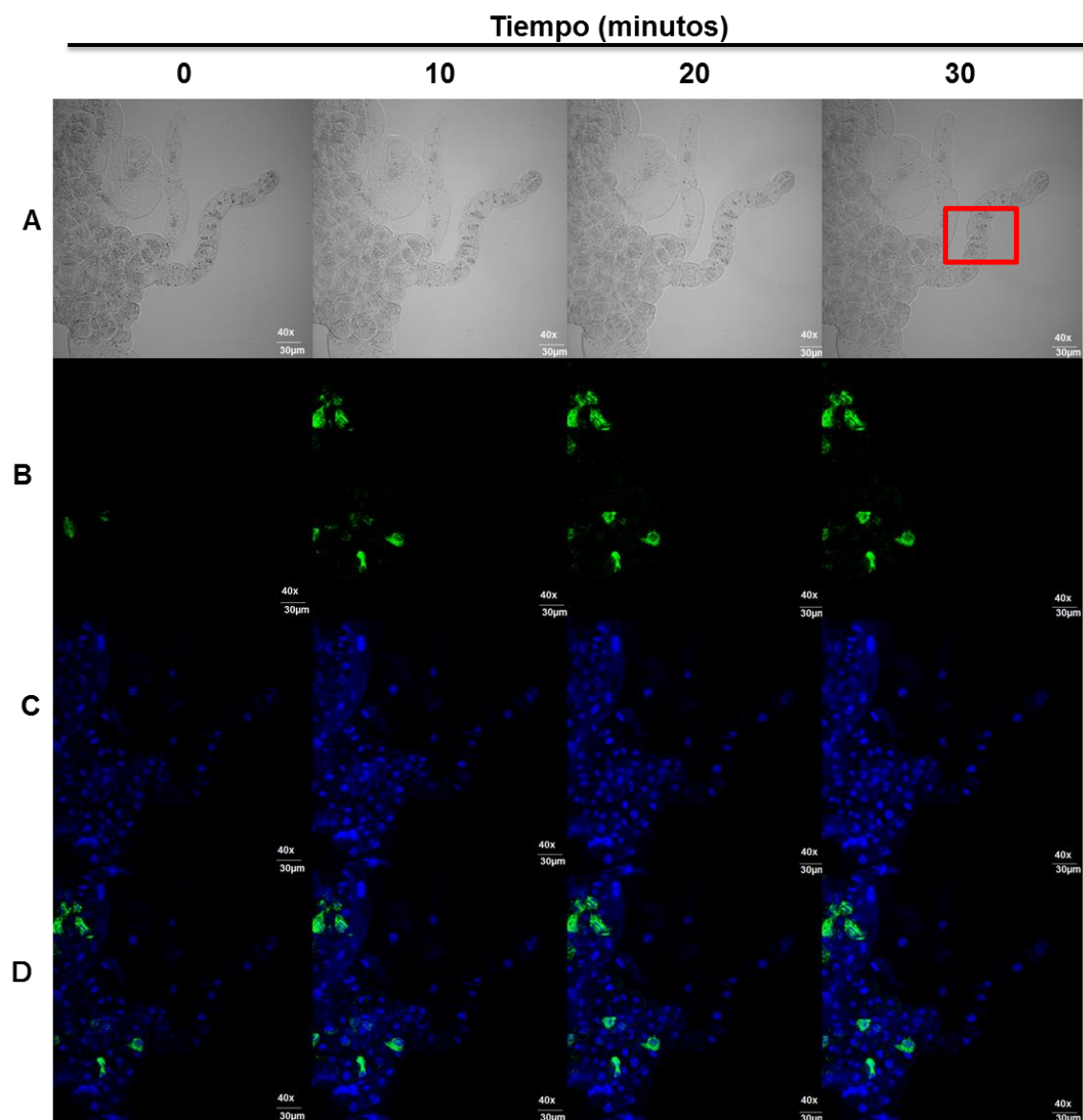


Figura 3.5 Localización de las ROS en las células de *C. chinense* tratadas con 50 μ M AS. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal. A) células en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de las ROS en las células. El cuadro rojo representa la célula que se mostrará en una ampliación en la figura 3.8.

En la figura 3.6 se observan las células de *C. chinense* que fueron tratadas con 100 μ M AS y fueron analizadas en un curso temporal de 30 min. En la figura 3.6A se muestra la morfología que presentaron las células en estas condiciones de tratamiento, la cual fue similar a las células testigo. En este campo de observación, únicamente se muestran células agrupadas en forma de cadena. El núcleo de estas células se observó circular y se encontraba en el centro de la célula, la pared celular estaba íntegra y delgada. En general las células se mostraron turgentes y bien formadas. Adicionalmente, es interesante mencionar que se encontraron pocos cuerpos membranosos presentes en el citosol, que fueron constantes durante todo el curso temporal.

En este tratamiento, no se detectaron señales correspondientes a las ROS en las células (Figura 3.6B). En la figura 3.6C se muestran la pared celular íntegra y delgada, así como el núcleo redondo, sin daño y algunas células presentan de uno o dos nucléolos

En la figura 3.6D se superponen las imágenes 3.6B y 3.6C de esta sección, lo cual permite conocer la localización de las ROS en las células tratadas con 100 μ M AS. Como se mencionó anteriormente, bajo estas condiciones de tratamiento y en el campo de observación presentado, en las células agrupadas en forma de cadena, no se encontró señal de ROS.

