



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FISIOLÓGIA VEGETAL

Aislamiento de peroxidasas catiónicas del apoplasto de *Solanum lycopersicon*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

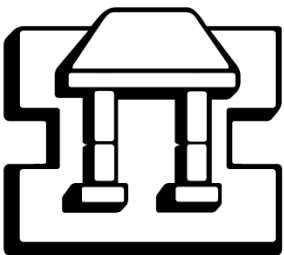
BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL CABRERA SANTOS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO



México, 2013

En la memoria y amor eterno de mi padre y hermano, por mis hermanos, familia y amigos, para mi madre Irene (paz, naturaleza emotiva que todo lo aprovecha).

*¡Cuán larga es la noche del tiempo limitado si se compara con el breve ensueño de la vida!*

*Ars longa, vita brevis*

## Agradecimientos

Quisiera agradecer todo el apoyo que me obsequiaron las personas involucradas en este trabajo, creo que sólo me desempeñe como una antena de su conocimiento, me refiero a los técnicos académicos de los laboratorios de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica de la UBIPRO, a mis sinodales (aprovecho para mostrar mi respeto y admiración a cada uno de ellos) en especial al Dr. Peñalosa y a la M. en C. Josefina Vazquez Medrano, a mis compañeros de laboratorio, me disculpo con todos si les hice pasar malestares durante mi tiempo junto a ustedes.

Mi agradecimiento al apoyo que sostuvo este trabajo aportado por el proyecto PAPIIT IN226210: "Participación de las peroxidasas de clase III obtenidas del apoplasto de tallos de *Solanum lycopersicon* en la oxidación de los ácidos indolacético e indolbutírico".

## Contenido

1	RESUMEN .....	1
2	INTRODUCCIÓN GENERAL .....	3
	2.1 Clasificación .....	3
	2.1.1 Clase I: Peroxidasas de procedencia procariota .....	3
	2.1.2 Clase II: Peroxidasas fúngicas .....	3
	2.1.3 Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas .....	3
	2.2 Justificación .....	4
3	FUNDAMENTOS TEORICOS.....	6
	A) Generalidades sobre peroxidasas de Clase III .....	6
	1.1 Características generales .....	6
	1.2 Ciclo catalítico .....	8
	1.3 Procesamiento y secreción .....	9
	1.4 Características estructurales .....	11
	1.5 Centro activo .....	12
	B) Peroxidasas a nivel celular, localización, usos y aplicaciones .....	15
	1.1 Localización celular .....	15
	1.2 Procesos fisiológicos mediados por peroxidasas .....	16
	1.3 Aplicaciones prácticas de las peroxidasas .....	18
	C) Antecedentes del uso de zeolitas como medio de separación de peroxidasas catiónicas.....	20
	1.1 Definiciones y conceptos básicos acerca de zeolitas .....	20
	1.2 Usos de la zeolita .....	25
	1.3 Propiedades de las zeolitas que influyen en la separación de moléculas.....	25
4	PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
	4.1 Planteamiento del problema .....	29
	4.2 Hipótesis .....	29
	4.3 Objetivos .....	30
	General.....	30
	Específicos .....	31
	4.4 Estrategia experimental .....	31
5	METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	33
	5.1 Características y condiciones en el crecimiento y mantenimiento de plantas de <i>Solanum lycopersicon</i> .....	33
	5.1.1. Tratamiento previo de brotes y al día cero del enraizamiento adventicio .....	33
	5.2 Tratamiento de brotes con AIB (brotes al 8° día de enraizamiento adventicio).....	33
	5.3 Digestión celular enzimática y producción de extracto (METODO A).....	33
	5.4 Fraccionamiento celular progresivo (METODO B) .....	34
	5.5 Cuantificación proteica .....	35

5.6	Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE) .....	35
5.7	Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) en solución.....	37
5.8	Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	37
5.9	Preparación de columnas de zeolita para la separación de enzimas catiónicas .....	38
5.10	Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (filtrados de la columna de zeolita) .....	39
5.11	Análisis microscópico de la columna de intercambio iónico.....	39
6	RESULTADOS.....	43
6.1	Tratamiento de brotes con enraizamiento adventicio.....	43
6.2	Extracción de proteínas de la pared celular .....	43
6.3	Extracción de componentes celulares por el Método A .....	44
6.4	Cuantificación Proteica, Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) obtenidas por el Método A y Separación de proteínas por la columna de intercambio iónico .....	44
6.5	Extracción de componentes celulares por el Método B1 y B2 .....	45
6.6	Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE) .....	46
6.7	Cuantificación Proteica y Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) de las fracciones obtenidas por el Método B2.....	47
6.8	Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	48
6.9	Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (Separación por columna de zeolita) .....	49
6.10	Análisis microscópico de la columna de intercambio iónico .....	50
7	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
7.1	Tratamiento de brotes con enraizamiento previo .....	52
7.2	Extracción de proteínas de la pared celular .....	52
7.3	Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE) .....	53
7.4	Cuantificación Proteica y Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) en solución.....	54
7.5	Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa .....	54
7.6	Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (filtrados de la columna de zeolita) .....	54
7.7	Análisis de la columna de intercambio iónico.....	55
8	CONCLUSIONES .....	56
9	BIBLIOGRAFÍA .....	57

Ilustración 1: Superfamilia de las Peroxidasas Hemo(Dunand, 2004-2012). .....	4
Ilustración 2: a) Estructura de una Peroxidasa; b) Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles; c) Diferentes estados de coordinación del hierro (1) el $N_{His}^{\epsilon}$ (Nitrógeno $\epsilon$ de la His proximal), (2) el $N_{His}^{\epsilon}$ y una molécula de $H_2O_2$ , y (3) el $N_{His}^{\epsilon}$ y un O.....	7
Ilustración 3: Ciclos de Peroxidasas de Clase III. El ciclo hidroxílico (flechas rojas) puede regular el nivel de $H_2O_2$ y la liberación de ROS ( $\cdot OH$ , $HOO\cdot$ ). El ciclo Peroxidativo (flechas azules) puede oxidar varios sustratos (XH) y liberar sus forma oxidada ( $X^{\cdot}$ ), ambos ciclos regulan los niveles de $H_2O_2$ . .....	8
Ilustración 4: Imagen estereoscópica del modelo esquemático de la CcP de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Finzel <i>et al</i> , 1984). Se muestra el dominio distal en rojo y el proximal en azul (Dueñas, 1998). .....	11
Ilustración 5: a) Imagen estereoscópica de los residuos e iones de calcio del dominio distal (superior) y proximal (inferior) implicados en el funcionamiento de LiP (Banci, 1997; Poulos <i>et al</i> , 1993). Los iones de $Ca^{2+}$ están representados por esferas grises; b) Puentes de Hidrógeno (líneas punteadas) presentes alrededor del grupo hemo en la Lignina Peroxidasa (LiP) (Poulos <i>et al</i> , op cit).....	14
Ilustración 6: Implicación de las Peroxidasas durante el ciclo de vida de una planta (Passardi <i>et al</i> , 2005) .....	18
Ilustración 7: a) Unidad básica de construcción de la zeolita, el tetraedro; b) Dos unidades de zeolita unidas en el centro por un átomo de Oxígeno. ....	21
Ilustración 8: Estructura típica de las zeolitas: a) Atómica, b) Tetraédrica y c) Cristalina (Olguín, s.f.). .....	21
Ilustración 9: Tamaños típicos de poro de zeolita (caja de zeolita) con uniones de oxígeno (Bekkm, 1991). .....	22
Ilustración 10: Unidades secundarias de construcción .....	23
Ilustración 11: Sorción de Moléculas de Surfactante sobre la superficie de la zeolita como: a) Monocapa, b) Bicapa incompleta y c) Bicapa (Olguín, s.f.).....	28
Ilustración 12: Retención de moléculas aniónicas, catiónicas o no polares por zeolitas acondicionada con surfactantes (Olguín, op cit).....	28
Ilustración 13: Estrategia general de trabajo.....	32
Ilustración 14: a) Proceso de Infiltración; b) Adaptación para centrifugado .....	34
Ilustración 15: Columna de Intercambio iónico. ....	38
Ilustración 16: Método A y Separación de proteínas con zeolita. ....	40
Ilustración 17: Método B1 .....	41
Ilustración 18: Método B2.....	42
Ilustración 19: Patrón enzimático de la muestra PCT correspondiente al Método A.....	44
Ilustración 20: Patrón enzimático de las muestras correspondientes al Método B1 al día 0 de enraizamiento: 1) Componentes solubles antes de la infiltración-centrifugado, 2) Componentes solubles después de la infiltración-centrifugado, 3) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 4) Componentes solubilizados con fuerza iónica y 5) Componentes solubilizados por digestión de las paredes; 6) Carril vacío. ....	45
Ilustración 21: Patrón enzimático de las muestras correspondientes al Método B2 al día 8 de enraizamiento: 1) Componentes extracelulares solubles, 2) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 3) Componentes solubilizados con fuerza iónica, 4 y 5) Componentes solubilizados con detergente y 6) Componentes solubilizados por digestión de las paredes.....	45
Ilustración 22: Evaluación de la actividad AIA y AIB oxidasa de los Componentes extracelulares solubles obtenidos por el Método B2, en todos los casos se usó buffer Fosfato de Sodio 0.1 M, pH, 6.5 para el medio de reacción. ....	46
Ilustración 23: Evaluación de la actividad AIA y AIB oxidasa de los Componentes extracelulares solubles obtenidos por el Método B2, en el casos de los ensayos con AIA y AIB se usó	

buffer de Acetato de Sodio 0.2 M, pH 4.2; mientras que para la actividad de Prx se usó buffer Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 para el medio de reacción. ....	46
Ilustración 24: Gráfica de los valores de absorbancia con respecto al tiempo: 1) G6PD 2) Componentes extracelulares solubles, 3) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 4) Componentes solubilizados con fuerza iónica, 5 y 6) Componentes solubilizados con detergente y 7) Componentes solubilizados por digestión de las paredes .....	48
Ilustración 25: Patrones enzimáticos de las fracciones obtenidas de la columna de zeolita: PCT) Proteinas celulares totales, 1er) Primer filtrado, 2do) Segundo filtrado, 1M) Lavado con NaCl 1M; a) Enraizamiento al día 8, y b) Enraizamiento al día 0. ....	49
Ilustración 26: a) y b): Zeolita modificada; c) y d): Zeolita natural .....	50

## 1 RESUMEN

Debido a que las peroxididasas se encuentran presentes durante cada etapa del ciclo de vida de las plantas y que se les reporta participando en un amplio rango de procesos fisiológicos; al ser parte de una numerosa familia multigénica, al tener un alto número de isoformas, con una heterogénea regulación de su expresión y a la modulación de su actividad y expresión en respuesta a estímulos internos y externos, estas enzimas han sido estudiadas extensamente.

La relevancia de este trabajo radica en tres factores cardinales, a saber: 1) El hecho de que ninguna de las 71 isoperoxidasas de clase III encontradas en el jitomate se dispone en forma aislada, es decir, las secuencias de las 71 isoenzimas reportadas en esta especie han sido inferidas; de acuerdo con peroxibase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), por medio de marcadores de secuencia expresadas (EST's por sus siglas en inglés) y por estudios genómicos, y en ningún caso se tiene evidencia experimental sobre la localización subcelular de alguna de ellas 2) Entre las peroxididasas de clase III se reporta que las que tienen importancia en el catabolismo de auxinas son las isoperoxidasas catiónicas, aunque en el jitomate se desconoce si es aplicable esta condición, 3) Si se dispone de un procedimiento para mostrar la actividad relativa de las isoperoxidasas con actividad auxina oxidasa, la comparación de sus actividades en dos momentos del curso del enraizamiento adventicio de tallos de jitomate, podría mostrar si hay consistencia en la suposición de que las peroxididasas catiónicas en el jitomate tienen relación con el catabolismo de auxinas. El trabajo busca contribuir a dilucidar el posible rol funcional que juegan las peroxididasas de clase III y a disponer de un método eficiente para su extracción y separación.

A partir del tejido de brotes axilares de *Solanum lycopersicon*, se obtuvieron zimogramas que revelaron bandas con actividad peroxidasa y auxina-oxidasa, en diferentes fracciones tisulares, obtenidas de brotes axilares que fueron sometidos a enraizamiento, tratándolos con AIB 20  $\mu$ M por 24 horas; entre ellas, se observaron dos bandas catiónicas. No existen reportes previos que den cuenta de la existencia física de la proteína responsable de la actividad de estas dos isoperoxidasas, obtenidas de la fracción soluble del apoplasto de jitomate; sólo se reporta la existencia de un gen que codifica una peroxidasa catiónica en jitomate inferida por homología. Se observó que la actividad de las bandas que provinieron de brotes sometidos por 8 días a enraizamiento adventicio fue mayor que la que presentó los mismos brotes recién cortados para ser sometidos a este tratamiento.

Por medio de un fraccionamiento que comprendía una infiltración-centrifugado y la posterior separación de la fracción soluble libre de células, fue posible evidenciar que el apoplasto contiene enzimas con esta actividad. La técnica de infiltrado-centrifugado permite recuperar de forma rápida y sencilla el líquido apoplástico sin aparente daño celular; la cantidad de líquido recuperado fue la suficiente para poder analizarlo.

El desarrollo de un sistema electroforético horizontal basado en la movilidad diferencial de las isoperoxidasas en razón de su carga eléctrica, con relación al pH, permitió observar enzimas con diferentes movilidades. Los zimogramas obtenidos revelaron que una de las dos isoenzimas catiónicas consumió los tres sustratos ensayados (O-Dianisidina, AIA y AIB) como donadores de H, lo que hace suponer que cabe entre sus roles funcionales su participación en el catabolismo de auxinas.

La separación de isoenzimas se llevó a cabo por medio de una columna de intercambio iónico a la que se le unieron grupos hidrofóbicos a base de Zeolita/Caolín con poro grande, se encontró que fue posible separar la enzima catiónica con actividad auxina oxidasa, de las demás isoperoxidasas presentes, conservando sus propiedades y actividad después de su desorción.



Dos peroxidasas catiónicas fueron obtenidas de los brotes; los datos evidencian que las enzimas catiónicas se encuentran de forma soluble en el apoplasto; no obstante, también existe evidencia de su asociación a las paredes celulares en trabajos realizados dentro de nuestro grupo de trabajo; se sugiere que existe un equilibrio entre la abundancia de una de éstas isoenzimas catiónicas en la fracción soluble y la que se encuentra asociada a la pared celular. El análisis de la naturaleza de la columna de intercambio y la asociación de las peroxidasas hace suponer que las relaciones que se dieron para la adsorción de las proteínas son en parte por interacciones hidrofóbicas y en parte por relaciones iónicas.

## 2 INTRODUCCIÓN GENERAL

Las peroxidasas (EC 1.11.1.x) son una clase de enzimas presentes en tejidos animales, plantas y en otros microorganismos, éstas catalizan la oxidación-reducción entre  $H_2O_2$  y varios reductores; las peroxidasas son proteínas que pueden contener un grupo hemo; las de tipo hemo agrupan a las peroxidasas no animales y de acuerdo con Welinder (Welinder, 1992) éstas se subdividen en tres clases: Peroxidasas intracelulares procarióticas (Clase I), Peroxidasas fúngicas (Clase II) y Peroxidasas de plantas o peroxidasas vegetales (Clase III); las plantas, de acuerdo con esta clasificación, contienen enzimas de las clases I y III.

### 2.1 Clasificación

Las peroxidasas hemo se clasifican en dos superfamilias en función de características propias de cada grupo y a diferencias estructurales. La superfamilia de las peroxidasas animales y la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas, a pesar de mostrar en algunos casos una identidad de secuencia baja, presentan el mismo plegamiento y se encuentran evolutivamente relacionadas (Welinder & Gajhede, 1993); son designadas por el sistema de clasificación enzimática (EC) de la siguiente manera: Intracelulares de clase I (EC 1.11.1.5/6/11), las de clase II liberadas por hongos (EC 1.11.1.13/14) y las secretadas por plantas o de clase III (EC 1.11.1.7).

#### 2.1.1 Clase I: Peroxidasas de procedencia procariota

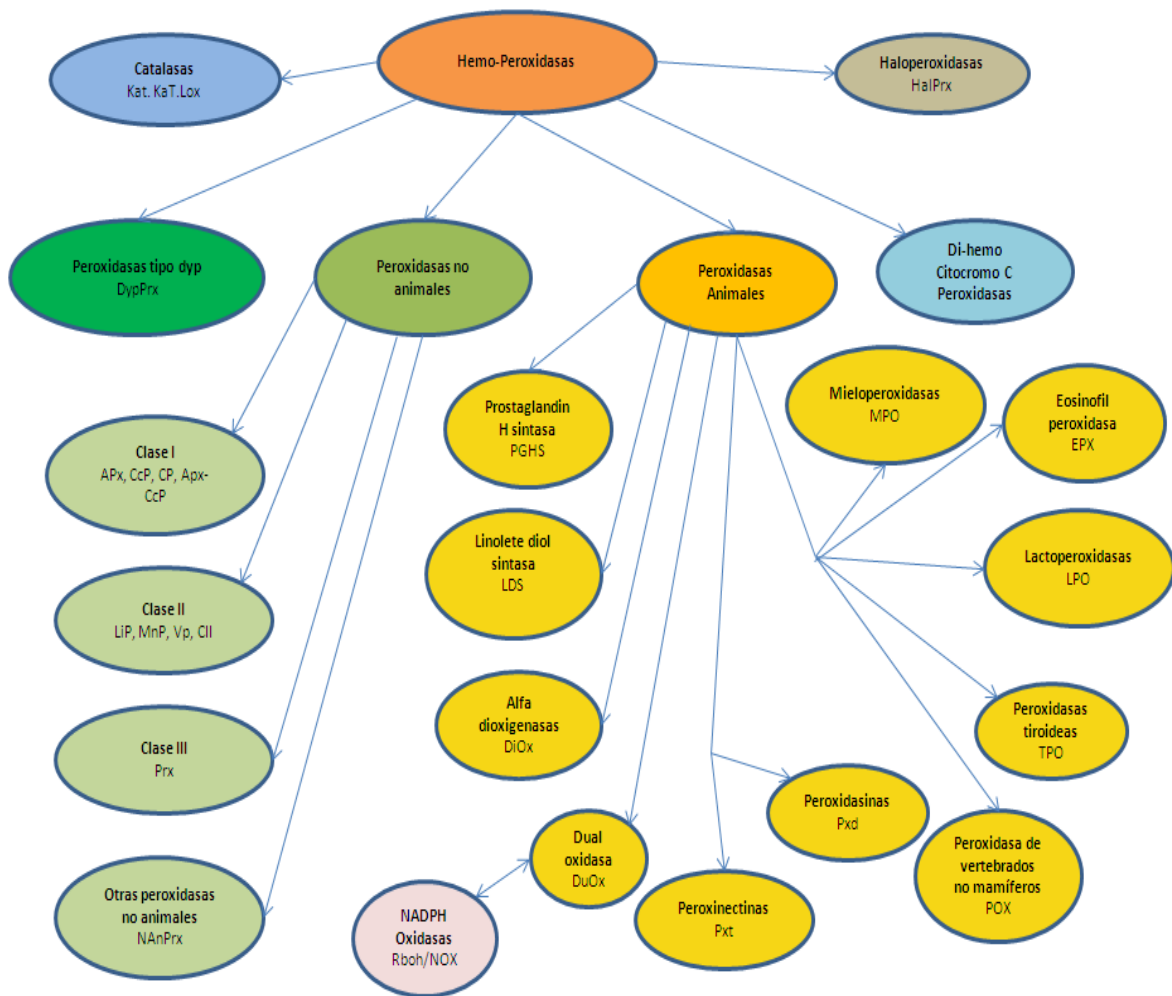
Este tipo de peroxidasas se encuentra en procariotes, plantas y en hongos; no presentan glicosilación y carecen de péptidos señal que permita su secreción vía retículo endoplásmico (elementos característicos de las peroxidasas de las clases II y III), tampoco presentan iones de calcio estructurales o puentes disulfuro (Welinder, 1992; Passardi, 2007); elementos característicos de las peroxidasas de clase III. Existen tres tipos de acuerdo a la clasificación de enzimas (EC) en esta clase: EC 1.11.1.5 (ferrocitocromo-c: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa), EC 1.11.1.6 (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa o más comúnmente conocida como catalasa peroxidasa) y EC 1.11.1.11 (L-ascorbato: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa).

#### 2.1.2 Clase II: Peroxidasas fúngicas

Las peroxidasas de clase II son secretadas por los Homobasidiomicetes, para degradar la lignina de origen vegetal. Esta clase consiste en: Lignina-peroxidasas (LiP; EC 1.11.1.14) y las Manganeso-peroxidasas (MnP; EC 1.11.1.13). A diferencia de las de clase I, son glucosidadas y contienen iones calcio; puentes disulfuro; así como péptidos señal que permite su secreción directamente al retículo endoplásmico. Estas peroxidasas poseen la habilidad de oxidar moléculas con un alto potencial redox como la lignina, además de ser esenciales en la descomposición material vegetal muerto y el reciclaje del suelo (Passardi, op cit).

#### 2.1.3 Clase III: Peroxidasas de secreción en plantas

Esta clase de peroxidasas son exclusivas de las plantas donde forman una gran familia multigénica; no obstante, su secuencia primaria se distingue de las otras clases por sólo algunos residuos (Passardi, 2004), su estructura espacial es muy similar a las de la clase II. Además, también presentan iones de calcio, puentes disulfuro y un residuo N-terminal como señal para su secreción; algunas de ellas pueden presentar un residuo C-terminal adicional, que se sugiere, puede dirigir su secreción en la vacuola. Las peroxidasas de clase III presentan los dos tipos de ciclo, durante el ciclo hidroxílico las peroxidasas pasan a través de un estado Fe (II) y usan el anión superóxido ( $O_2^-$ ) para generar radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ); por medio de esto, son capaces de participar en una amplia gama de procesos tales como el metabolismo de auxinas, elongación/rigidez de la pared celular, protección contra patógenos e inclusive mediar la simbiosis con otros organismos como en la nodulación y micorrización (Passardi, 2005).



**Ilustración 1: Superfamilia de las Peroxidasas Hemo (Dunand, 2004-2012).**

En resumen; las peroxidasas de clase III son parte de una amplia familia multigénica y debido al alto número de isoformas, a la heterogénea regulación de su expresión y a la existencia de dos ciclos catalíticos (peroxidativo e hidroxílico); se encuentran involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo de vida de una planta y como consecuencia de esto, la perspectiva sin esclarecer que aún se tiene acerca de sus funciones. (Welinder, 1992; Passardi, 2005; Fry, 1986; Scialabba *et al*, 2001; Salzwedel & Dazzo, 1993; Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988).

