

Universidad de La Habana

Facultad de Biología



Diseño de un protocolo para la medición de la actividad de enzimas de defensa en plantas de *Raphanus sativus*.

Autor: Sheila Toledo Blanco

**Tutores: Dr. Georgina Espinosa López
Lic. Elaine Puentes Bermúdez**

Trabajo de Diploma presentado en opción
al título de Licenciada en Bioquímica
y Biología Molecular.

Septiembre de 2020

A ustedes, que son mis pilares.

Agradecimientos

A mis tutoras Georgina Espinosa y Elaine Puentes quienes me han guiado en este camino, brindándome sus conocimientos y apoyándome en cada paso. Gracias por transmitirme su experiencia, por ser mis ejemplos e influir tanto en mi formación. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. A ambas, infinitas gracias.

A todos los profesores de la Facultad de Biología, quiénes fueron esenciales en mi formación profesional. A mis compañeros de la universidad y amigos, a Katherine Menéndez, Ana Jessica Díaz, y en especial a Isabel López, por su apoyo imprescindible.

Por último y no menos importante a mi familia, mi abuela, mi tío y mis padres quienes han sido esenciales en mi formación, sin ustedes esto no fuese posible. A mis segundos padres, mis trikis, gracias por su cariño, por hacerme crecer cada día.

En especial, a Albe, gracias por ser un pilar fundamental en toda esta experiencia y darme fuerzas cuando más lo necesitaba.

A todos sinceramente, *Muchísimas Gracias.*

Listado de abreviaturas y acrónimos

AS: Ácido salicílico.

BL: Brasinólida.

BRI1: *Receptor Brassinosteroid-Insentive 1*.

BRs: Brasinoesteroides.

BSA: Albúmina de Suero Bovino, *Bovine albumin serum* (por sus siglas en inglés).

CAT: Catalasa.

CBBG: Azul Coomassie Brillante G-250, *Coomassie Brilliant Blue G-250* (por sus siglas en inglés).

CNPR: Centro de Investigación de Productos Naturales.

DETAPAC: *Diethylene Triamine Penta Acetic Acid* (por sus siglas en inglés)

EDTA: *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid* (por sus siglas en inglés).

ETI: Inmunidad Desencadenada por Efectores, *Effector-Triggered Immunity* (por sus siglas en inglés).

EtOH: Etanol.

HR: Respuesta Hipersensible, *Hypersensitive Response* (por sus siglas en inglés).

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina, *L-dihydroxy phenylalanine* (por sus siglas en inglés).

LRR: Repeticiones Ricas en Leucina, *Leucine rich repeat* (por sus siglas en inglés).

NaCl: Cloruro de Sodio.

DO : Densidad óptica.

PAMP/MAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, *Pathogenor Microbe-Associated Molecular Patterns* (por sus siglas en inglés).

PPO: Polifenol oxidasa, *Polyphenol oxidase* (por sus siglas en inglés).

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones, *Pattern Recognition Receptors* (por sus siglas en inglés).

PTI: Inmunidad Desencadenada por Patrones, *Pattern Triggered Immunity* (por sus siglas en inglés).

PUFA: Ácidos grasos poli-insaturados, *polyunsaturated fatty acid* (por sus siglas en inglés).

PVPP: Polivinil Pirrolidona.

ROS: Especies reactivas del oxígeno, *reactive oxygen species* (por sus siglas en inglés).

SOD: Superóxido dismutasa.

24-epiBL: 24-epibrasinólida.

28-HomoBL: 28-homobrasinólida.

Resumen

Las plantas son organismos sésiles que se enfrentan a condiciones adversas tanto bióticas, como abióticas. Ante estas condiciones se desencadenan respuestas de defensa que incluyen el aumento de la actividad de un grupo de enzimas. Los diferentes mecanismos de defensa son regulados mediante fitohormonas, entre ellas los brasinoesteroides (BRs), cuya aplicación exógena o la modificación de su contenido en plantas, puede conducir al incremento de la actividad de estas enzimas. Este trabajo tiene como objetivo diseñar un protocolo que permita la posterior evaluación del efecto de dos análogos sintéticos de BRs en las enzimas de defensa superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y polifenol oxidasa (PPO) en plantas de *Raphanus sativus*. En el trabajo se identifican las metodologías para la preparación de extractos enzimáticos que permitan evaluar la actividad de las mismas. Para la medición de SOD se establece la metodología de extracción con acetona como correcta, mientras que las enzimas CAT y PPO se evalúan en extractos acuosos. Se establecen los ensayos que permiten la determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas SOD, CAT y PPO en extractos enzimáticos crudos.

Palabras clave: catalasa, extractos enzimáticos crudos, polifenol oxidasa, *Raphanus sativus*, superóxido dismutasa.

Abstract

Plants are sessile organisms that face adverse conditions, both biotic and abiotic. These conditions trigger defensive responses that include increased activity of a group of enzymes. The different defense mechanisms are regulated by phytohormones, among them brassinosteroids (BRs), whose exogenous application or the modification of their content in plants can lead to an increase in the activity of these enzymes. This work aims to design a protocol that allows the subsequent evaluation of the effect of two synthetic BRs analogues on the defense enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and polyphenol oxidase (PPO) in *Raphanus sativus* plants. The work identifies the methodologies for the preparation of enzyme extracts that allow evaluating their activity. For the measurement of SOD, the acetone extraction methodology is established as correct, while the CAT and PPO enzymes are evaluated in aqueous extracts. The tests that allow the determination of the kinetic parameters of the enzymes SOD, CAT and PPO in crude enzyme extracts are established.

Keywords: catalase, enzymatic crude extract, polyphenol oxidase, *Raphanus sativus*, superoxide dismutase.

Índice general

Introducción	1
Objetivos	4
1. Revisión Bibliográfica	5
1.1. Mecanismos de defensa en plantas.	5
1.1.1. Defensa ante ataque de patógenos.	5
1.1.2. Defensas ante estrés abiótico.	7
1.1.3. Defensa hormonal.	7
1.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS).	10
1.2.1. Producción de ROS.	11
1.2.2. Efectos de ROS.	11
1.3. Estrés oxidativo.	13
1.3.1. Mecanismos de resistencia	13
1.4. Enzimas de defensa en plantas.	15
1.4.1. Superóxido Dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1).	15
1.4.2. Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6).	16
1.4.3. Polifenol oxidasa (PPO) (EC 1.10.3.1).	17
1.5. Parámetros experimentales.	18
1.6. <i>Raphanus sativus</i> como modelo experimental.	19
2. Materiales y Métodos	21
2.1. Material vegetal.	21
2.2. Diseños experimentales.	21
2.2.1. Primer diseño experimental: Actividad enzimática en plantas no sometidas a estrés salino.	21

2.2.2.	Segundo diseño experimental: Actividad enzimática en plantas sometidas a estrés salino (NaCl).	22
2.3.	Metodologías para la extracción de enzimas.	24
2.3.1.	Protocolo de extracción propuesto por Liu <i>et al.</i> (2010), con modificaciones.	24
2.3.2.	Protocolo de extracción propuesto por Baquero Duarte <i>et al.</i> (2005), con modificaciones.	24
2.4.	Determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford.	25
2.4.1.	Medición de la proteína estándar.	25
2.4.2.	Cuantificación de proteínas en el extracto enzimático.	25
2.5.	Ensayos enzimáticos.	25
2.5.1.	Superóxido Dismutasa (SOD).	26
2.5.2.	Catalasa (CAT).	27
2.5.3.	Polifenol Oxidasa (PPO).	28
2.6.	Procesamiento matemático.	29
3.	Resultados	30
3.1.	Determinación de la cantidad de proteínas.	30
3.2.	Enzima Superóxido Dismutasa (SOD).	31
3.2.1.	Actividad enzimática de SOD en extractos obtenidos mediante protocolo de extracción enzimática propuesto por Liu <i>et al.</i> (2010), con modificaciones.	31
3.2.2.	Actividad enzimática de SOD en extractos obtenidos mediante protocolo de extracción enzimática propuesto por Baquero Duarte <i>et al.</i> (2005), con modificaciones.	33
3.3.	Enzima Catalasa (CAT).	35
3.4.	Enzima Polifenol Oxidasa (PPO).	35
3.4.1.	PPO, primer diseño experimental: plantas no sometidas a estrés salino.	36
3.4.2.	PPO, segundo diseño experimental: plantas sometidas a estrés salino.	37

4. Discusión	39
4.1. Determinación de la cantidad de proteínas.	40
4.2. Enzima Superóxido Dismutasa (SOD).	41
4.3. Enzima Catalasa (CAT)	43
4.4. Enzima Polifenol Oxidasa (PPO).	44
5. Conclusiones	46
6. Recomendaciones	47
Literatura Citada	48

Introducción

Las plantas son productores primarios que desempeñan un papel fundamental en la sostenibilidad de la vida en la Tierra (Mithöfer *et al.*, 2016) y representan una rica fuente de nutrientes para muchos organismos, incluyendo: bacterias, hongos, protistas, insectos y vertebrados. Por su parte, los hombres dependen casi exclusivamente de las plantas para la alimentación y las utilizan, además, para la obtención de otros productos importantes como maderas, medicinas y biocombustibles (Freeman y Beattie, 2008).

Las plantas son organismos sésiles, por lo que están obligados a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos (Vivanco *et al.*, 2005). Continuamente se enfrentan a condiciones adversas tanto bióticas, como abióticas, frente a las cuales se desencadenan respuestas de defensa.

Entre los mecanismos de defensa que se pueden desencadenar se incluye el aumento de la actividad de enzimas que participan en las respuestas de defensa, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la polifenol oxidasa (PPO).

La SOD es una familia de enzimas que constituye la primera línea de defensa antioxidante en plantas, catalizando la descomposición de una de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), el anión superóxido. La actividad de la enzima le permite a la planta mantener un balance entre la producción y eliminación de este anión, que a altas concentraciones puede provocar daños significativos en las estructuras celulares (Gill *et al.*, 2015).

La CAT es una hemoproteína tetramérica que está presente en la mayoría de los or-

ganismos aerobios y es una de las enzimas principales en el catabolismo del peróxido de hidrógeno (Luhova *et al.*, 2003). El peróxido de hidrógeno participa en numerosos procesos de regulación dentro de la planta (Xie *et al.*, 2019) y su balance es imprescindible, ya que puede ocasionar daños oxidativos a estructuras celulares. Además, a partir del peróxido de hidrógeno, en presencia de metales de transición, se puede formar el radical hidroxilo que tiene la capacidad de reaccionar rápidamente con todo tipo de macromoléculas y no existe un mecanismo enzimático que lo elimine (Møller *et al.*, 2007).

La PPO son una familia de metaloenzimas monoméricas que reaccionan con una amplia gama de sustratos fenólicos, catalizando la oxidación de fenoles propios de la célula a quinonas. Han sido implicadas en las respuestas de defensa de las plantas debido a la aparición de sus productos de reacción en el momento de ataques de patógenos e insectos, lesiones y diferentes tipos de estrés (Mayer y Harel, 1979; Constabel *et al.*, 1995; Maki y Morohashi, 2006).

Los diferentes mecanismos de defensa de las plantas frente a condiciones adversas son regulados mediante fitohormonas (Verma *et al.*, 2016). Los brasinoesteroides (BRs) pertenecen a este grupo de moléculas y son esenciales en los procesos de expansión y división celular, diferenciación de tejidos, reproducción y resistencia a distintos tipos de estrés bióticos y abióticos (Belkhadir y Chory, 2006). La aplicación exógena o la modificación de su contenido en plantas, puede conducir al incremento de la tolerancia al estrés de los cultivos (Moreno-Castillo *et al.*, 2018), modulando la actividad de enzimas de defensa, entre ellas: SOD, CAT y PPO (Fariduddin *et al.*, 2014), por lo que presentan un gran potencial en la agricultura (Hernández Silva y García-Martínez, 2016).

Entre los BRs, la Brasinólida (BL) presenta mayor actividad. Desafortunadamente su contenido en fuentes naturales es sumamente bajo y tanto su aislamiento como su síntesis, son costosas. La 24-epibrasinólida (24-epiBL), es un estereoisómero de BL y es el BRs más ampliamente utilizado hasta la fecha, pero sus aplicaciones prácticas son limitadas debido a su elevado precio. Por esta razón, el desarrollo nuevas moléculas con buena actividad y bajo costo es de gran significado práctico (Lei *et al.*, 2017).

El laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación de Productos Naturales (CNPR) de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, desarrolló productos a partir de saponinas y fitoesteroides de plantas, y mediante ensayos de actividad biológica observaron que algunos de estos tienen efectos naturales similares a BRs. Moreno-Castillo *et al.* (2018) analizaron, mediante métodos computacionales, la afinidad y las formas de unión de estos compuestos sintéticos análogos de BRs a su receptor BRI1 e indicaron que 17 de ellos pueden ser considerados buenos candidatos para la realización de pruebas biológicas.

Dos de estos compuestos (DI-31 y MH-5) se seleccionaron para el análisis del efecto de su aplicación en las enzimas de defensa SOD, CAT y PPO, en plantas de *Raphanus sativus*. Para diseñar un protocolo que permita la evaluación de los efectos de estos análogos sintéticos de brasinoesteroides, en la actividad de estas enzimas que participan en la defensa de las plantas, se hace necesario optimizar técnicas y metodologías para determinar la actividad de estas enzimas.

Objetivo General

Diseñar protocolos para determinar la actividad de enzimas de defensa en plantas de *Raphanus sativus*.

Objetivos específicos

1. Determinar una metodología para la obtención del extracto crudo de proteínas.
2. Establecer los ensayos que permitan determinar los parámetros cinéticos de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y polifenol oxidasa (PPO).

Capítulo 1

Revisión Bibliográfica

1.1. Mecanismos de defensa en plantas.

Las plantas juegan un papel fundamental en la sostenibilidad de la vida en la Tierra, al convertir en nutrientes la energía solar, por lo que son la fuente vital de la mayoría de los organismos. Continuamente se enfrentan a condiciones adversas tanto bióticas (bacterias, virus, viroides, hongos, protistas, micoplasmas e invertebrados), como abióticas (sequías, temperaturas extremas, presencia de metales pesados, entre otros), frente a las cuales se desencadenan respuestas de defensa. Para hacer frente a estas amenazas, las plantas poseen un sistema de defensa altamente sofisticado, el cual, como el sistema inmune en animales, reconoce las moléculas no propias o señales emitidas por las células dañadas, y responden por activación de una efectiva respuesta inmune contra los organismos invasores (Jones y Dangl, 2006; Howe y Jander, 2008).