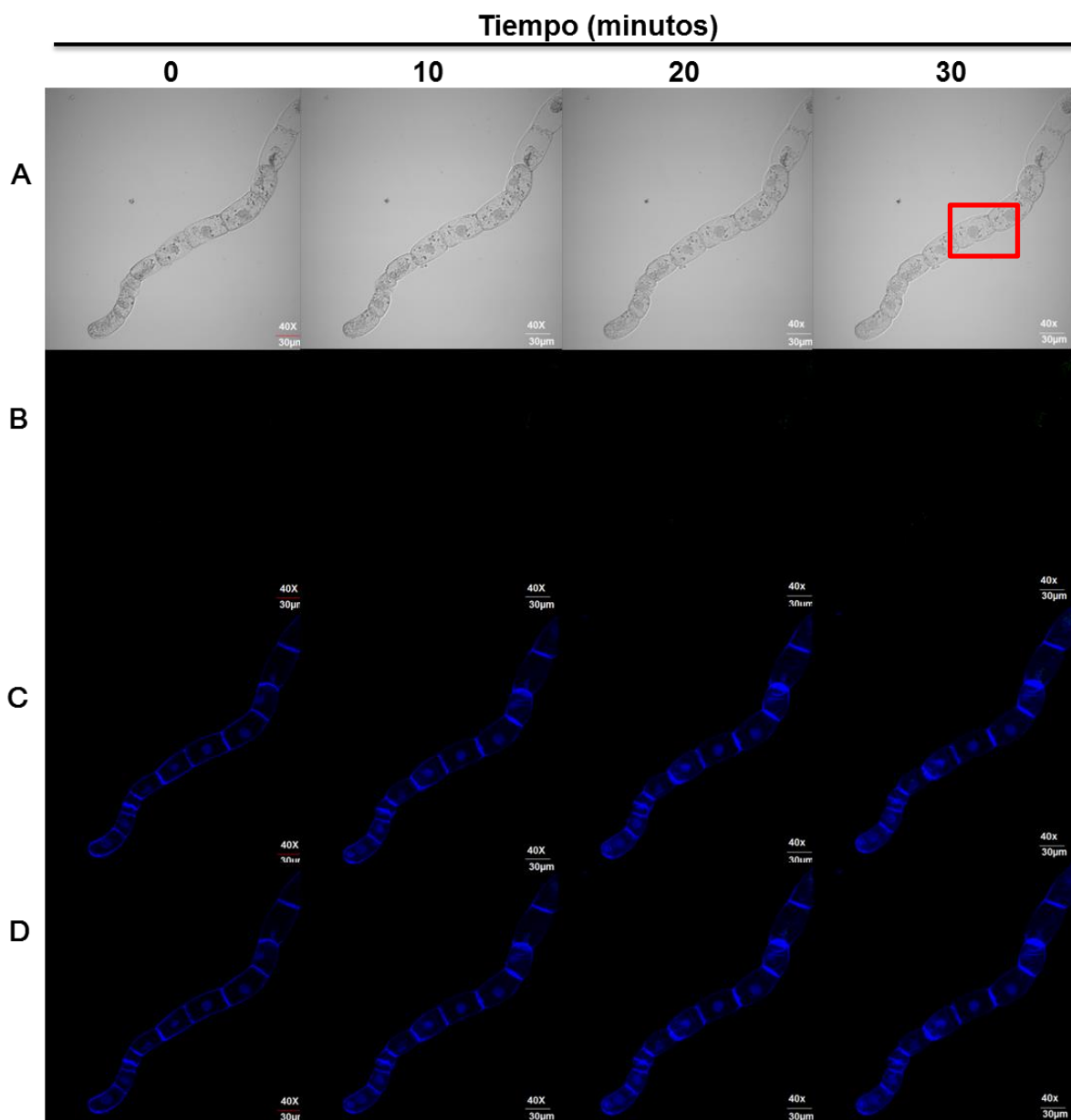


Figura 3.6 Localización de las ROS en las células de *C. chinense* tratadas con 100 μM AS. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal. A) células en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de las ROS en las células. El cuadro rojo representa la célula que se mostrará en una ampliación en la figura 3.8.

Las micrografías de la figura 3.7 muestran células que fueron tratadas con 200 μM AS y observadas durante un curso temporal de 30 min. Se observaron células agrupadas en cadena que se encontraban hinchadas, en comparación con las células testigo (Figura 3.7A). Además, los núcleos se observan redondos y rodeados de cuerpos membranosos. En contraste, su pared celular era delgada en los bordes exteriores de la célula; sin embargo, en el espacio intercelular se observa translúcida.

En la figura 3.7B se muestran las señales correspondientes a las ROS bajo estas condiciones, donde se observó una muy tenue señal a los 10 min de observación, la cual fue aumentando en intensidad hasta los 30 min. Sin embargo, en comparación con las células testigo, esta señal es menor. En la figura 3.7C se observa que la pared celular se mostró delgada e íntegra en todas las células del campo de observación y el núcleo redondo. Pocas células presentaron dos nucléolos.

La localización de las ROS tratadas con 200 μM AS se presentan en la figura 3.7D, que resultó de la superposición de las figuras B y C. Las ROS se encontraban cerca de la pared celular y se mostraron señales puntuales en el núcleo.