## 2.2 Justificación

La enzimología es una herramienta básica en el conocimiento de diferentes procesos, aportándonos la información necesaria para crear modelos que nos permiten dilucidar los mecanismos de los fenómenos dentro de los seres vivos. Este trabajo parte de la necesidad de conocer el rol funcional de las proteínas con actividad de peroxidasa y más específicamente, si es que las peroxidasas presentan actividad *in vitro* de auxina oxidasa y si esa actividad tiene relevancia en el contexto fisiológico. Así, se dispuso evaluar la actividad AIA oxidasa y AIB oxidasa de enzimas con formas catiónicas, dado que son las auxinas mayormente involucradas en el enraizamiento adventicio, el cual se adoptó como modelo para evaluar la relación fisiológica de la actividad de estas enzimas y por reportarse en la literatura a las peroxidasas catiónicas, como las más frecuentemente responsables de la degradación oxidativa de auxinas. El estudio se realizó en plantas de *Solanum lycopersicon*, pues esta especie ha sido elegida para estudiar su genoma, de manera que se dispone de la secuencia de aminoácidos parcial o total, inferida de la secuenciación de sus ácidos nucleicos, de las 71 isoenzimas hasta ahora

reconocidas en esta especie, todas ellas pertenecientes a las peroxidasas de clase III. Se buscó en paralelo, que los ensayos realizados condujeran a proporcionar un método sencillo para su aislamiento y evaluación.

### 3 FUNDAMENTOS TEORICOS

#### A) Generalidades sobre peroxidasas de Clase III

##### 1.1 Características generales

Las peroxidasas de clase III (donante: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasa E.C.1.11.1.7) son enzimas cuya función elemental es la oxidación de diversos sustratos a expensas del peróxido de hidrogeno; son hemoproteínas (presentan el grupo prostético hemo: ferriprotoporfirina IX) con actividad catalítica; debido a que se encuentran presentes en todas las plantas terrestres y a que presentan una dramática gama de productos, implicados en funciones fisiológicas elementales, resultado de su ciclo catalítico, estas enzimas han sido investigadas extensivamente (Gaspar, *et al*, 1982). Los pesos de estas enzimas oscilan entre los 35,000 y los 100,000 Daltons (alrededor de 251 a 726 residuos), los cuales aumentan si se incluye el peso de su composición en carbohidratos (alrededor de un +/- 20%). En su centro activo se encuentra un grupo hemo tipo b que contiene un ion de hierro en estado de oxidación de +3 en cuya coordinación participan los cuatro nitrógenos pirrólicos y el nitrógeno ε del anillo imidazólico de una histidina axial denominada histidina proximal. El sexto ligando se encuentra libre y puede variar a lo largo del ciclo catalítico. No obstante que presentan un bajo nivel de identidad (menor al 20%), todas presentan una estructura secundaria y plegamiento similar (Banci, 1997; Finzel *et al* 1984; Welinder & Gajhede, 1993; Gajhede *et al*, 1997).

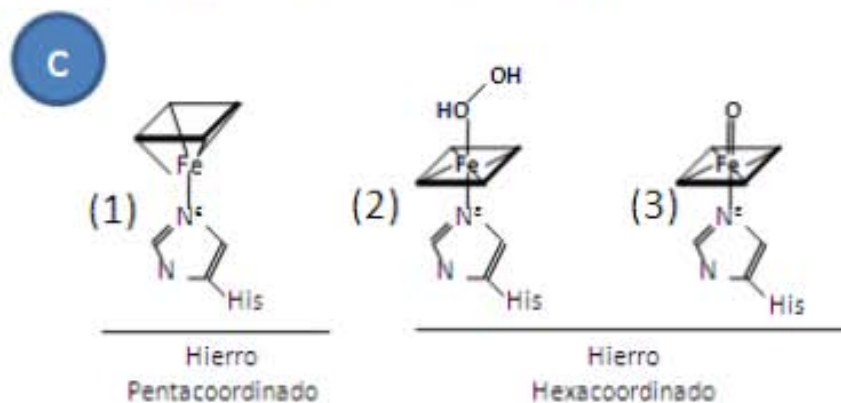
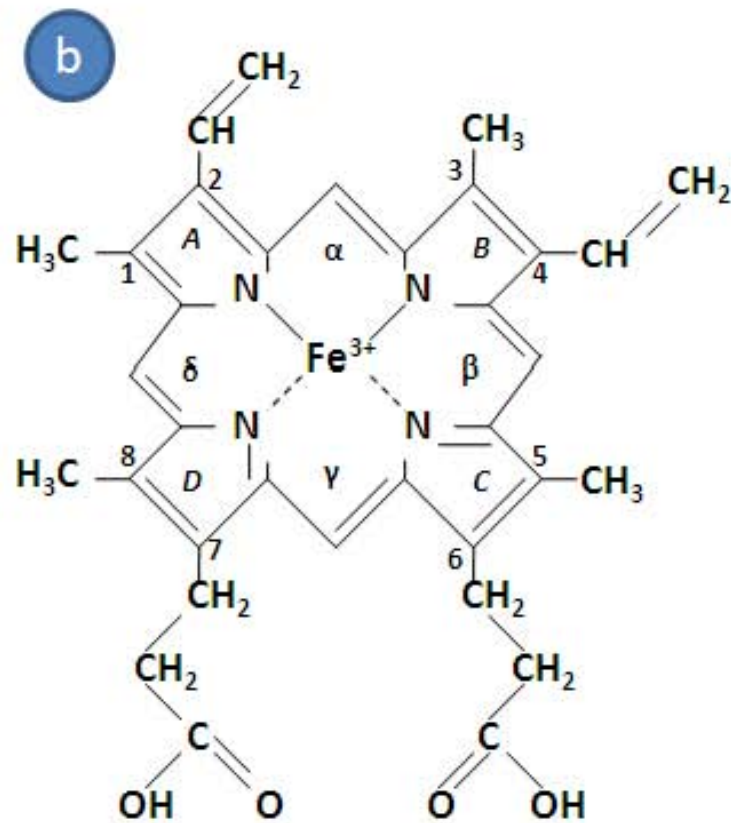
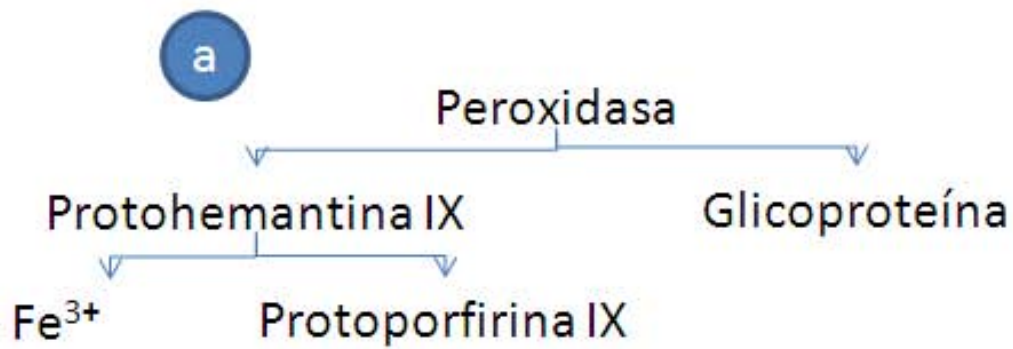


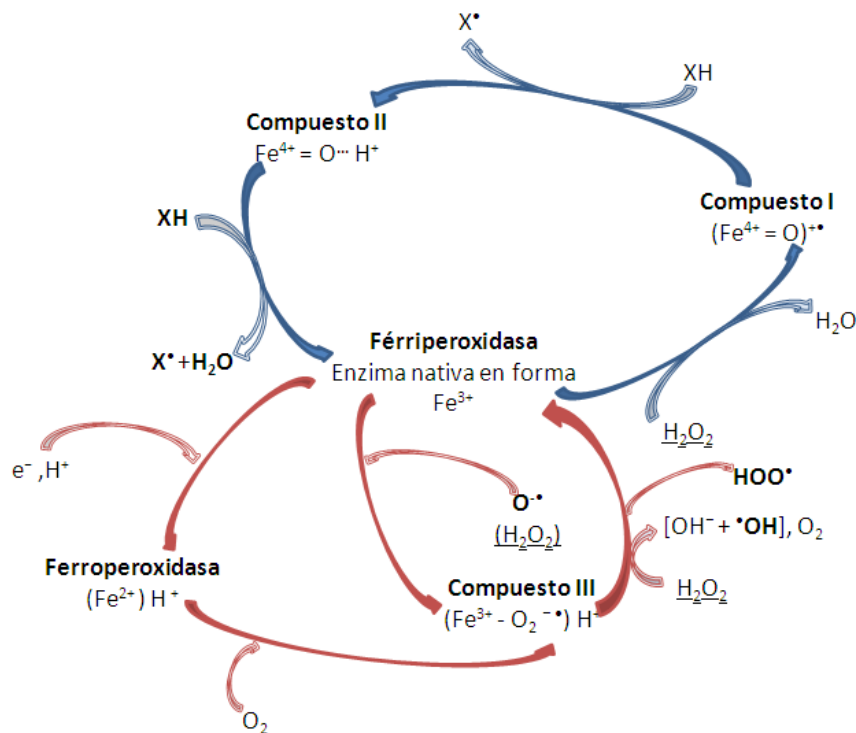
Ilustración 2: a) Estructura de una Peroxidasa; b) Hemo tipo b con el hierro ligado a los nitrógenos de los cuatro pirroles; c) Diferentes estados de coordinación del hierro (1) el  $N_{\text{His}}^{\epsilon}$  (Nitrógeno  $\epsilon$  de la His proximal), (2) el  $N_{\text{His}}^{\epsilon}$  y una molécula de  $H_2O_2$ , y (3) el  $N_{\text{His}}^{\epsilon}$  y un O.

Una peroxidasa de clase III está dividida en dos diferentes dominios estructurales formados en su mayoría por alfa-hélices (de 10-13) conectados entre sí por medio de bucles y vueltas, también se encuentran formadas en menor cantidad por laminas beta y aparentemente sólo presentan conservados algunos residuos de Glicina y Prolina esenciales para su forma funcional (Banci, 1997).

Estas peroxidasas a partir de los niveles de  $H_2O_2$  y por medio de sus dos posibles ciclos catalíticos (peroxidativo e hidroxílico) participan en la producción e interacción de especies reactivas de oxígeno ( $\cdot OH$ ,  $HOO\cdot$ ). Mediante la modulación de su actividad y expresión en respuesta a estímulos internos y externos se encuentran en cada etapa del ciclo del vida de las plantas ya sea tornando rígida la pared celular; produciendo Especies Reactivas de Oxígeno (o más comúnmente ROS por sus siglas en ingles) para hacerla flexible (Fry, 1986); previniendo ataques biológicos y químicos por el aumento de barreras físicas o contraataque por medio de una alta producción de ROS (Scialabba *et al*, 2001) así como también, formando parte de las más pacíficas simbiosis (Salzwedel & Dazzo, 1993; Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988).

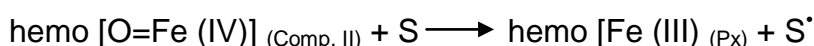
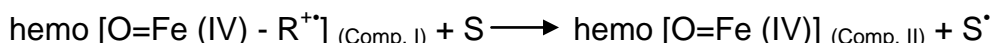
### 1.2 Ciclo catalítico

Estas moléculas presentan dos tipos de ciclo, debido a los cuales se abre la posibilidad de un amplio rango de procesos en donde están implicadas. Durante ambos ciclos las peroxidasas reducen hidroperóxidos para catalizar la oxidación de un amplio número de sustratos como: compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas o metabolitos secundarios. La mayor parte de las peroxidasas siguen el mecanismo de reacción que se describe en la Ilustración 3.



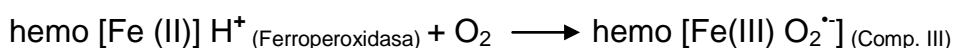
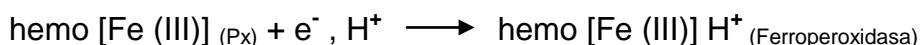
**Ilustración 3: Ciclos de Peroxidasas de Clase III.** El ciclo hidroxílico (flechas rojas) puede regular el nivel de  $H_2O_2$  y la liberación de ROS ( $\cdot OH$ ,  $HOO\cdot$ ). El ciclo Peroxidativo (flechas azules) puede oxidar varios sustratos ( $XH$ ) y liberar sus forma oxidada ( $X^*$ ), ambos ciclos regulan los niveles de  $H_2O_2$ .

El proceso catalítico Peroxidativo involucra varios pasos, empezando con una reacción del grupo hemo frente al peróxido de hidrogeno. Esta reacción produce agua y la oxidación de la enzima con dos electrones. Este estado es llamado Compuesto I, el cual contiene un centro oxiferril (Fe (IV)=O) y un catión radical el cual se puede localizar, dependiendo de la isoenzima, en el grupo hemo o en un residuo. Después, el Compuesto I oxida una molécula de sustrato (S) para formar un sustrato radical y el Compuesto II, donde el catión radical es reducido a su estado completo. Finalmente, el Compuesto II es reducido por una segunda molécula de sustrato para llevar a la enzima a su primer estado (III), el ciclo puede quedar resumido de la siguiente forma:

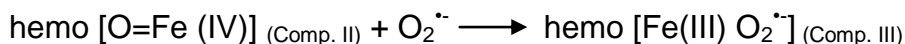


La formación de compuesto III durante el ciclo hidroxílico sucede por la interacción directa de la forma nativa de la enzima (forma férrica) con el anión superóxido o por la formación intermedia de la ferropoxidasa por medio de donadores de  $e^-$  y  $H^+$  (lo que ha sido identificado también como producto de la interacción entre el Compuesto II y  $H_2O_2$ ), la asociación del Compuesto III con peróxido de hidrogeno da como resultado la formación de ROS; adicionalmente se ha observado que el Compuesto III desaparece en presencia de donadores y aceptores de electrones lo que lleva a la formación de la ferriperoxidasa, lo que hace del compuesto un híbrido entre los complejos ferropoxidasa-oxígeno y el complejo ferropoxidasa-anión superóxido; a su vez, el Compuesto III puede reaccionar con la Ferropoxidasa y el Compuesto II liberando  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Gaspar *et al*, 1982). En ausencia de sustratos reductores adecuados, un exceso de  $H_2O_2$  reacciona con el Compuesto II para formar el Compuesto III ( $Fe^{3+} O_2^{\cdot-}$ ) produciéndose la inactivación de la enzima y la pérdida del grupo hemo (Wariishi y Gold, 1990); el ciclo Hidroxílico y la formación del Compuesto III puede llevarse a cabo por las siguientes vías:

1



2



Ambos ciclos (Peroxidativo e Hidroxílico) implican la regulación de  $H_2O_2$  y como resultado de éste, la formación y liberación de ROS ( $\cdot OH$ ,  $HOO\cdot$ ), la fuente de  $e^-$  y  $H^+$  pueden ser auxinas u otras moléculas reductoras.

### 1.3 Procesamiento y secreción

Los genes de las peroxidasa de clase II y III se caracterizan por presentar secuencias que codifican extremos N-terminales conocidos como péptidos señal. Estas secuencias dirigen a las peroxidasa hacia el espacio extracelular siguiendo una ruta de secreción donde acontecen los siguientes eventos: un plegamiento cotraduccional en el retículo endoplásmico, donde se forman los puentes disulfuro (Freedman, 1989), la incorporación de una secuencia precursora (Glucosa<sub>3</sub>-Manosa<sub>9</sub>-Glucosa-N-acetilglucosamina<sub>2</sub>) que se une a la asparagina de la mayoría de las secuencias NXT/S de la proteína (Gavel, 1990) y la unión de iones de calcio que estabilizan la estructura de la apoperoxidasa resultante. Por último, si el contenido hemo



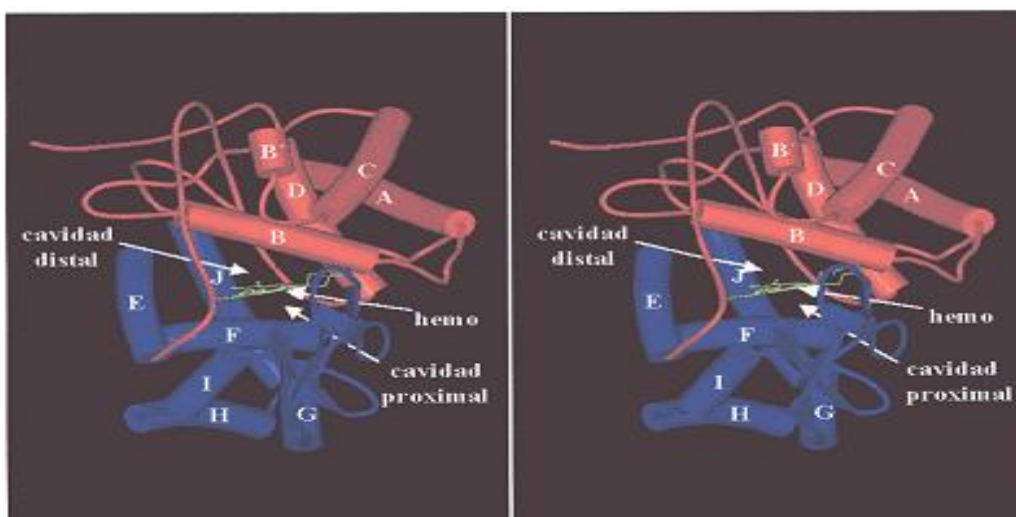
presente en la célula es el necesario, se incorpora a la proteína dando lugar a la holoperoxidasa correspondiente. Las peroxidases así formadas progresan en el aparato de Golgi, donde tiene lugar un procesamiento adicional de los carbohidratos antes de ser secretadas.

Aunque la exportación al espacio extracelular es la ruta seguida por defecto, también se han detectado peroxidases en vacuolas (Gaspar *et al*, 1982), lo que sugiere la existencia de rutas de secreción alternas. Cabe mencionar la presencia de secuencias acidas en el extremo C-terminal (propéptidos ácidos) las cuales dirigen a las peroxidases hacia las vacuolas; donde este péptido señal es removido (Bednarek *et al*, 1990).

#### 1.4 Características estructurales

El estudio con difracción de rayos X hechos por Finzel y colaboradores (Finzel *et al*, 1984), sobre la enzima Citocromo-c Peroxidasa (CcP) permitió dilucidar dos dominios bien definidos en una estructura formada por 10 alfa-hélices (las de Clase III contienen tres alfa hélices extra) que representan aproximadamente el 50% de la molécula, junto con cinco láminas beta, cuatro de ellas formando pares antiparalelos; el dominio I (distal), formado por el extremo N-terminal y de las hélices A-D, se encuentra distribuido sobre la hélice B que se localiza sobre el grupo hemo; un lazo de gran longitud entre las hélices D y E conecta este dominio con el dominio II (proximal); éste contiene de las hélices E-I y la mayor parte de la estructura B (beta). La última hélice (hélice J) comienza en el dominio II (por debajo del hemo) y se proyecta en el dominio I; esta organización en dos dominios estructurales con los extremos N y C-terminal situados en el mismo dominio es característica de muchas estructuras compuestas por dos dominios; un amplio canal, entre los dos dominios, conecta el lado distal de la cavidad del hemo con la superficie de la proteína permitiendo el acceso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al centro activo. El reconocimiento de la identidad de la CcP permitió dilucidar la estructura de las peroxidases en general, dando un panorama esencial de sus propiedades y funciones; actualmente es conocida una amplia variedad de estructuras tridimensionales de este tipo de enzimas.

La estructura además, presenta dos iones de calcio que mantienen la estructura, los sitios de unión de los iones se encuentran altamente conservados en peroxidases fúngicas y de plantas; cada ion calcio se encuentra en un dominio diferente, el ion del dominio proximal se encuentra fuertemente unido en comparación con el ion de calcio distal, el cual parece estar débilmente asociado, debido a su cercanía a la superficie molecular y a su exposición al solvente. Los iones calcio se encuentran ligados a los residuos de las hélices B y F, que forman la superficie distal y proximal de la cavidad hemo, contiguos a cada una de las histidinas catalíticas (Banci, 1997). Algunos estudios en los que se extrajeron los iones calcio muestran que estas enzimas pierden su actividad catalítica (Shiro *et al*, 1986; Barber *et al*, 1995) o se inactivan totalmente debido a cambios estructurales (Sutherland & Aust, 1996; Sutherland *et al*, 1997). Además es importante mencionar que los 4 puentes disulfuro en las cisteínas, tres en el dominio distal y uno en el proximal, ayudan a mantener la estructura, plegamiento y función de la proteína.



**Ilustración 4: Imagen estereoscópica del modelo esquemático de la CcP de *Saccharomyces cerevisiae* (Finzel *et al*, 1984). Se muestra el dominio distal en rojo y el proximal en azul (Dueñas, 1998).**

## 1.5 Centro activo

En la Cuadro 1 se muestran los residuos implicados en la reducción de  $H_2O_2$  y en la estabilización de los diferentes estados de oxidación del hierro a lo largo del ciclo catalítico. Dichos residuos se encuentran por encima y por debajo del plano ocupado por el grupo hemo, en los denominados lados distal y proximal respectivamente, haciendo referencia a las dos histidinas axiales, una de las cuales actúa como quinto ligando del hierro.

**Cuadro 1: Residuos de los lados distal y proximal del hemo en diferentes peroxidasas de la superfamilia de las peroxidasas bacterianas, fúngicas y de plantas (Dueñas, 1998).**

Enzima	Lado distal			Lado proximal		
CcP	R48	W51	H52	H175	W191	D235
APX	R38	W41	H42	H163	W179	D208
LiP	R43	F46	H47	H176	F193	D238
MnP	R42	F45	H46	H173	F190	D242
ARP-CIP	R52	F55	H56	H184	L201	D246
PNP	R38	F41	H42	H169	F213	D239
HRP	R38	F41	H42	H170	F221	D247

### 1.5.1 Residuos del lado proximal

El lado proximal del hemo presenta dos residuos invariables en todas las peroxidasas: una histidina axial situada en la hélice F y un aspartato que forma parte de la hélice H (H175 y D235 en la CcP) (Welinder & Gajhede, 1993); la histidina es el ligando proximal del hierro y se encuentra unida a la cadena lateral del aspartato por un puente de hidrógeno (Ilustración 5.b); esta interacción proporciona al residuo de histidina el carácter aniónico imprescindible para la estabilización de los elevados estados de oxidación del hierro (Goodin, *et al*, 1993; Banci *et al*, 1995). En el lado proximal de todas las peroxidasas también se puede observar un residuo aromático que varía en las tres clases de peroxidasas; este residuo es un triptófano en las de la Clase I y una fenilalanina en las de las clases II y III, con la excepción de la ARP y CIP (peroxidasa de *Arthromyces ramosus* y *Coprinus cinereus*) que presenta una leucina en dicha posición. En la CcP (no en otras peroxidasas de la Clase I) el radical del Compuesto I se sitúa en el triptófano (Sivaraja *et al*, 1989), una posición diferente a la del resto de las peroxidasas en las que el radical queda centrado en el grupo hemo; esta diferencia es debida a que el triptófano, a diferencia de la fenilalanina, es susceptible de oxidación por el radical catiónico del grupo hemo.