1.1.1. Defensa ante ataque de patógenos.

Los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos pueden ser clasificados en dos categorías: defensas constitutivas o preexistentes y defensas inducidas (Mithöfer y Boland, 2012).

Defensas constitutivas o preexistentes.

Los mecanismos de defensa constitutivos, siempre están presentes en las plantas. Estos mecanismos incluyen características estructurales y productos del metabolismo

secundario que poseen propiedades antimicrobianas. Estos metabolitos secundarios pueden existir en formas biológicamente activas o pueden ser almacenados en compartimentos celulares específicos como precursores inactivos que se activan enzimáticamente en respuesta a ataques de patógenos o daños tisulares (Mithöfer *et al.*, 2016).

Defensas inducidas.

A diferencia de las defensas constitutivas, la activación de los mecanismos de defensa inducida dependen del reconocimiento del patógeno por la planta.

La Inmunidad Desencadenada por Patrones (PTI, por sus siglas en inglés) constituye la primera línea de defensa de las plantas frente al ataque por patógeno, y tiene lugar a través del reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP/MAMPs, por sus siglas en inglés) relativamente conservados, que interactúan con Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) ubicados en la superficie celular (Trdá *et al.*, 2015). Sin embargo, en numerosas ocasiones, existen patógenos que son capaces de emitir moléculas efectoras que rompen esta primera línea de defensa (De Jonge *et al.*, 2010; Bardoel y van Strijp, 2011). Frente a estos patógenos exitosos, las plantas tienen una segunda línea de defensa, donde proteínas de Resistencia (R) median el reconocimiento de estos efectores específicos del atacante, lo que conlleva a una Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI, por sus siglas en inglés) (Pieterse *et al.*, 2009).

La PTI conduce a la fortificación de la pared celular, induce la expresión de genes que codifican proteínas antimicrobianas o enzimas que participan en vías de síntesis de compuestos antimicrobianos y estimula la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La ETI también conduce a muchas de estas respuestas, pero es usualmente más fuerte que la PTI ya que tiene un efecto nocivo directo sobre el patógeno e induce genes de defensa (Grant y Loake, 2000). A menudo culmina en un proceso donde se produce la muerte celular programada que se conoce como Respuesta Hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) (Taiz *et al.*, 2017).

1.1.2. Defensas ante estrés abiótico.

Las plantas se encuentran frecuentemente expuestas a condiciones ambientales desfavorables que afectan su crecimiento, desarrollo y reproducción. Entre estas condiciones se encuentran: inundaciones, sequías, temperaturas extremas, salinidad excesiva de los suelos, disposición inadecuada de nutrientes y el exceso o deficiencia de luz. Como resultados directos de la influencia del estrés, o de los daños que produce, se desencadena un amplio rango de respuestas vegetales que puede modificar la expresión genética y el metabolismo celular (Buchanan *et al.*, 2015).

Los mecanismos de resistencia al estrés abiótico pueden ser agrupados en dos categorías: mecanismos de evasión, que previenen la exposición al estrés, y los mecanismos de tolerancia, que le permiten a la planta resistir a este tipo de estrés. Algunos mecanismos de tolerancia como el cierre de los estomas, las espinas reflectoras de la luz y las raíces profundas, son rasgos constitutivos que están presentes en plantas, independientemente de la presencia o no de condiciones ambientales desfavorables. Existen, además, otros mecanismos de resistencia que son adquiridos a través del proceso de aclimatación, donde las plantas alteran su homeostasis, en respuesta a los cambios de los factores ambientales (Buchanan *et al.*, 2015).

1.1.3. Defensa hormonal.

Las hormonas vegetales son moléculas de señalización que están presentes en muy pequeñas cantidades. La sensibilidad del tejido a estas y los cambios en la concentración hormonal median procesos de desarrollo y las respuestas de defensa frente a factores ambientales (Verma *et al.*, 2016).

Brasinoesteroides (BRs).

En los inicios de 1960, se pensaba que el rápido crecimiento y germinación de granos de polen estaban asociados a la presencia de un promotor del crecimiento (Buchanan *et al.*, 2015). Esta percepción cambió cuando Mitchell *et al.* (1970) observaron cómo un extracto crudo de polen de *Brassica napus* (nabo) indujo una rápida elongación de

los internodos de *Phaseolus vulgaris* (frijol pinto). Este primer trabajo condujo a que en 1979 se aislara por primera vez, a partir del polen de *Brassica napus*, un promotor de crecimiento vegetal de naturaleza esteroidea, el cual recibió el nombre de Brasinólida (BL) (Fig. 1a) (Grove *et al.*, 1979). A partir de este descubrimiento, se han identificado más de 70 productos naturales de similar estructura y función, los cuales han sido catalogados como Brasinoesteroides (BRs) y constituyen un sexto grupo de fitohormonas (Kutschera y Wang, 2012).

Los BRs desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, regulando diversos procesos entre los que se encuentran: elongación y división celular, fotomorfogénesis, diferenciación del xilema, reproducción y respuesta ante estrés tanto biótico, como abiótico (Nolan *et al.*, 2020). Están presentes en plantas vasculares y no vasculares, y en todos los órganos vegetales (raíces, tallos, hojas, flores, antenas, polen semillas y granos) (Bajguz y Tretyn, 2003; Zullo y Bajguz, 2019).

Estructuralmente los BRs poseen cuatro anillos y una cadena lateral y se forman a partir de la condensación de bloques de cinco átomos de carbono, denominados isoprenos (Bishop y Yokota, 2001). De acuerdo al número de moléculas de carbono presentes en los BRs, estos se pueden clasificar en C27-BR, C28-BR y C29-BR (Bajguz *et al.*, 2020).

Los BRs son reconocidos por un ectodominio de repeticiones ricas en Leucina (LRR) del receptor BRI1 (Clouse, 2015), el cual es miembro de una familia de receptores de membrana tipo tirosina quinasa. Una vez que se produce la unión BRs-BRI1 se inicia una cascada de señalización intracelular que comienza con la autofosforilación del receptor y culmina en la modificación de la expresión genética (Karlova y de Vries, 2006).

Está ampliamente descrito en la literatura cómo la aplicación exógena de BRs incrementa la actividad de las enzimas de defensa antioxidantes, lo que aumenta la tolerancia de las plantas ante distintos tipos de estrés abiótico, entre ellos: estrés por metales pesados (Arora *et al.*, 2012; Yusuf *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018; Dalyan *et al.*, 2018), temperaturas extremas (Hayat *et al.*, 2010; Mazorra *et al.*, 2011; Fariduddin *et al.*, 2011), sequías (Anjum *et al.*, 2011; Lima y Lobato, 2017), salinidad (El-Mashad y

Mohamed, 2012; Ding *et al.*, 2012), entre otros.

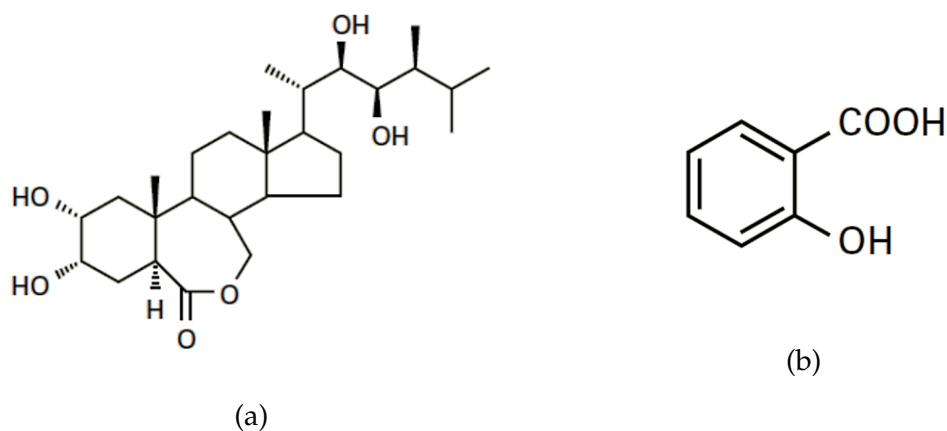


Figura 1: Estructura de hormonas vegetales, modificado de Buchanan *et al.* (2015)
a) Brasinólida (BL) y b) Ácido salicílico (AS).

La BL está considerada como el brasinoesteroide natural más activo descubierto hasta la fecha (Grove *et al.*, 1979). Desafortunadamente, su concentración en fuentes naturales es baja, y tanto su purificación de fuentes vegetales como su síntesis orgánica constituye un proceso bastante costoso (Moreno-Castillo *et al.*, 2018). Por tanto, se han buscado otras alternativas basadas en la síntesis de nuevas moléculas con alto grado de actividad biológica con bajos costos de producción (Lei *et al.*, 2017).

En este sentido, el laboratorio de Bioproductos del Centro de Investigación de Productos Naturales (CNPR) de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, ha desarrollado diversos productos a partir de saponinas y fitoesteroides de plantas, y mediante ensayos de actividad biológica se ha observado que algunos de estos tienen efectos naturales similares a BRs (Moreno-Castillo *et al.*, 2018). Se analizaron, mediante métodos computacionales, la afinidad y las formas de unión de estos compuestos sintéticos análogos de BRs a su receptor BRI1 e indicaron que 17 de ellos pueden ser considerados buenos candidatos para la realización de pruebas biológicas. Entre estos análogos funcionales se destacan dos compuestos, DI-31 y MH-5 (Fig. 2), que han arrojado resultados prometedores en el efecto de estos compuestos en la defensa de las plantas frente al ataque por patógenos.

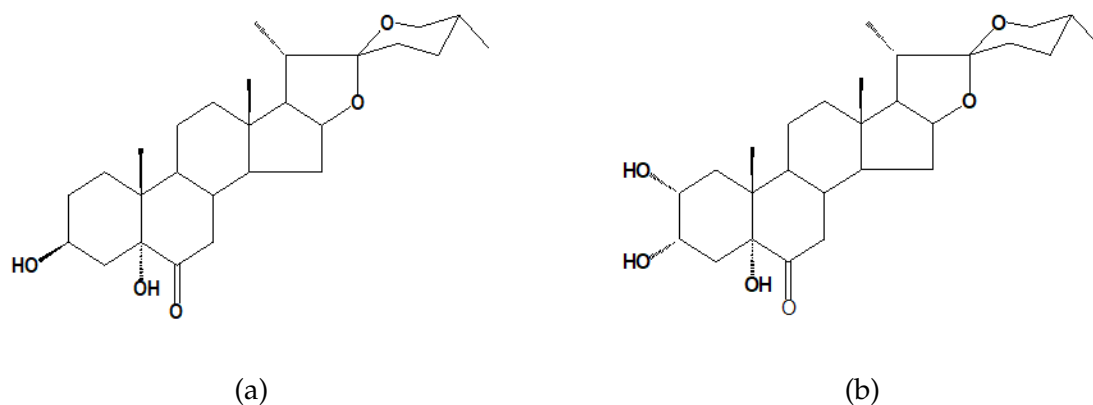


Figura 2: Estructura de análogos sintéticos de BRs a) DI-31 y b) MH-5.

Ácido salicílico (AS).

El AS (Fig. 1b) es una hormona vegetal de naturaleza fenólica que participa en varias respuestas fisiológicas (Raskin, 1992) y se asocia con la activación de proteínas que participan en las respuestas de defensa (Glazebrook, 2005).

En la literatura existen abundantes informes de la función del AS en la defensa contra distintos tipos de estrés abiótico, como los producidos por metales pesados (Al-yemeni *et al.*, 2014), bajas temperaturas (Mutlu *et al.*, 2013), sequías (Alam *et al.*, 2013) y salinidad (Fayez y Bazaid, 2014), mediante el aumento de la actividad de las enzimas de defensa antioxidante.

1.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son metabolitos del oxígeno molecular (Pandey, 2014) que se generan en las plantas como consecuencia inevitable de las reacciones metabólicas aerobias (Buchanan *et al.*, 2015) o como respuesta de defensa. El oxígeno molecular es generalmente inactivo debido a la configuración de sus electrones (Eltner, 1987), pero a diferencia de este, las ROS son moléculas inestables y altamente reactivas. Entre las ROS se incluyen radicales del oxígeno: anión superóxido ($O_2^- \bullet$), radical hidroxilo ($OH \bullet$) y radical perhidroxilo ($O_2H \bullet$) y otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el singlete de oxígeno (1O_2) (Buchanan *et al.*, 2015).

1.2.1. Producción de ROS.

En las plantas, la formación de ROS se lleva a cabo en diferentes compartimentos celulares (Apel y Hirt, 2004) e implica la fuga de electrones desde las cadenas transportadoras hacia el dioxígeno (Corpas *et al.*, 2015). Los cloroplastos y los peroxisomas son los principales productores en presencia de luz, mientras que la mitocondria es su principal fuente en condiciones de oscuridad (Choudhury *et al.*, 2013).

El anión superóxido se produce principalmente en mitocondrias, apoplastos y en el fotosistema I (PSI) de los cloroplastos, mientras que el peróxido de hidrógeno se genera en los peroxisomas (Gechev *et al.*, 2006; Halliwell, 2006).

El singlete de oxígeno se produce principalmente en el fotosistema II de los cloroplastos. Su formación estimula la producción de otras ROS (Buchanan *et al.*, 2015), pero no se relaciona con la transferencia de electrones, ya que es el primer estado excitado del dioxígeno, producido mediante fotoactivación (Triantaphylidès y Havaux, 2009).

Como se muestra en la figura 3, la reducción del O_2 ocurre a través de una secuencia de pasos. La primera reducción produce radicales superóxido o hidroperóxido. Posteriormente, el superóxido es dismutado a peróxido de hidrógeno, lo cual puede ocurrir de forma espontánea (por pérdida de un electrón) o mediante la acción de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) (Gechev *et al.*, 2006). El peróxido de hidrógeno producido puede ser transformado al radical hidroxilo en presencia de metales de transición como el hierro (Fe), mediante las reacciones de Haber-Weiss (o de Fenton) (Dat *et al.*, 2000). Este también puede ser eliminado por acción de la enzima catalasa (CAT) o del ciclo ascorbato-glutatión (Blokina *et al.*, 2003; Rinalducci *et al.*, 2008).