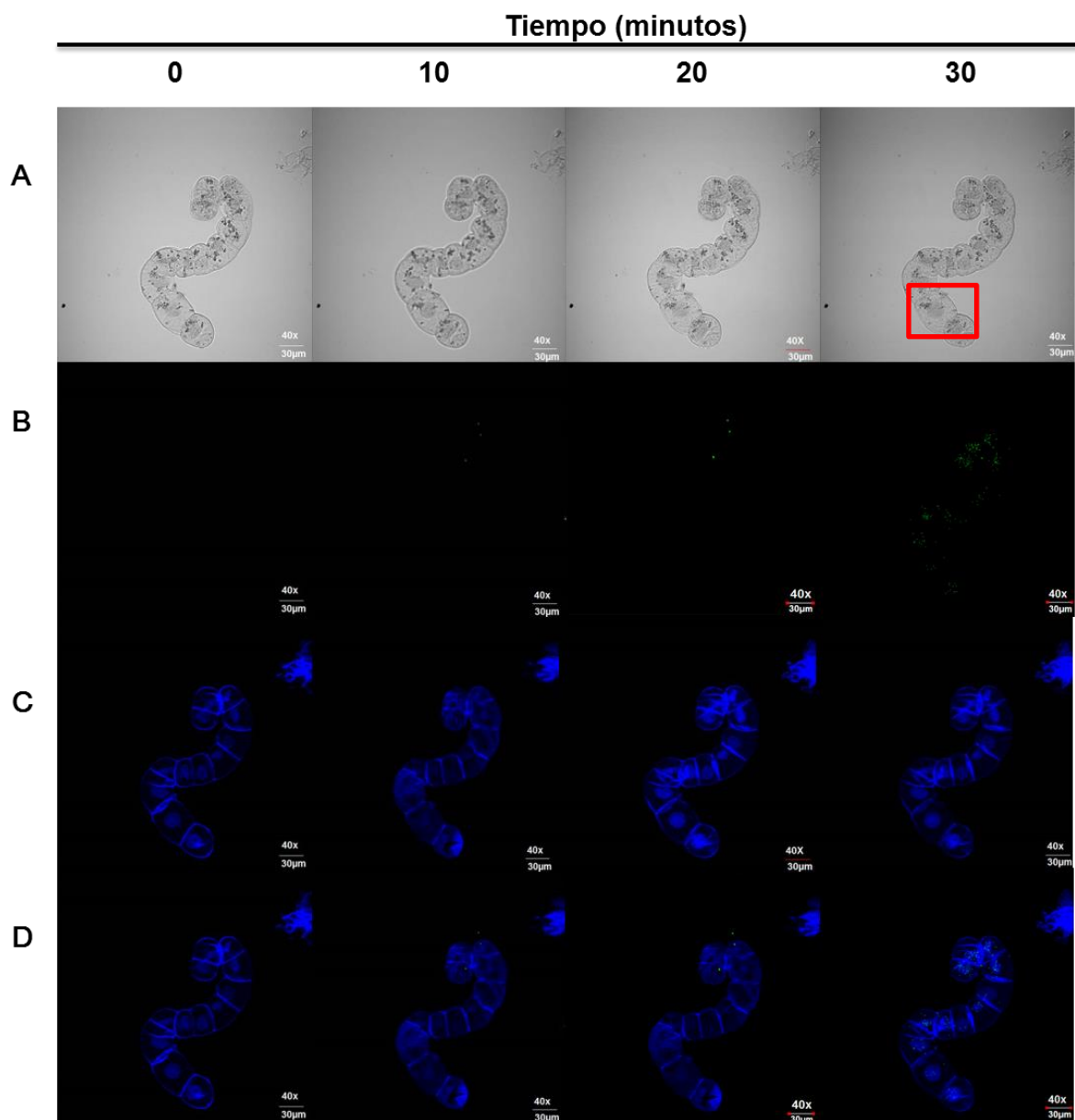


Figura 3.7 Localización de las ROS en las células de *C. chinense* tratadas con 200 μ M AS. Las imágenes fueron obtenidas con un del microscopio confocal. A) células en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de las ROS en las células. El cuadro rojo representa la célula que se mostrará en una ampliación en la figura 3.8.

La figura 3.8 es una composición fotográfica de las células amplificadas 3.0 x. Se muestran únicamente imágenes de las células tratadas con los diferentes tratamientos con AS observadas a los 30 minutos.

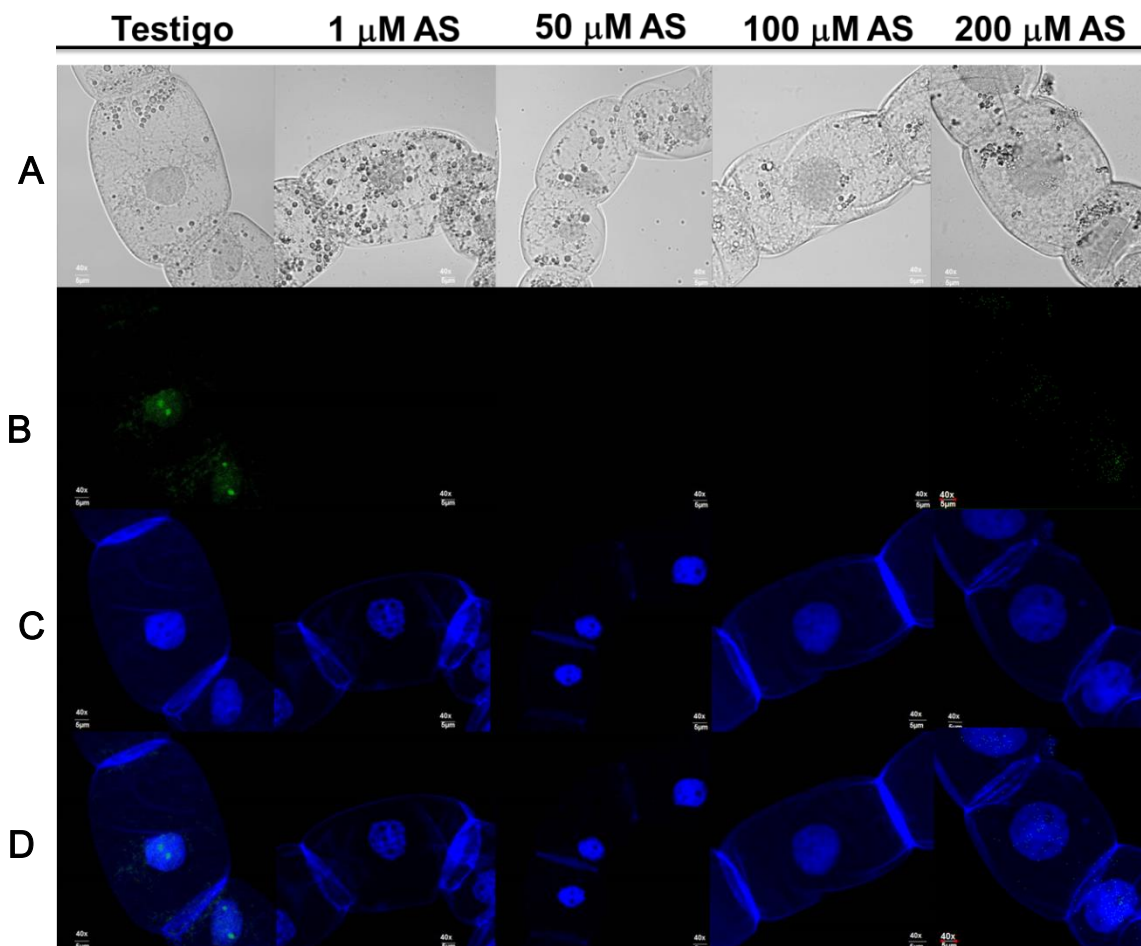


Figura 3.8 Micrografías de las células de *C. chinense* tratadas con las diferentes concentraciones de AS a los 30 minutos de observación; las imágenes están a un zoom de 3.0 x. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal. A) células en el campo claro, B) señal verde fluorescente que indica la localización de las ROS, C) núcleo y pared celular localizados por la señal azul fluorescente y D) superposición de las imágenes B y C que permiten la localización de los niveles de las ROS en las células. Cada columna representa las células tratadas a una concentración con AS.

Esta composición fotográfica permite una mejor apreciación de las características mencionadas como son la presencia de cuerpos membranosos, localización de ROS en el núcleo (células testigo) y el adelgazamiento de la pared celular (células tratadas con 50 μM AS). Cabe mencionar que en esta condición se obtuvo el menor porcentaje de viabilidad (64%). También se muestra la presencia de diferentes núcleolos en las células tratadas con 1 μM AS, en contraste, con los otros tratamientos las células tienen de uno a dos núcleolos.

Estos resultados permitieron determinar que las células de *C. chinense* generan ROS intracelularmente y que estas se encuentran localizadas en el citosol, en los bordes de la célula y en el núcleo. Los tratamientos con 1, 50 y 100 μM AS no presentaron señales de ROS en las células agrupadas en cadena; sin embargo, en las células aglomeradas si se encontraron estas y fueron aumentando en intensidad a los 30 min de observación. También es importante resaltar la presencia de cuerpos membranosos en abundancia en las células tratadas con 1 y 50 μM AS, en contraste en las células tratadas con 100 μM AS fueron pocos, lo anterior comparado con las células testigo.