### 1.5.2 Residuos del lado distal

Los residuos del lado distal conjuntamente con los del lado proximal participan en la estabilización de los estados de oxidación del hierro en los compuestos I y II de la enzima e intervienen directamente en la interacción con el  $H_2O_2$ ; al igual que en el lado proximal, dos residuos se encuentran conservados en todas las peroxidasas: una histidina distal y una arginina distal (H52 y R48 en la CcP) (Welinder & Gajhede, 1993). El  $H_2O_2$  accede al centro activo y se une como sexto ligando hexacoordinando el hierro del hemo; por tanto, esta posición tiene que estar libre en la enzima nativa para que se pueda iniciar el ciclo catalítico; en esta tarea parecen estar implicados los residuos hidrofílicos del lado distal, capaces de estabilizar una extensa red de moléculas de  $H_2O$  mediante una red de puentes de hidrógeno que, junto con el fuerte enlace Fe-NE<sub>2</sub> entre el hierro y la histidina proximal, impiden que alguna

de estas moléculas interaccione con el hierro; la reacción con el  $H_2O_2$  funciona en dos pasos: en el primero el  $H_2O_2$  se une al hierro del hemo y en el segundo el enlace O-O del  $H_2O_2$  (Ilustración 2. c. 2) se rompe dando lugar al Compuesto I y una molécula de  $H_2O$  (Vitello *et al*, 1993); en la formación y estabilización de este compuesto parecen tener un papel importante la histidina distal y la arginina distal (Vitello, op cit); la transferencia de un protón del  $H_2O_2$  a la histidina distal (en forma desprotonada, en estado nativo, debido a una extensa red de puentes de hidrógeno) facilita la unión del anión peróxido al Fe (III) del hemo. La estabilización mediada por la R48 (un residuo cargado positivamente) estaría provocada por interacciones electrostáticas con la carga negativa del oxígeno distal durante la ruptura heterolítica del enlace O-O del  $H_2O_2$ ; una vez roto este enlace, el extremo guanidina de la arginina se desplazaría hacia el interior de la cavidad distal formando un puente de hidrógeno con el oxígeno que queda unido al hierro, estabilizando así los compuestos I y II (Edwards *et al*, 1987).

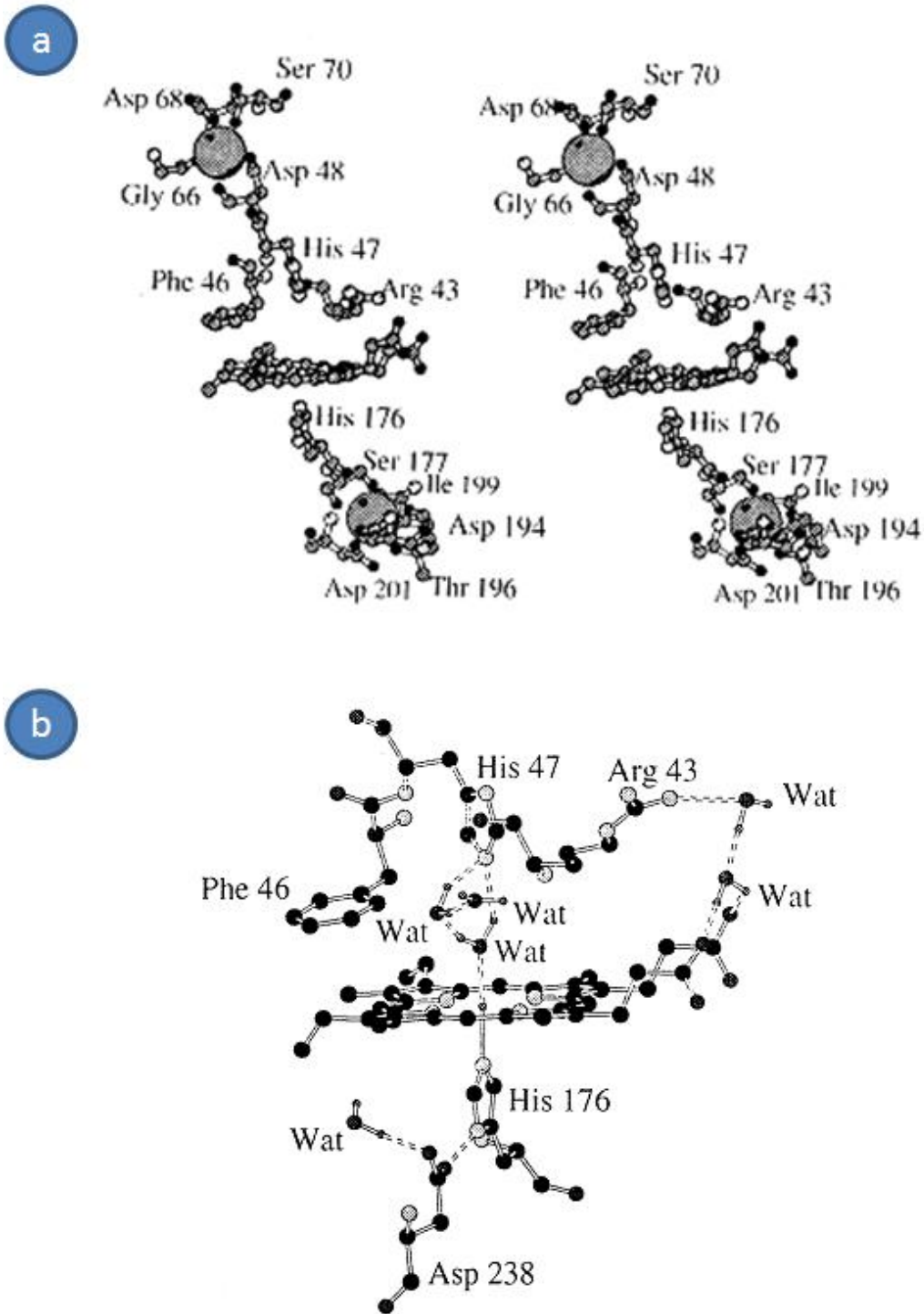


Ilustración 5: a) Imagen estereoscópica de los residuos e iones de calcio del dominio distal (superior) y proximal (inferior) implicados en el funcionamiento de LiP (Banci, 1997; Poulos *et al*, 1993). Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  están representados por esferas grises; b) Puentes de Hidrógeno (líneas punteadas) presentes alrededor del grupo hemo en la Lignina Peroxidasa (LiP) (Poulos *et al*, op cit).

## B) Peroxidasas a nivel celular, localización, usos y aplicaciones

### 1.1 Localización celular

Considerando las técnicas desarrolladas para la tinción y detección de peroxidasas (reacciones con 3,3'-diamino-benzidina o más comúnmente "DAB", p-fenilenodiamina, benzidina, tetrametilbenzidina, o-dianisidina, etc.) y la localización de actividad por medio de microscopio óptico y de electrones, se puede afirmar que estas enzimas se encuentran en distintos tejidos de la planta; es importante tener reservas en cuanto a los aspectos técnicos que se usaron en los diversos estudios para dilucidar la localización de peroxidasas, ya que muchos de ellos se basan en fraccionamientos mecánicos y enzimáticos del material vegetal y por lo tanto es posible la contaminación de los extractos proteicos iniciales.

Localización de peroxidasas en células vegetales de plantas superiores de acuerdo con Gaspar (Gaspar *et al*, 1982):

- 1.- Pared celular
- 2.- Plasmalema
- 3.- Citoplasma
- 4.- Aparato de Golgi
- 5.- Vacuolas de secreción
- 6.- Vacuolas pequeñas
- 7.- Vacuola central o tonoplasto
- 8.- Retículo Endoplasmático Rugoso
- 9.- Ribosomas ligados
- 10.- Ribosomas libres
- 11.- Cloroplastos
- 12.- Cromosomas
- 13.- Nucléolos

La presencia de peroxidasas en la pared celular es enteramente aceptada; análisis citoquímicos y filtraciones al vacío con tejido activo muestran que las células liberan peroxidasas hacia el medio extracelular, en donde permanecen activas a diferencia de las peroxidasas del protoplasto (Mader, 1976); muy recientemente se ha demostrado la existencia de peroxidasas extracelulares por medio de cultivos en suspensión (Cesarino *et al*, 2013).

La localización de peroxidasas dentro de la célula ha sido más difícil de determinar; se ha demostrado que se encuentran peroxidasas en cisternas y vesículas del aparato de Golgi, en pequeñas vacuolas centrales y en el retículo endoplasmático; cabe señalar que dentro del retículo se ha encontrado que el citocromo P450 también presenta actividad peroxidativa (Renneberg *et al*, 1978); otros reportes señalan la localización de peroxidasas en el plasmalema, ribosomas y en componentes del núcleo, esto debido quizás a la difusión después de la disrupción celular y al posterior ligado a las cargas negativas que presentan dichos compartimentos celulares (Gaspar *et al*, 1982).

Mitocondrias y cloroplastos también pueden presentar una cantidad considerable de peroxidasas después de la separación de los componentes celulares por centrifugación en gradiente de densidad; sin embargo, estudios citoquímicos posteriores no confirman el resultado por lo que probablemente la contaminación de las mitocondrias y cloroplastos pueda ser adquirida durante el fraccionamiento celular (Plenisca *et al*, 1976).

La localización subcelular de la gran mayoría de las peroxidasas de clase III no se ha determinado experimentalmente. De acuerdo con la base de datos Peroxibase hasta diciembre de 2012, no se ha determinado la localización de 10,134 peroxidasas de un total de 10,771 reportadas.

## 1.2 Procesos fisiológicos mediados por peroxidasas

La evolución de los organismos y su adaptación a condiciones medioambientales más oxigenadas ha dependido de la funcionalidad de las peroxidasas como adaptación evolutiva; las peroxidasas forman parte de muchos mecanismos fisiológicos de las plantas, como ya se ha mencionado son poseedoras de 2 ciclos catalíticos y estas participan a través de todo el ciclo de vida de las plantas, como por ejemplo:

### 1.- Germinación:

Durante la germinación de *Raphanus sativus* (Rábano) se ha observado la liberación de peroxidasas al medio circundante (Scialabba *et al*, 2002); por medio de su ciclo hidroxílico son capaces de formar peróxido y subsecuentemente radicales  $\cdot\text{OH}$ , el cual debido a su alta capacidad reactiva puede jugar un rol de defensa en contra de patógenos durante la germinación; no obstante, se conoce que pueden ser liberados en ausencia de ataques (Scialabba, op cit). Las peroxidasas se encuentran desde los primeros días de germinación, defendiendo de ataques contra patógenos y por su capacidad para romper uniones entre compuestos de la pared en rededor del área de protrusión durante la ruptura del endospermo; momento vulnerable contra patógenos (Passardi *et al*, 2005).

### 2.- Crecimiento celular y aflojamiento de la pared celular:

Estos dos fenómenos están relacionados con la extensibilidad celular, lo cual ocurre por medio de la modulación del entrecruzamiento (cross-link) de los polímeros de la pared; muchos procesos pueden estar relacionados con el fenómeno de extensibilidad como por ejemplo: el ensamble y ruptura de polímeros de xiloglucano por medio de la xiloglucano endotransglucosilasa o por la supresión de fuerzas no covalentes que mantienen la arquitectura molecular (p.e. supresión de puentes de hidrogeno entre las celulosas y xiloglucanos por medio de expansinas); en otras palabras, las peroxidasas regulan por medio del producto de sus dos ciclos directa e indirectamente la arquitectura de la pared (Cosgrove, 2001).

### 3.- Enlaces entrecruzados de compuestos de la pared celular:

Las peroxidasas son capaces de levantar barreras físicas catalizando la formación de enlaces entrecruzados de compuestos que forman la pared celular, esto en respuesta de diversos estímulos como lesiones, interacción en contra de patógenos y agresiones climáticas; la extensibilidad, digestibilidad y la adherencia celular son propiedades inherentes a la pared pero están dictados por el entrecruzamiento de las moléculas que la componen (Fry, 1986); este proceso puede ocurrir como resultado de la evolución de la pared celular durante el crecimiento y senescencia de la planta (Passardi *et al*, 2005).

### 4.- Lignificación y Suberización:

Durante el proceso de formación de estas dos moléculas, las peroxidasas participan en el cross-link de monómeros de fenólicos para la formación de suberina y el acoplamiento

oxidativo de subunidades de lignina por medio de polimerización oxidativa; las peroxidasas forman radicales fenoxi-monolignol a costa de  $H_2O_2$  como oxidante; los cuales forman polímeros de lignina de forma espontánea (Lewis & Yamamoto, 1990).

#### 5.- Estrés biótico y abiótico:

Es conocido que las plantas expuestas a un estrés agudo regulan por completo su actividad de peroxidasa; esta reacción sucede tanto en el estrés de tipo biótico como abiótico, es decir, bajo influencias de tipo químico (p.e. contaminación por metales pesados, desechos industriales y agrícolas), biológicos (p.e. patógenos) y físicos (p.e. lesiones). La participación de las peroxidasas puede en estos casos ser de tipo pasivo por medio del levantamiento de barreras o activo con la producción de especies reactivas de oxígeno en contra de agentes perjudiciales (Schützendübel & Polle, 2002; Seregin, 2001); en caso que los factores de estrés superen este tipo de barreras y penetren en el interior de la planta, las peroxidasas pueden jugar un papel mayor ya sea aislando o eliminando el cuerpo extraño.

#### 6.- Simbiosis:

Durante este tipo de procesos, los mecanismos de defensa descritos anteriormente son controlados para que se lleven a cabo las respectivas interacciones; en el fenómeno de formación de nódulos ciertas leguminosas, después de la inoculación inicial, forman este tipo de agrupación celular para proveer el ambiente necesario para que se lleve a cabo la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, donde una degradación localizada junto con modificaciones de la actividad de peroxidasa de la pared celular preceden a la inoculación inicial (Salzwedel & Dazzo, 1993). El otro caso importante es durante la micorrización: fenómeno que está relacionado íntimamente con la nutrición y tolerancia a estrés en las plantas (Koide & Schreiner, 1992) en donde este proceso -como es conocido- modifica enzimáticamente (tanto actividad como isoformas de enzimas) las raíces y por lo tanto, la actividad peroxidasa (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988). Es importante recalcar que durante los dos tipos de interacción mencionados es posible que se lleven a cabo modificaciones dentro de la pared celular que permite la asociación pacífica con bacterias u hongos, según sea el caso.

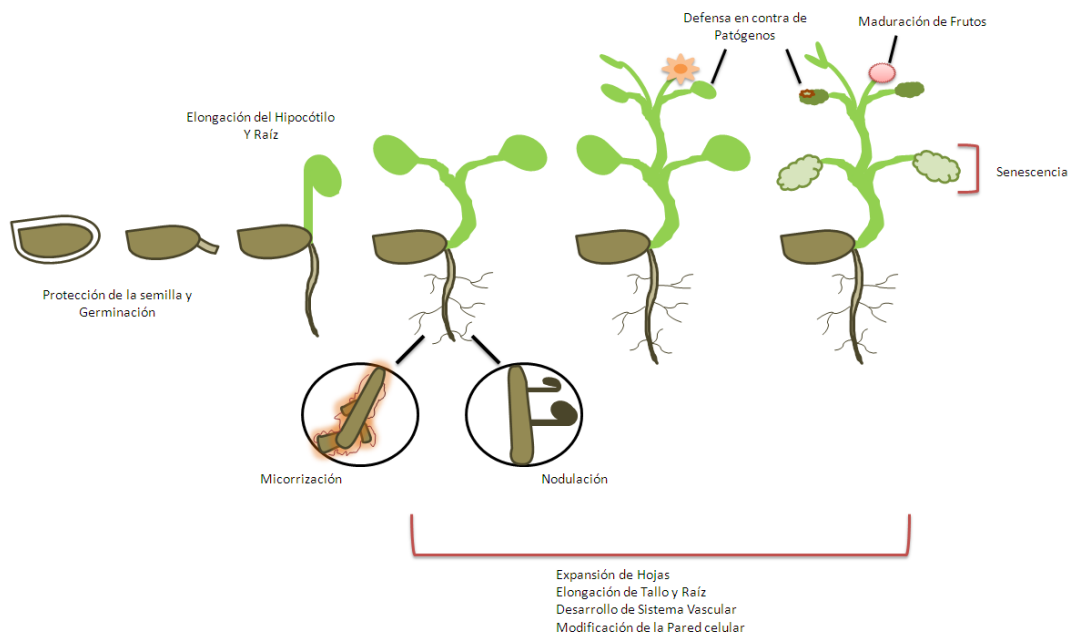
#### 7.- Senescencia:

Durante este proceso; se han reportado cambios celulares que implican la síntesis etileno y cambios en la actividad de peroxidasa (Jiménez *et al*, 1998); una disminución de la expresión de los genes implicados en la fotosíntesis y un incremento con aquellos genes implicados en senescencia también ha sido observada durante el periodo de envejecimiento celular (Abarca *et al*, 2001). El incremento de radicales de oxígeno como  $O_2^{\cdot -}$  se ha observado durante la inducción y desarrollo en la etapa de senescencia; lo que sugiere que, este tipo de radicales pueden inducir el envejecimiento celular (Kawano *et al*, 1998).

#### 8.- Crecimiento y maduración de frutos:

El crecimiento de los frutos es un fenómeno más estrechamente relacionado con la expansión celular que con la división celular, dicho proceso esta mediado por la actividad de las peroxidasas sobre el balance entre el aflojamiento y rigidez de la pared. Las peroxidasas podrían no estar relacionadas directamente con la maduración de frutos; pero pueden controlar el paro de crecimiento mediante cambios mecánicos en las propiedades de la pared y consecuentemente producir una barrera protectora en la epidermis (Passardi *et al*, 2005).





**Ilustración 6: Implicación de las Peroxidasas durante el ciclo de vida de una planta (Passardi *et al*, 2005)**

### 1.3 Aplicaciones prácticas de las peroxidasas

Con el desarrollo de los distintos sistemas para analizar patrones enzimáticos, estas proteínas han sido útiles como herramienta en investigaciones genéticas, en donde son usadas en la identificación de poblaciones o especies híbridas así como en la determinación del efecto de la endogamia y la migración de polen en la estructura genética de poblaciones (Gaspar, 1982).

Se han utilizado electroforesis de muestras de peroxidasas como herramienta en estudios de identificación y filogenia; como en los casos de cultivos de Vid (Royo *et al*, 1997), cacahuate (Cherry & Ory, 1973), distintas variedades de algodón (Farooq & Sayyed, 1999), así como en muchas otras plantas en diferentes clados filogenéticos. La diversidad de isoenzimas ha sido útil en la caracterización de cultivares, documentar parentescos y detectar cruzamientos (outcrossing); sin embargo, no existen pruebas concluyentes que indiquen que los distintos bandeos enzimáticos son producto directo de genes, aunque es evidente que cada genotipo tiene un patrón definido de isoenzimas; en el caso de híbridos interespecíficos, éstos pueden mostrar patrones enzimáticos aditivos de entre sus precursores, lo cual explica la ausencia o la aparición de ciertas bandas que sólo pueden estar presentes en uno de los padres (Trinh, *et al*, 1981).

Las peroxidasas también son usadas como marcadores bioquímicos de expresión sexual, por ejemplo Retig (Retig, 1972), encontró que la actividad de las peroxidasas es más alta en plantas de pepino dioicas que en monoicas; mientras que, en los respectivos patrones enzimáticos obtenidos de electroforesis no se encontraron diferencias; de esta forma es posible que la actividad de peroxidasa está ligada a los niveles hormonales en plantas, y en cuyos casos después de un tratamiento de esta índole, se observan cambios en la expresión sexual y actividad.

Ya que la actividad de peroxidasa está relacionada con la senescencia y maduración de frutos, entonces, estas pueden ser usadas como parámetros en la producción de vinos y bebidas; por ejemplo en estudios como el de Gardner (Gardner *et al*, 1969) se ha mostrado la correlación entre la actividad y la calidad en los productos sin el procesamiento adecuado.

Otro uso importante radica en que pueden ser usadas como indicadoras en varios tipos de estrés fisiológicos; un elevado nivel de actividad es inducido por frío (De Jong *et al*, 1968), sequia (Viera-De-Silva, 1968), calor (Gulen & Eris, 2004), hipoxia (Siegel *et al* 1966) o estrés salino (Sreenivasulu *et al*, 1999; Jebara *et al*, 2005); debido a esto, las peroxidasas son a menudo consideradas como los indicadores más sensibles en varios tipos de estrés, déficit y contaminación; sin embargo, no parece ser del todo una regla ya que la actividad también se encuentra ligada a estímulos fisiológicos internos.

El potencial uso de las peroxidasas en la biorremediación de suelos y aguas residuales contaminadas con fenoles, cresoles y fenoles clorados, nos dan una nueva perspectiva acerca de estas enzimas; las peroxidasas también se han utilizado en aplicaciones analíticas prácticas en kits de diagnóstico, tales como la cuantificación de ácido úrico, glucosa, colesterol y lactosa por mencionar algunos ejemplos (Hamid & Rehman, 2009).

## C) Antecedentes del uso de zeolitas como medio de separación de peroxidasaas catiónicas.

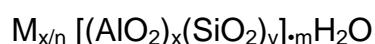
### 1.1 Definiciones y conceptos básicos acerca de zeolitas

El descubrimiento y uso de este tipo de material se remonta a los años 50's donde a partir del descubrimiento del mineral estilbita y su posterior "intumescencia" (perdida de agua por medio de calor), se formó un nuevo material: la zeolita (del griego "zeo" hervir y "lithos" piedra); término acuñado por primera vez por Alex Fredrik Cronstedt, debido a que el material parecía hervir al calentarlo (Masters & Maschmeyer, 2011). A menudo se consideran como uno de los grupos de minerales más abundantes sobre la tierra; hasta hoy en día se han descubierto cerca de 40 especies naturales; la síntesis de zeolitas se conoce desde 1862, no obstante, no fue desde el periodo de 1921 a 1956, con la disponibilidad de la técnica de difracción de rayos X, que los productos sintéticos se pudieron identificar totalmente.

#### 1.1.1 Composición química y Esqueleto estructural

Las zeolitas pertenecen a la familia de los tectosilicatos y son aluminosilicatos cristalinos muy porosos (1-20 Å de diámetro), con elementos de los grupos IA y IIA (Sodio, Potasio, Calcio y Magnesio) como cationes; su estructura consiste en un armazón de tetraedros de  $[\text{SiO}_4]^{4-}$  y  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  conectados el uno al otro en las esquinas por medio de átomos de oxígeno.

Los tetraedros fungen como el "ladrillo de construcción" (Ilustración 7) del que parten los diversos patrones estructurales que puede adoptar este material; cada tetraedro de  $[\text{AlO}_4]^{5-}$  da una carga negativa a la estructura; las cuales se neutralizan por cationes de compensación intercambiables localizados en los canales y poros de la estructura; algunos cationes estructurales también pueden ser intercambiados sin alterar la estructura. El armazón presenta canales o espacios interconectados (también llamados espacios intracristalinos) los cuales pueden estar ocupados por cationes, moléculas de agua u otros adsorbatos y sales; la fórmula química por celda unitaria puede expresarse por la siguiente formula empírica (Bekkum *et al*, 1991; Bish & Ming, 2001, Olguín, s.f.):



Dónde:

M= Cation de valencia n [(Na, K, Li) y/o (Ca, Mg, Ba, Sr)]

m= Número de moléculas de agua.