1.2.2. Efectos de ROS.

Cuando los niveles de ROS son bajos o moderados funcionan como segundos mensajeros que median una serie de reacciones en las células de las plantas, incluyendo el cierre de los estomas, la muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés)

producción finalmente conduce a la muerte de la célula (Møller *et al.*, 2007; Sharma y Dietz, 2009; Gill y Tuteja, 2010).

En cualquier caso, si la concentración intracelular de las ROS no es controlada, la consecuencia directa es el daño a estructuras celulares debido a la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y componentes del ADN, así como la interrupción de rutas metabólicas (Møller *et al.*, 2007; Imlay, 2008).

1.3. Estrés oxidativo.

Existen vías de eliminación que metabolizan las ROS y de esta forma controlan su concentración. Sin embargo, un desbalance en la generación y metabolismo de los niveles de ROS, interrumpe la homeostasis celular conduciendo a una variedad de retos fisiológicos que de forma general se conocen como “estrés oxidativo”(Pandey, 2014).

En las células vegetales, el mayor daño oxidativo se produce en proteínas y lípidos. La actividad de las proteínas se altera mediante modificaciones en su estructura (Grimm *et al.*, 2012), mientras que los lípidos, generalmente los poliinsaturados, pueden experimentar un proceso de descomposición oxidativa en la membrana plasmática, conocido como peroxidación lipídica (Catalá y Díaz, 2016; Gaschler y Stockwell, 2017). Se ha demostrado que la peroxidación lipídica desencadena una serie de reacciones que producen otras moléculas altamente reactivas, como cetonas, aldehídos y monóxido de hidrógeno; además, puede modificar proteínas mediante la oxidación de algunos residuos aminoacídicos (Farmer y Mueller, 2013; Reginato *et al.*, 2015).

1.3.1. Mecanismos de resistencia

Debido a los efectos dañinos que puede producir un desbalance de ROS, las plantas poseen un sistema de defensa antioxidante eficiente que evita el daño oxidativo y a la vez garantiza las funciones de señalización de las ROS (Liu *et al.*, 2009; Gill y Tuteja, 2010). Este sistema de defensa está compuesto por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos altamente regulados, que mantienen un balance entre la producción

y eliminación de ROS, con el objetivo de mantener la homeostasis redox de la célula (Møller, 2001).

Mecanismos no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos en plantas incluyen: ascorbato, glutatión reducido, taninos, flavonoides, α -tocoferol, carotenoides y precursores de la lignina (Apel y Hirt, 2004), que actúan a través de una serie de reacciones redox y evitan el daño oxidativo (Blokhina *et al.*, 2003).

Los carotenoides y flavonoides neutralizan algunas ROS, entre las que se incluyen el peróxido de hidrógeno y el singlete de oxígeno. El ascorbato es el antioxidante hidrosoluble más abundante y poderoso que protege las membranas. El glutatión reducido constituye un importante mecanismo antioxidante y está involucrado en algunas funciones vitales dentro de la célula (Mittler, 2002). El α -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble en las membranas fotosintéticas donde protege contra la peroxidación lipídica (Gechev *et al.*, 2006).

Mecanismos enzimáticos

Los mecanismos enzimáticos incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodihidroascorbato reductasa (MDHAR), guaiacol peroxidasa (POX), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPX) (Riley *et al.*, 2004).

La SOD constituye la primera línea de defensa contra las ROS y es la única enzima en plantas que dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno puede ser directamente catabolizado por CAT, o en presencia de sustratos reductores por varios tipos de peroxidasas, en el ciclo ascorbato–glutatión (Halliwell, 2006).

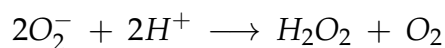
La extensión del estrés oxidativo en una célula está determinada por la cantidad de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Por lo tanto, el balance de las actividades de SOD y CAT es crucial para suprimir los niveles tóxicos de ROS en la

célula (Benezer-Benezer *et al.*, 2008).

1.4. Enzimas de defensa en plantas.

1.4.1. Superóxido Dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1).

Las Superóxido Dismutasas son una familia de metaloenzimas, descritas por primera vez por McCord y Fridovich (1969), que constituyen la primera línea de defensa antioxidante contra las ROS, catalizando la reacción:



Existen tres isoformas de la enzima que son clasificadas de acuerdo al ión metálico presente en el centro activo: cobre/zinc (SOD Cu/Zn), hierro (SOD Fe) y manganeso (SOD Mn). Estas isoenzimas están distribuidas en diferentes compartimentos celulares, probablemente porque el anión superóxido no puede difundir a través de las membranas (Takahashi y Asada, 1983), por lo que debe ser eliminado en su sitio de producción. La comparación de las secuencias y estructuras de estas isoformas indican que SOD Mn y SOD Fe están estrechamente relacionadas, mientras SOD Cu/Zn parecen haber evolucionado independientemente (Bowler *et al.*, 1994).

La isoforma SOD Cu/Zn es la más abundante en organismos eucariotas y está localizada principalmente en el citoplasma, en los cloroplastos y en diferentes tipos de peroxisomas. También se encuentran en el núcleo y en el apoplasto. La isoforma SOD Mn se ha encontrado en mitocondrias y peroxisomas, mientras que la isoforma SOD Fe está presente en los cloroplastos (Muñoz *et al.*, 2005).

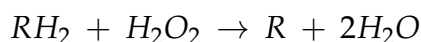
Para cada isoforma el mecanismo de catálisis es similar e involucra un bolsillo o pliegue rodeado de residuos aminoácidos cargados positivamente que atraen al anión superóxido hacia el centro activo de la enzima. El metal de transición presente en el centro activo lleva a cabo una transferencia de electrones entre dos aniones superóxido (Bowler *et al.*, 1994).

1.4.2. Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6).

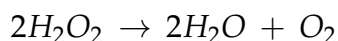
La catalasa ($H_2O_2:H_2O_2$ oxidorreductasa) es una hemoproteína tetramérica que está presente en la mayoría de los organismos aerobios. Además, es una de las enzimas principales en el catabolismo del peróxido de hidrógeno (Luhova *et al.*, 2003).

Las CAT de plantas se encuentran mayormente en los peroxisomas (Luhova *et al.*, 2003) y existen varias isoformas de la enzima, lo que sugiere que posee múltiples funciones (Scandalios *et al.*, 1997).

En dependencia de la concentración de peróxido de hidrógeno, la CAT puede ejercer una función dual (Deisseroth y Dounce, 1970). A bajas concentraciones puede actuar peroxidativamente, donde varias sustancias como el etanol y el ácido ascórbico pueden ser oxidadas siguiendo la reacción:



Mientras que a altas concentraciones de sustrato la CAT descompone rápidamente el peróxido de hidrógeno mediante la reacción catalítica:



Evidencias cinéticas y espectrofotométricas sugieren que la CAT utiliza un mecanismo de dos pasos en estas reacciones (Deisseroth y Dounce, 1970; Dounce, 1983).

En la reacción catalítica, la CAT presenta una constante de Michaelis-Menten muy elevada, en consecuencia, la enzima no se satura fácilmente con sustrato. De esta manera, la actividad enzimática aumenta linealmente frente a una amplia gama de concentraciones de peróxido de hidrógeno, lo que le permite controlar la concentración intracelular de esta ROS (Scandalios *et al.*, 1997).

1.4.3. Polifenol oxidasa (PPO) (EC 1.10.3.1).

Las PPO son una familia de metaloenzimas monoméricas que reaccionan con una amplia gama de sustratos fenólicos. El centro activo de la enzima consiste en dos átomos de cobre, cada uno acoplado con tres residuos de histidina conservados (Lerch, 1983; Huber *et al.*, 1985).

Las PPO se encuentran en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos y son liberadas al citoplasma ante daños mecánicos en la estructura tisular y celular que pueden ocurrir durante la senescencia, lesiones o estrés (Marshall *et al.*, 2000; Mayer, 2006). Esto conduce al contacto de la enzima con compuestos fenólicos que son liberados desde la vacuola, donde se encuentran almacenados (Queiroz *et al.*, 2008). La actividad catalítica de la enzima está influenciada por características estructurales de los sustratos, como la naturaleza de la cadena lateral y el número de grupos hidroxilo y la posición que ocupan en el anillo de benzeno (Macheix *et al.*, 1990).

La PPO cataliza dos reacciones (Fig. 4): la o-hidroxilación de monofenoles a o-difenoles (actividad creolasa) y la oxidación de estos a o-quinonas (actividad catecolasa), utilizando el oxígeno molecular como agente oxidante (Jukanti, 2017).

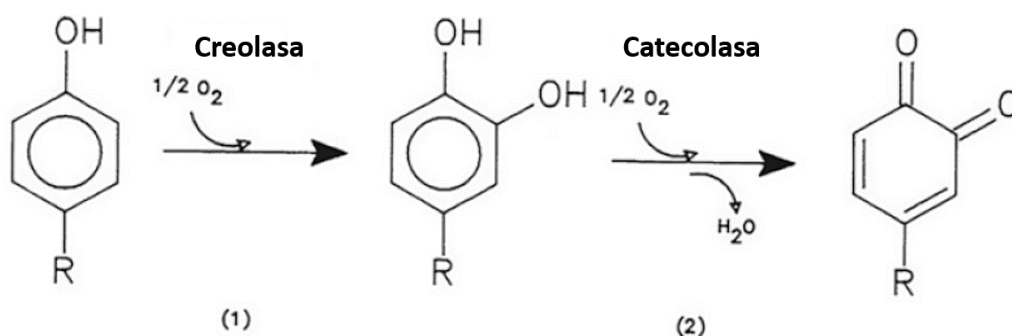


Figura 4: Actividad creolasa (1) y catecolasa (2) de PPO. Modificado de Nicolas *et al.* (1994).

Las o-quinonas generadas son altamente reactivas e inestables (Mayer, 2006) y pueden reaccionar con grupos amino y tiol de aminoácidos libres y proteínas mediante mecanismos no enzimáticos, o reaccionar covalentemente con otros compuestos fe-

nólicos para formar diferentes pigmentos, ocasionando así el efecto conocido como pardeamiento enzimático (Kumar *et al.*, 2008). Este efecto es muy común en frutas y verduras y ha sido propuesto como mecanismo de defensa contra patógenos e insectos (Mayer y Harel, 1979; Vaughn *et al.*, 1988).

Las PPO han sido implicadas en las respuestas de defensa de las plantas debido a la aparición de sus productos de reacción en el momento de ataques de patógenos e insectos, lesiones y diferentes tipos de estrés (Mayer y Harel, 1979; Constabel *et al.*, 1995; Maki y Morohashi, 2006). Además, se ha identificado que aplicaciones exógenas de BRs aumentan la tolerancia de plantas a diferentes tipos de estrés, mediante el incremento de la actividad de PPO (Sharma *et al.*, 2010, 2012; El-Mashad y Mohamed, 2012).

1.5. Parámetros experimentales.

En la figura 5 se muestra la velocidad máxima inicial (V_{max}) a una concentración determinada de enzima $[E_o]$. Este parámetro cinético posee las mismas unidades de v_o y representa la máxima eficiencia catalítica de una enzima frente a un sustrato específico, a la concentración de enzima y valores de pH, fuerza iónica y temperatura utilizados experimentalmente (Chávez *et al.*, 1990).

En la figura 5 también se muestra el valor de K_m . Este parámetro cinético representa la concentración inicial de sustrato $[S_o]$, que da lugar a una velocidad inicial igual a la mitad de la velocidad máxima y tiene las mismas unidades de $[S_o]$. El valor de K_m es característico de una enzima frente a un sustrato particular y en las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura del experimento, pero no depende de la concentración de enzima (Chávez *et al.*, 1990).

El valor de K_m medido de esta forma puede diferir de su valor verdadero, el cual es definido en términos de constantes de velocidad. Si hay presente inhibidores u otros factores, el valor medido debe ser denominado K_m aparente (Chávez *et al.*, 1990).

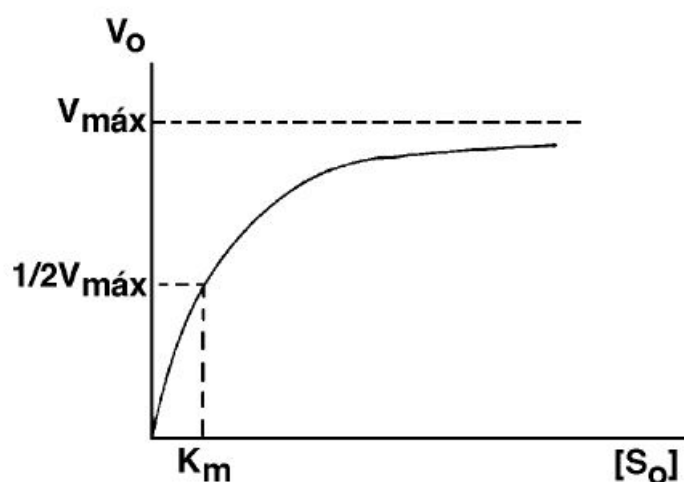


Figura 5: Representación gráfica de v_o en función de $[S_o]$, a $[E_o]$ constante, para una reacción enzimática monosustrato, a partir de la ecuación de Michaelis-Menten. V_{max} : velocidad máxima; K_m : constante de Michaelis (Chávez *et al.*, 1990).

En las condiciones de cumplimiento del equilibrio de Michaelis-Menten, cuando $K_m = K_s$ el valor de K_m puede reflejar la mayor o menor afinidad de una enzima por un sustrato. Esta relación es inversa, por tanto, a mayor valor de K_m más concentración de sustrato se requiere para alcanzar la mitad de V_{max} y viceversa (Chávez *et al.*, 1990).

En este trabajo, no es posible determinar la K_{cat} debido a que la enzima no está purificada, por lo que se trabajará con V_{max} . Por este motivo, tampoco se puede determinar el valor real de K_m , por lo que el valor obtenido para este parámetro será referido como K_{ma} y será utilizado para caracterizar las enzimas.

1.6. *Raphanus sativus* como modelo experimental.