3.4 EFECTO DEL AS EN LOS NIVELES EXTRACELULARES DE H_2O_2

Algunas suspensiones celulares liberan H_2O_2 al medio durante su crecimiento, por lo tanto que trabajo se planteó como un objetivo determinar si el cultivo *C. chinense* liberaba H_2O_2 al medio, en células sin y con tratamiento con AS. Las suspensiones celulares de 14 días de cultivo fueron acondicionadas y tratadas a las diferentes concentraciones finales de AS (0, 1, 50, 100 y 200 μM) durante 30 min, y se aplicó el ensayo enzimático como se describió en la sección 2.6. Los valores de absorbancias de las muestras fueron interpolados en la curva estándar elaborada (Figura 2.7). Los resultados indicaron que bajo las condiciones experimentales, las suspensiones celulares de *C. chinense* no liberan H_2O_2 al medio.

Lo anterior se determinó llevando a cabo diferentes ensayos de cuantificación, donde se utilizaron diferentes volúmenes de muestra con la finalidad de concentrar el H_2O_2 posiblemente presente en el medio de cultivo de las células tratadas con las diferentes concentraciones de AS, a los 30 min de tratamiento. Sin embargo, para ninguno de los

casos se detectaron niveles de H₂O₂ extracelular (Cuadro 3.1). Cabe mencionar que los volúmenes de muestra utilizados se ajustaron de acuerdo al volumen máximo de muestra necesarios para el ensayo de Amplex Red ®, siendo el volumen máximo de reacción de 480 µl, los cuales incluyen: 240 µl de muestra más 240 µl de la mezcla de reacción (la HRP, Amplex Red ® y solución amortiguadora).

Cuadro 3. Determinación de H₂O₂ extracelular en el medio de cultivo de las células de *C. chinense* tratadas con diferentes concentraciones de AS.

Tratamientos con AS [µM]	µl de medio de cultivo de las suspensión celular de 14 días				[µM H ₂ O ₂]
0	20	50	120	240	0
1	20	50	120	240	0
50	20	50	120	240	0
100	20	50	120	240	0
200	20	50	120	240	0

CAPÍTULO IV

4 DISCUSIÓN

El AS funciona como una señal en diferentes tipos de estrés (abiótico y abiótico). Es una molécula que tiene un efecto ambivalente, por un lado, promueve la acumulación de las ROS (prooxidante) y por el otro, su eliminación (antioxidante) (Herrera-Vásquez *et al.*, 2015) en diferentes compartimentos celulares (Wrzaczek *et al.*, 2013), siendo esto esencial para la respuesta de defensa. Adicionalmente, los inductores y otros estímulos ambientales pueden también inducir un estallido oxidativo en los cultivos celulares (Gracio-Medrano *et al.*, 2005).

En estudios realizados en el modelo de suspensiones celulares, se ha estudiado la participación de la señalización fosfolipídica en la regulación del metabolismo secundario, en particular en la producción de vainillina, estimulada con el MeJA y con el AS (Altúzar-Molina, 2008; Rodas-Junco *et al.*, 2015). Los resultados generados en esos estudios demostraron que el AS estimula la actividad de la PLC y la PLD así como aumenta el contenido de vainillina en las células de *C. chinense* tratadas con diferentes concentraciones de AS. También se evaluó la formación de PA en respuesta al AS y el MeJA, encontrándose un aumento en sus niveles por la activación de la PLC.

La vía fosfolipídica da lugar a la generación de segundos mensajeros, como son el PA, el DAG, los lisofosfolípidos y los ácidos grasos libres (Rodas-Junco, 2014). El PA considerado como una molécula de señalización lipídica universal, regula numerosos procesos (Zhao, 2015) activando la señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} , a la NADPH oxidasa, canales iónicos, el tráfico vesicular y el estrés oxidativo (Testerink y Munnik 2005, Wang, 2002). En *Arabidopsis*, se ha encontrado que el PA es requerido en la respuesta a ROS, y en su defecto, la ausencia de la PLD δ provoca una mayor sensibilidad para provocar la muerte celular generada por H_2O_2 (Zhao, 2015).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se evaluaron los niveles intracelular y extracelulares de H_2O_2) en respuesta a a diferentes concentraciones de AS en el modelo de suspensiones celulares de *C. chinense*. Primeramente se llevó a cabo la cuantificación de la viabilidad en células con y sin tratamiento con AS, ya que la señalización mediada por el AS puede conducir a la muerte celular programada (Chen *et al.*, 1993). De esta manera, es importante mencionar que el ensayo de inducción con AS, bajo las condiciones experimentales evaluadas, no generó un cambio importante en la viabilidad de las células de *C. chinense*, manteniéndose aproximadamente a un 80% (Figura 3.2). Por lo tanto, se demostró que los tratamientos con AS fueron adecuados para evaluar el estrés oxidativo.

Cab-Guillén (2012) realizó experimentos de dosis respuesta con AS (0, 1, 10, 50, 100 y 150 μ M) en suspensiones celulares de *C. chinense*, de 14 días de edad, para evaluar su efecto en el crecimiento celular durante 24 días. Se detectó una estimulación en el crecimiento de las células tratadas con 1 μ M AS, mientras a 100 y 150 μ M AS hubo una disminución en el crecimiento. Las células tratadas con 10 y 50 μ M AS no presentaron diferencias en comparación con las células testigo. En este estudio, las células tratadas con 50 μ M AS presentaron la menor viabilidad (64%). Se sugiere entonces que las concentraciones de AS empleadas no afectaron el crecimiento celular.

En suspensiones celulares de arroz tratadas con diferentes inductores químicos, entre ellos el AS (a una concentración final de 100 μ M) durante 48 horas, se reportó una disminución del 7% en su viabilidad en comparación con la muestra testigo (Masuta *et al.*, 1991). Además, notaron que las células tratadas con AS presentaron un engrosamiento en la pared celular en comparación con el testigo. De esta forma, concluyen que el AS proporciona mayor resistencia y por ende, una mayor protección a las células a pesar que su viabilidad haya disminuido. En contraste, es importante mencionar que en nuestro estudio las células tratadas con 50 μ M AS mostraron un adelgazamiento de la pared celular.

Con respecto a lo anterior, Malinovsky *et al.*, (2014) señalan que al existir una distorsión de la integridad de la pared celular se genera una deformación en membrana plasmática adyacente a la pared; por lo cual, bajo esta condición de tratamiento de 50 μ M AS estaría ocurriendo un cambio en la estructura de la pared celular, pero sin afectar notablemente la

integridad de la membrana plasmática, siendo esto reflejado en su viabilidad que es 1.2 veces menor que las células testigo.