"x" + "y"= Número de tetraedros de aluminio y silicio por celda unitaria

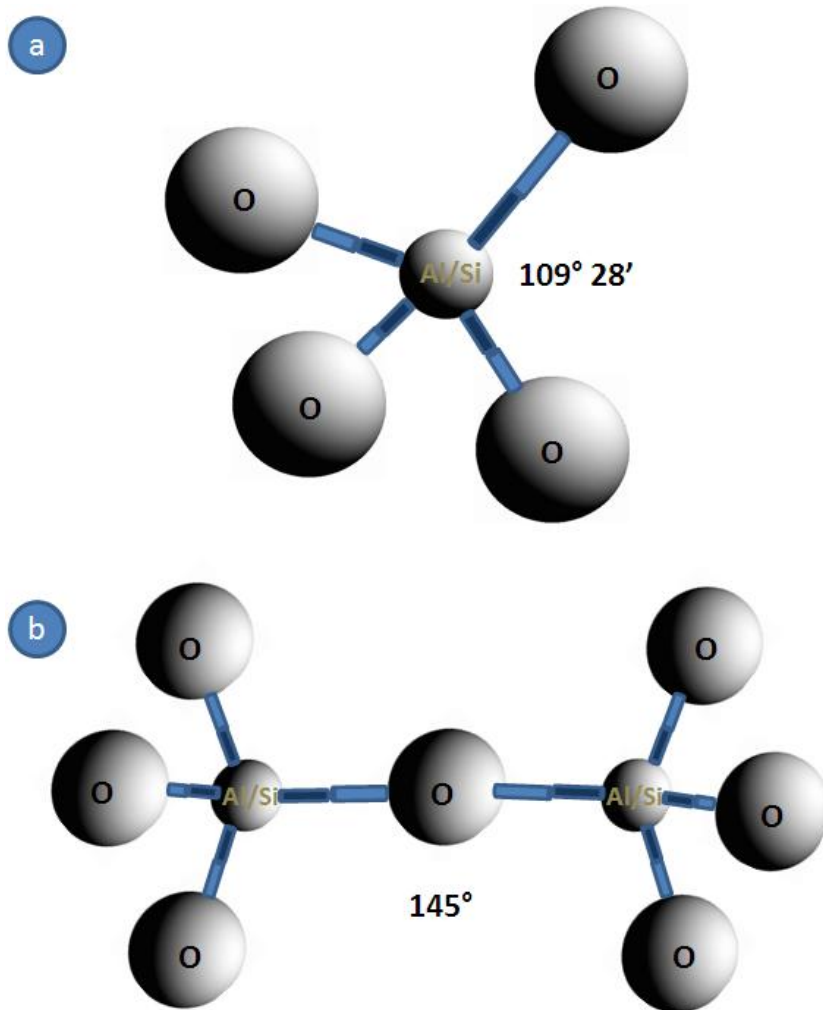


Ilustración 7: a) Unidad básica de construcción de la zeolita, el tetraedro; b) Dos unidades de zeolita unidas en el centro por un átomo de Oxígeno.

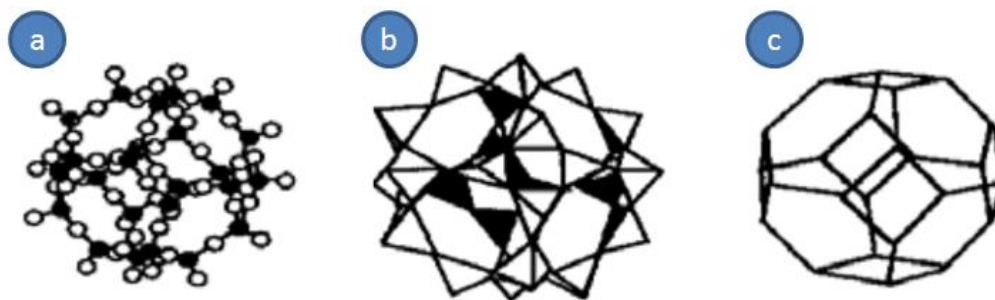
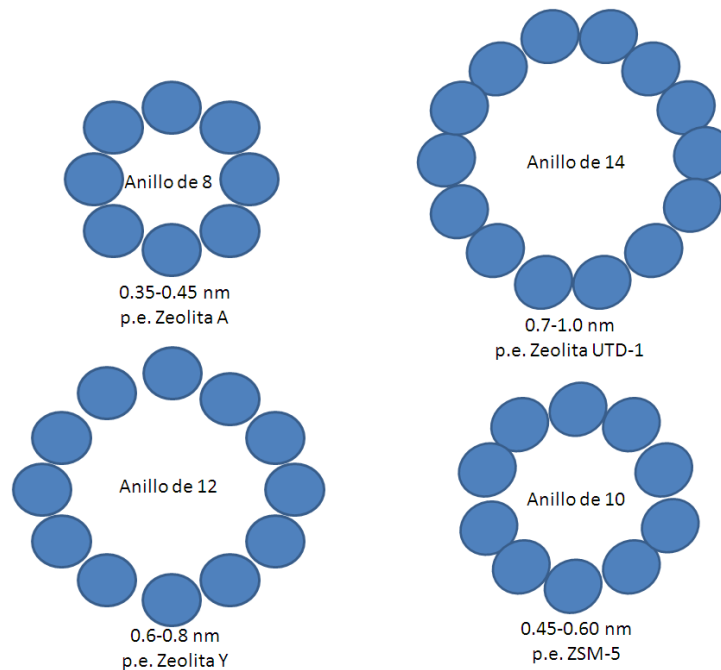


Ilustración 8: Estructura típica de las zeolitas: a) Atómica, b) Tetraédrica y c) Cristalina (Olguín, s.f.).

El arreglo estructural característico del material hace que las zeolitas presenten una superficie interna extremadamente grande, entre 500 y 1000  $\text{m}^2/\text{g}$ , con relación a su superficie externa; sin embargo, esta superficie es poco accesible para elementos macromoleculares (Olguín, op cit).



**Ilustración 9: Tamaños típicos de poro de zeolita (caja de zeolita) con uniones de oxígeno (Bekum, 1991).**

La microporosidad abierta y la estructura permiten la transferencia de materia entre el espacio intracristalino y el medio circundante; el factor determinante en esta transferencia es el diámetro de los poros de la zeolita, ya que sólo pueden ingresar o salir del espacio intracristalino aquellas moléculas cuyas dimensiones sean inferiores a un cierto valor, el cual varía de una zeolita a otra; en la Cuadro 2 se muestran algunas propiedades importantes de las zeolitas (Bish & Ming, 2001; Giannetto *et al*, 2000).

**Cuadro 2: Características generales de las zeolitas.**

Propiedad	Valor
<b>Diámetro de poro (caja sólida, tetraedro con uniones de oxígeno)</b>	2 a 12 Å
<b>Diámetro de cavidades (gran cavidad)</b>	6 a 12 Å
<b>Superficie interna</b>	500-1000 m <sup>2</sup> /g <sup>(6)</sup>
<b>Capacidad de intercambio catiónico</b>	0 a 650 meq/100g
<b>Capacidad de adsorción</b>	<0.35 cm <sup>3</sup> /g
<b>Estabilidad térmica</b>	Desde 200°C hasta más de 1000°C

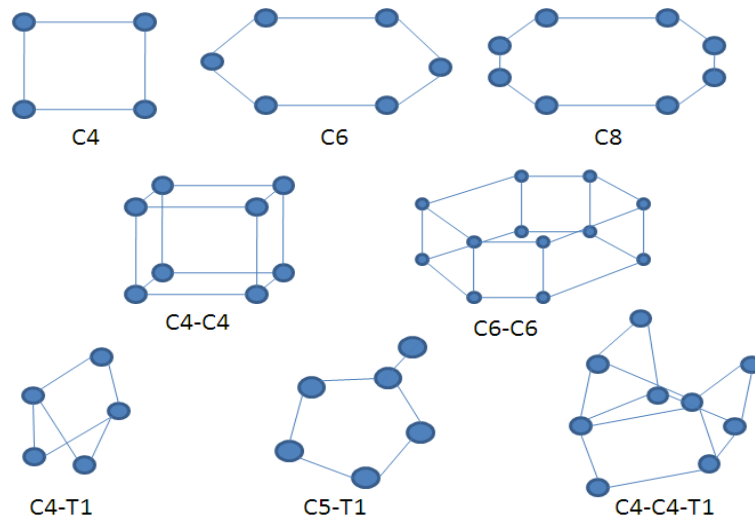
### 1.1.2 Clasificación

Para su clasificación se toma en cuenta el número de átomos de oxígeno que forman los anillos o poros por los cuales se penetra al espacio intracristalino.

**Cuadro 3: Clasificación de las zeolitas respecto al tamaño de los poros.**

Zeolita	Átomos de O que forman la abertura	Diámetro de poro $\theta$ (Å)	Ejemplos
<b>Poros extra grande</b>	18	$\theta > 9$	MCM-9, VPI-5
<b>Poros grande</b>	12	$6 < \theta < 9$	Y, $\beta$ , $\Omega$
<b>Poros mediano</b>	10	$5 < \theta < 6$	ZSM-5, ZSM-11
<b>Poros pequeño</b>	8	$3 < \theta < 5$	Erionita, A

La combinación sencilla de las "unidades secundarias de construcción" originadas por la unión de tetraedros, conducirá a las diferentes estructuras cristalinas de las zeolitas: cubos, prismas hexagonales o cubos-octaedros. Meier (Meier, 1987) apoyándose en estudios cristalográficos, propuso una clasificación estructural de las zeolitas (Cuadro 4) basada en la existencia de 8 unidades secundarias de construcción; la estructura final del armazón consiste en el ensamble de estas unidades (Ilustración 10).



**Ilustración 10: Unidades secundarias de construcción**

Cuadro 4: Clasificación estructural de las zeolitas (Meier, 1987)

GRUPO C4 (GRUPO DE LA FILIPSITA)			GRUPO C8-T1 (GRUPO DE LA MORDENITA)			GRUPO C6-C6 (GRUPO DE LA FAUJASITA)		
ZEOLITA	TO <sub>4</sub>	Si/Al	ZEOLITA	TO <sub>4</sub>	Si/Al	ZEOLITA	TO <sub>4</sub>	Si/Al
Li-ABW	8		Bikitaita	9		Linde	24	
Filipsita	16		Deschiardita	24		Rho	46	
Harmotoma	16		Epistilbita	24		ZK5	96	1-3
Gismondita			Ferrierita	36	4-7	Faujasita	192	
Na-P	16		Mordenita	48		Paulingita	672	
Amicita	16	1-3	ZSM-5	96	<20	Linde N	768	
Garronita	16	96	ZSM-11	11				
Yugawaralita	16							
Merlionita	32							
GRUPO C4-C4 (GRUPO DE LA ANALCITA)			GRUPO C6 (GRUPO DE LA CHABAZITA)			GRUPO C4-C4-T1 (GRUPO DE LA HEULANDITA)		
Analcita	48		Sodalita	12		Brewsterita	16	
Leucita	48	1-3	Cancrinita	12		Heulandita	36	2.5-5.0
Wairakita	48		Ofrerita	18		Stilbita	72	
A	48		Losod	24	2.5-4.0	Stellerita	72	
GRUPO C4-T1 (GRUPO DE LA NATROLITA)			Gmelinita	24		Barretita	72	
Edingtonita			Liotita	36		GRUPO C8 (GRUPO DE LA LAUMONTITA)		
Gonnardita	20		Chabazita	36		Laumontita	24	1-2
Thomsonita	40	1-2	Mazzita	36				
Natrolita	40		Erionita	36				
Scolecita	40		Aghanita	48				
Mesolita	120		Levynita	54				

TO<sub>4</sub>: Número de tetraedros por celda unitaria. Si/Al: relación Si/Al en el grupo estructural.

## 1.2 Usos de la zeolita

Los usos potenciales de la zeolita aumentan día con día; tal lo demuestran los artículos patentes y libros que sobre ellas se publican anualmente; estos materiales zeolíticos, debido a sus propiedades (selectividad, intercambio iónico, difusividad aparente), se usan cada año como suavizante de agua, en detergentes, como catalizadores, adsorbente así como en el mejoramiento de las características de suelos al controlar el pH y humedad; a continuación describo algunas otras de ellas:

1.- Remoción de micotoxinas en alimentos para animales de granja: Huwing y colaboradores (Huwing *et al*, 2001) prueban varias clases de adsorbentes (carbón activado, zeolita, colestiramina y levaduras), encuentra que al menos un tipo de micotoxina (Aflatoxina, Zearalenona, Ocratoxina, Tricoteceno, Fumonisin y Acido Ciclopiazónico) es retenida por una clase de adsorbente.

2.- Actividad antimicrobiana: Experimentos como los de Rivera-Garza y colaboradores muestran la eficacia del tratamiento con zeolitas modificada con Ag y Na en aguas contaminadas con materia fecal (Rivera-Garza *et al*, 2000); por su parte, De la Rosa-Gómez (De la Rosa-Gómez *et al*, 2008) prueba el efecto de zeolitas ricas en Ag sobre aguas contaminadas con bacterias coliformes.

3.- Tratamiento de aguas residuales: Wang & Peng (Wang & Peng, 2010) examinan y discuten la capacidad de adsorción de varios tipos de zeolita natural y modificada en agua residual contaminada con amonio, iones de metales pesados, aniones inorgánicos, colorantes y otros compuestos orgánicos; muestran la eficacia de la zeolita en su remoción; por su parte, Díaz-Nava (Díaz-Nava *et al*, 2009) observa que existe la remoción de fenol por medio de zeolita modificada con surfactantes.

4.- Remoción de metales pesados y elementos radiactivos: Erdem y colaboradores (Erdem *et al*, 2004) muestran la eficacia de clinoptilolita en la remoción de agua residual contaminada con  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ; sus resultados muestran el alto potencial para remover cationes de metales pesados de agua residual industrial. Con resultados parecidos Ouki & Kavannagh (Ouki & Kavannagh, 1997) prueban el efecto de clinoptilolita y chabazita en la remoción de Pb, Cd, Cu, Zn, Cr, Ni y C.

La mayor parte de tratamientos están basados en la alteración de las propiedades de los diferentes tipos de zeolita, debido a la posible modificación de éstas, es posible adaptarlas a varios tipos de tratamientos; aplicando detergentes u otros iones que modifican sus propiedades y estructura.

## 1.3 Propiedades de las zeolitas que influyen en la separación de moléculas

Las siguientes cualidades de las zeolitas han sido importantes en la separación de moléculas de otras sustancias contaminantes, estas propiedades han sido desarrolladas para lograr un proceso económico y eficiente de separación, a continuación describo brevemente estas propiedades:

### 1.3.1 Intercambio iónico y capacidad de intercambio catiónico

El **intercambio iónico** es una de las propiedades más importantes de las zeolitas; debido a que, por un lado se pueden llevar a cabo modificaciones de las zeolitas para cambiar sus propiedades superficiales (afinidad por compuestos orgánicos); y por otro lado, es útil en más de un proceso industrial, en la agricultura, en la acuicultura y en usos ambientales. El intercambio iónico que sucede con la zeolita se puede entender como el intercambio de iones entre una fase líquida y una sólida, la cual se encuentra cargada, esta carga a su vez es balanceada por medio de iones con carga contraria llamados contraiones. Cuando el intercambiador iónico, conteniendo iones A, es inmerso en una fase líquida, conteniendo iones

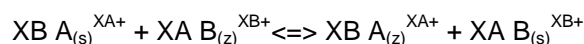


B, se establece un proceso de difusión en donde los iones A difunden hacia el exterior y los iones B al interior de la estructura sólida, hasta eventualmente llegar a un equilibrio. Esta clase de difusión es el resultado de una considerable diferencia de concentraciones entre las fases (Vassilis, 2005).

Específicamente la capacidad de intercambio radica en aquellos factores que determinan la selectividad de la zeolita, como por ejemplo:

- a) Naturaleza de los iones: tamaño, carga iónica, forma.
- b) Temperatura.
- c) Concentración del electrolito y los cationes en solución.
- d) Aniones asociados con los cationes en solución.
- e) Estructura de la zeolita-topología de la red, densidad de carga de la red.

Para un intercambio iónico binario en el que se involucran los iones  $AX^{A+}$  y  $BX^{B+}$ , la reacción química se puede expresar de la siguiente forma:



Dónde:

XA y XB= cargas de los cationes de intercambio A y B

z y s= cationes en el material sólido (zeolita) y en solución, respectivamente

Los aniones también están presentes en la solución acuosa y mantienen la electroneutralidad en dicha fase.

El equilibrio de intercambio binario puede ser descrito mediante isotermas de intercambio, las cuales se construyen graficando la concentración en el equilibrio del ion que se intercambia y que se encuentra en solución como una función de la concentración en el equilibrio de este mismo ion en la zeolita, para una temperatura constante y a una determinada concentración del ion en solución (Olguín s/f).

Por otra parte, la **capacidad de intercambio catiónico** se define como la medida del número de contraiones (iones de balanceo) presentes por unidad de peso o volumen de zeolita, este número representa los cationes disponible para intercambiar (Semmens, 1984); en otras palabras, se trata de una función del grado de sustitución de Al por Si en el armazón de la estructura de la zeolita, entre mayor sea dicha sustitución mayor será la cantidad de cationes necesaria para mantener la electroneutralidad y por lo tanto se tendrá una alta Capacidad de intercambio; sin embargo, se debe tener presente que este tipo de medida es solo representativa de experimentos bajo ciertas condiciones y que a menudo es confundida con los diversos conceptos de capacidad de intercambio tales como: Capacidad de intercambio ideal, Capacidad de intercambio teórica, Capacidad efectiva, Capacidad de intercambio real, Nivel máximo de intercambio, Capacidad operativa y Capacidad de penetración (Vassilis, 2005).

Aquellos factores que en general pueden alterar, reducir o aminorar esta facultad radican en que:

- a) El tamaño de poro puede ser más pequeño que el radio iónico de algunos elementos, lo cual los lleva a ser completa o parcialmente excluidos o cuando el radio iónico de los cationes intercambiables es más grande que el volumen de poro y/o de

los canales intracristalino; y en consecuencia, del proceso de tamizado iónico (Semmens, 1984).

b) Los cationes pueden quedar atrapados en posiciones estructurales del armazón (unidades solidas); de esta manera no puede existir intercambio (Mumpton, 1984).

### 1.3.2 Adsorción

Un proceso de adsorción corresponde a la acumulación preferencial de una substancia en una fase líquida o gaseosa sobre la superficie de un sólido; para entender esta propiedad en las zeolitas hay que recordar que los espacios intracristalinos, en general, pueden estar ocupados por moléculas de agua; las cuales pueden formar una capa de hidratación sobre los cationes intercambiables (Mumpton, op cit); varias de estas moléculas de agua pueden ser removidas de las cavidades y canales después de que la zeolita pasa por un proceso de calentamiento durante varias horas a diferentes temperaturas entre los 200 °C y 350 °C (deshidratación o activación de la zeolita); esto permite penetrar dentro de las cavidades a otras moléculas; de esta manera, la propiedad de adsorción de las zeolitas está fuertemente ligada al tipo, número y localización de los cationes accesibles, los cuales son los sitios donde se da la adsorción (Arbuznikov *et al*, 1998). Esta propiedad ha sido ampliamente usada en la separación de moléculas en base a sus tamaños y polaridades.

Varios factores pueden afectar esta propiedad, como por ejemplo (Flanigen, 1984):

- a) La proporción de Si/Al de la zeolita.
- b) Volumen y tamaño de poro.
- c) Tipos de sitios de adsorción.
- d) Tamaño y forma de las cajas y canales de la estructura.

Las zeolitas pueden ser modificadas por surfactantes iónicos para aumentar la retención de contaminantes y retardar la migración de los mismos; el tratamiento de zeolitas naturales con surfactantes altera dramáticamente la química de su superficie, los iones orgánicos se intercambian irreversiblemente con los cationes nativos tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^+$ ; la modificación de las zeolitas con surfactantes les da la capacidad de poder sorber moléculas orgánicas, mientras que la superficie interna continúa actuando como intercambiador (Olguín, s/f).

Actualmente se emplea una amplia variedad de surfactantes, teniendo como prioridad los bajos costos y disponibilidad de estos; la concentración del surfactante resulta ser importante debido a la relación de esta con respecto a la concentración micelar crítica (típicamente  $<1\text{mM}$ ); lo cual puede o no llevar a la formación sobre la superficie externa de monómeros o micelas que llevan a la formación de bicapas completas o incompletas entre la primera capa retenida por intercambio iónico y una segunda capa unida por enlace hidrofóbico y estabilizada por iones; mientras que la estructura interna de la zeolita puede seguir actuando como intercambiador iónico (Olguín, op cit); en las ilustraciones 11 y 12 se muestra la representación de este arreglo.

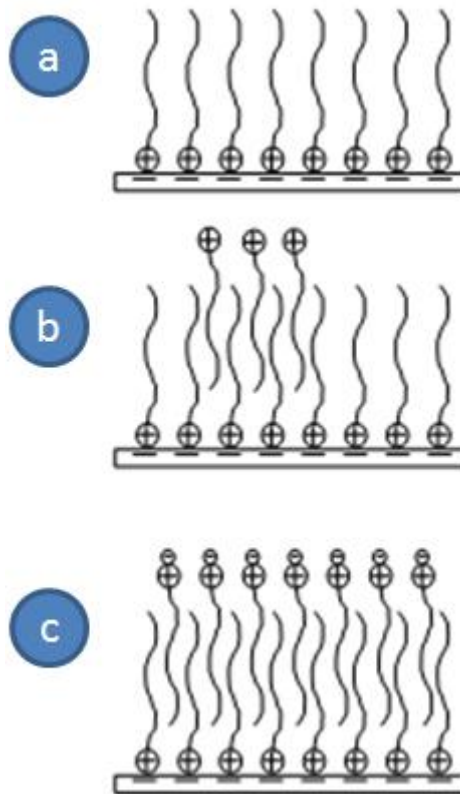


Ilustración 11: Sorción de Moléculas de Surfactante sobre la superficie de la zeolita como: a) Monocapa, b) Bicapa incompleta y c) Bicapa (Olguín, s.f.).