La selección de este modelo experimental se basa en el gran número de fuentes existentes en la literatura, donde son utilizadas plantas de rábano para estudiar el efecto de BRs en las enzimas de defensa vegetal. El rábano es considerado un cultivo modelo para el estudio de los efectos de distintos tipos de estrés, entre ellos hídrico (Mahesh *et al.*, 2013), oxidativo (Sharma *et al.*, 2012) y por metales pesados (Dhriti *et al.*, 2014).

Las plantas de rábano poseen un tiempo relativamente corto de germinación, así como un bajo costo, lo que constituyen ventajas en su utilización como modelo experimental. Además, numerosos estudios han corroborado el aumento de las enzimas de defensa de *Raphanus sativus* al aplicar análogos sintéticos de BRs.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal.

Como modelo experimental se utilizaron plantas de *Raphanus sativus* (rábano). Las plantas se mantuvieron expuestas a la luz solar de forma indirecta, por un tiempo de aproximadamente 15 días, manteniéndose en condiciones constantes de luminosidad y de disponibilidad de agua y nutrientes.

2.2. Diseños experimentales.

Se describen dos diseños experimentales que permiten la evaluación de la actividad de las enzimas de defensa en plantas de *R. sativus* sometidas y no sometidas a estrés salino.

2.2.1. Primer diseño experimental: Actividad enzimática en plantas no sometidas a estrés salino.

Para este experimento se utilizó un total de 15 plantas de rábano, divididas en 5 grupos experimentales (3 plantas por grupo): Control negativo (planta sin tratar), Etanol (EtOH) (0,01 mg/mL), DI-31 (0,01 mg/mL), MH-5 (0,01 mg/mL) y Ácido Salicílico (AS) (0,01 mg/mL) como control positivo del experimento (Fig. 6).

Para su cultivo se preparó una mezcla de tierra/humus en partes iguales en un semillero germinador y se sembraron dos semillas en cada división. Cada grupo experimental fue sometido a un único tratamiento, los cuales fueron aplicados por aspersión foliar (con el uso de un nebulizador) en tres dosis: a las 0, 24 y 48 horas luego de comenzado el experimento.

Las hojas de las plantas se recolectaron a las 24, 48 y 72 horas después de haber comenzado el ensayo. Las muestras fueron maceradas en nitrógeno líquido y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.



Figura 6: Primer diseño experimental: Plantas de *Raphanus sativus* no sometidas a estrés salino. Tratamientos: AS, DI-31, EtOH y control negativo.

2.2.2. Segundo diseño experimental: Actividad enzimática en plantas sometidas a estrés salino (NaCl).

Este diseño se basa en la metodología propuesta por Muthukumarasamy *et al.* (2000) (con modificaciones) y permite estudiar el efecto de los compuestos DI-31 y MH-5 en la actividad de las diferentes enzimas ante estrés por salinidad. El diseño de los tratamientos se muestra en la tabla 1.

Para crear las condiciones de estrés salino se utilizó una solución de NaCl 80 mM, ya que esta concentración disminuye la masa seca en un 50% respecto al control (Muthukumarasamy *et al.*, 2000).

Tabla 1: Diseño de los tratamientos.

	Tratamientos
1	semillas con H_2O destilada
2	NaCl
3	NaCl + DI-31 (1 mg/mL)
4	NaCl + MH-5 (1 mg/mL)
5	NaCl + AS (1 mg/mL)

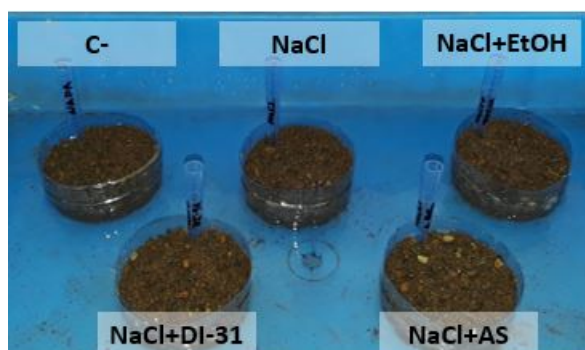


Figura 7: Segundo diseño experimental: Semillas de *Raphanus sativus* previas a su germinación sometidas a estrés salino. Tratamientos: control negativo, NaCl, NaCl+EtOH, NaCl+DI-31 y NaCl+AS.

Previo a la siembra, se incubaron las semillas de rábano por tres horas en una solución que contenía cada uno de los tratamientos utilizados, lo que constituye una de las diferencias fundamentales entre los diseños experimentales propuestos. Está ampliamente informado en la literatura que las incubaciones previas en agua o soluciones de varias sustancias afectan positivamente los rasgos tanto de la semilla, como del retoño (Burgass y Powell, 1984; Bradford, 1986; Taylor *et al.*, 1998; McDonald, 2000).

Posteriormente se sembraron diez semillas en cada recipiente relleno de una mezcla de tierra/humus en partes iguales. Los grupos experimentales fueron irrigados con las soluciones descritas anteriormente cada 5 días, durante un período de 30 días. Se recolectaron las hojas de las plantas a los 15 y 30 días después de la primera irrigación y se almacenaron a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior procesamiento.

2.3. Metodologías para la extracción de enzimas.

Para la preparación de los extractos enzimáticos crudos se utilizaron dos protocolos diferentes.

2.3.1. Protocolo de extracción propuesto por Liu *et al.* (2010), con modificaciones.

Se maceraron 500 *mg* de tejido vegetal, utilizando un mortero de cerámica, en nitrógeno líquido, para mantener baja la temperatura y asegurar la ruptura tisular. A la muestra pulverizada se le añadió 1 *mL* de la Solución de Extracción (Fosfato de Sodio 50 *mM*, EDTA disódico 1 *mM*, 2 % Polivinil Pirrolidona (PVPP), pH 7.0; 4°C).

Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 *g* por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a tubos limpios y utilizado para la cuantificación de proteínas y los ensayos enzimáticos de SOD, CAT y PPO.

2.3.2. Protocolo de extracción propuesto por Baquero Duarte *et al.* (2005), con modificaciones.

En un mortero de cerámica se maceraron 500 *mg* de material vegetal en nitrógeno líquido, para asegurar la baja temperatura y la ruptura tisular.

Una vez triturado el tejido, se añadió al mortero 1 *mL* de Acetona pura para análisis y se maceró nuevamente. El macerado se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se incubó a 4°C durante 30 minutos para obtener un precipitado proteico y se desechó el sobrenadante de acetona utilizando una micropipeta. Este proceso se realizó nuevamente y el sobrenadante se eliminó mediante evaporación al vacío con un “SpeedVac”.

El precipitado final se resuspendió con 1 *mL* de una solución tampón de Fosfato de Potasio (200 *mM*, pH 6.8) y se mantuvo bajo agitación continua por 24 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10 000 *g* durante 20 minutos y se desechó

el precipitado. El sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de proteínas y los ensayos enzimáticos de SOD y PPO.

2.4. Determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford.

La concentración de proteínas se determinó siguiendo la metodología propuesta por Bradford (1976), con modificaciones. Se empleó el Reactivo de Bradford, el cual contiene como colorante Azul Coomassie Brillante G-250 (CBBG, por sus siglas en inglés). La Albúmina de Suero Bobino (BSA, según sus siglas en inglés) se empleó como proteína estándar.

2.4.1. Medición de la proteína estándar.

Partiendo de una solución 1 mg/mL de BSA se prepararon diluciones seriadas, de manera que cada muestra analizada contaba con: $100\text{ }\mu\text{g}$; $50\text{ }\mu\text{g}$; $25\text{ }\mu\text{g}$; $12,5\text{ }\mu\text{g}$; $6,25\text{ }\mu\text{g}$ y $3,125\text{ }\mu\text{g}$. De cada dilución fueron añadidos $100\text{ }\mu\text{L}$ en tubos de ensayo diferentes y se adicionó el Reactivo de Bradford necesario para un volumen final de 3 mL . Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. La DO de cada muestra se midió a 595 nm en un espectrofotómetro de luz visible (UV-1800 UV/Visible, China) (Kruger, 2009).

2.4.2. Cuantificación de proteínas en el extracto enzimático.

Este proceso se realizó de forma similar a la descrita anteriormente, utilizando un volumen del extracto enzimático de concentración proteica desconocida, contenido en el intervalo analizado en la proteína estándar.

2.5. Ensayos enzimáticos.

Se describen los protocolos utilizados para la medición de la actividad de las enzimas SOD, CAT y PPO.

2.5.1. Superóxido Dismutasa (SOD).

La cuantificación de la actividad enzimática de SOD se realizó mediante el método colorimétrico propuesto por Ma *et al.* (2009), con modificaciones.

Este método se basa en la estimación de la inhibición que produce la actividad de la enzima SOD en la autooxidación del Pyrogallol (ácido 1,2,3-trihidroxibenzoico). El 50% de la inhibición es equivalente a una unidad de SOD (Pandey, 2014).

En una cubeta de vidrio se añadieron 2 700 μL de solución tampón Tris-HCl 50 mM EDTA disódico 1 mM (pH 8.2), 100 μL de extracto enzimático y 200 μL de Pyrogallol a diferentes concentraciones (10 mM; 6,4 mM; 3,2 mM; 1,6 mM y 0,8 mM), para un volumen final de 3 000 μL (3 mL).

La solución de Pyrogallol se preparó a 15 mM en 1 M de HCl, solución que es posible almacenar hasta 3 meses (Masayasu y Hiroshi, 1979). En el momento del ensayo, se diluyó a las concentraciones mencionadas anteriormente.

El blanco del experimento se preparó añadiendo todos los componentes del ensayo, excepto el extracto (que fue sustituido por H_2O destilada) a fin de determinar la velocidad basal de autooxidación del Pyrogallol en la solución. Este proceso de inhibición de la autooxidación del Pyrogallol se monitoreó a partir de la medición de la DO a 240 nm, cada 15 segundos, durante 3 minutos, a 25°C, en un espectrofotómetro de luz visible (UV-1800 UV/Visible, China).

Para el cálculo de la actividad de SOD, se utilizaron los valores de DO obtenidos tanto para el blanco, como para la muestra. Para ello se siguieron las siguientes ecuaciones, en el orden referido (Pandey, 2014):

$$\text{Tasa de autooxidación del Pyrogallol} = \frac{[DO(420) \text{ final} - DO(420) \text{ inicial}]}{[\text{Tiempo de ensayo (min)}]} \quad (2.1)$$

$$\text{Tasa de SOD} = \frac{[DO(420) \text{ final} - DO(420) \text{ inicial}]}{[\text{Tiempo de ensayo (min)}]} \quad (2.2)$$

$$\text{Inhibición (I)} = \text{Tasa de autoxidación del Pyrogallol} - \text{Tasa de SOD} \quad (2.3)$$

$$\text{Inhibición} = \frac{\text{Inhibición (I)}}{\text{Tasa de autoxidación del Pyrogallol}} * 100 \quad (2.4)$$

$$50\% \text{ de Inhibición} = 1 \text{ unidad de SOD} \rightarrow \% \text{ Inhibición de X} = \frac{X}{50} \text{ unidades de SOD} \quad (2.5)$$

$$\text{Factor de dilución 1} = \frac{V(\text{de la mezcla de ensayo})}{V(\text{del extracto enzimático en la mezcla de ensayo})} \quad (2.6)$$

$$\text{Factor de dilución 2} = \frac{V(\text{total del extracto enzimático})}{V(\text{del extracto enzimático utilizado en el ensayo})} \quad (2.7)$$

$$\text{Factor de dilución total (FD)} = \text{Factor de dilución 1} * \text{Factor de dilución 2} \quad (2.8)$$

$$\text{Actividad de SOD (unidades } mg^{-1} \text{ MF)} = \frac{\text{unidades de SOD} * \text{FD}}{\text{MF de la muestra}} \quad (2.9)$$

El Factor de Dilución 2 (Ecuación 2.7) no se utilizó en este ensayo, pero es importante para el cálculo de la actividad enzimática total de una planta o de un órgano completo de la misma.

2.5.2. Catalasa (CAT).

Para la cuantificación de la actividad CAT, se siguió la metodología propuesta por (Chance y Maehly, 1955), con modificaciones.

El extracto enzimático utilizado fue el obtenido mediante el protocolo de extracción propuesto por Liu *et al.* (2010), con modificaciones. En una cubeta de cuarzo se añadieron 1 500 μL de solución tampón Fosfato de Potasio 50 mM (pH 7.0), 500 μL de H_2O_2 a dos concentraciones diferentes (5 mM y 50 mM) y 100 μL de extracto enzimático, para

un volumen final de 3 000 μL (3 mL). Se utilizó como blanco los mismos componentes referidos anteriormente, con excepción del extracto enzimático (que fue sustituido por H_2O destilada).

El H_2O_2 30% se diluyó en solución de Fosfato de Potasio 50 mM, en el momento del ensayo. Se ajustó la DO de esta solución a 2,05 cm^{-1} . Se monitoreó la disminución de H_2O_2 a partir del decremento de absorbancia, utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (*Thermo Scientific spectronic Genesys 10UV*, Estados Unidos) a 240 nm a intervalos de 15 segundos, durante 5 minutos, a 25°C.

Para calcular la actividad enzimática específica se utilizó el coeficiente de extinción del H_2O_2 39,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y se expresa en nmol de H_2O_2 por miligramo de masa fresca (MF) por minuto ($\text{nmol}(\text{H}_2\text{O}_2)\text{mg}^{-1}\text{MF}^{-1}\text{min}^{-1}$).

2.5.3. Polifenol Oxidasa (PPO).

La actividad de la enzima polifenol oxidasa se determinó siguiendo la metodología descrita por Baquero Duarte *et al.* (2005), con modificaciones.

Este ensayo se realizó utilizando un Espectrofotómetro de placas *FLUOstar OPTIMA* (BMG LABTECH, Alemania), lo que permitió reducir en gran medida el volumen final del ensayo (200 μL). La mezcla de reacción consistió en 100 μL de extracto enzimático más 100 μL de L-DOPA disuelto en solución de Fosfato de Potasio 200 mM, pH 7.0. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron 10 mM; 7 mM; 5 mM; 2,5 mM y 1,25 mM. Se utilizó como blanco los mismos componentes referidos anteriormente, con excepción del extracto enzimático (que fue sustituido por H_2O destilada). La reacción se monitoreó por 2 minutos, a intervalos de 10 segundos, a 25°C y a una longitud de onda de 475 nm.