En los experimentos realizados para determinar la localización de ROS intracelularmente como se observa en las (Figuras 3.3-3.8) se emplearon técnicas de marcaje fluorescentes con el fluoróforo DCFDA AM-acetoximetil éster de diacetato de 2'7'-diclorodihidro fluoresceína. La reducción del ácido acético del 2'7'-difluoresceína es estable a la autoxidación (Brandt y Keston, 1965) debido a que este método está basado en la oxidación del diacetildihidrofluoresceína por el peróxido de hidrógeno, convirtiéndose así en la forma fluorescentemente detectable (Keston y Brandt, 1965)

En este trabajo, los resultados de la localización de las ROS permitieron conocer que las células presentan niveles basales de las ROS y que en las células tratadas con AS, estos disminuyen. Estos resultados forman parte de los primeros reportes generados de estallido oxidativo determinado en suspensiones celulares de *C. chinense*. En contraste con otros cultivos en suspensión, no detectaron niveles basales, sino hasta ser sometidos a algún tipo de estrés, por ejemplo en respuesta a la toxicidad por aluminio (Esquivel-Hernández, 2016), Las micrografías permitieron observar la formación de estructuras membranosas en las células que fueron tratadas con AS. Existen reportes relacionan la señalización por AS es mediada con el proceso de autofagia, así como en la inducción de la formación de vesículas (Masuta *et al.*, 1991) a nivel de membrana plasmática (Kulich y Žárský, 2015).

Respecto al H₂O₂ extracelular en los cultivos celulares, Gracia-Medrano y colaboradores (2005) investigaron el estrés oxidativo generado en suspensiones celulares de *Lycopersicon esculentum* Mill. inducido por la adición de oligogalaturónidos. Este tratamiento disparó una rápida síntesis de H₂O₂, el cual fue detectable dentro de las dos primeras horas en el medio extracelular, que alcanzó un nivel de 4.5 veces el inicial después de las seis horas. La cantidad de detectada fue de 10⁻¹⁴ mol H₂O₂/célula min, los cuales son comparables con los valores obtenidos en cultivos de soya y tabaco, en respuesta a la infección con *Phytophthora parasítica*. Por lo tanto, el resultado obtenido en este estudio estaría indicando que las condiciones de tratamiento con AS, tanto en tiempo como en exposición, no promueven la liberación de H₂O₂ al medio de cultivo. Por ejemplo, Gemés y colaboradores (2011) determinaron la participación del AS en respuesta a la

salinidad dada por la adición de 100 μM NaCl y con 0.1 μM a 0.1 mM AS en plántulas y raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*), concluyendo que las concentraciones micromolares de AS no generan un cambio importante en el metabolismo oxidativo intracelular.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo se pudo concluir lo siguiente:

- Las concentraciones de AS utilizadas en este trabajo, no tuvieron un efecto significativo en la viabilidad de las células de *C. chinense*.
- Los niveles intracelulares de las ROS se modificaron por los tratamientos con AS, en comparación con la muestra testigo.
- Se cuenta con el constructo pk2gw7.0-HyPer para la cuantificación de H₂O₂ *in vivo* en protoplastos transformados
- Se consiguió reproducibilidad en el aislamiento de los protoplastos de *C. chinense*, a partir de células de 14 días de cultivo y se estandarizaron las condiciones para determinar su viabilidad con y sin tratamiento con AS.
- Las suspensiones celulares de *C. chinense* en las condiciones evaluadas, tiempo y concentraciones con AS, no liberaron H₂O₂ al medio.

5.2 PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se determinó que en las suspensiones celulares de *C. chinense* tratadas con AS (0, 1, 50, 100 y 200 μM) se modificaron los niveles intracelulares de ROS y que el H_2O_2 no fue liberado al medio bajo estas condiciones. Con base en lo anterior, y para continuar el estudio de la respuesta de esta línea celular, en el estallido oxidativo generado principalmente por el H_2O_2 , se propone:

- Realizar una dosis respuesta de AS a concentraciones mayores a las empleadas en este trabajo.
- Determinar la actividad de diferentes enzimas que participan en la respuesta redox, como la NADPH oxidasa.
- Cuantificar los niveles de Ca^{2+} y PA con los tratamientos con AS sugeridos a mayores concentraciones.
- Transformar protoplastos de *C. chinense* con el plásmido pk2gw7.0-HyPer3 y determinar la eficiencia de la transformación.
- Realizar los experimentos de dosis respuesta de AS en los protoplastos transformados.
- Cuantificar los niveles intracelulares de H_2O_2 *in vivo* en los protoplastos transformados y determinar su localización.
- Generar una línea celular transformada con el plásmido pk2gw7.0-HyPer.
- Realizar una construcción molecular para co-localizar los niveles de H_2O_2 *in vivo* y Ca^{2+} .

BIBLIOGRAFÍA

- Altúzar-Molina, A. R. (2008). Efecto del ácido salicílico y del jasmonato de metilo en la vía de transducción de señales a través de fosfolípidos en células en suspensiones de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida Yucatán, México. p. 55
- Altúzar-Molina, A., J.A. Muñoz-Sánchez, F. Vázquez-Flota, M. Monforte-González, G. Recagni-Di Palma y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2011). Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cell. Plant Physiology and Biochemistry, 49, 151-158.
- Aper, K. y H. Hirt (2004). Reactive oxygen species: Metabolism oxidative stress and signaling transduction. Annual Review Plant Biology, 55, 337-391.
- Arasimowicz-Jelonek, M., J. Floryszak-Wieczorek, K. Drzewiecka, J. Chmielowska-Back, D. Abramowski y K. Izbiariska (2014). Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. Plant, 239, 679-694.
- Betz, W.J., F. Mao y W.J. Bewick (1992). Activity dependent staining and destaining of living motor nerve terminals. Journal of Neuroscience, 12, 363-375.
- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. Journal of Botany, 22, 488-508.
- Bienert, G.P. y F. Chaumont (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. Biochimia et Biophysica Acta, 1840, 1596-1604.
- Bienert, G.P., J.K. Shjoerring y T.P. Jahn (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochimia et Biophysica Acta, 1758, 994-1003.
- Bonnemain, J. L., J. F. Chollet y F. Rocher (2013). Transport of salicylic acid and related compounds, en: Salicylic Acid Plant Growth and Development, Hayat, S., A. Ahmad y M.N. Alyemeni. (Ed) Springer. New York. pp. 43-59.
-

- Brandt R. y A.S. Keston(1965). Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluoremetric analysis. *Analytical Biochemistry*, 11, 6-9.
- Caarls, L., C.J. Pieterse y S.C.M. Van Wees (2015). How Salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6, 170.
- Cab-Guillén, Y. A. (2012). Efecto del ácido salicílico en suspensiones células de *Coffea arabica* L. y *Capsicum chinense* Jacq. en respuesta a la toxicidad por aluminio. Tesis de Licenciatura. Oxkutzcab, Yucatán. p. 99.
- Camarena-Gutiérrez, G. y R. de la Torre-Almaráz (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas. *Revista Chapingo, Series Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13, 157-173.
- Carballo, S. (2013). Asociación de las características tintoriales por Gram y tinción de fluorescencia modificada con síntesis de ADN y ARN en las distintas etapas del ciclo celular. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente Núcleo Sucre, Departamento de Bioanálisis. Cumaná, Venezuela, p. 56
- Cárdenas-Rodríguez, N. y J. Pedraza-Chaverri (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*, 17, 161-173.
- Castro-Concha, L.A., R.M. Escobedo y M.L. Miranda-Ham (2012). Measurement of cell viability *in vitro* cultures, en: *Methods in Molecular Biology*, Loyola-Vargas V.M. y F. Vazquez-Flota. (Ed) *Plant Cell Culture Protocols. (Second Edition)*. Humana Press, New Jersey. pp. 31871-76.
- Cheeseman, J.M. (2007). Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship plant stress. *Plant Stress*, 92, 4-15.
- Chen, Z., H. Silva y D. Klessig (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262, 1883-1886.