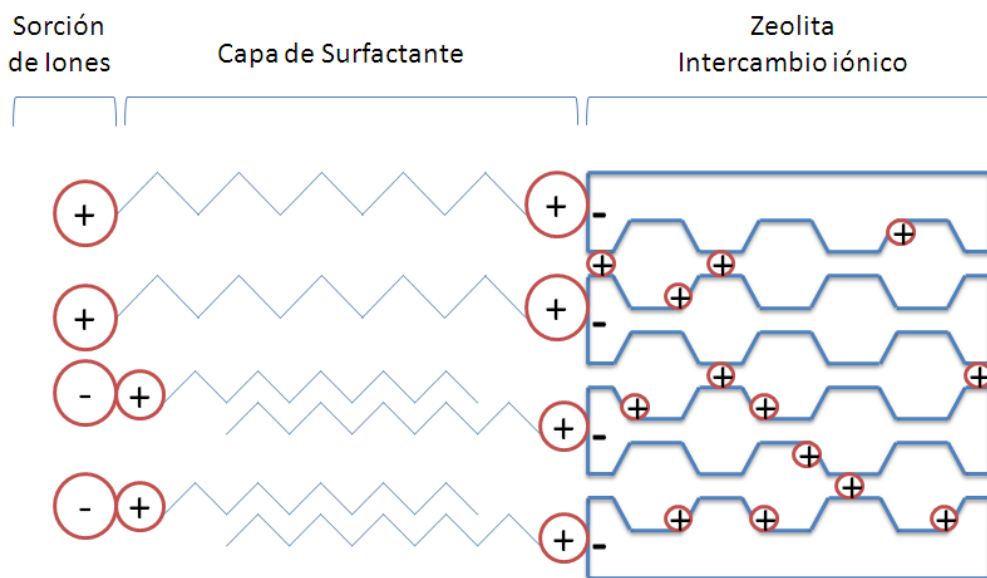


Ilustración 12: Retención de moléculas aniónicas, catiónicas o no polares por zeolitas acondicionada con surfactantes (Olguín, op cit).

## 4 PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1 Planteamiento del problema

Debido a la alta variedad de isoenzimas y a sus diversos sustratos potenciales *in vitro*, se ha dificultado identificar el rol fisiológico de las peroxididasas de clase III; por esto, habrá más oportunidad de aproximarse al conocimiento del rol que tienen estas enzimas, si se tiene la posibilidad de aislarlas para analizar las propiedades de cada entidad molecular y los cambios que se presentan en ellas durante el curso de los procesos en los que se les ha involucrado hipotéticamente. Las Proteínas de la Pared Celular (CWP's); dentro de las cuales se encuentran las Peroxididasas de clase III, representan aproximadamente el 10% del peso total de la pared (Cassab & Varner, 1988); por lo que su estudio se ha convertido en una estrategia necesaria en la caracterización de las moléculas asociadas a la pared implicadas en el crecimiento y división celular, y que además constituyen uno de los recursos dentro de la propagación y conservación vegetal; esto sin olvidar la importancia económica que el jitomate representa y por ende, lo relevante que resulta aproximarse al entendimiento de los mecanismos que ocurren en su propagación, con los beneficios potenciales que esto supone en la agricultura. El aislamiento y caracterización de isoenzimas pretende ser la base para el posterior análisis de estas moléculas, así como de estudios que proporcionen información acerca de estos componentes de la pared celular y de sus relaciones intermoleculares. Este trabajo buscó realizar una contribución en este sentido planteando las siguientes interrogantes:

- 1.- ¿Cuál será el mejor método para llevar a cabo el fraccionamiento tisular?
- 2.- De las fracciones obtenidas, ¿en cuáles se observaran enzimas con actividad de Peroxidasa, AIA oxidasa y AIB oxidasa?
- 3.- Antes y durante el proceso de enraizamiento, ¿se presentarán cambios en la actividad?
- 4.- ¿Cuántas de las proteínas con actividad tendrán formas catiónicas bajo estas condiciones?
- 5.- ¿De qué manera se podrá conocer la localización de dichas enzimas?, es decir, ¿Se encontraran en el medio extracelular o en el citosol?
- 6.- En el caso de estar en el medio extracelular, ¿estarán asociadas a la pared o disueltas?
- 7.- De las fracciones en donde se encontró al menos una enzima catiónica con actividad ¿Cómo aislar dicha enzima, tomando como criterio principal su carga neta a pH neutro?

### 4.2 Hipótesis

- 1.- De acuerdo con el criterio desarrollado por Li (Li *et al*, 1989):
  - a) Las enzimas lavadas de tejidos con soluciones que no dañan el plasmalema, están solubles o unidas débilmente a la pared.
  - b) Las enzimas solubles en el citoplasma se pueden obtener por medio de la disrupción celular y posterior sedimentación de organelos y paredes celulares rotas.
  - c) Enzimas ligadas iónicamente a la pared pueden ser extraídas lavando las pastillas sedimentadas con soluciones salinas de alta fuerza iónica.
  - d) Las enzimas obtenidas del lavado con detergentes en baja concentración pueden estar asociadas a las paredes con base en su disposición tridimensional y del efecto hidrofóbico.
  - e) La actividad enzimática que permanece en la pastilla después del lavado con soluciones salinas y detergentes; se encuentra atrapada o unida covalentemente a la pared

Se espera que un método de fraccionamiento progresivo sea el método de fraccionamiento tisular más eficiente, en tanto que sea capaz de proporcionar la información para entender las interacciones entre las enzimas y el medio circundante.

2.- Dependiendo de la forma en la que se recuperen las distintas fracciones durante el transcurso del fraccionamiento tisular, será posible discurrir sobre su localización celular y forma de asociación; debido a la existencia de enzimas extracelulares inferida por medio de péptidos de secreción, cultivos en suspensión y filtrados al vacío; se espera que con el proceso de infiltrado-centrifugado se recuperen las enzimas responsables de la actividad en la parte soluble del apoplasto y consecuentemente no encontrar indicios de contaminación citosólica o daño celular por medio de la actividad enzimática de la Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PD).

3.- Debido a que durante el transcurso del enraizamiento adventicio la concentración de auxina libre debe regresar a sus niveles normales, se espera encontrar una mayor actividad enzimática a los 8 días de iniciado este proceso, en el supuesto de que las peroxidasas de clase III son responsables del catabolismo de auxinas.

4.- Debido a que la variación en los puntos isoeléctricos de estas enzimas da como resultado formas aniónicas y catiónicas, y a la relación de ambos grupos a roles específicos, asociándose las formas catiónicas a la degradación auxínica (Boyer, 1983; Chibbar *et al*, 1984; Passardi *et al*, 2005), se espera encontrar al menos una enzima catiónica con actividad enzimática de Peroxidasa y Auxina-oxidasa bajo las condiciones provistas experimentalmente; en un intento de dilucidar su posible rol funcional.

5 y 6.- Debido a que se interpreta que las Peroxidasas se encuentran en el medio extracelular, se espera que la actividad de fracciones apoplásticas sea mayor y podrán estar asociadas a la pared de tres formas de acuerdo al criterio planteado por Cesarino (Cesarino *et al*, 2013), que agrupa a los componentes de la pared con respecto a su asociación en:

- a) Libres: Proteínas con poca o ninguna interacción con los componentes de la pared.
- b) Unidas Débilmente: Proteínas asociadas por medio de interacciones hidrofóbicas e iónicas a la matriz.
- c) Unidas Fuertemente: Proteínas unidas por el entrecruzamiento (cross-link) con componentes de la pared por enlaces covalentes.

7.- Las columnas de intercambio iónico representan una alternativa específica en la separación por carga; basándose en su uso como tamiz molecular y más particularmente en las propiedades de intercambio iónico, capacidad de intercambio catiónico y adsorción que presentan las zeolitas (Klint *et al*, 1994; Chiku *et al*, 2003 Farhani, 2009), así como con el criterio propuesto por Cesarino (Cesarino *et al*, 2013); se espera que columnas a base de zeolita/caolín con grupos hidrofóbicos separen isoenzimas catiónicas y aniónicas en base a asociaciones hidrofóbicas e iónicas.

## 4.3 Objetivos

### General

1.- Determinar la presencia de bandas catiónicas a pH 6.8 que presenten actividad Peroxidasa y Auxina-oxidasa, en la fracción del apoplasto obtenida de brotes axilares de *Solanum lycopersicon* (jitomate) durante el transcurso del enraizamiento adventicio a los días cero y ocho, así como proveer un método para separar dichas enzimas.

### **Específicos**

1.- Proveer el método más eficiente de fraccionamiento tisular para que por medio de éste, se obtenga la información necesaria sobre el lugar y la forma en que están asociadas las enzimas.

2.- Observar y cuantificar la actividad de Peroxidasa y Auxina-oxidasa realizando ensayos en geles de poliacrilamida y en solución para actividad de Peroxidasa y únicamente en geles para Auxina-oxidasa, con la finalidad de conocer el número y la actividad de las bandas obtenidas de cada fracción.

3.- Observar el posible cambio de actividad en brotes axilares durante dos etapas de enraizamiento adventicio, con la finalidad de conocer el efecto que produce el proceso de formación de raíces inducido por auxinas y su degradación sobre la actividad enzimática.

4.- Modificar un método electroforético existente que lleve a proveer un método que por sus características permita observar la movilidad de enzimas hacia el cátodo y que además se ajuste a las necesidades experimentales así como al material disponible; con la finalidad de conocer cuántas enzimas catiónicas con actividad se encuentran en las distintas fracciones obtenidas.

5 y 6.- Evaluar dos métodos de extracción (Fraccionamiento progresivo y Digestión enzimática), para discernir cual es más eficiente en tanto que provea información que permita dilucidar las interacciones entre las enzimas y el medio circundante.

7.- Proveer un método eficiente de separación de moléculas catiónicas y aniónicas de extractos proteicos complejos, aprovechando las propiedades de columnas de intercambio iónico hechas a base de zeolita en la separación y aislamiento de moléculas; con la finalidad de separar moléculas y permitir su posterior análisis.

### **4.4 Estrategia experimental**

Para llevar a cabo los objetivos planteados se empleó la siguiente estrategia:

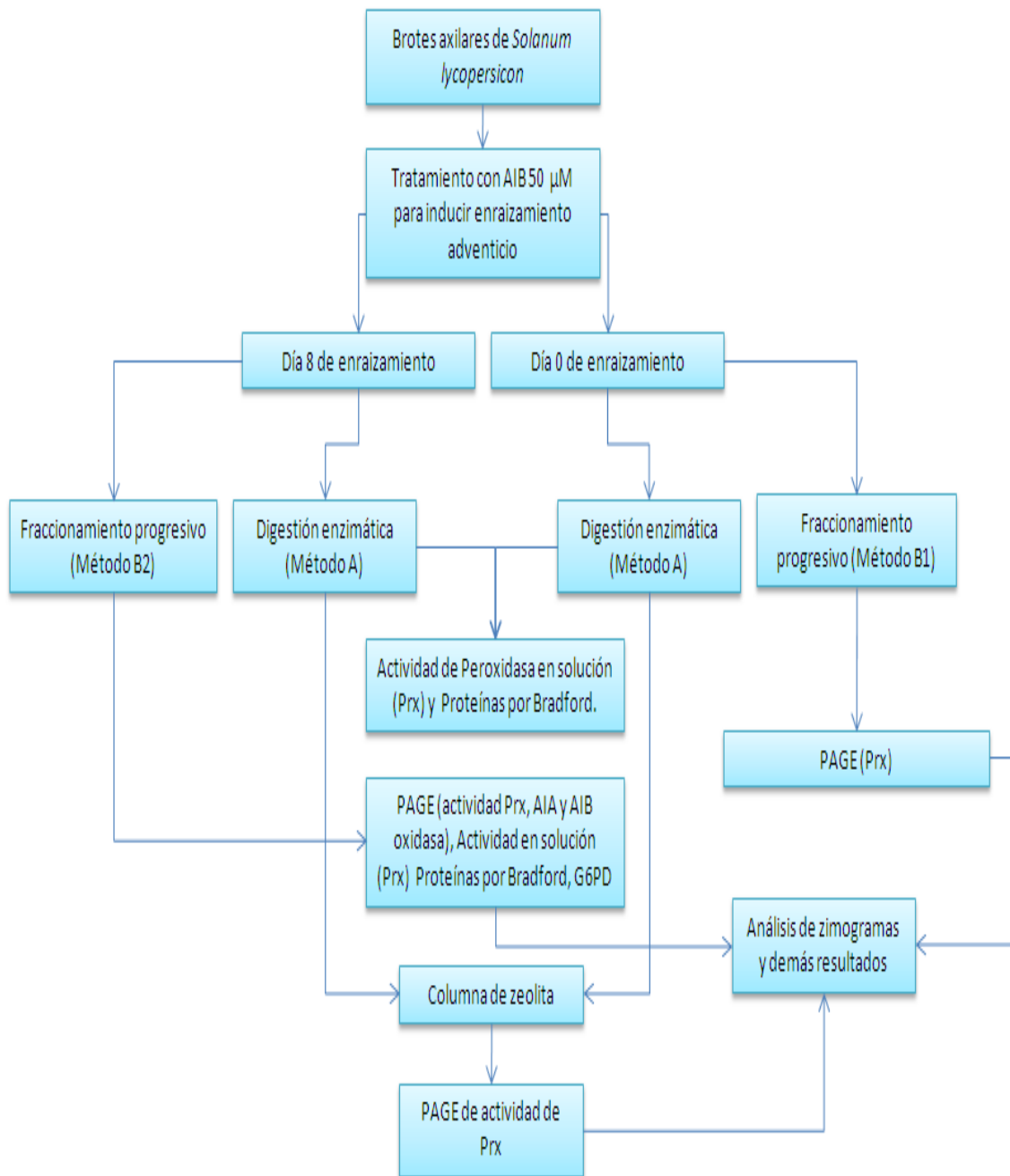


Ilustración 13: Estrategia general de trabajo.

## 5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 5.1 Características y condiciones en el crecimiento y mantenimiento de plantas de *Solanum lycopersicon*

Brotos axilares cortados de *Solanum Lycopersicon* variedad saladet "Reconquista", Western Seeds, fueron muestreados de plantas de aproximadamente 1 año de edad, las plantas se encontraban con la siguientes condiciones dentro de invernadero: temperatura promedio de 17.87 °C que varió de los 17 a 30 °C y luminancia promedio de 91 lum/ft<sup>2</sup> (Moreno, 2009); las plantas fueron colocadas en tezontle como sustrato y regadas cada tercer día con agua corriente y un régimen de solución nutritiva de Hoagland (solución estándar 2:1) una vez por semana; como criterio principal al momento de la toma de muestras se consideró la talla de los brotes (más de 5 cm y menos de 15 cm de largo) y el grado de tejido secundario (en la menor cantidad posible).

#### 5.1.1. Tratamiento previo de brotes y al día cero del enraizamiento adventicio

A dos lotes de 17 g cada uno, se les podaron las hojas y se lavaron con agua destilada, en el caso del lote de brotes al día cero; después del lavado, se procedieron a cortar en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de longitud, posteriormente las rodajas fueron lavadas nuevamente para descartar la posible contaminación celular producida por el corte.

### 5.2 Tratamiento de brotes con AIB (brotes al 8° día de enraizamiento adventicio)

El lote de brotes lavados y sin cortar para tratar ocho días con enraizamiento adventicio; se colocaron en una cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones:

- a) Temperatura: 25 °C
- b) Fotoperiodo: 12 hrs luz/12 hrs obsc. 8:00 On/20:00 Off.

En la cámara de crecimiento, los brotes permanecieron sumergidos en 500 ml de solución de AIB 50 µM durante 24 horas; posteriormente se mantuvieron sumergidos en agua bidestilada durante 7 días (168 horas); el agua se reemplazó cada tercer día.

### 5.3 Digestión celular enzimática y producción de extracto (METODO A)

Los brotes rebanados al día cero del enraizamiento (punto 5.1.1) fueron congelados con nitrógeno líquido y macerados en un mortero; una vez triturados los brotes, se homogenizaron con 30 ml de solución amortiguadora de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5; 0.3 gr de celulasa E.C. 3.2.1.4 (Sigma) y 2.0 ml de pectinasa de *Aspergillus niger* (Sigma) en agitación durante 12 horas a temperatura ambiente; el extracto resultante se filtró con gasa esterilizada para retener las partículas grandes; el filtrado se centrifugó a 15000 g durante 15 min a 4 °C; la pastilla formada por organelos y paredes rotas se desechó, el sobrenadante se consideró las **Proteínas Celulares Totales** y almacenó en alícuotas de 1.5 ml.



## 5.4 Fraccionamiento celular progresivo (METODO B)

El fraccionamiento se llevó con base en el método de Li (Li *et al*, 1989) el cual consiste en la recuperación del líquido apoplástico por medio del filtrado al vacío del tejido, seguido de la homogenización de este y la posterior recuperación del sobrenadante que contenía la fracción citoplasmática soluble, la pastilla fue lavada con fuerza iónica alta con la finalidad de remover la actividad asociada a la pared por este tipo de fuerza, seguido de lavados con detergente para remover la posible contaminación intracelular, por último se recuperó la actividad asociada de manera covalente por medio de la digestión del tejido final. De este método se ensayaron dos variaciones: la primera (**Método B1**) implicó una modificación la cual consistió en analizar la solución de Fosfato de Sodio en la que permanecieron sumergidas las rodajas de tejido durante 5 minutos previos al proceso de filtrado al vacío (infiltración-centrifugación), las siguientes fracciones se obtuvieron tal como lo indica el método, quedando de la siguiente manera: 1) **componentes solubles antes de la infiltración-centrifugado**, 2) **componentes solubles después de la infiltración-centrifugado**, 3) **componentes intracelulares y extracelulares solubles**, 4) **componentes solubilizados con fuerza iónica** y 5) **componentes solubilizados por digestión de las paredes**.

La segunda variación del método (**Método B2**) se llevó a cabo de la siguiente forma: los brotes axilares se cortaron en rodajas, se lavaron y se secaron; posteriormente, las rodajas se mantuvieron sumergidas por aproximadamente 5 minutos en solución amortiguadora de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5; a continuación se procedió a infiltrar el tejido, esto se llevó a cabo colocando las rodajas dentro de una jeringa de 10 ml junto con solución de Fosfato de Sodio, se sacaron las burbujas de aire atrapadas en la jeringa y se procedió a tirar del embolo manteniendo tapado el orificio del pivote con la yema del dedo en intervalos con relajamiento cada minuto durante 5 minutos (Ilustración 14. a), una vez infiltrado el tejido se procedió inmediatamente a centrifugar a 480 g durante 15 min a 4°C usando jeringas de 5 ml adaptadas para recuperar el líquido infiltrado (Ilustración 14. b); el líquido recuperado se consideró como los **componentes extracelulares solubles** y se almacenó en alícuotas de 1.5 ml; el tejido procedente del paso anterior se congeló con nitrógeno líquido y se maceró junto con 30 ml del mismo buffer.

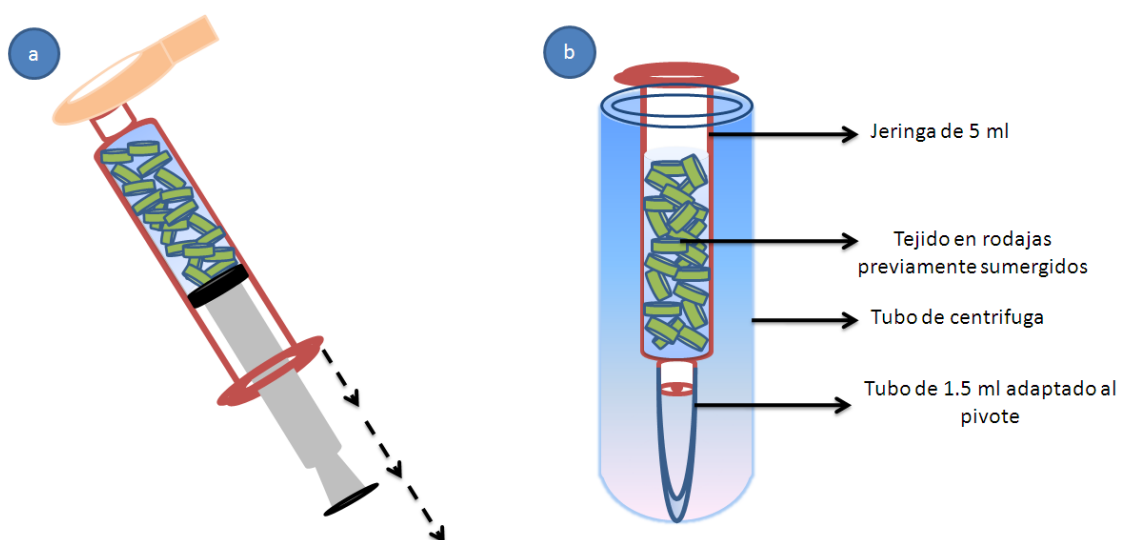


Ilustración 14: a) Proceso de Infiltración; b) Adaptación para centrifugado

El tejido homogenizado se centrifugó a 27000 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se consideró como los **componentes intracelulares y extracelulares solubles**; entre tanto, la

pastilla resultante se resuspendió en 5 ml de buffer de NaCl 1M y se mantuvo en hielo con agitación por 30 minutos; posteriormente se centrifugó a 27000 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se dializó en volúmenes de 3 ml dentro de membranas de celulosa (33 mm x 21 mm) (Sigma) agregando 500 ml de solución amortiguadora de Fosfato de Sodio 5 mM durante 24 horas, la fracción resultante consideró como los **componentes solubilizados con fuerza iónica**.

La pastilla obtenida se lavó y centrifugó dos veces con 5 ml de buffer de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 que contenía 1% de tritón x-100, los sobrenadantes de estos lavados se consideraron como los **componentes solubilizados con detergente**; posteriormente la pastilla se lavó tres veces con buffer sin tritón x-100 con el fin de remover trazas de contaminantes.

La pastilla del lavado anterior se digirió con 10 ml de solución de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 y celulasa 1% (peso/vol) durante 2 horas a 25°C en agitación; a continuación el digerido se centrifugó a 27000 g durante 15 min a 4°C; el sobrenadante se consideró como los **componentes solubilizados por digestión de las paredes**.

## 5.5 Cuantificación proteica

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976), se mezclaron: 5 ml de reactivo de Bradford + 0.9 ml de agua destilada + 0.1 ml de muestra, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm del complejo proteína-azul de Coomassie G-250, por último se procedió a calcular la concentración por interpolación en curva patrón de albumina de suero bovino (BSA) con un gradiente de concentración de 10 a 50 µg. Las pruebas espectrométricas se llevaron a cabo en un equipo Lambda 2S UV/Vis Perkin Elmer; el procedimiento simultáneo para la curva patrón y el problema se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 5: Procedimiento para preparar Curva Patrón y Muestra Problema.**

Sustancia	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de Proteínas (ml)(BSA 100 µg/ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	--
Agua destilada	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	--
Solución Problema (Conteniendo 10-100 µg de Proteína)	--	--	--	--	--	--	0.1

## 5.6 Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

Para esta prueba se diseñó un sistema electroforético horizontal con la muestra en el medio del gel para propiciar la migración de enzimas aniónicas y catiónicas en base al método de Laemmli (Laemmli, 1970); geles horizontales de poliacrilamida al 7.5% (1 cm de espesor), pH 6.8, en condiciones no desnaturalizantes, se ensayaron en amortiguador de corrida al 1.2X\* con una intensidad de 150 Volts, 50 mA y 250 Watts durante 2.5 horas o hasta que el marcador de pH se encontrara al borde del gel; en los Cuadros 6 y 7 se muestran los reactivos y volúmenes usados para preparar los geles y muestra para sembrar.