Una unidad de actividad fue definida como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto. La actividad específica fue expresada en unidades de actividad por miligramo de proteína.

2.6. Procesamiento matemático.

Para la realización de la curva típica y de los gráficos de barra se utilizó el programa *Microsoft Excel 2013*.

Se realizó un ANOVA simple mediante el programa *PAST* (Hammer *et al.*, 2001), para comparar las concentraciones de proteínas de los extractos utilizados para medir la enzima SOD.

Se empleó el programa *GraphPad Prism 5* (Motulsky, 2007) para la confección de las curvas de cinética enzimática Michaelis-Menten.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Determinación de la cantidad de proteínas.

La curva de calibración obtenida por el método de Bradford (1976) (Fig. 8) es la de una ecuación de regresión lineal. El valor del coeficiente R^2 muy cercano a 1 refleja un buen ajuste lineal de los datos. Los valores de concentración de proteínas se especifican para cada uno de los extractos.

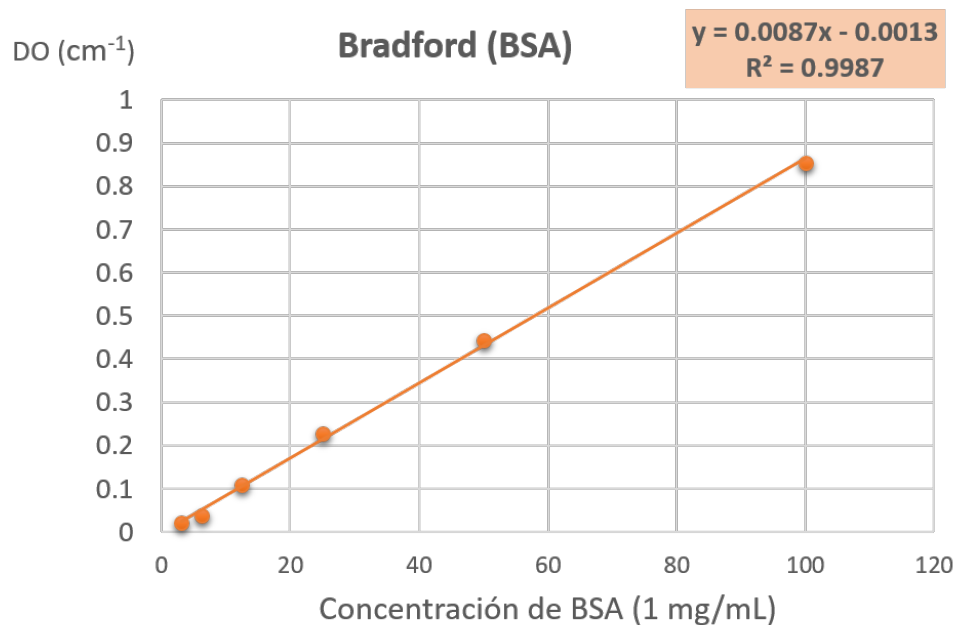


Figura 8: Representación de DO obtenida por el reactivo Bradford y la concentración de Albúmina de Suero Bovino.

3.2. Enzima Superóxido Dismutasa (SOD).

La actividad de la enzima SOD, para los diferentes tratamientos, se determinó en plantas no sometidas a estrés salino (primer diseño experimental).

3.2.1. Actividad enzimática de SOD en extractos obtenidos mediante protocolo de extracción enzimática propuesto por Liu *et al.* (2010), con modificaciones.

La concentración de proteínas de los extractos obtenidos para cada uno de los tratamientos en el caso de la enzima SOD, se muestra en la tabla 2. El ANOVA simple indicó que las diferencias entre estos valores no fueron significativas ($F = 0,1249$, $p = 0,9427$).

Tabla 2: Concentración de proteína en 20 μL de las muestras con los diferentes tratamientos: control negativo (C-), etanol (EtOH), DI-31 y ácido salicílico (AS).

	C-	EtOH	DI-31	AS
24 horas	12,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10,38 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$
48 horas	8,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$	14,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
96 horas	6,87 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$	7,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$	6,36 $\mu\text{g}/\text{mL}$

En la determinación de actividad enzimática de SOD con este protocolo, para cada uno de los extractos se analizaron concentraciones diferentes de Pyrogallol (6,4 mM; 3,2 mM; 1,6 mM y 0,8 mM).

Los resultados de velocidad de autooxidación del Pyrogallol obtenidos para cada uno de los tiempos (24, 48 y 96 horas) se muestran en las tablas 3, 4 y 5 respectivamente. Los valores de autooxidación son todos cercanos a cero, no se detectó actividad enzimática.

Este ensayo se realizó en otras dos especies de plantas, *Nicotiana tabacum* (tabaco) y *Solanum lycopersicum* (tomate) y con diferentes concentraciones de EDTA. En todos los

casos, los resultados obtenidos (no mostrados) fueron similares.

Tabla 3: Resultados de ΔDO para SOD a las 24 horas de aplicados los tratamientos.

[sustrato]	ΔDO blanco	ΔDO C-	ΔDO EtOH	ΔDO DI-31	ΔDO AS
6,4mM	0,001	0,0012	0,0011	0,001	0,001
3,2mM	0,0006	0,0007	0,0006	0,0006	0,0006
1,6mM	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
0,8mM	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

Tabla 4: Resultados de ΔDO para SOD a las 48 horas de aplicados los tratamientos.

[sustrato]	ΔDO blanco	ΔDO C-	ΔDO EtOH	ΔDO DI-31	ΔDO AS
6,4mM	0,0005	0,0007	0,0006	0,0007	0,0006
3,2mM	0,0003	0,0004	0,0004	0,0003	0,0004
1,6mM	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,0002
0,8mM	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005	0,00005

Tabla 5: Resultados de ΔDO para SOD a las 96 horas de aplicados los tratamientos.

[sustrato]	ΔDO blanco	ΔDO C-	ΔDO EtOH	ΔDO DI-31	ΔDO AS
6,4mM	0,0009	0,001	0,001	0,0011	0,001
3,2mM	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
1,6mM	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
0,8mM	0,00007	0,00009	0,0001	0,00004	0,0001

3.2.2. Actividad enzimática de SOD en extractos obtenidos mediante protocolo de extracción enzimática propuesto por Baquero Duarte *et al.* (2005), con modificaciones.

El extracto enzimático obtenido mediante la segunda metodología de extracción contenía $1,64 \mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, aproximadamente seis veces menor que la concentración de proteínas presente en los extractos obtenidos mediante el protocolo de extracción de Liu *et al.* (2010).

En la tabla 6 se muestra el cálculo de la actividad enzimática de SOD a las 24 horas de aplicados los tratamientos, para diferentes concentraciones de Pyrogallol (10 mM; 6,4 mM; 3,2 mM y 1,6 mM). Se utilizan los valores de Factor de dilución 1 = 30 (Ecuación 2.6) y el FD=30 (Ecuación 2.8).

Tabla 6: Cálculo de la actividad enzimática de SOD. El hipervínculo indicado entre paréntesis conduce a la ecuación utilizada para el cálculo del parámetro.

	10mM	6.4mM	3.2mM	1.6mM
<i>Tasa de autoxidación del Pyrogallol (min^{-1})</i> (2,1)	0,066	0,034	0,028	0,012
<i>Tasa de SOD (min^{-1})</i> (2,2)	0,061	0,028	0,025	0,011
<i>Inhibición (I) (min^{-1})</i> (2,3)	0,005	0,006	0,003	0,001
<i>%Inhibición (%)</i> (2,4)	7,614	17,647	10,144	8,333
<i>50% de Inhibición (%)</i> (2,5)	0,152	0,353	0,203	0,167
<i>Actividad de SOD (unidades mg^{-1} MF)</i> (2,9)	9,137	21,176	12,173	10

Con los resultados de actividad enzimática de SOD para las diferentes concentraciones de Pyrogallol mostradas en la tabla 6 se obtuvo la curva de cinética enzimática Michaelis-Menten que se muestra en la figura 9.

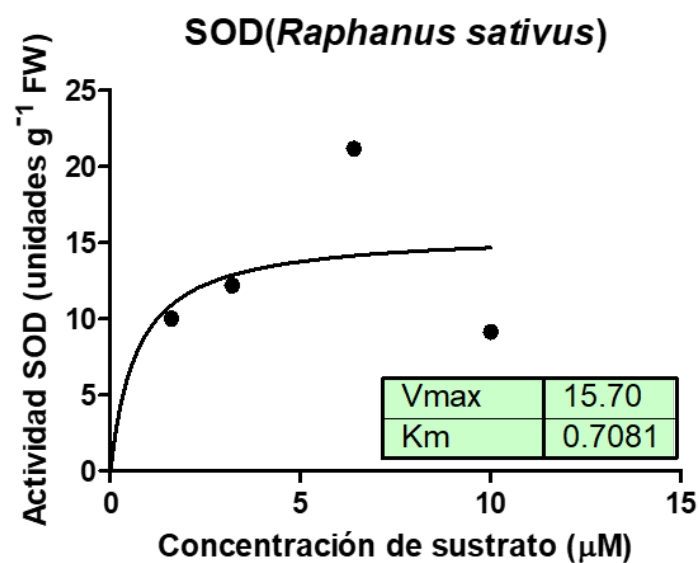


Figura 9: Cinética enzimática de Michaelis-Menten de la enzima SOD obtenida mediante el programa *GraphPad Prism*. Se muestran los valores K_m y V_{max} de SOD en plantas de *R. sativus* que germinaron a partir de semillas que no fueron impregnadas previamente y no estaban sometidas a estrés. Se utilizó el protocolo de extracción con acetona (Baquero Duarte *et al.*, 2005). Se analiza un único caso representativo (n=1) por lo que no se puede realizar análisis estadístico.

3.3. Enzima Catalasa (CAT).

El extracto enzimático fue preparado a partir de plantas que no estaban sometidas a estrés salino utilizando el protocolo de extracción de Liu *et al.* (2010) (primer diseño experimental, epígrafe 2.2.1). La concentración de proteínas fue de $10,82 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Con los valores obtenidos se construyó la curva de cinética enzimática que se muestra en la figura 10.

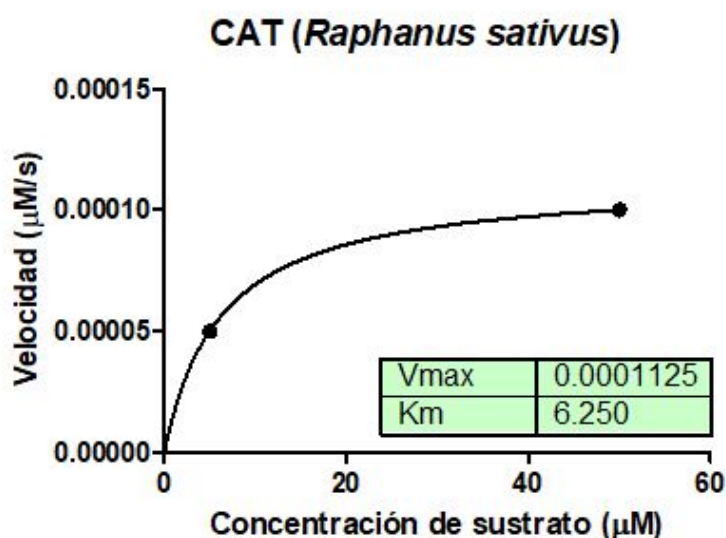


Figura 10: Cinética enzimática Michaelis-Menten de la enzima CAT obtenida mediante el programa *GraphPad Prism*. Se muestran los valores de K_m y V_{max} de CAT en plantas de *R. sativus* que germinaron a partir de semillas que no fueron impregnadas previamente y no estaban sometidas a estrés. La proteína se extrajo mediante el protocolo de Liu *et al.* (2010). Se analiza un único caso representativo ($n=1$) por lo que no se puede realizar análisis estadístico.

3.4. Enzima Polifenol Oxidasa (PPO).

Los extractos obtenidos mediante el segundo protocolo de extracción enzimática (Baquero Duarte *et al.*, 2005), no mostraron resultados de la enzima PPO, no hubo variación en la DO, ni en la pendiente.

3.4.1. PPO, primer diseño experimental: plantas no sometidas a estrés salino.

El extracto enzimático de plantas no sometidas a estrés salino, obtenido mediante el protocolo de extracción propuesto por Liu *et al.* (2010) (epígrafe 2.3.1), presentó una concentración de $10,26 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. En la figura 11 se muestra la cinética enzimática de Michaelis-Menten obtenida para las concentraciones de L-DOPA: 10 mM ; 5 mM ; $2,5 \text{ mM}$ y $1,125 \text{ mM}$.

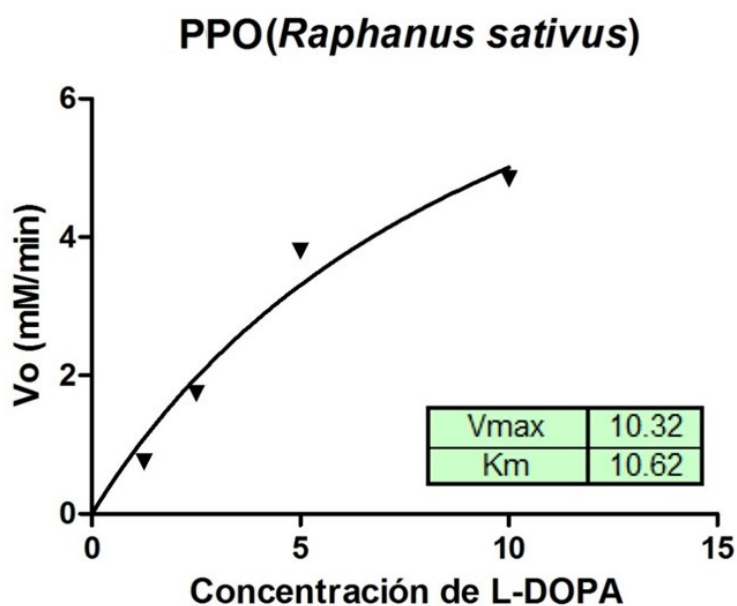


Figura 11: Cinética enzimática Michaelis-Menten de la enzima PPO obtenida mediante el programa *GraphPad Prism*. Se muestran los valores de K_m y V_{max} de PPO en plantas de *R. sativus* que germinaron a partir de semillas que no fueron impregnadas previamente y no estaban sometidas a estrés. El extracto se obtuvo mediante el protocolo de extracción de (Liu *et al.*, 2010). Se analiza un único caso representativo ($n=1$) por lo que no se puede realizar análisis estadístico.