- Coego, G. A. (2006). Análisis funcional del gen Ep5C y su implicación en los mecanismos de defensa en plantas. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. p. 161.
- Cuéllar, L., A. Sehtman, L. Donatti y M. Allevato (2008). Ácido salicílico. *Acta Terapía Dermatológica*, 31, 108-112.
- Dat, J.F., N. Capelli y F.V. Breusegem (2007). The interplay between salicylic acid and reactive oxygen species during cell death in plants, en: *Salicylic Acid- A Plant Hormone*, Hayat, S. y A. Ahmad. (Ed) Springer. The Netherlands. pp. 2-18.
- Dean, J.V., L.A. Mohammed y T. Fitzpatrick (2005). The formation, vacuolar localization and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221, 287-296.
- Dempsey, D.M., A., A.C. Vlot, M.C. Wildermuth y D.F. Klessing (2011). Salicylic acid. Biosynthesis and metabolism, en: *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists (Ed) Springer Verlag. Berlin. pp. 1-24.
- Díaz Zogaya, J.C. (1995). *Metabolismo celular: respiración y biosíntesis*. Bioquímica. México Internamericana. McGraw-Hill.
- Esquivel-Hernández, L.Y. (2016). Participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción de peróxido de hidrógeno en la tolerancia al aluminio de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida Yucatán México, pp 81.
- Fisher-Parton, S., R. M. Parton, P.C. Hickey, J. Dijksterhuis, H.A. Atkinson y N.D. Read. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198, 246-259.
- García-Galindo, H.J., M. García-Roslaes y C. Berestían (1995). La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia*, 46, 84-102.

- Gémes, K., P. Poor, E. Horváth, Z. Kolbert, D. Szopkó, A. Szepesi y I. Tari (2011). Crosstalk between salicylic acid and NaCl generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. *Physiologia Plantarum*, 142, 179-192.
- Gracia-Medrano, R.M. E., F. Vázquez-Flota y M.L. Miranda-Ham (2005). Reactive oxygen species scavenging enzymes in *Lycopersicon esculentum* mill. cell suspension cultures elicited with oligogalacturonides. *Phyton*, 15-25.
- Gutierrez-Carbajal, M.G., M. Monforte-González, M. L. Miranda-Ham, G. Godoy-Hernández y F. Vázquez-Flota (2010). Induction of capsaicinoids synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *Biologia Plantarum*, 54, 430-434.
- Hayat, S. y A. Ahmad (2007). *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. The Netherlands, Springer. 401 p.
- Herrera-Vásquez A., P. Salinas y L. Holuigue (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-9.
- Houot, V., P. Etienne, A.S. Petitot, S. Barbier, J. P. Blein y L. Suty (2001). Hydrogen peroxide indices programmed cell death features in culture tobacco By-2 cells, in a dose-dependet manner. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1721-1730.
- <http://www.sagarpa.gob.mx/delegaciones/yucatán/boletines/páginas/201208B058.aspx>
[Acceso 13 Agosto 2015].
- Inzé, D. y M. Van Montagu (1995). Oxidative stress in plants *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 53-158.
- Jack, D. B. (1997). One hundred years of aspirin. *The Lancet*, 350, 437-439.
- Janda, M. y E. Ruelland (2015). Magical mystery tour: Salicylic acid signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 117-128.
-

- Janda, T. O. Kinga Gondor, R. Yordanova, G. Szalai y M. Pál (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologia Plantarum*, 36, 2537-2546.
- Jean-Luc C., P. Gerbeau-Pissot, J. Fromentin, C. Cantrel, D. Thomas, E. Jeannette, T. Kalachova, S. Mongrand, F. Simon-Plas y E. Ruelland (2017). Diacylglycerol kinases activate tobacco NADPH oxidase-dependent oxidative burst in response to crypyogein. *Plant, Cell & Envitonment*, 40, 585-598.
- Kalachova, T., O. Lakovenko y V. Kravets (2012). Effects of salicylic and jasmonic acid in Phospholipase D activity and the level of active oxygen species in soybean seedlings. *Biologiccheskie Membrany*, 29, 169-177.
- Kawano, T. y F. Boutea (2013). Crosstalk between intracellular and extracellular salicylic acid signaling events leading to long-distance spread of signaling. *Plant Cell Reports*, 32, 1125-1138.
- Keston A.S. y R. Brandt (1965). The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Analitic Biochemistry*, 11, 1-5.
- Kulich, I. y Žárský (2014). Autophagy-related direct membrane important from ER/cytoplasm into the vacuole or apoplast: A hidden gateway also for secondary metabolites and phytohormones?. *International Journal of Molecular Science*, 15, 7462-7474
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*, 228, 127-134.
- Lu, H., J. T. Greenberg y L. Holuigue (2016). Editorial: Salicylic acid signaling network. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-3.
- Malamy, J. y D. F Klessig (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *The plant Journal*, 2, 643-654.
- Malinovsky F.G., J. U. Fangel y W. G. T. Willats (2014). The role of the cell in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-12.
-

- Martín, Y., C. Avedaño, M.J. Piedras y A. Krzyzanowska (2010). Evaluation of Evans Blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. *Nature, Protocol Exchange*. pp. 1038
- Masuta, C., M. Van den Bulcke, G. Bauw, M. Van Muntagui y A. B. Caplan (1991). Differential effects of elicitors on the viability of rice suspension cells. *Plant Physiology*, 97, 619-629.
- Miranda-Ham, M.L. y L. Castro-Concha (2010). Estrés oxidativo en plantas, en *Temas modernos de nutrición vegetal*, Benavides Mendoza, A. (Ed) Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. pp 1-114.
- Mroginski, L.A. y W.M. Roca (2004). Establecimiento de ccultivos de tejidos vegetales in vitro, en *Cultivo de tejidos en la Agricultura*, pp. 20-40.
- Muñoz-Sánchez, J. A., A. Chan-May, Y. Cab-Guillen y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2013). Effect of salicylic acid on the attenuation of aluminum toxicity in *Coffea arabica* L. suspension cell: A possible protein phosphorylation signaling pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 188-195.
- Murashige T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Orozco- Cárdenas, M. y C. A. Ryan (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Plant biology*, 96, 6553-6557.
- Pieters, C. M. J. y L. C. van Loon (1999). Salicylic acid independent plant defense pathways. *Trends in plant science*, 4, 52-58.
- Ramírez-Benítez J. E. y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2008). Role reactive oxygen species (ROS). In *aluminium-induced signaling resistance in plants*. *Current Topics in Biochemical Research*, 10,79-86.