**Cuadro 6: Reactivos y Volúmenes para geles de Poliacrilamida**

Reactivo o Solución	Volumen (ml)
Solución de monómeros (30.8%T, 2.7%CBis).	7.5
Amortiguador pH 6.8 (0.5M Tris-HCl, pH 6.8).	7.5
Agua bidestilada.	14.7
TEMED N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ).	0.015
Persulfato amónico (APS) (N <sub>2</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ).	0.15
	<b>29.865</b> <b>Total</b>

\* De una solución Stock (Tris 0.025M + Glicina 0.192M) 10X se tomó el volumen necesario para una concentración al 1.2X.

**Cuadro 7: Volúmenes usados en la preparación de la muestra para la corrida electroforética**

Reactivo o Solución	Volumen (µL)
Glicerol ACS reagent, ≥99.5% (Sigma)	50
Solución de Azul de Bromofenol al 0.5%	15
Muestra (Conteniendo 10-100 µg de Proteína)	50
	<b>115</b> <b>Total</b>

\*Del Total de la mezcla se dispuso un volumen de 20 µL por pozo.

Los medios de reacción para revelar actividad enzimática en los geles se detallan a continuación:

Actividad enzimática de AIA y AIB:

En base a Hoyle (Hoyle, 1977) se prepararon dos tipos de medios de reacción en un volumen total de 20.5 ml cada uno; en el primer caso se usó Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 y en el otro Acetato de Sodio 0.2 M, pH 4.2; ambos con: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Fluka Sigma-Aldrich) 1.59 mM, Fast Blue BB base (Sigma) 3.247 mM (0.9756 mg/ml) disuelto en 5 ml de etanol, Acido p-Coumárico 0.9744 mM y según fue el caso; AIA o AIB 0.97mM (estos tres últimos reactivos disueltos en 1 ml de etanol).

Peroxidasa (Prx):

La actividad de peroxidasa fue detectada en un medio de reacción que contenía en un volumen total de 18.5 ml: 18.4 ml de Amortiguador de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5; Bencidina dihidrocloruro (titración) ≥99% (25.7 mg) 2.691 mM disuelta en 1 ml de etanol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Fluka Sigma-Aldrich) 209 mM.

Los geles fueron sumergidos en el respectivo medio de reacción durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente; una vez visible el patrón enzimático, los geles se lavaron con agua destilada y se procedió a digitalizar la respectiva imagen por medio del software Alphamager AIC acoplado a un fotodocumentador MultiImage™ Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation).

## 5.7 Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) en solución

En un volumen total de 3 ml se ensayaron dos medio de reacción: 1) 300  $\mu$ L de o-Dianisidina 13 mM (en el caso de las fracciones obtenidas con el Método A) y 2) 300  $\mu$ L de Guayacol 1.5  $\mu$ M (en el caso del Método B); ambos medios se prepararon con: 68  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Fluka Sigma-Aldrich) 927 mM, 2636  $\mu$ L de Amortiguador de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 y 75  $\mu$ L de muestra. La actividad enzimática fue registrada mediante espectrofotometría continua a temperatura ambiente con una longitud de onda de 470 nm, se determinó la velocidad inicial de la reacción considerando la variación de la densidad óptica durante 5 minutos, la actividad fue expresada en U/ml; la variación en la actividad se monitoreó y graficó con el programa Lambda 2 acoplado a un equipo Lambda 2S UV/Vis Perkin Elmer.

## 5.8 Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-D, EC 1.1.1.49) se ensayó por el método que describe Kong (Kong *et al*, 2010); en un volumen total de 3 ml que contenía: 1900  $\mu$ L de amortiguador Tris-HCl 55 mM, pH 8; 808  $\mu$ L solución de MgCl 3.3 mM, 92  $\mu$ L solución de NADP 0.2 mM y 100  $\mu$ L de muestra de proteína; se realizó además, un ensayo que contenía 100  $\mu$ L de G6PD 3.3 mM con el fin de identificar y comparar la actividad; el ensayo se midió a 340 nm determinando posteriormente, la formación de NADPH por minuto a 25 °C; el ensayo se monitoreó y graficó usando el programa y equipo usado para la actividad de Peroxidasa.

## 5.9 Preparación de columnas de zeolita para la separación de enzimas catiónicas

La elaboración de columnas de zeolita se llevó a cabo con base en los métodos propuestos por Klint (Klint *et al*, 1994), Chiku (Chiku *et al*, 2003) y Tomašević-Ćanović (Tomašević-Ćanović *et al*, 2003) de la siguiente forma: por medio del método de activación en suspensión se integraron: 20 g de zeolita en roca (8-10 Å) posteriormente pulverizada y tamizada con malla de 320 µm, 4.046 g de Caolín (disilicato aluminico dihidratado:  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 200 mg (0.2%) de Cloruro de Estearil Dimetil Bencil Amonio ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{Cl}$ ) y 20 ml de agua bidestilada; la pasta se dejó secar durante 24 horas dentro de una estufa a 40 °C; después, la mezcla deshidratada se pulverizó nuevamente; para el montaje de la columna de intercambio iónico se usaron 1.5 g de la mezcla por cada 3 ml de Proteínas Celulares Totales; en la Ilustración 15 se muestra el dispositivo usado.

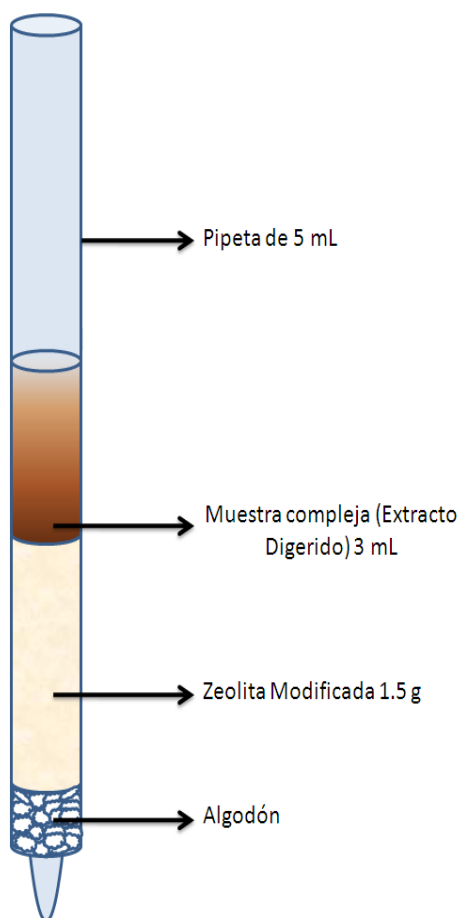


Ilustración 15: Columna de Intercambio iónico.

La muestra filtró por la columna durante 24 horas, obteniéndose una primera fracción recuperada únicamente por gravedad; posteriormente la columna fue lavada dos veces con 3 ml de solución de Tris-HCl 75 mM, pH 8.8; de ambos filtrados se recuperó aproximadamente la mitad del volumen usado el cual se procedió a almacenar en alícuotas de 1.5 ml; para la desorción de las proteínas catiónicas de la columna, esta fue lavada con 1 ml de solución de NaCl 1M; la fracción correspondiente se procedió a dializar de la forma antes descrita durante por lo menos 24 horas.

### **5.10 Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (filtrados de la columna de zeolita)**

La actividad enzimática de peroxidasa se ensayó en geles de poliacrilamida usando las mismas condiciones anteriormente descritas.

### **5.11 Análisis microscópico de la columna de intercambio iónico**

El análisis de la mezcla de Zeolita, Caolín y Cloruro de Estearil usada para la elaboración de la columna se evaluó mediante la técnica de microanálisis de Rx empleando un accesorio EDS de INCA (Oxford Instruments,) acoplado a un microscopio de barrido JEOL JMS 6380 LV; se procedió a comparar con zeolita sin modificación.

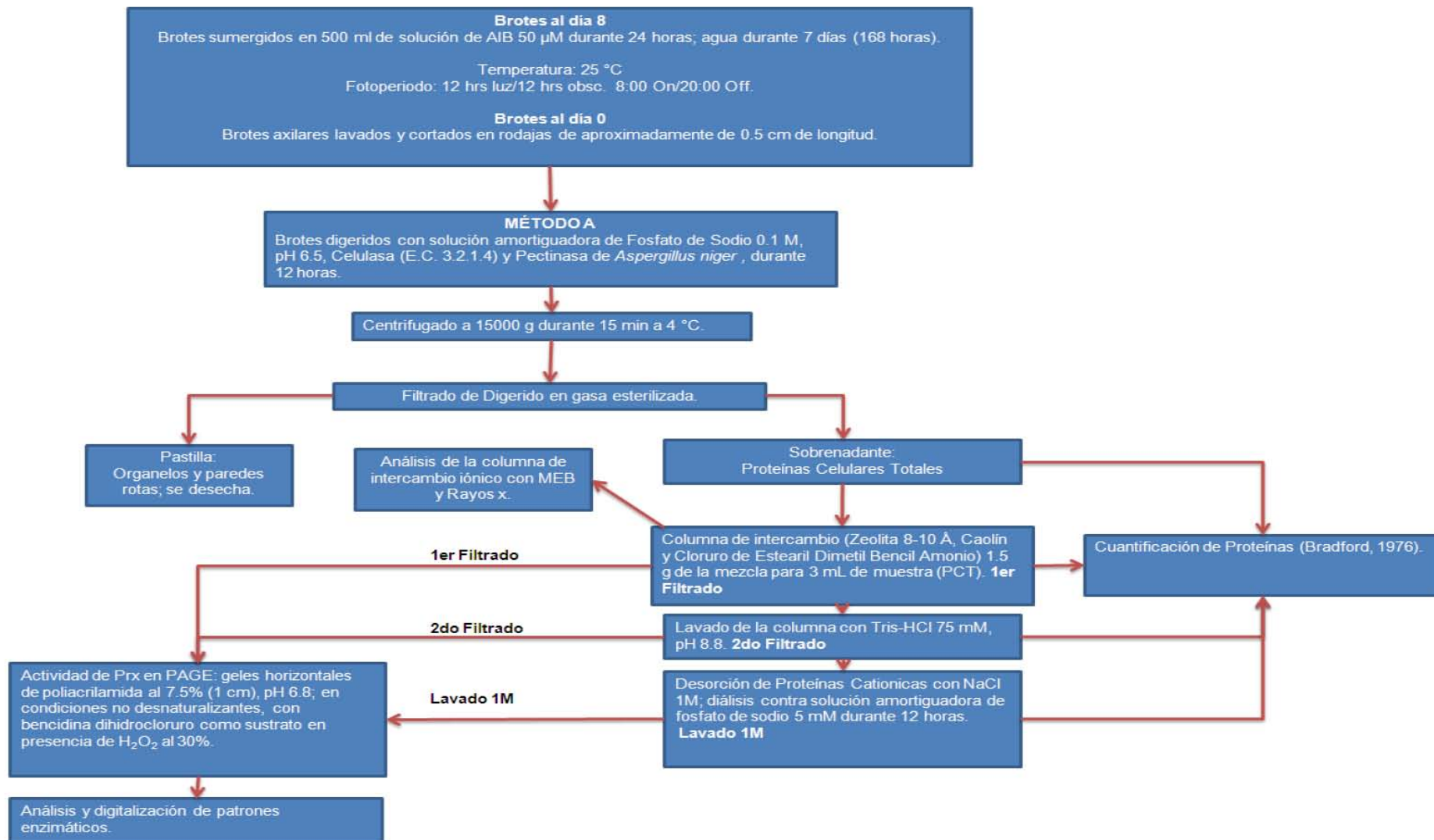


Ilustración 16: Método A y Separación de proteínas con zeolita

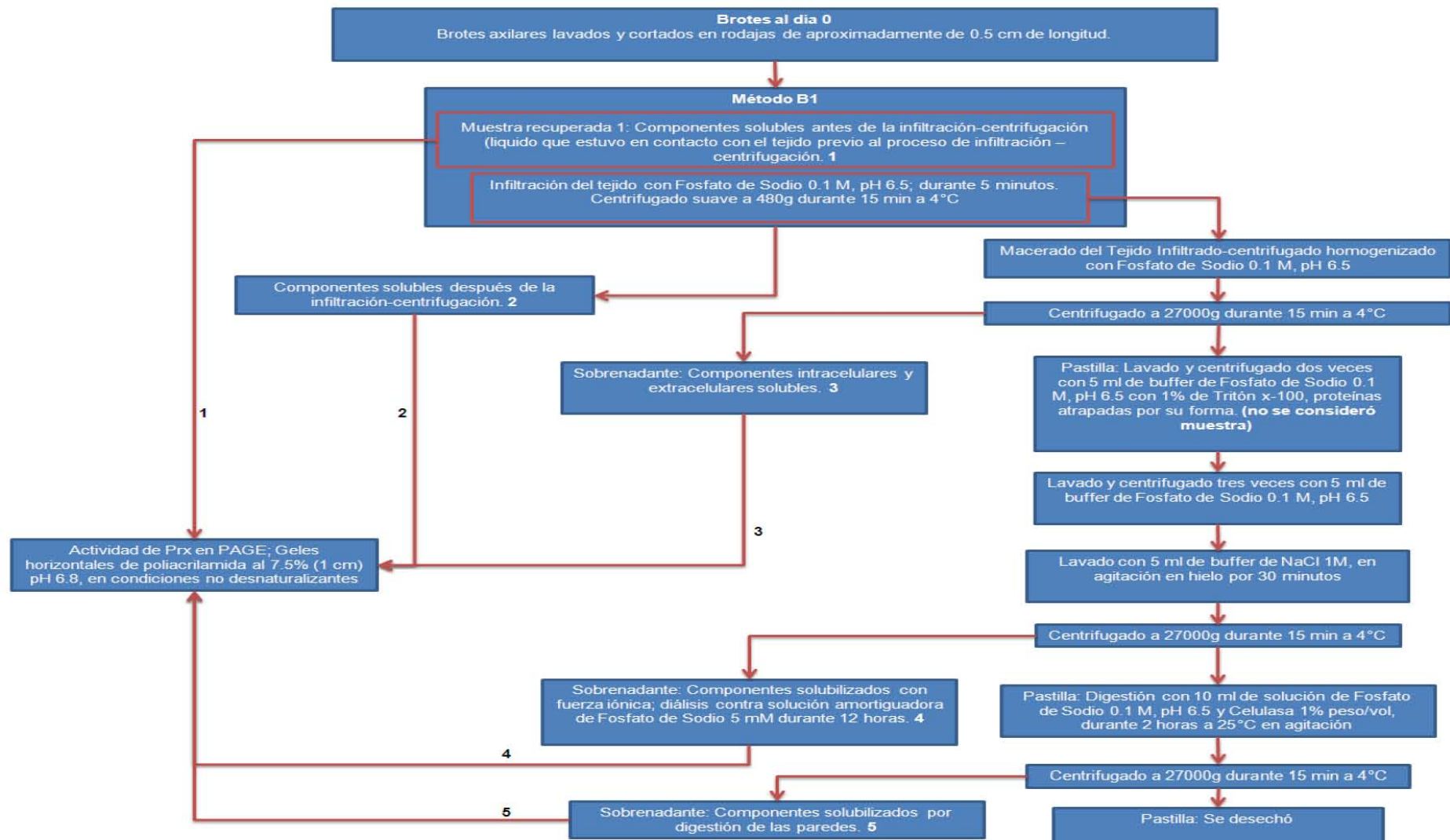


Ilustración 17: Método B1



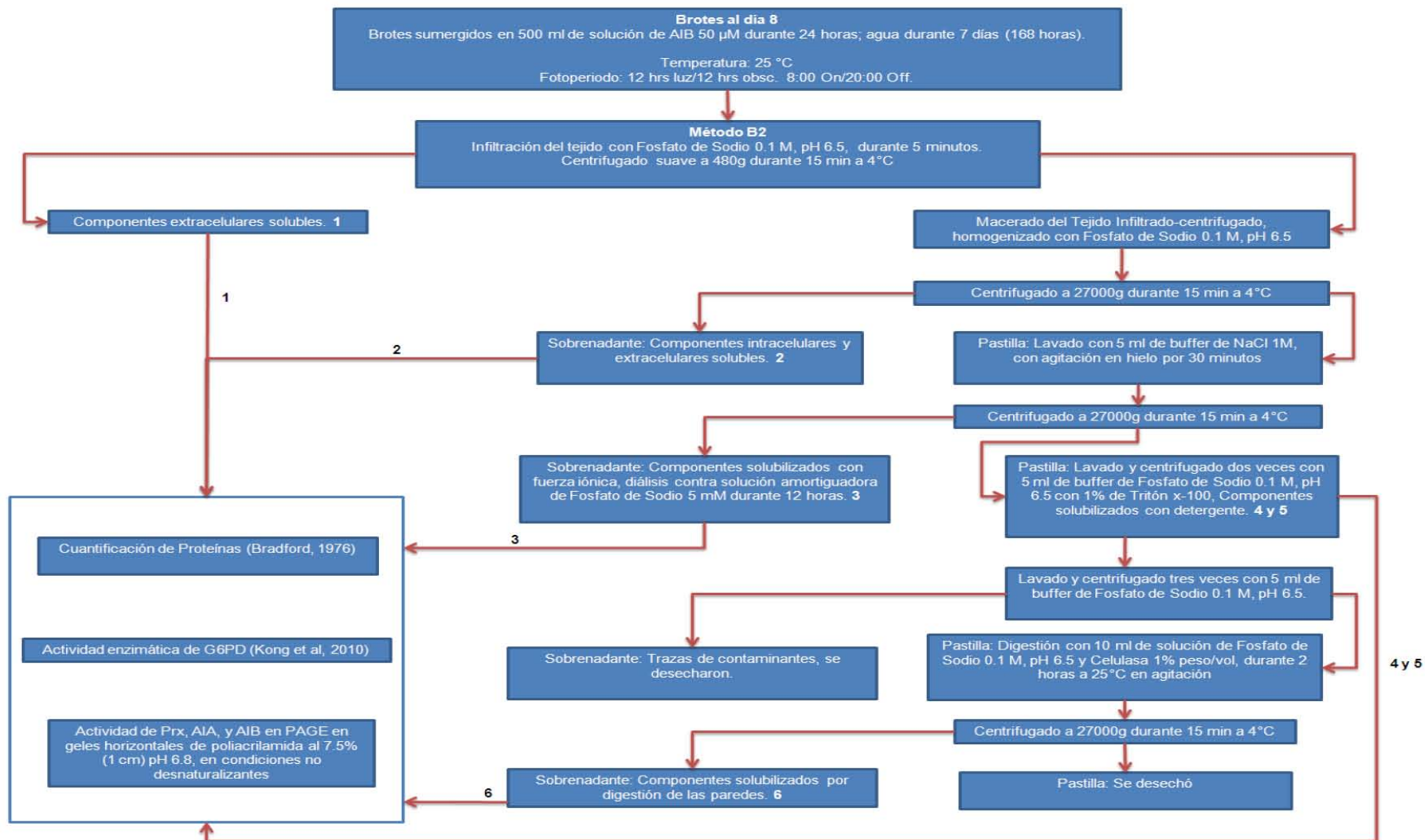


Ilustración 18: Método B2

## 6 RESULTADOS

Los resultados que se describen a continuación fueron seleccionados como experimentos representativos con un mínimo de tres ensayos; la fase de estandarización del método B (Método B1) se tomó en cuenta como parte de los resultados no obstante a que se realizó una sola vez como se describe, es importante mencionar que este método se realizó con brotes al día cero del enraizamiento, el método fue considerado debido a la información que proporcionó para confirmar los resultados de la siguiente parte del método B (Método B2).

### 6.1 Tratamiento de brotes con enraizamiento adventicio

El cambio de actividad de Prx en las muestras con enraizamiento adventicio a los días 0 y 8, fue evaluado en los patrones enzimáticos mostrados en las Ilustraciones 19, 20, 21 y 25.

### 6.2 Extracción de proteínas de la pared celular

A manera de resumen, con el método A se obtuvo una única fracción: **Proteínas Celulares Totales (PCT)**; la primera variante del método B (**B1**) permitió obtener las siguientes fracciones: 1) **Componentes solubles antes de la infiltración-centrifugado**, 2) **Componentes solubles después de la infiltración-centrifugado**, 3) **Componentes Intracelulares y extracelulares solubles**, 4) **Componentes solubilizados con fuerza iónica** y 5) **Componentes solubilizados por digestión de las paredes**; la segunda variación (**B2**) se desarrolló por medio de un fraccionamiento del tejido de brotes al octavo día del enraizamiento, el método implicó una primera extracción del líquido apoplástico por medio de un proceso de infiltración-centrifugación suave (Lohaus *et al*, 2001; Witzel *et al*, 2011; Li *et al*, op cit) seguido de la extracción progresiva de las enzimas restantes, de este método se obtuvieron seis fracciones: 1) **Componentes extracelulares solubles**, 2) **Componentes Intracelulares y extracelulares solubles**, 3) **Componentes solubilizados con fuerza iónica**; 4 y 5) **Componentes solubilizados con detergente** y 6) **Componentes solubilizados por digestión de las paredes**; la eficiencia de ambos procedimientos se determinó en función de los patrones isoenzimáticos obtenidos en los geles de poliacrilamida, así como en la información que se obtuvo en cuanto a las relaciones intermoleculares existentes entre las enzimas y el medio circundante.

### 6.3 Extracción de componentes celulares por el Método A

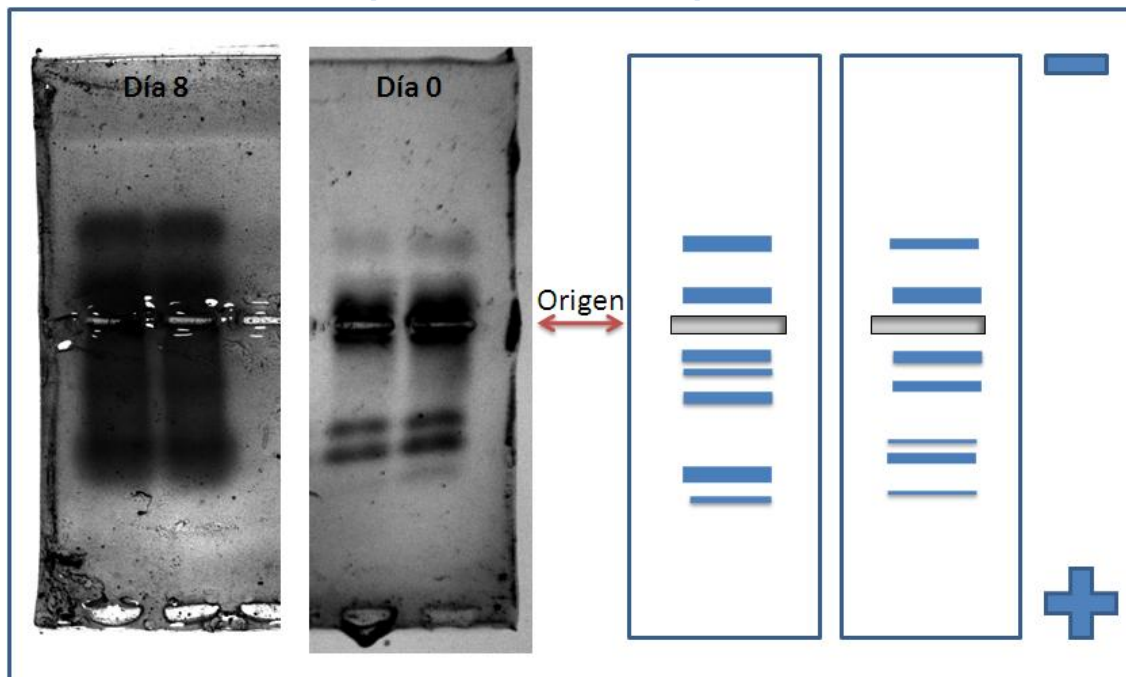


Ilustración 19: Patrón enzimático de la muestra PCT correspondiente al Método A

### 6.4 Cuantificación Proteica, Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) obtenidas por el Método A y Separación de proteínas por la columna de intercambio iónico

La concentración proteica se obtuvo por interpolación en curva patrón con una pendiente de 0.9877, en el cuadro 8 se presentan los resultados de las fracciones obtenidas por el método A, así como de los filtrados obtenidos en la columna de zeolita.