3.4.2. PPO, segundo diseño experimental: plantas sometidas a estrés salino.

Según el procedimiento de Liu *et al.* (2010), con modificaciones, se obtuvieron dos extractos de plantas con tratamientos diferentes: control negativo ($10,13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína) y planta sometida a estrés salino ($9,78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína). Se muestra la cinética enzimática de Michaelis-Menten obtenida en la figura 12 para las concentraciones de L-DOPA: 7 mM ; 5 mM y $2,5 \text{ mM}$.

La comparación de los valores de K_m y V_{max} obtenidos en cada uno de los extractos, se muestra en la figura 13.

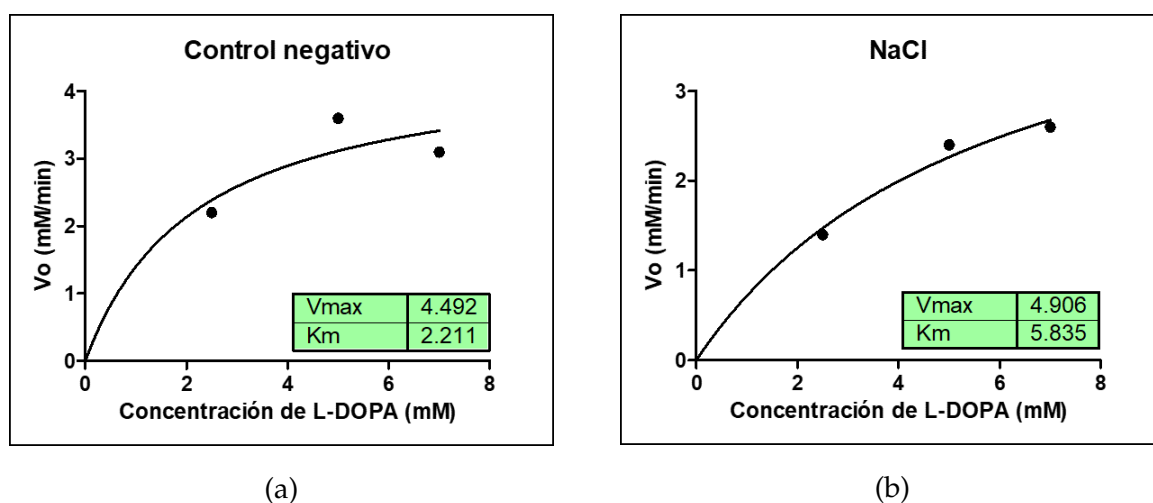


Figura 12: Cinética enzimática Michaelis-Menten de la enzima PPO obtenida mediante el programa *GraphPad Prism*. Se muestran los valores de K_m y V_{max} de PPO en plantas de *R. sativus* que germinaron a partir de semillas impregnadas previamente con NaCl (sometidas a estrés salino) (b) y su control negativo (a). El extracto se obtuvo mediante el protocolo de extracción de (Liu *et al.*, 2010). Se analiza un único caso representativo ($n=1$) por lo que no se puede realizar análisis estadístico.

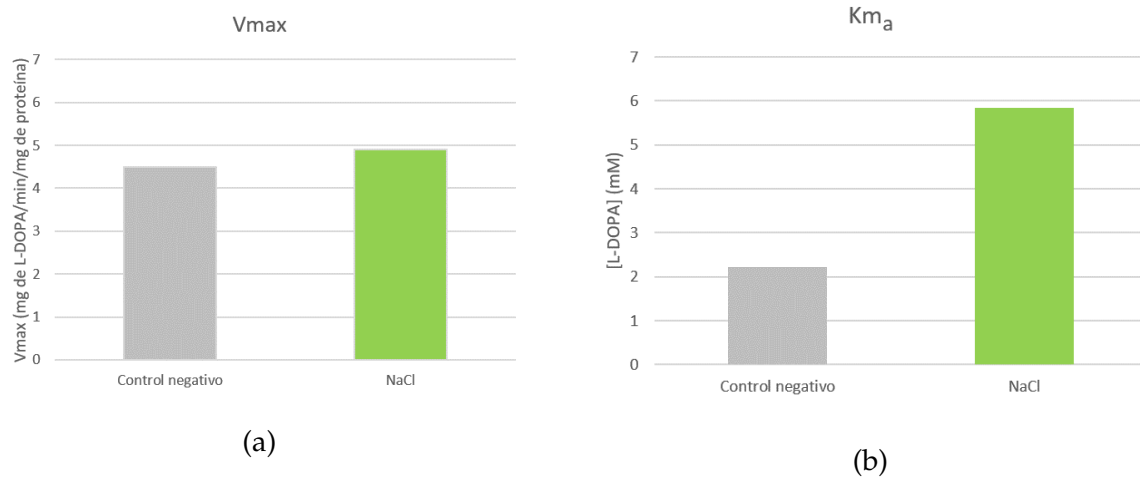


Figura 13: Valores de V_{max} (a) y K_m (b) de PPO obtenidos en plantas de *R. sativus*, control negativo y sometidas a estrés por salinidad.

Como se observa en la figura 13 los valores de V_{max} de las plantas control son muy similares a los obtenidos para las plantas sometidas a estrés por salinidad, pero si se observa un cambio en los valores de K_m .

Capítulo 4

Discusión

En el presente trabajo se lleva a cabo una propuesta preliminar de un protocolo para evaluar la eficiencia de brasinoesteroides sintéticos sobre la actividad de tres enzimas de defensa en plantas.

La selección de *Raphanus sativus* como modelo experimental se basó en los numerosos trabajos científicos que detectan el incremento de la actividad de las enzimas de defensa, ante aplicaciones exógenas de BRs, aumentando así la tolerancia de las plantas frente a distintos tipos de estrés. Por ejemplo, Mahesh *et al.* (2013) utilizaron *R. sativus* como modelo para analizar el efecto de dos análogos de BRs (24-EpiBL y 28-HomoBL) y observaron el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes, lo que disminuyó el efecto inhibitorio causado por estrés hídrico. Anuradha *et al.* (2007) indican cómo al tratar plantas sometidas a estrés por Cadmio (Cd) con 24-EpiBL y 28-HomoBL aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. La 24-EpiBL disminuyó los efectos de toxicidad del Cadmio (Cd) y el Mercurio (Hg), mediante la modulación de la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD y CAT (Dhriti *et al.*, 2014); además, disminuyó el estrés oxidativo a través del incremento de la actividad de las enzimas de defensa, incluyendo PPO (Sharma *et al.*, 2012). Ramakrishna y Rao (2013) identificaron el aumento de la tolerancia en plantas de *R. sativus* ante toxicidad por Zinc (Zn) al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes, como resultado de la aplicación de 28-homoBL. Además, Choudhary *et al.* (2012) comprobaron que plantas de *R. sativus* sometidas a estrés por Cobre (Cu), al ser tratadas con BRs exógenos poseían mayor acumulación de enzimas antioxidantes.

En este trabajo se proponen dos diseños experimentales que permiten la posterior evaluación de la actividad de las enzimas de defensa en plantas de *R. sativus* y el efecto que pueden ejercer los análogos sintéticos de BRs sobre la actividad de las mismas. El protocolo propuesto permitirá determinar si existen diferencias en las respuestas generadas al aplicar los compuestos DI-31 y MH-5 en plantas sometidas a estrés salino, o no sometidas a este.

Existen diferentes vías de aplicación exógena de BRs, entre las que se incluyen incubación de la semilla en el compuesto, tratamientos en las raíces y aspersión foliar (Yusuf *et al.*, 2019). Con el objetivo de evaluar si este elemento tiene influencia en el efecto de los tratamientos, se proponen dos vías diferentes (aspersión foliar e incubación de la semilla en el compuesto), lo que permitirá establecer cuál de estas es más efectiva para desencadenar la respuesta de defensa.

4.1. Determinación de la cantidad de proteínas.

El método de cuantificación de proteínas Bradford descrito por primera vez por Bradford (1976), es una metodología rápida, simple y certera para estimar la concentración de proteínas (Kruger, 2009). El colorante CBBG existe en dos formas de coloración diferente, rojo y azul. La forma roja es convertida a la azul al unirse el CBBG a la proteína, lo que produce un incremento de absorción de 465 a 595 *nm*, que es monitoreado espectrofotométricamente (Bradford, 1976).

El colorante se une más fácilmente a los residuos de arginina y lisina de las proteínas (Compton y Jones, 1985; Congdon *et al.*, 1993). Esta especificidad puede conducir a variaciones en los resultados del ensayo frente a proteínas diferentes, siendo este el principal inconveniente del método. El método original de Bradford muestra gran variación en la respuesta a diferentes proteínas (Read y Northcote, 1981; Friedenauer y Berlet, 1989; Stoscheck, 1990). Para solucionar este problema se han realizado numerosas variaciones a la metodología, sin embargo, estos cambios generalmente resultan en

un ensayo menos robusto, que a menudo es más susceptible a interferencias. Consecuentemente, el método original ideado por Bradford (1976) sigue siendo el más conveniente y ampliamente utilizado (Kruger, 2009).

Aunque los resultados del análisis de varianza con los datos de concentración de proteínas fueron no significativos entre los distintos tiempos del experimento, a medida que pasa el tiempo disminuye la concentración de proteínas, por lo que los ensayos no se deben prolongar hasta cuatro días.

4.2. Enzima Superóxido Dismutasa (SOD).

El método de determinación de la actividad enzimática de SOD, mediante la inhibición de la autoxidación del Pyrogallol es uno de los más utilizados, sin embargo, en la literatura se observan diferencias en las condiciones de ensayo empleadas. Por ejemplo, hay variaciones en la longitud de onda, la adición o no de EDTA, el pH de la solución tampón Tris-HCl, el solvente, el tiempo de ensayo y la temperatura, por lo que existen también variaciones en los resultados obtenidos (Zhang *et al.*, 2016).

El Pyrogallol se autooxida rápidamente en soluciones alcalinas, formando gran número de productos intermedios, cuya aparición puede ser medida a 420 nm (Fig. 14) (Marklund y Marklund, 1974). La habilidad de SOD de inhibir la autoxidación del Pyrogallol (al generar superóxido) ha sido empleada de forma exitosa para la cuantificación de esta enzima. El Pyrogallol es un buen reductor de hierro (Fe) y el hierro reducido se puede autooxidar rápidamente generando radicales hidroxilo, lo que produce interferencias en el ensayo. La adición de agentes quelantes como DETAPAC y EDTA en la mezcla del ensayo, elimina la posibilidad de interferencias de los iones Fe^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} (Pandey, 2014), aunque pueden existir interferencias pequeñas de Fe^{2+} (Misra y Fridovich, 1972; Marklund y Marklund, 1974).

La velocidad de autoxidación del Pyrogallol depende fuertemente de su concentración y del pH. Además, existen otras moléculas redox de bajo peso molecular que

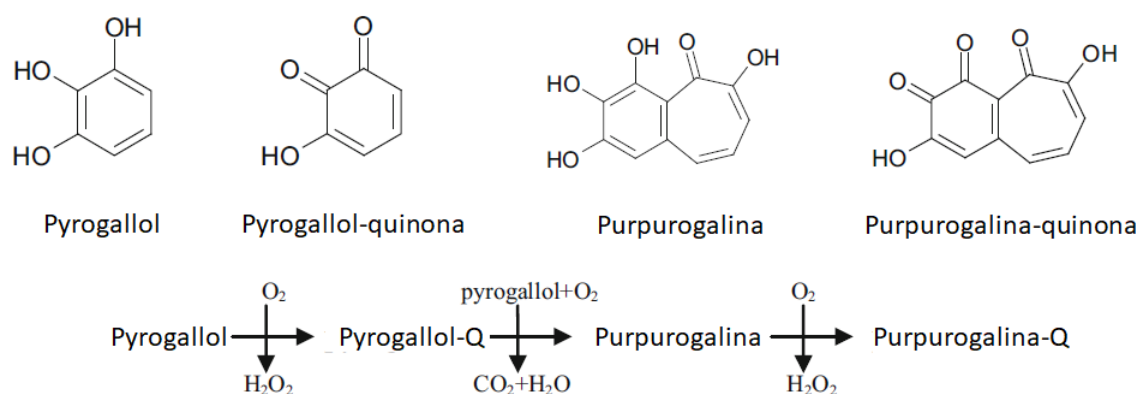


Figura 14: Productos y secuencia de reacción del Pyrogallol. Modificado de Ramasarma *et al.* (2015).

pueden reaccionar directamente con el dioxígeno, aumentando la velocidad de autooxidación del Pyrogallol (Gao *et al.*, 1998).

En las tablas 3, 4 y 5 se observa que la velocidad de autooxidación del Pyrogallol en la solución tampón, siempre es menor o igual que la velocidad para los extractos, por lo que aparentemente no se produce inhibición de la autooxidación del Pyrogallol, que teóricamente debería existir producto de la actividad de SOD. Esto se puede deber a interferencias de algunos de los componentes del extracto que determinan una mayor autooxidación de la que la enzima puede contrarrestar.

La adición de EDTA en mayor proporción no cambió el resultado obtenido, luego la presencia de algún catión divalente no autoxidaba el sustrato. Por tanto, 1mM de EDTA es suficiente para impedir la influencia de estos cationes, lo que se corresponde con lo indicado por Marklund y Marklund (1974).

El protocolo de extracción con acetona (Baquero Duarte *et al.*, 2005) eliminaría las interferencias de pigmentos, por lo que se decidió extraer la enzima mediante este protocolo y evaluar la actividad de SOD en este extracto.