- Rangel Sánchez, G., E. Castro Mercado, E. Beltran Peña, H. Reyes de la Cruz y E. García Pineda (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12, 90-95.
- Raskin, I., H. Skubatz, W. Tang y B. J. D. Meeuse (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Annals of Botany*, 66, 369-373.
- Rivas-San Vicente, M. y J. Plasencia (2011). Salicylic acid beyond defense: Its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 1, 1-18.
- Rodas-Junco B.A. (2014). Estudio de la señalización fosfolipídica en la regulación de la producción de vainillina estimulada por el ácido salicílico en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida Yucatán, México. p. 115
- Rodas-Junco, B.A., Y. Cab-Guillen, J.A. Muñoz-Sánchez, F. Vázquez-Flota, M. Monforte-González y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2015). Salicylic acid induces vanillin synthesis through the phospholipid signalling pathway in *Capsicum chinense* cell cultures. *Plant Signalling & Behavior*, 8, 1-8.
- Sabater Jara, (2013). Estudio de las Respuestas de defensa Inducidas por elicitores en cultivos vegetales. Tesis de Licenciatura. Universidad Murcia, Murcia, España. p. 264.
- Sánchez, S. (2010). Respuesta antioxidante al tratamiento con ácido salicílico en plantas de papa infectadas con fitoplasma. Tesis de maestría. Montecillo Texcoco, EDO. De México.
- Sharma, S. (2015). Interaction of calcium signaling with reactive oxygen and reactive nitrogen species, en: *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*, Jagadis, K. y A. U. Igamberdiev. (ed) Springer, Germany. pp 301-316.

- Sunkar, R., V.V. Chinnusamy, J. Zhu y J.K. Zhu (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Science*, 12, 301-309.
- Szabados, L. L.A. Mroginski y W.M. Roca (2004). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, en *Cultivo de tejidos en la Agricultura*. Cali, Colombia. pp. 174-1995.
- Tambusi, E. A. (2004). Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, España. p 59
- Testerink, C. y T. Munnik (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *TRENDS in Plant Science*, 10, 368-375.
- Veal, E., A.M. Day y B. A. Morgan (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, 1-14.
- Vlot, A. C., D'M. A. Dempsey y D. F. Klessig (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phitopathology*, 47,177-206.
- Wang, X. (2002). Phospholipase D in hormonal and stress signaling . *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 408-414.
- Wrzaczek, M., M. Brosche y Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops-production perception, regulation. *Current Opinion in Plant biology*, 16, 575-582.
- Yan, S. y X. Dong (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Plant Biology*, 20, 64-68.
- Zhao, J. (2015). Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defense response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *Journal of Experimental Botany*, 66, 1721-1736.
- Foyer C.H. y G. Noctor (2013). Redox Signaling in Plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18, 2087-2090.
-

ANEXOS**ANEXO I. AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE LAS SUSPENSIONES CELULARES de *C. chinense***

1. Pesar 0.2 g de Driselasa ® de *Basidiomycetes sp.*, 0.2 g de cellulisina y adicionar 600 µl de pectinasa de *Aspergillus niger*.
2. Adicionar 15 ml del medio de aislamiento para protoplastos [sorbitol 450 mM, KCl 123 mM, sacarosa 87 µM, CaCl₂ anhidrido 6 mM, NH₄NO₃ 10 mM, KH₂PO₄ 625 µM, ácido 2-(N-morfolino etano sulfónico, (MES) 5 mM].
3. Filtrar el medio con un filtro millipore (0.45 µM) en una caja Petri y agregar 15 µl de ampicilina (50 µg/ml) y 7 µl de leupeptina (100 µg/ml).
4. Pesar 1 g de peso fresco de las suspensiones celulares filtradas y adicionarlo a la solución de aislamiento. Homogenizar.
5. Incubar a 28°C en oscuridad con agitación (30 rpm) durante 16 h.
6. Decantar las células en un tubo falcón de 50 ml estéril durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Remover el sobrenadante y resuspender en 5 ml de medio de aislamiento fresco, repetirlo dos veces.
8. Contar y ajustar a una densidad de aproximadamente de 1×10^5 protoplastos.

ANEXO II. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE PROTOPLASTOS

1. Colocar 250 μl de protoplastos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml (aproximadamente 1×10^5 células).
2. Elaborar una solución de trabajo de diacetato de fluoresceína (FDA) (5 mg/ml acetona) diluida en 2 ml del medio de aislamiento para protoplastos.
3. Agregar 125 μl de la solución de trabajo de FDA al tubo con protoplastos e incubar durante 5 min.
4. Observar los protoplastos (10 μl) en un microscopio de epifluorescencia (Axioplan III Germany) a 490-514 nm, empleando una cámara de Newbauer.
5. Determinar el número de protoplastos viables: $(\text{No. protoplastos en el campo fluorescentes} / \text{No. protoplastos en el campo claro}) \times 100$.

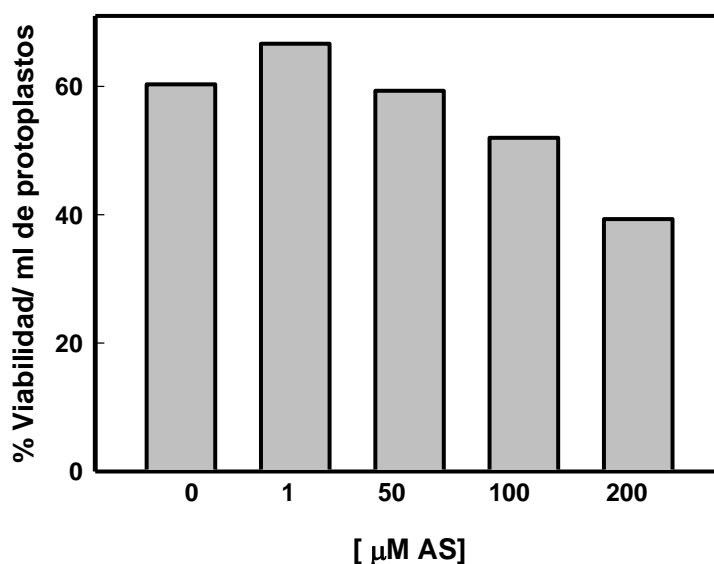


Figura A1. Efecto del AS en la viabilidad de protoplastos. Los protoplastos fueron tratados con diferentes concentraciones (finales) de AS durante 30 min. La viabilidad se determinó con el diacetato de fluoresceína (FDA) y el conteo se realizó con una cámara de Newbauer.