**Cuadro 8: Actividad enzimática de Peroxidasa; las muestras se evaluaron con O-Dianisidina como sustrato, se incluye la determinación de proteína y el número de bandas catiónicas del total de bandas observadas en cada fracción: PCT) Proteínas Celulares Totales; 1er) Primer filtrado, 2do) Segundo filtrado, 1M) Lavado con NaCl 1M.**

Método	Fracciones obtenidas	Proteína total (mg/ml)	Velocidad inicial (mM min <sup>-1</sup> )	Actividad Total (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Bandas catiónicas observadas/Total de bandas con actividad Prx
A: Digestión celular enzimática y producción de extracto de pared celular y apoplasto	PCT	1.8587	0.0637	0.19115	0.1028	2/7
Separación de enzimas catiónicas con columna de zeolita	1er	0.8905	0.0257	0.0773	0.0868	0/3
	2do	0.6121	0.0551	0.1653	0.2701	1/5
	1M	0.0650	0.0065	0.0195	0.3000	1/1

## 6.5 Extracción de componentes celulares por el Método B1 y B2

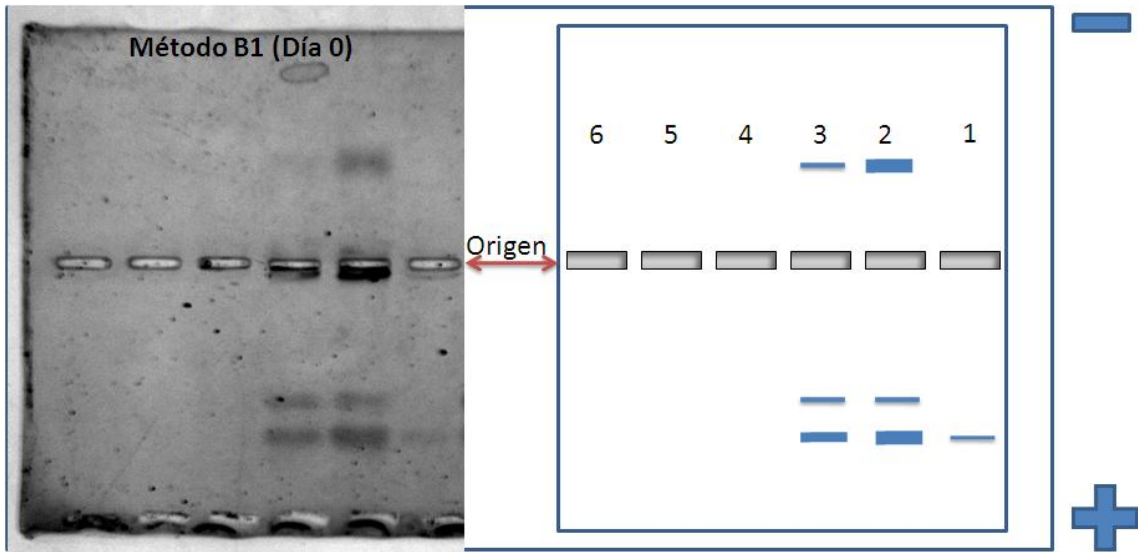


Ilustración 20: Patrón enzimático de las muestras correspondientes al Método B1 al día 0 de enraizamiento: 1) Componentes solubles antes de la infiltración-centrifugado, 2) Componentes solubles después de la infiltración-centrifugado, 3) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 4) Componentes solubilizados con fuerza iónica y 5) Componentes solubilizados por digestión de las paredes; 6) Carril vacío.

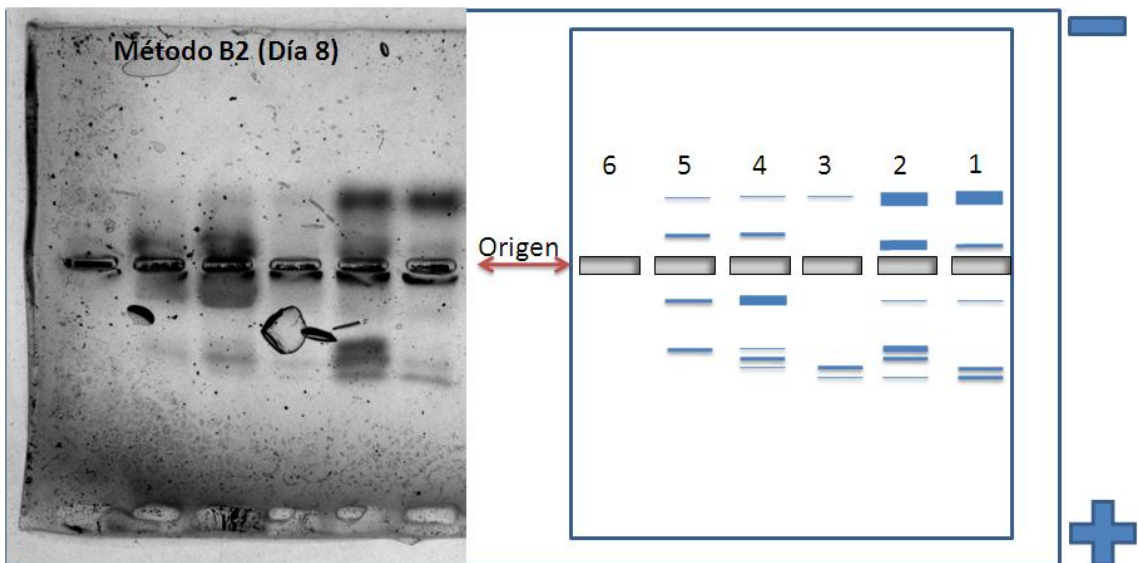


Ilustración 21: Patrón enzimático de las muestras correspondientes al Método B2 al día 8 de enraizamiento: 1) Componentes extracelulares solubles, 2) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 3) Componentes solubilizados con fuerza iónica, 4 y 5) Componentes solubilizados con detergente y 6) Componentes solubilizados por digestión de las paredes.

## 6.6 Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

La actividad de las isoenzimas en los componentes extracelulares solubles del Método B2 se muestra en las Ilustraciones 22 y 23.

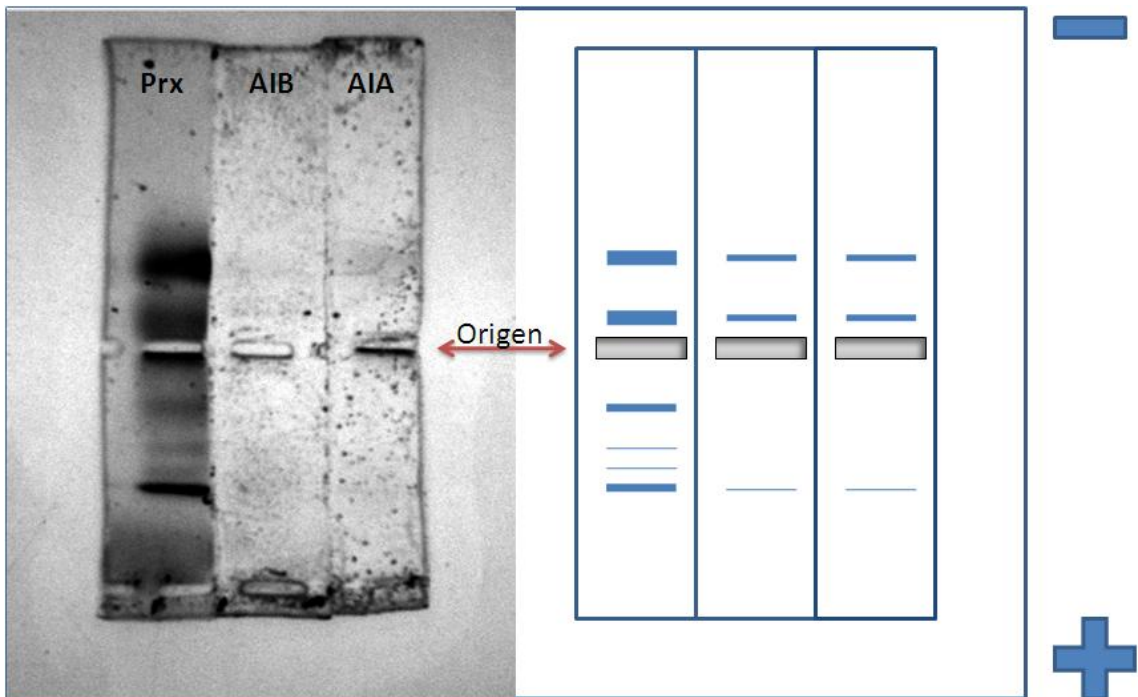


Ilustración 22: Evaluación de la actividad AIA y AIB oxidasa de los Componentes extracelulares solubles obtenidos por el Método B2, en todos los casos se usó buffer Fosfato de Sodio 0.1 M, pH, 6.5 para el medio de reacción.

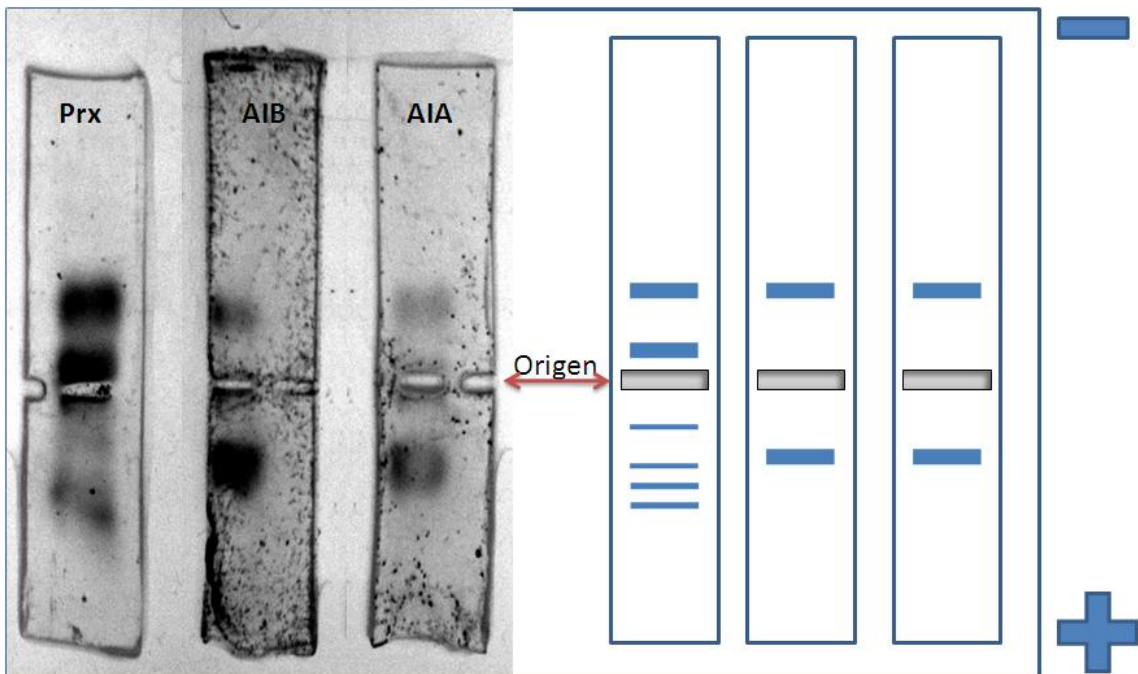


Ilustración 23: Evaluación de la actividad AIA y AIB oxidasa de los Componentes extracelulares solubles obtenidos por el Método B2, en el casos de los ensayos con AIA y AIB se usó buffer de Acetato de Sodio 0.2 M, pH 4.2; mientras que para la actividad de Prx se usó buffer Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5 para el medio de reacción.

## 6.7 Cuantificación Proteica y Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) de las fracciones obtenidas por el Método B2

Los resultados obtenidos de las gráficas de actividad se presentan en la Cuadro 9.

Cuadro 9: Actividad enzimática de Peroxidasa evaluada con Guayacol como sustrato, se incluye la determinación de proteína y el número de bandas catiónicas del total de bandas observadas en cada fracción: 1) Componentes extracelulares solubles, 2) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 3) Componentes solubilizados con fuerza iónica, 4 y 5) Componentes solubilizados con detergente y 6) Componentes solubilizados por digestión de las paredes.

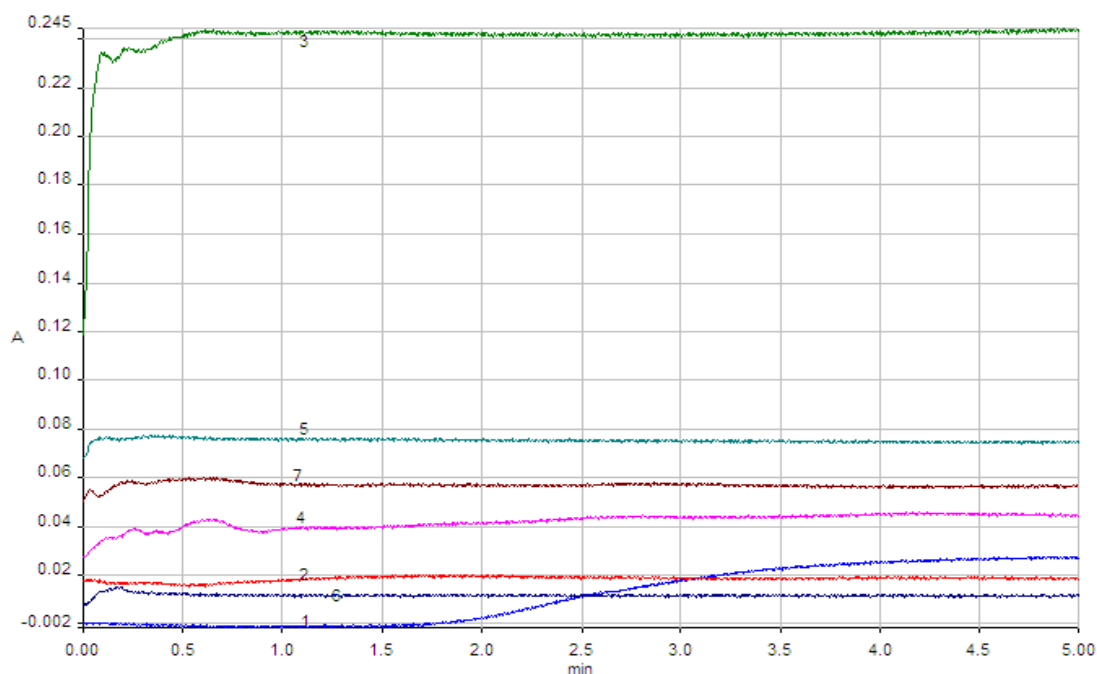
Método	Fracciones obtenidas	Proteína total (mg/ml)	Velocidad inicial (mM min <sup>-1</sup> )	Actividad Total (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Bandas catiónicas observadas/Numero de bandas con actividad Prx totales
B2: Fraccionamiento celular progresivo modificado	1	0.11857	0.06757	0.2027	1.7094	2/5
	2	0.4890	0.03577	0.1073	0.2194	2/6
	3	0.2420	0.1266	0.3800	1.5700	1/3
	4	0.8464	0.0184	0.0552	0.0652	2/6
	5	0.8923	0.0479	0.1438	0.1612	2/4
	6	0.7120	0.0218	0.0655	0.0921	0/0

## 6.8 Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La contaminación por contenido intracelular de las muestras obtenidas por el Método B2 se cuantificó por la formación de NADPH por medio de la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Cuadro 10), es preciso notar que en la gráfica correspondiente al control con G6PD comercial, los cambios de absorbancia comienzan al minuto y medio.

**Cuadro 10: Presencia de actividad de Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa en muestras correspondientes al Método B2.**

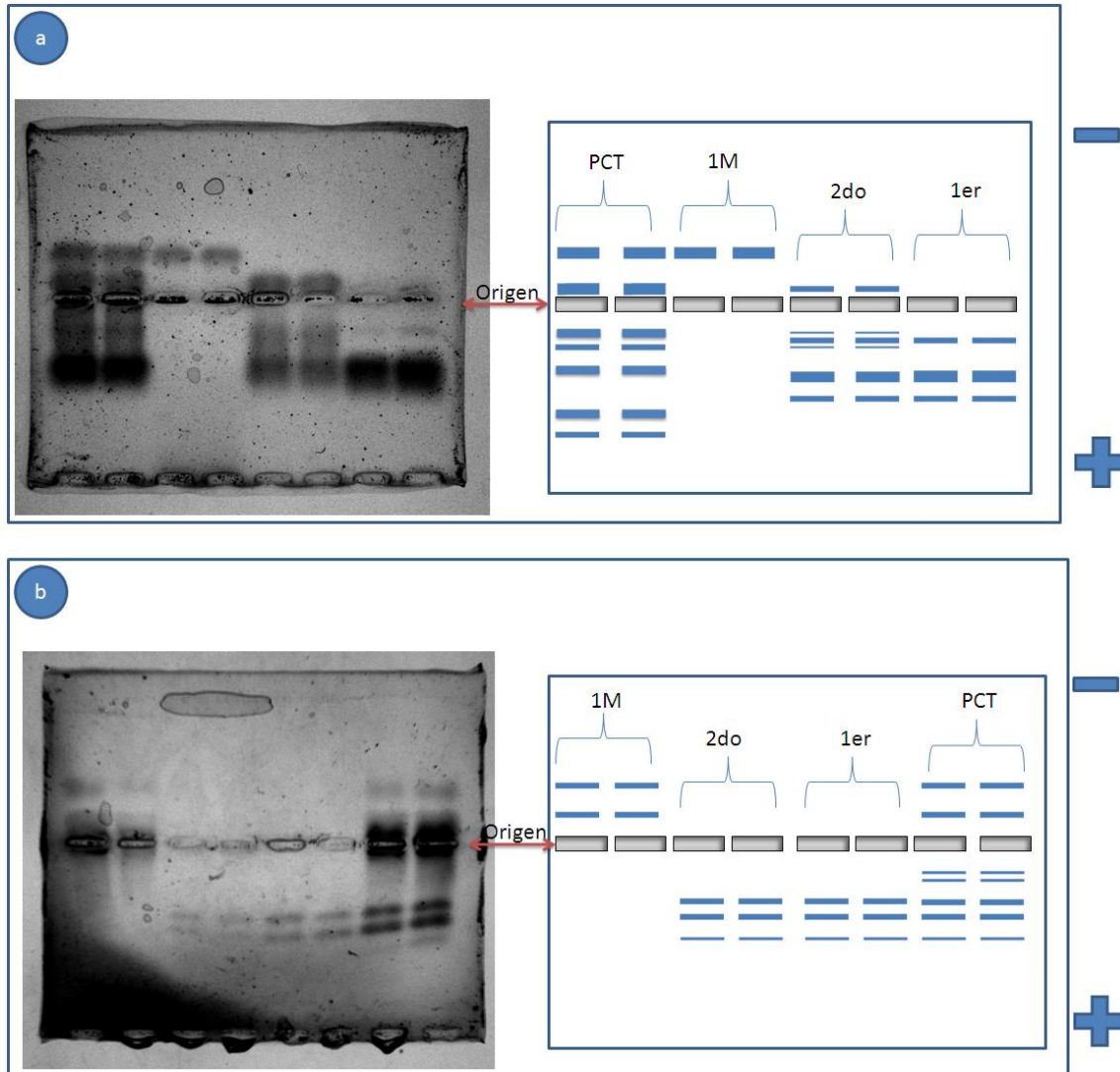
Muestra	Actividad Total NADPH(U/ml)
1 (G6PD)	0.0024078
2 (Componentes extracelulares solubles)	No detectable
3 (Componentes intracelulares y extracelulares solubles)	No detectable
4 (Componentes solubilizados con fuerza iónica)	0.00101871
5 (Componentes solubilizados con detergente)	No detectable
6 (Componentes solubilizados con detergente)	No detectable
7 (Componentes solubilizados por digestión de las paredes)	No detectable



**Ilustración 24: Gráfica de los valores de absorbancia con respecto al tiempo: 1) G6PD 2) Componentes extracelulares solubles, 3) Componentes intracelulares y extracelulares solubles, 4) Componentes solubilizados con fuerza iónica, 5 y 6) Componentes solubilizados con detergente y 7) Componentes solubilizados por digestión de las paredes**

## 6.9 Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (Separación por columna de zeolita)

En la Ilustración 25 se muestran los resultados obtenidos de los geles; los patrones enzimáticos corresponden a las muestras obtenidas a través de la columna de zeolita partiendo de la muestra PCT obtenida del método A al día 0 y 8 del enraizamiento adventicio.



**Ilustración 25: Patrones enzimáticos de las fracciones obtenidas de la columna de zeolita: PCT) Proteínas celulares totales, 1er) Primer filtrado, 2do) Segundo filtrado, 1M) Lavado con NaCl 1M; a) Enraizamiento al día 8, y b) Enraizamiento al día 0.**



## 6.10 Análisis microscópico de la columna de intercambio iónico

La Ilustración 26 muestra el arreglo estructural cristalino de la zeolita natural y la zeolita usada para la columna de intercambio iónico (modificada con Caolín y Cloruro de Estearil Dimetil Bencil Amonio), las caracterizaciones por medio de rayos x se muestran en los espectros correspondientes.