La técnica de extracción enzimática con acetona empleada en este trabajo se basó en reportes previos, en los que se obtenía una buena eficiencia en la extracción de proteína

y en la actividad enzimática (Sala y Lafuente, 1999; Narváez, 2002; Camelo *et al.*, 2004). Los polvos de acetona permiten que el extracto presente una alta actividad con una mayor estabilidad, además de evitar la inactivación enzimática durante la extracción, porque con la acetona se retiran los fenoles, β -carotenos y ácidos orgánicos del extracto, disminuyendo así la reacción de las enzimas con estos compuestos (Baquero Duarte *et al.*, 2005). Otros artículos, por ejemplo López-Blancas *et al.* (2014) también emplean protocolos de extracción similares.

Dado los resultados obtenidos en el presente trabajo, es probable que la causa del incremento de la autooxidación del Pyrogallol sea la presencia de sustancias como fenoles, β -carotenos y ácidos orgánicos. Los extractos obtenidos mediante el protocolo de extracción de Baquero Duarte *et al.* (2005) (con modificaciones) presentaron actividad de la enzima SOD, aunque por este protocolo hay una pérdida importante de proteínas.

4.3. Enzima Catalasa (CAT)

La metodología más utilizada para medir la actividad de la enzima CAT es la medición espectrofotométrica del cambio de absorbancia a 240 *nm* ante altos niveles de peróxido de hidrógeno (mayores o iguales a 30 *mM*). Los altos niveles de peróxido de hidrógeno llevan inmediatamente a la inhibición de la enzima CAT, alterando la estructura de su centro activo. Existe la necesidad de un método para evaluar continuamente la baja actividad de la enzima CAT frente a un fondo de alto nivel de absorbancia que se produce debido a que muchos constituyentes celulares, como ácidos nucleicos y proteínas exhiben una intensa absorción a 240 *nm* (Hadwan, 2018).

La cinética de la CAT no sigue un patrón usual. Primeramente, no es posible saturar la enzima con sustrato dentro del intervalo de concentraciones menores a 5 *M* de peróxido de hidrógeno. Por otra parte, a concentraciones mayores de 0,1 *M* ocurre una rápida inactivación de la enzima. En consecuencia, la determinación de la actividad a concentraciones saturantes, no es posibles. En contraste a las reacciones que se desarrollan a concentraciones saturantes de sustrato, la descomposición enzimáti-

ca del peróxido de hidrógeno es una reacción de primer orden, por lo que la tasa de reacción es proporcional a la cantidad de peróxido de hidrógeno presente. Para evitar una rápida disminución en la tasa inicial de la reacción, esta se debe llevar a cabo con concentraciones de H_2O_2 bajas (alrededor de 0,01 M) (Aebi, 1984).

Este trabajo condujo a la identificación de posibles causas de errores en la medición de la CAT. Por ejemplo, el extracto enzimático debe ser adicionado y al instante realizar la medición espectrofotométrica, que debe realizarse específicamente en cubetas de cuarzo. El pH debe ser controlado y es necesario evitar que el extracto enzimático experimente procesos de congelación-descongelación. Además se debe comprobar que no existan burbujas en las paredes de la cubeta.

4.4. Enzima Polifenol Oxidasa (PPO).

El compuesto L-DOPA posee un gran potencial como sustrato modelo para estudios de la degradación enzimática de compuestos fenólicos. En presencia de la enzima PPO es convertido rápidamente a 2-carboxi 2,3-dihidroindol 5,6-quinona, que puede ser medido espectrofotométricamente a 475 nm (Pind *et al.*, 1994).

La PPO es una de las enzimas responsables de la oxidación de compuestos fenólicos (Sheen y Calvert, 1969) y la disminución de su actividad puede inducir una acumulación de fenoles totales (Das y Misra, 1992). Muthukumarasamy *et al.* (2000) comprobaron que la actividad enzimática de PPO en plantas, disminuye ante e estrés por salinidad, lo que puede llevar al daño oxidativo.

Al comparar los valores de K_{ma} de las plantas que germinaron a partir de semillas que no fueron incubadas en agua previo a su siembra (Fig. 11) con los valores de semillas que si fueron incubadas en agua (Fig. 12a), podemos observar como la incubación afecta positivamente el valor de este parámetro, lo que coincide con los informes encontrados en la literatura (Burgass y Powell, 1984; Bradford, 1986; Taylor *et al.*, 1998; McDonald, 2000). En el caso de V_{max} las plantas de semillas que no fueron incubadas

en agua previo a su siembra (Fig. 11), mostraron un valor mayor de este parámetro que las plantas incubadas en agua y las sometidas a estrés salino (Fig. 12). No se puede llegar a conclusiones reales a partir de los valores obtenidos, pues se trata de ensayos puntuales, en los que no se pueden realizar análisis estadísticos.

En el trabajo realizado la variación entre los valores de V_{max} de plantas sometidas a estrés por salinidad y su control negativo fue pequeña, como se puede observar en la figura 13a.

Por su parte los valores obtenidos de K_m mostraron una mayor variación. En este caso, como se muestra en la figura 13b, los extractos obtenidos a partir de plantas de *R. sativus* sometidas a estrés presentaron un valor de K_m mayor, con respecto al control negativo, lo que pudiese indicar aumentos de la afinidad de la enzima por el sustrato en respuesta al estrés salino.

Al medir la actividad enzimática de PPO en extractos realizados según la metodología de extracción de Baquero Duarte *et al.* (2005), no se observó actividad de la enzima. En este sentido, se recomienda utilizar otra solución tampón para diluir el precipitado proteico formado en el ensayo y la utilización de un sustrato diferente, por ejemplo: catecol (Martínez-Damián *et al.*, 2013).

Capítulo 5

Conclusiones

1. Se determinó la metodología propuesta por Baquero Duarte *et al.* (2005) (con modificaciones) para la obtención de extractos crudos donde se pueda evaluar la actividad de la enzima SOD. La metodología propuesta por Liu *et al.* (2010) (con modificaciones) fue seleccionada para la obtención de extractos crudos, donde se pueden evaluar las enzimas CAT y PPO.
2. Se estableció el ensayo de Ma *et al.* (2009), con modificaciones, para medir los parámetros cinéticos de la enzima SOD, el protocolo de (Chance y Maehly, 1955), con modificaciones para el análisis de la enzima CAT y el ensayo de Baquero Duarte *et al.* (2005), con modificaciones para la determinación de los parámetros de la enzima PPO.

Capítulo 6

Recomendaciones

1. Determinar la actividad de las enzimas SOD, CAT y PPO siguiendo los protocolos descritos, para evaluar el efecto de los análogos sintéticos de BRs.

Literatura Citada

- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**. Elsevier, vol. 105, pp.121–126. 44
- Alam, M.M., Hasanuzzaman, M., Nahar, K. y Fujita, M., 2013. Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by up-regulating the antioxidant defense and glyoxalase system. **Australian Journal of Crop Science**, 7(7), p.1053. 10
- Alyemeni, M.N., Hayat, Q., Wijaya, L. y Hayat, S., 2014. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthetic efficiency and enzyme activities of leguminous plant under cadmium stress. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, 42(2), pp.440–445. 10
- Anjum, S., Wang, L., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. y Zou, C., 2011. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. **Journal of Agronomy and crop science**, 197(3), pp.177–185. 8
- Anuradha, S., Rao, S. *et al.*, 2007. The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. **Plant Soil and Environment**, 53(11), p.465. 39
- Apel, K. y Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 55, pp.373–399. 11, 14
- Arora, P., Bhardwaj, R. y Kanwar, M.K., 2012. Effect of 24-epibrassinolide on growth, protein content and antioxidative defense system of *Brassica juncea* L. subjected to cobalt ion toxicity. **Acta physiologiae plantarum**, 34(5), pp.2007–2017. 8

- Bajguz, A., Chmur, M. y Gruszka, D., 2020. Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. **Frontiers in plant science**, 11, p.1034. 8
- Bajguz, A. y Tretyn, A., 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. **Phytochemistry**, 62(7), pp.1027–1046. 8
- Baquero Duarte, L.E., Castro Rivera, J.A. y Narváez Cuenca, C.E., 2005. Catalase, Peroxidase and Polyphenoloxidase from Pitaya Amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) Fruits: Ripening and Senescence. **Acta Biológica Colombiana**, 10(2), pp.49–60. 9, 24, 28, 33, 34, 35, 42, 43, 45, 46
- Bardoel, B.W. y Strijp, J.A. van, 2011. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. **Journal of Molecular Recognition**, 24(6), pp.1077–1086. 6
- Belkhadir, Y. y Chory, J., 2006. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. **Science**, 314(5804), pp.1410–1411. 2
- Benezer-Benezer, M., Castro-Mercado, E. y García-Pineda, E., 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. **Revista mexicana de fitopatología**, 26(1), pp.56–61. 15
- Bishop, G.J. y Yokota, T., 2001. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. **Plant and Cell Physiology**, 42(2), pp.114–120. 8
- Blokhina, O., Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of botany**, 91(2), pp.179–194. 11, 14
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. y Asada, K., 1994. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 13(3), pp.199–218. 15
- Bradford, K.J., 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience (USA)**. 23, 44

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), pp.248–254. 25, 30, 40, 41
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. y Jones, R.L., 2015. **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons. 7, 9, 10, 11
- Burgass, R. y Powell, A.A., 1984. Evidence for repair processes in the invigoration of seeds by hydration. **Annals of botany**, 53(5), pp.753–757. 23, 44
- Camelo, Á.P.R., Restrepo, P. y Cuenca, C.E.N., 2004. Polifenoloxidasas y peroxidasa de pulpa de uva caimarona (*Pourouma cecropiifolia*). **Revista Colombiana de química**, 33(1), pp.57–66. 43
- Catalá, A. y Díaz, M., 2016. Impact of lipid peroxidation on the physiology and pathophysiology of cell membranes. **Frontiers in physiology**, 7, p.423. 13
- Chance, B. y Maehly, A., 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. 27, 46
- Chávez, M., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990. Temas de enzimología. **Min. Educación Superior**, 567. 18, 19
- Choudhary, S.P., Kanwar, M., Bhardwaj, R., Yu, J.Q. y Tran, L.S.P., 2012. Chromium stress mitigation by polyamine-brassinosteroid application involves phytohormonal and physiological strategies in *Raphanus sativus* L. **PLoS One**, 7(3), p.e33210. 39
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L. y Panda, S.K., 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant signaling & behavior**, 8(4), p.e23681. 11
- Clouse, S.D., 2015. A history of brassinosteroid research from 1970 through 2005: thirty-five years of phytochemistry, physiology, genes, and mutants. **Journal of plant growth regulation**, 34(4), pp.828–844. 8
- Compton, S.J. y Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, 151(2), pp.369–374. 40
- Congdon, R.W., Muth, G.W. y Splittgerber, A.G., 1993. The binding interaction of Coomassie blue with proteins. **Analytical biochemistry**, 213(2), pp.407–413. 40

- Constabel, C.P., Bergey, D.R. y Ryan, C.A., 1995. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92(2), pp.407–411. 2, 18
- Corpas, F.J., Gupta, D.K. y Palma, J.M., 2015. Production sites of reactive oxygen species (ROS) in organelles from plant cells. **Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress**. Springer, pp.1–22. 11
- Dalyan, E., Yüzbaşıoğlu, E. y Akpınar, I., 2018. Effect of 24-epibrassinolide on antioxidative defence system against lead-induced oxidative stress in the roots of *Brassica juncea* L. seedlings. **Russian Journal of Plant Physiology**, 65(4), pp.570–578. 8
- Das, N. y Misra, M., 1992. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.): Oxidases. **PROCEEDINGS-NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES INDIA SECTION B**, pp.263–263. 44
- Dat, J., Van Breuseghem, F., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M. y Inze, D., 2000. Active oxygen species and catalase during plant stress response. **Cell Mol Life Sci**, 57, pp.779–786. 11
- De Jonge, R., Van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Van Der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H. y Thomma, B.P., 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. **science**, 329(5994), pp.953–955. 6
- Deisseroth, A. y Dounce, A.L., 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, 50(3), pp.319–375. 16
- Dhriti, K., Amandeep, R., Vandana, G., Nitika, K. y Renu, B., 2014. 24-Epibrassinolide mediated changes in photosynthetic pigments and antioxidative defence system of radish seedlings under cadmium and mercury stress. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, 10(3). 19, 39

- Ding, H.D., Zhu, X.H., Zhu, Z.W., Yang, S.J., Zha, D.S. y Wu, X.X., 2012. Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 24-epibrassinolide. **Biologia plantarum**, 56(4), pp.767–770. 9
- Dounce, A.L., 1983. A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. **Journal of theoretical biology**, 105(4), pp.553–567. 16
- El-Mashad, A.A.A. y Mohamed, H.I., 2012. Brassinolide alleviates salt stress and increases antioxidant activity of cowpea plants (*Vigna sinensis*). **Protoplasma**, 249(3), pp.625–635. 8, 18
- Elstner, E.F., 1987. Metabolism of activated oxygen species. **Biochemistry of metabolism**. Elsevier, pp.253–315. 10
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Ahmad, I. y Ahmad, A., 2014. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. **Biologia Plantarum**, 58(1), pp.9–17. 2
- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Chalkoo, S., Hayat, S. y Ahmad, A., 2011. 28-homobrassinolide improves growth and photosynthesis in *Cucumis sativus* L. through an enhanced antioxidant system in the presence of chilling stress. **Photosynthetica**, 49(1), pp.55–64. 8
- Farmer, E.E. y Mueller, M.J., 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annual review of plant biology**, 64, pp.429–450. 13
- Fayez, K.A. y Bazaid, S.A., 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 13(1), pp.45–55. 10
- Freeman, B.C. y Beattie, G.A., 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**. 1
- Friedenauer, S. y Berlet, H.H., 1989. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. **Analytical biochemistry**, 178(2), pp.263–268. 40
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z. y Gao, X., 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 45(1), pp.41–45. 42

- Gaschler, M.M. y Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, 482(3), pp.419–425. 13
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. y Laloi, C., 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, 28(11), pp.1091–1101. 11, 14
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Saba, S.C. y Tuteja, N., 2015. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(14), pp.10375–10394. 1
- Gill, S.S. y Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, 48(12), pp.909–930. 12, 13
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 43, pp.205–227. 10
- Grant, J.J. y Loake, G.J., 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant physiology**, 124(1), pp.21–30. 6
- Grimm, S., Höhn, A. y Grune, T., 2012. Oxidative protein damage and the proteasome. **Amino acids**, 42(1), pp.23–38. 13
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L. y Cook, J.C., 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. **Nature**, 281(5728), pp.216–217. 8, 9
- Hadwan, M.H., 2018. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. **BMC biochemistry**, 19(1), p.7. 43
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, 141(2), pp.312–322. 11, 14