ANEXO III. OBTENCIÓN DEL PLÁSMIDO pk2gw7-Hyper3

1. Recombinar 2 μ l del plásmido pENTER-HyPer3, 1 μ l de solución salina (1:4 v/v) y 2 μ l del vector destino pk2gw7 (Figura A2a).
2. Incubar la reacción a 25°C durante una hora.
3. Adicionar 5 ml de la reacción de recombinación a un tubo con 100 μ l de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α .
4. Aplicar choque térmico para transformar las células: 30 minutos en hielo y 45 seg a 42°C y luego adicionar 800 μ l de caldo super óptimo (SOC), [2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa].
5. Incubar a 37 °C con agitación a 100 rpm durante una hora y centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min.
6. Resuspender la pastilla en 100 μ l del sobrenadante y colocar en cajas Petri que contengan medio LB sólido con espectinomicina (200 mg/ml).
7. Incubar a 37°C durante 16 h.
8. Seleccionar colonias positivas y realizar PCR en colonia (Figura A3).
9. Purificar el plásmido y verificar su amplificación en un gel de agarosa al 1.2%.
10. Mandar a secuenciar el plásmido pk2gw7-HyPer3 (Figura A2b).
11. Conservar del plásmido pk2gw7-HyPer3 en glicerol al 80% y almacenar en el ultracongelador a - 20°C.

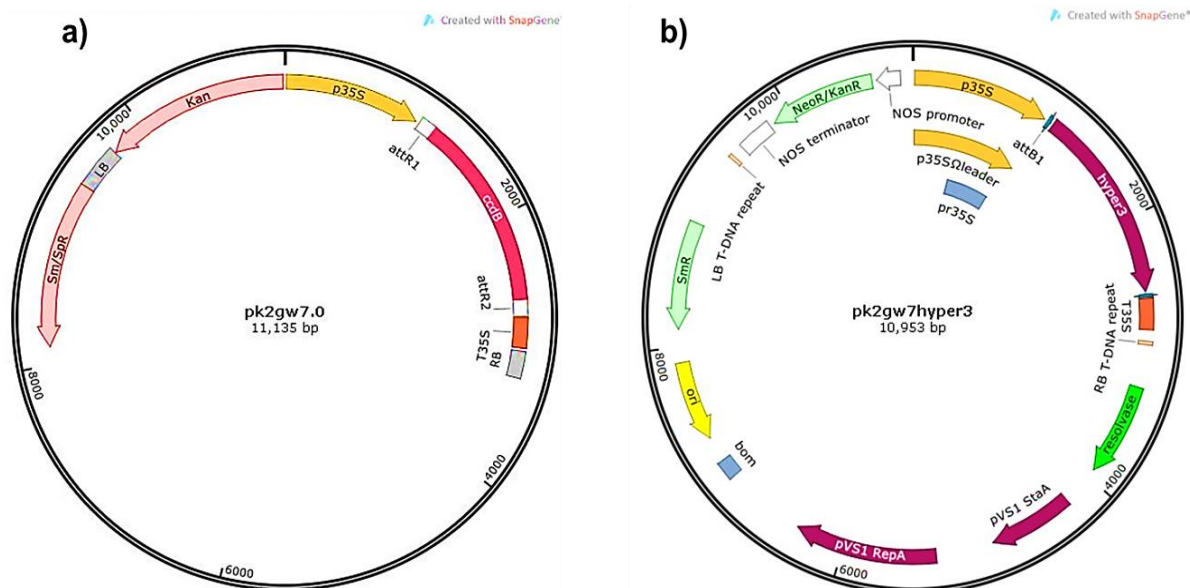


Figura A2. Vector de expresión en plantas pk2gw7.0. a) El vector contiene los sitios de recombinación attR1 y attR2 para su recombinación con el plásmido pENTR:-HyPer3, un promotor p35S y un gen de resistencia a kanamicina. b) El Vector pk2gw7.0 que contiene la secuencia de interés HyPer 3 de 1437 pb, este constructo fue recombinado en células de *E. coli* DH5 α . (Imágenes del software Snap Gene ® versión 2.3.2.). La secuencia de este constructo se encuentra disponible en la base de datos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el número de acceso 3879.

Perspectivas del uso del constructo pk2gw7.0:HyPer3

- Estandarizar las condiciones de transformación de protoplastos con el plásmido pk2gw7-Hyper3.
- Comparar los protoplastos transformados con el vector pk2gw7.0:HyPer3 con los protoplastos transformados con el vector vacío, por microscopía confocal y por PCR.
- Analizar los niveles de H₂O₂ *in vivo* en protoplastos transformados (con y sin tratamiento con AS) con el plásmido pk2gw7-Hyper3.

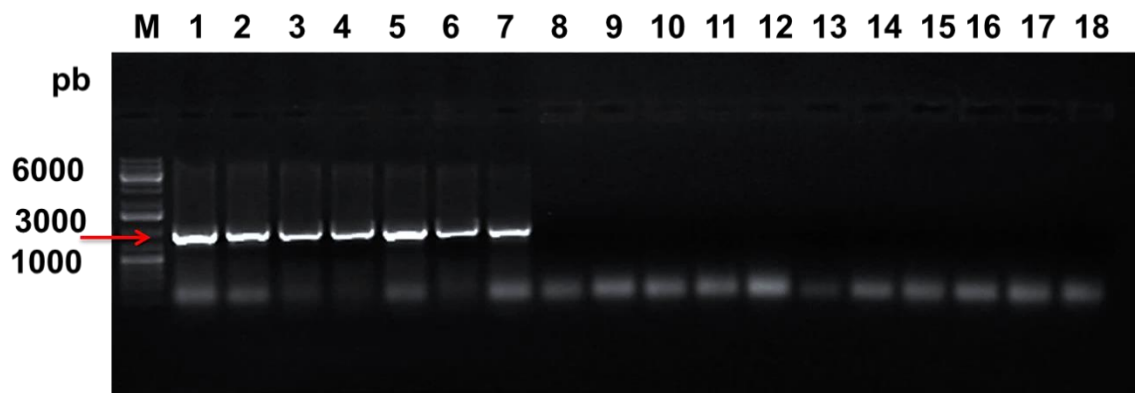


Figura A3. Amplificación de la clona pk2gw7.0:HyPer3 en un gel de agarosa al 1.2%. El constructo de la clona se llevó a cabo en el vector de expresión pk2gw7.0 con la secuencia de la sonda molecular HyPer3, la amplificación se realizó mediante una PCR empleando el oligonucleótido en sentido (pH735S) y el oligonucleótido antisentido con el número de acceso 3879 (datos de secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM). El tamaño esperado del constructo es de 973 pb. Los números en los carriles indican las clonas tomadas del cultivo y el carril con la letra M se refiere al marcador de peso molecular de 1 kb.