- Hammer, Ø., Harper, D.A., Ryan, P.D. *et al.*, 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, 4(1), p.9. 29
- Hayat, S., Hasan, S.A., Yusuf, M., Hayat, Q. y Ahmad, A., 2010. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. **Environmental and Experimental Botany**, 69(2), pp.105–112. 8
- He, J., Wang, Y., Ding, H. y Ge, C., 2016. Epibrassinolide confers zinc stress tolerance by regulating antioxidant enzyme responses, osmolytes, and hormonal balance in *Solanum melongena* seedlings. **Brazilian Journal of Botany**, 39(1), pp.295–303. 8
- Hernández Silva, E. y García-Martínez, I., 2016. Brasinoesteroides en la agricultura. I. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, 7(2), pp.441–450. 2
- Howe, G.A. y Jander, G., 2008. Plant immunity to insect herbivores. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 59, pp.41–66. 5
- Huber, M., Hintermann, G. y Lerch, K., 1985. Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. **Biochemistry**, 24(22), pp.6038–6044. 17
- Imlay, J.A., 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annu. Rev. Biochem.**, 77, pp.755–776. 12, 13
- Jones, J.D. y Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. **nature**, 444(7117), pp.323–329. 5
- Jukanti, A., 2017. Distribution, localization, and structure of plant polyphenol oxidases (PPOs). **Polyphenol oxidases (PPOs) in plants**. Springer, pp.11–32. 17
- Karlova, R. y Vries, S.C. de, 2006. Advances in understanding brassinosteroid signaling. **Science's STKE**, 2006(354), pp.pe36–pe36. 8
- Kruger, N.J., 2009. The Bradford method for protein quantitation. **The protein protocols handbook**. Springer, pp.17–24. 25, 40, 41

- Kumar, V.A., Mohan, T.K. y Murugan, K., 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). **Food Chemistry**, 110(2), pp.328–333. 18
- Kutschera, U. y Wang, Z.Y., 2012. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. **Journal of experimental botany**, 63(10), pp.3511–3522. 8
- Lei, B., Heng, N., Dang, X., Liu, J., Yao, X. y Zhang, C., 2017. Structure based in silico identification of potentially non-steroidal brassinosteroids mimics. **Molecular BioSystems**, 13(7), pp.1364–1369. 2, 9
- Lerch, K., 1983. Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. **Molecular and cellular biochemistry**, 52(2), pp.125–138. 17
- Lima, J. y Lobato, A., 2017. Brassinosteroids improve photosystem II efficiency, gas exchange, antioxidant enzymes and growth of cowpea plants exposed to water deficit. **Physiology and molecular biology of plants**, 23(1), pp.59–72. 8
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y.b., Cui, B., Huang, Y.h., Colón-Carmona, A. y Wang, Z.h., 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, 176(3), pp.375–382. 13
- Liu, Z.J., Guo, Y.K. y Bai, J.G., 2010. Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. **Journal of plant growth regulation**, 29(2), pp.171–183. 9, 24, 27, 31, 33, 35, 36, 37, 46
- López-Blancas, E., Martínez-Damián, M.T., Colinas-León, M.T., Bautista-Bañuelos, C., Martínez-Solís, J. y Rodríguez-Pérez, J.E., 2014. Actividad antioxidante y enzimática de albahaca Nufar (*Ocimum basilicum* L.) almacenada en refrigeración. **Agronomía Mesoamericana**, 25(2), pp.256–265. 43
- Luhova, L., Lebeda, A., Hedererová, D. y Pec, P., 2003. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. **Plant soil and environment**, 49(4), pp.151–157. 2, 16

- Ma, S., Mu, W., Gao, J. y Zhou, J., 2009. Spectroscopic study of 2-(2-pyridyliminomethyl) phenol as a novel fluorescent probe for superoxide anion radicals and superoxide dismutase activity. **Journal of fluorescence**, 19(3), pp.487–493. 26, 46
- Macheix, J., Fleuriet, A. y Billot, J., 1990. Phenolic compounds in fruit processing. **Fruit phenolics**, 1, pp.295–358. 17
- Mahesh, K., Balaraju, P., Ramakrishna, B. y Rao, S.S.R., 2013. Effect of brassinosteroids on germination and seedling growth of radish (*Raphanus sativus* L.) under PEG-6000 induced water stress. **American Journal of Plant Sciences**, 2013. 19, 39
- Maki, H. y Morohashi, Y., 2006. Development of polyphenol oxidase activity in the micropylar endosperm of tomato seeds. **Journal of plant physiology**, 163(1), pp.1–10. 2, 18
- Marklund, S. y Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European journal of biochemistry**, 47(3), pp.469–474. 41, 42
- Marshall, M.R., Kim, J. y Wei, C., 2000. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. **FAO, Rome**, 49. 17
- Martínez-Damián, M.T., Cruz-Álvarez, O., Beryl Colinas-León, M.T., Rodríguez-Pérez, J.E. y Ramírez-Ramírez, S.P., 2013. Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* L.) almacenada bajo refrigeración. **Agronomía Mesoamericana**, 24(1), pp.57–69. 45
- Masayasu, M. y Hiroshi, Y., 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. **Clinica Chimica Acta**, 92(3), pp.337–342. 26
- Mayer, A.M., 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry**, 67(21), pp.2318–2331. 17
- Mayer, A.M. y Harel, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, 18(2), pp.193–215. 2, 18

- Mazorra, L.M., Holton, N., Bishop, G.J. y Núñez, M., 2011. Heat shock response in tomato brassinosteroid mutants indicates that thermotolerance is independent of brassinosteroid homeostasis. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49(12), pp.1420–1428. 8
- McCord, J.M. y Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, 244(22), pp.6049–6055. 15
- McDonald, M.B., 2000. Seed priming. **Seed technology and its biological basis**. Sheffield Academic Press, Sheffield, pp.287–325. 23, 44
- Misra, H.P. y Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, 247(10), pp.3170–3175. 41
- Mitchell, J., Mandava, N., Worley, J., Plimmer, J. y Smith, M., 1970. Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen. **Nature**, 225(5237), pp.1065–1066. 7
- Mithöfer, A. y Boland, W., 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual review of plant biology**, 63, pp.431–450. 5
- Mithöfer, A., Maffei, M.E. *et al.*, 2016. General mechanisms of plant defense and plant toxins. 1, 6
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, 7(9), pp.405–410. 12, 14
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual review of plant biology**, 52(1), pp.561–591. 14
- Møller, I.M., Jensen, P.E. y Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 58, pp.459–481. 2, 12, 13
- Moreno-Castillo, E., Ramírez-Echemendía, D.P., Hernández-Campoalegre, G., Mesa-Tejeda, D., Coll-Manchado, F. y Coll-García, Y., 2018. In silico identification of new potentially active brassinosteroid analogues. **Steroids**, 138, pp.35–42. 2, 3, 9

Motulsky, H., 2007. Prism 5 statistics guide, 2007. **GraphPad Software**, 31(1), pp.39–42.

29

Muñoz, I.G., Moran, J.F., Becana, M. y Montoya, G., 2005. The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. **Protein Science**, 14(2), pp.387–394. 15

Muthukumarasamy, M., Gupta, S.D. y Panneerselvam, R., 2000. Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. **Biologia Plantarum**, 43(2), pp.317–320. 22, 44

Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., Atici, Ö. y Nalbantoğlu, B., 2013. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. **Biologia Plantarum**, 57(3), pp.507–513. 10

Narváez, C., 2002. **Evaluación del comportamiento fisiológico del fruto de uva caimaron (Pourouma cecropiifolia) a temperatura ambiente ya temperaturas de refrigeración**. Tesis Doctorado. Tesis de Maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias 43

Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R. y Tuteja, N., 2017. Reactive oxygen species (ROS) metabolism and signaling in plant-mycorrhizal association under biotic and abiotic stress conditions. **Mycorrhiza-eco-physiology, secondary metabolites, nanomaterials**. Springer, pp.223–232. 12

Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J. y Aubert, S.Y., 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, 34(2), pp.109–157. 17

Nolan, T.M., Vukašinović, N., Liu, D., Russinova, E. y Yin, Y., 2020. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. **The Plant Cell**, 32(2), pp.295–318. 8

Pandey, V.K., 2014. Oxidative stress mediated ageing in non orthodox seeds involvement of ROS scavenging enzymes telomeres and telomerase. **Raipur**. 10, 13, 26, 41

- Peralta-Pérez, M.d.R. y Volke-Sepúlveda, T., 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. **Revista mexicana de ingeniería química**, 11(1), pp.75–88. 12
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B. y Gechev, T.S., 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. **Frontiers in plant science**, 6, p.69. 12
- Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Ent, S. Van der y Van Wees, S.C., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature chemical biology**, 5(5), pp.308–316. 6
- Pind, A., Freeman, C. y Lock, M., 1994. Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands—measurement of phenol oxidase activity. **Plant and Soil**, 159(2), pp.227–231. 44
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E. y Valente-Mesquita, V.L., 2008. Polyphe-
nol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. **Food reviews international**, 24(4), pp.361–375. 17
- Ramakrishna, B. y Rao, S.S.R., 2013. Preliminary studies on the involvement of glutathione metabolism and redox status against zinc toxicity in radish seedlings by 28-Homobrassinolide. **Environmental and experimental botany**, 96, pp.52–58. 39
- Ramasarma, T., Rao, A.V., Devi, M.M., Omkumar, R., Bhagyashree, K. y Bhat, S., 2015. New insights of superoxide dismutase inhibition of pyrogallol autoxidation. **Molecular and cellular biochemistry**, 400(1-2), pp.277–285. 42
- Raskin, I., 1992. Salicylate, a new plant hormone. **Plant physiology**, 99(3), p.799. 10
- Read, S.M. y Northcote, D., 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical biochemistry**, 116(1), pp.53–64. 40
- Reginato, M., Varela, C., Cenzano, A.M. y Luna, V., 2015. Role of polyphenols as antioxidants in native species from argentina under drought and salinization. **Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress**. Springer, pp.247–267. 13

- Rinalducci, S., Murgiano, L. y Zolla, L., 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. **Journal of Experimental Botany**, 59(14), pp.3781–3801. 11
- Ruley, A.T., Sharma, N.C. y Sahi, S.V., 2004. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42(11), pp.899–906. 14
- Sala, J.M. y Lafuente, M.T., 1999. Catalase in the heat-induced chilling tolerance of cold-stored hybrid Fortune mandarin fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(6), pp.2410–2414. 43
- Santos, L., Batista, B. y Lobato, A., 2018. Brassinosteroids mitigate cadmium toxicity in cowpea plants. **Photosynthetica**, 56(2), pp.591–605. 8
- Scandalios, J.G., Guan, L. y Polidoros, A.N., 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. **Cold Spring Harbor Monograph Series**, 34, pp.343–406. 16
- Sharma, I., Pati, P.K. y Bhardwaj, R., 2010. Regulation of growth and antioxidant enzyme activities by 28-homobrassinolide in seedlings of *Raphanus sativus* L. under cadmium stress. 18
- Sharma, N., Hundal, G.S., Sharma, I. y Bhardwaj, R., 2012. Effect of 24-epibrassinolide on protein content and activities of glutathione-S-transferase and polyphenol oxidase in *Raphanus sativus* L. plants under cadmium and mercury metal stress. **Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology**, 6(1), pp.1–7. 18, 19, 39
- Sharma, S.S. y Dietz, K.J., 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in plant science**, 14(1), pp.43–50. 13
- Sheen, S. y Calvert, J., 1969. Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in three tobacco types. **Plant physiology**, 44(2), pp.199–204. 44
- Stoscheck, C.M., 1990. Increased uniformity in the response of the Coomassie blue G protein assay to different proteins. **Analytical biochemistry**, 184(1), pp.111–116. 40

- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M. y Murphy, A., 2017. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora. 6
- Takahashi, M.A. y Asada, K., 1983. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 226(2), pp.558–566. 15
- Taylor, A., Allen, P., Bennett, M., Bradford, K., Burris, J. y Misra, M., 1998. Seed enhancements. **Seed science research**, 8(2), pp.245–256. 23, 44
- Trdá, L., Boutrot, F., Claverie, J., Brulé, D., Dorey, S. y Poinssot, B., 2015. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. **Frontiers in plant science**, 6, p.219. 6
- Triantaphylidès, C. y Havaux, M., 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. **Trends in plant science**, 14(4), pp.219–228. 11
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. y Duke, S.O., 1988. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, 72(3), pp.659–665. 18
- Verma, V., Ravindran, P. y Kumar, P.P., 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC plant biology**, 16(1), p.86. 2, 7
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E. *et al.*, 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. **Investigación y ciencia**, 341(2), pp.68–75. 1
- Wassim, A., Ichrak, B.R. y Saïda, A., 2013. Putative role of proteins involved in detoxification of reactive oxygen species in the early response to gravitropic stimulation of poplar stems. **Plant signaling & behavior**, 8(1), p.e22411. 12
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q. y Cai, Y., 2019. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. **BioMed research international**, 2019. 2, 12
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Ahmad, I. y Ahmad, A., 2014. Brassinosteroid-mediated evaluation of antioxidant system and nitrogen metabolism in two contrasting cultivars of *Vigna radiata* under different levels of nickel. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 20(4), pp.449–460. 8

- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Khan, T.A., Faizan, M. y Faraz, A., 2019. Interplay Between Antioxidant Enzymes and Brassinosteroids in Control of Plant Development and Stress Tolerance. **Brassinosteroids: Plant Growth and Development**. Springer, pp.323–348. 40
- Zhang, Q.A., Wang, X., Song, Y., Fan, X.H. y MArtín, J.F. gArcía, 2016. Optimization of pyrogallol autoxidation conditions and its application in evaluation of superoxide anion radical scavenging capacity for four antioxidants. **Journal of AOAC International**, 99(2), pp.504–511. 41
- Zullo, M.A.T. y Bajguz, A., 2019. The brassinosteroids family–structural diversity of natural compounds and their precursors. **Brassinosteroids: Plant Growth and Development**. Springer, pp.1–44. 8