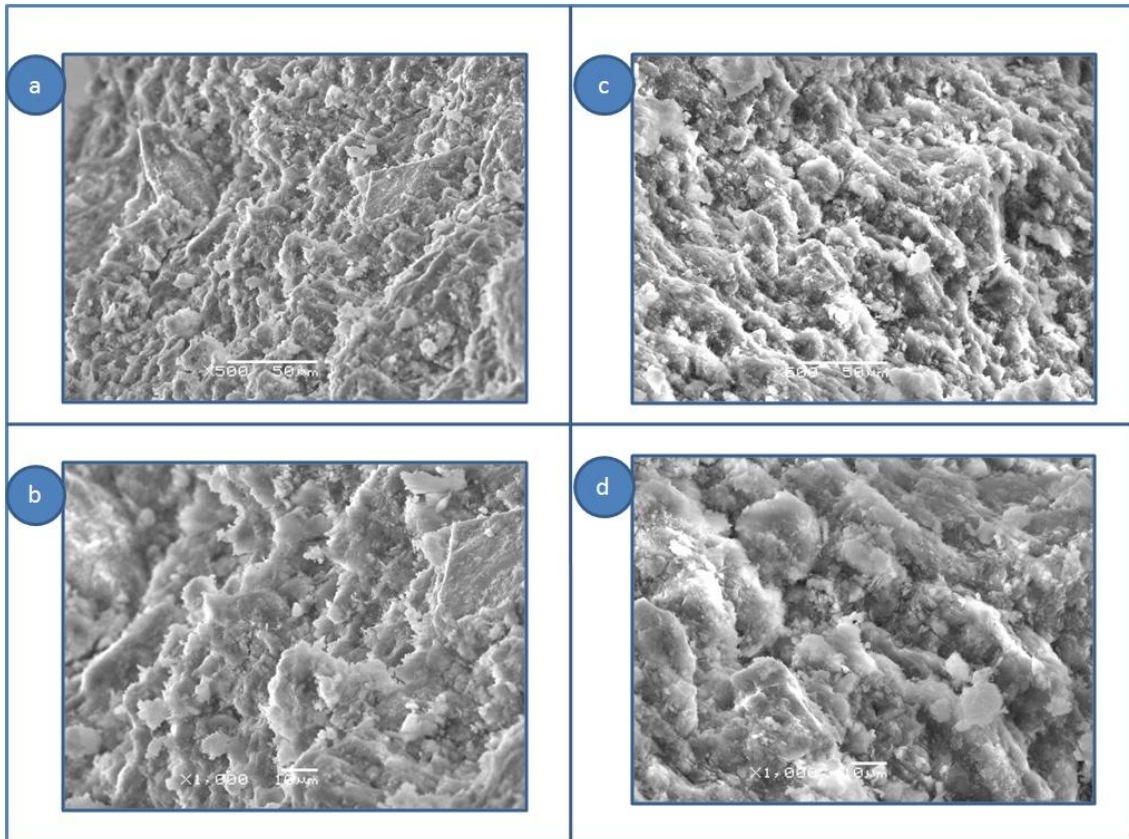
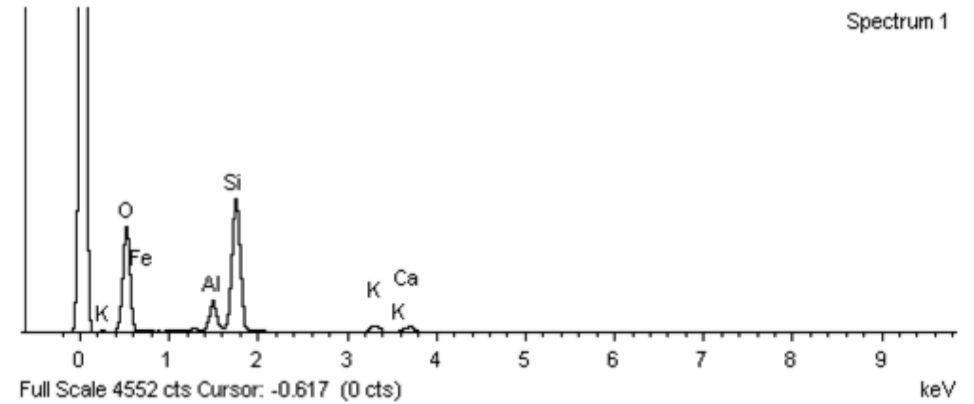


Ilustración 26: a) y b): Zeolita modificada; c) y d): Zeolita natural

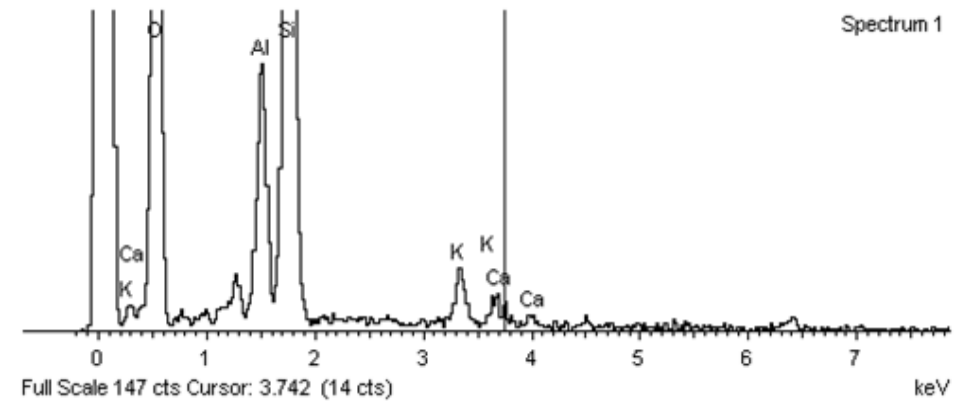
**Cuadro 11: Espectro de Zeolita Natural**

Elemento	Peso%	Compuesto%	Formula	Número de iones
Al K	7.26	13.71	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.70
Si K	35.49	75.92	SiO <sub>2</sub>	3.28
K K	3.16	3.81	K <sub>2</sub> O	0.21
Ca K	3.04	4.26	CaO	0.20
Fe K	1.79	2.30	FeO	0.08
O	49.26			8.00
<b>Total</b>	<b>100.00</b>			



**Cuadro 12: Espectro de Zeolita Modificada**

Elemento	Peso%	Compuesto%	Formula	Número de iones
Al K	8.75	16.53	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.82
Si K	36.40	77.86	SiO <sub>2</sub>	3.29
K K	2.66	3.20	K <sub>2</sub> O	0.17
Ca K	1.72	2.40	CaO	0.11
O	50.48			8.00
<b>Total</b>	<b>100.00</b>			



## 7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Tratamiento de brotes con enraizamiento previo

Existen cambios en la actividad enzimática en el curso temporal del enraizamiento de brotes sometidos a un tratamiento que induce la formación de raíces adventicias; los datos correspondientes a la actividad en geles de las muestras tomadas al octavo día de enraizamiento, muestran una mayor actividad que aquellas obtenidas de las muestras al día cero. En los experimentos desarrollados por Güneş (Güneş *et al*, 2000) se observa un incremento en la actividad durante la aparición de raíces; es decir entre los días 8-10 del enraizamiento; el significado que puede tener esta elevación de actividad es que, dada la capacidad de oxidar *in vitro* a las auxinas que demuestran las isoenzimas que aumentan su actividad, este cambio constituya un mecanismo para restablecer los niveles basales de auxina, condición necesaria para los componentes que como las auxinas, desencadenan respuestas a través de las vías de señalización. Las auxinas promueven el desarrollo de raíces adventicias (Pop *et al*, 2011) y se elevan para dar inicio al enraizamiento adventicio, el avance de este proceso conduce a aumentar la actividad de enzimas que tienen la capacidad de degradar a las auxinas (Acosta *et al*, 1988), por lo que se interpreta que éste es un mecanismo que restablece los niveles de auxina endógena. Una posibilidad más es que esta actividad aumentada contribuya a la protección del área de protrusión, a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como defensa contra patógenos, también podría estar relacionada con este aumento de actividad, la necesidad de realizar cambios en la arquitectura de la pared, catalizados por peroxidasas (Passardi, 2005; Cosgrove, 2001). Es recomendable realizar experimentos en distintos días de enraizamiento con la finalidad de conocer los patrones enzimáticos durante distintas etapas del proceso.

### 7.2 Extracción de proteínas de la pared celular

Los datos obtenidos de la extracción propuesta en el Método A no resuelven las dudas en cuanto a las interacciones entre las isoenzimas y el medio circundante, ya que estas se pierden al ser afectadas por las condiciones o los materiales involucrados en el método; la muestra obtenida de este proceso resultó ser idónea para la separación posterior por medio de la columna de zeolita, considerando la importante cantidad de isoenzimas en la muestra; es necesario considerar como parte del método una separación por gradiente de densidad con el fin de separar las fracciones subcelulares y fortalecer la evidencia experimental que determine la posible asociación de las peroxidasas de clase III con las paredes celulares o con algunas otras fracciones y la naturaleza de dicha asociación.

De acuerdo con las hipótesis planteadas, el Fraccionamiento Progresivo (Método B) resultó ser el método más eficiente y el que proporciona mayor información sobre las interacciones que se producen entre las isoperoxidasas de clase III y el medio circundante; los resultados obtenidos con el Método B1 muestran que las isoenzimas se encuentran en el medio extracelular (corroborando que se trata de enzimas de secreción), algunas de ellas se encuentran en la fracción soluble, lo que hace suponer que se encuentran de forma libre en el apoplasto; tanto el método B1 como B2, permiten suponer que las isoenzimas se encuentran asociadas en diferentes formas, de acuerdo con lo planteado por Li y Cesarino (Li *et al*, 1989; Cesarino *et al*, 2013). En los zimogramas obtenidos se observaron dos isoenzimas con formas catiónicas las cuales se encuentran solubles; estas pueden ser extraídas por medio de un proceso de infiltración seguido de la recuperación del líquido infiltrante con un centrifugado gentil; no obstante, es necesario medir y variar la cantidad de energía aplicada durante la infiltración, sustancias infiltrantes y tiempos de infiltrado, como lo hecho por Witzel (Witzel *et al*, 2011). El método corre el riesgo de ser considerado rustico; sin embargo ya ha sido ensayado bajo

diferentes modificaciones: un técnica de centrifugado sin el proceso de infiltrado (Dannel *et al*, 1995), un infiltrado sin el centrifugado (Behling *et al*, 1989) o una combinación de ambos (Klement 1965; Rathmell & Sequeira, 1974; Terry & Bonner, 1980; Rohringer *et al*, 1983); e inclusive el método ya ha sido sujeto a examen crítico (Dietz, 1997; Grignon & Sentenac, 1991); de los cuales se puede concluir que el método funciona muy bien cuando se aplican fuerzas de menores a 1000 g sin obtener contaminación citosólica en el líquido apoplástico, así como la disponibilidad en el uso de diferentes sustancias infiltrantes las cuales pueden ser usadas para determinar diferentes metabolitos e iones; además este método puede ser adaptado para ser aplicado en diferentes tipos de tejidos y especies, recuperando la cantidad suficiente para ser analizada, una de las posibles desventajas que representa el uso del método, como señala Lohaus (Lohaus *et al*, 2001), es que cambios localizados en solutos apoplásticos de algunas regiones del tejido pueden no ser detectados, en conclusión el método resulta ser una opción sencilla y barata para el análisis de la fracción apoplástica. Adicionalmente, la evidencia nos indica que las enzimas catiónicas pudieran estar relacionadas con la pared por asociaciones de tipo iónicas o hidrofóbicas, lo que sugiere un equilibrio entre ambas partes a suerte de que la parte asociada a la pared pudiera actuar como reservorio, la cual muestra actividad como efecto de la señalización ocurrida en el apoplasto, el equilibrio entre la parte unida y libre puede ser mantenido por diferencias en el pH y la concentración de iones en el medio apoplástico, adicionalmente los estudios hechos por Liao (Liao *et al*, 1999) sobre una peroxidasa catiónica aislada de las hojas de *Vitis pseudoreticulata* indican que enzimas con un *pI* superior a 8.0 se encuentran activas en medios con pH de 5.7 y que su actividad es estimulada por sales inorgánicas en altas concentraciones, lo cual refuerza la hipótesis del equilibrio; es importante tomar en cuenta la hipótesis de una posible subfuncionalización; es decir, la división de las funciones producto de genes parálogos (Passardi, 2005), para confirmarlo es necesario realizar pruebas genómicas que indiquen que se trata de la misma isoenzima. Debido a que estas enzimas fueron observadas en la extracción con Tritón x-100, existe la posibilidad de que estas se encuentren adheridas a la pared en relación a su forma o plegamiento; sin embargo su presencia se deba también a un remanente derivado de los pasos anteriores del método; no obstante a la posible pérdida de su forma y consecuentemente a su inactivación, las isoenzimas permanecen activas con detergentes en bajas concentraciones. No se observaron bandas en la fracción digerida; es decir, existe la posibilidad de que no existan enzimas unidas fuertemente (covalentemente).

### 7.3 Actividad enzimática en Geles de Poliacrilamida (PAGE)

De los patrones enzimáticos observados con Bencidina, AIA y AIB una de las enzimas catiónicas cuenta con la facultad de usar los tres sustratos como donadores de H, de los cuales sus productos pueden ser intermediarios en distintos eventos (Passardi, 2004; 2005); debido al equilibrio hipotético, es posible que su rol funcional y equilibrio cambie de acuerdo a las necesidades de la planta.

Los ensayos de actividad de AIA y AIB mostraron mayor intensidad de las bandas cuando se usó buffer de Acetato de Sodio 0.2 M, pH 4.2, la actividad de Peroxidasa se muestra igualmente intensa con buffer de Fosfato de Sodio 0.1 M, pH 6.5; estos datos dan evidencia de las condiciones en que la enzima se muestra activa, en el cual es necesario un ambiente de reacción más protonado ( $H^+$ ) proporcionado por el AIB sin disociar en el medio extracelular y el sitio de su localización *in vivo* (alrededor de 5 en la pared celular debió a la  $H^+ATPasa$ ), de forma que la enzima se encuentre bajo un pH más ácido en forma soluble o libre. Para conocer el rango de pH al que trabaja la enzima será necesario hacer pruebas con gradientes; debido a la falta de una prueba de actividad de peroxidasa bajo medios más ácidos no es posible establecer una correlación, es menester realizar dicha prueba.

## 7.4 Cuantificación Proteica y Actividad enzimática de Peroxidasa (Prx) en solución

Los datos indican que la cantidad de proteína en la muestra obtenida del método A es la más alta de todas, tomando en cuenta la disrupción y digestión que implicó el método; esta cantidad corresponde casi a la totalidad de los tres filtrados de la columna, no obstante se puede apreciar que existe una pérdida de proteína debido a que existe una diferencia de 0.2911  $\mu\text{g}$  del total de los filtrados con respecto a la cantidad inicial medida, es posible que la cantidad no recuperada corresponda a moléculas de otra naturaleza que permanecieron unidas a la zeolita o bien que corresponda a la fracción de proteínas catiónicas; las cuales, con una posterior elución podrían ser recuperadas.

La cantidad de proteína obtenida de las muestras por el método B2 indican que la recuperación de proteínas es mayor después del lavado del tejido con Tritón x-100, es decir, casi la mitad del total de proteína obtenida por el método, corresponde a componentes que pueden estar asociados iónicamente o por su estructura (forma o plegamiento) a la pared. Por otra parte es posible observar que otra cantidad elevada de proteína se recupera cuando se lleva a cabo la digestión del tejido; lo que indica, junto con los patrones enzimáticos, que esta cantidad no corresponde a enzimas con actividad; en otras palabras, ninguna enzima se mantiene unida a las paredes covalentemente; la actividad encontrada podría explicarse por medio del tipo de relación descrita por Maehly & Chance, Hinman & Lang y Morita (Maehly & Chance, 1954; Hinman & Lang, 1965; Morita *et al*, 1962); es decir, el producto formado medido depende de la concentración enzimática o a que posiblemente, la actividad observada corresponda a otro producto susceptible a 470 nm.

## 7.5 Evaluación de contaminación por contenidos intracelulares mediante la actividad enzimática de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Hay actividad detectable en la muestra obtenida por extracción con fuerza mecánica y fuerza iónica alta; no obstante, individualmente la extracción con fuerza mecánica no presenta contaminación celular, existe la posibilidad de que trazas de componentes del citoplasma no fueran removidos del todo con el centrifugado posterior y si por el NaCl, la otra posible hipótesis es que aun existieran células sin daños después del macerado que bajo las condiciones de salinidad resultaron comprometidas o dañadas, esto podría explicar su presencia en la muestra. Es importante señalar que el primer minuto y medio de la reacción corresponde a un error experimental, de esta forma la actividad fue considerada después de ese tiempo; esto se determinó debido también, a que la muestra en la que se ensayó la G6PD mostró actividad hasta ese tiempo; por otra parte, la susceptibilidad de la G6PD a desnaturalizarse podría ser la respuesta a la falta de su actividad en algunas fracciones debido a que todas fueron congeladas antes de realizar el ensayo de actividad, debido a esta evidencia no es posible asegurar totalmente que las muestras se encontraran libres de contaminación citosólica, sin embargo es muy probable que el método de extracción por infiltrado-centrifugado no ocasione daño celular.

## 7.6 Actividad enzimática de Peroxidasa en Geles de Poliacrilamida (filtrados de la columna de zeolita)

La separación de proteínas catiónicas por medio de columnas de zeolita modificada resultó ser una opción adecuada. Los patrones enzimáticos muestran que de la totalidad de enzimas, un primer grupo de peroxidasa aniónicas no fueron retenidas por la zeolita ya que son recuperadas únicamente por gravedad (1<sup>er</sup> Filtrado), existe la posibilidad de que este grupo no sea retenido debido al carácter hidrofóbico que proporciona la adición del surfactante; un grupo más de enzimas aniónicas y catiónicas son recuperadas en conjunto con Tris-HCl 75 mM, pH

8.8 (2<sup>do</sup> Filtrado), lo que indica que la fuerza iónica con la que se encontraban asociadas a la columna fue débil, existe la posibilidad de que el grupo de enzimas fuera en parte un remanente del primer filtrado que fue removido por la solución de Tris-HCl y en parte el producto del intercambio iónico (tanto aniónicas como catiónicas), es necesario tomar en cuenta lo propuesto por Olguín (Olguín, s/f); es decir, que la sorción se vio afectada debido a que la superficie de la zeolita no fue homogénea en su composición con respecto al surfactante, propiciando la posible formación de bicapas completas o incompletas.

La recuperación de la enzima más catiónica se da por medio de la elución de la columna con solución de NaCl 1M, esto indica la fuerza de asociación con la columna; en la Ilustración 25 se puede observar que es la única isoenzima presente con actividad de peroxidasa, por su movilidad con respecto a el gel, esta enzima parece ser la misma con actividad de Auxina-oxidasa; no es posible determinar si se encuentra del todo aislada ya que la columna es capaz de sorber moléculas cargadas de distinta índole sin actividad catalítica visible, no obstante este método descarta varios compuestos debido a su principio de separación por intercambio iónico; este método es recomendable debido a que como señala Chiku (Chiku *et al*, 2003), las zeolitas son sumamente adaptables y más resistentes a diversas condiciones que otras resinas de intercambio además de que mantienen las propiedades para que las enzimas permanezcan activas; se recomienda hacer ensayos con un gradiente de Fuerza Iónica para conocer el rango de concentración necesario para la recuperación de la enzima, además claro está, la posibilidad de modificar la estructura de la zeolita de acuerdo a necesidades específicas.

## 7.7 Análisis de la columna de intercambio iónico

La caracterización por difracción de rayos x indica que la zeolita modificada tiene una porcentaje de Si/Al<sub>2</sub> ligeramente más alta con respecto a zeolita natural, esto hace suponer que como lo indica Chiku y Klint (Chiku *et al*, 2003; Klint *et al*, 1994) la zeolita modificada tiene un grado más alto de hidrofobicidad y por ende una menor capacidad de intercambio iónico, esta característica se atribuye al proceso de modificación realizado y a la capa de surfactante; es posible que una parte de las interacciones sean también de este tipo.

Los iones Fe<sup>+</sup> presentes en la zeolita natural pudieron encontrarse en los espacios intracristalinos como catión de compensación, los cuales fueron removidos durante el proceso de activación en la zeolita modificada; es posible que la cavidad generada por la remoción de los contraiones pudiera ser ocupada por algún grupo cargado perteneciente al Cloruro de Estearil (nitrógeno central del ion amonio); la estructura de la zeolita fue modificada debido a la mezcla con el caolín, es posible ver la estructura cristalina característica del caolín intercalada con la de la zeolita (Ilustración 26 a y b); el tamaño de poro de la zeolita natural de la que se parte también puede ser modificado; lo observado por Tomašević-Ćanović (Tomašević-Ćanović *et al*, 2003) indica que la columna preparada bajo el método descrito es estable químicamente bajo diferentes rangos de pH.

## 8 CONCLUSIONES

A partir del tejido de brotes axilares de *Solanum lycopersicon*, se obtuvieron zimogramas que revelaron bandas con actividad peroxidasa y auxina-oxidasa en diferentes fracciones que fueron sometidas a enraizamiento, tratándolos con AIB 20  $\mu\text{M}$  por 24 horas; se observaron dos bandas catiónicas. No existen reportes previos que den cuenta de la existencia física de la proteína responsable de la actividad de estas dos isoperoxidasas, obtenidas de la fracción soluble del apoplasto de jitomate; sólo se reporta la existencia de un gen que codifica una peroxidasa catiónica en jitomate inferida por homología. Se observó que la actividad de las bandas que provinieron de brotes sometidos por 8 días a enraizamiento adventicio fue mayor que la que presentó los mismos brotes recién cortados para ser sometidos a este tratamiento.

Por medio del fraccionamiento que comprendía la infiltración-centrifugado y la posterior separación de la fracción soluble libre de células, fue posible evidenciar que el apoplasto contiene enzimas con esta actividad. La técnica de infiltrado-centrifugado permite recuperar de forma rápida y sencilla el líquido apoplástico sin aparente daño celular; la cantidad de líquido recuperado fue la suficiente para realizar los análisis posteriores.

El desarrollo de un sistema electroforético horizontal basado en la movilidad diferencial de las isoperoxidasas en razón de su carga eléctrica, con relación al pH, permitió observar enzimas con diferentes movilidades. Los zimogramas obtenidos revelaron que una de las dos isoenzimas catiónicas consumió los tres sustratos ensayados (O-Dianisidina, AIA y AIB) como donadores de H, lo que hace suponer que cabe entre sus roles funcionales su participación en el catabolismo de auxinas.

La separación de isoenzimas se llevó a cabo por medio de una columna de intercambio iónico a la que se le unieron grupos hidrofóbicos a base de Zeolita/Caolín con poro grande, se encontró que fue posible separar la enzima catiónica con actividad auxina oxidasa, de las demás isoperoxidasas presentes, conservando sus propiedades y actividad después de su desorción.

Dos peroxidases catiónicas fueron obtenidas de los brotes; los datos evidencian que las enzimas catiónicas se encuentran de forma soluble en el apoplasto; no obstante, también existe evidencia de su asociación a las paredes celulares en trabajos realizados dentro del laboratorio; se sugiere que existe un equilibrio entre la fracción soluble y la que se encuentra asociada a la pared celular. El análisis de la naturaleza de la columna de intercambio y la asociación de las peroxidases hace suponer que las relaciones que se dieron para la adsorción de las proteínas son en parte por interacciones hidrofóbicas y en parte por relaciones iónicas.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, D., Martín, M., & Sabater, B. (2001). Differential leaf stress responses in young and senescent plants. *Physiol. Plant* , 113:409–415.
- Acosta, M.; del Río, J. A.; Arnao, M. B.; Sánchez-Bravo, J.; Sabater, F.; García-Carmona F. & García-Cánovas, F. (1988). Oxygen consumption and enzyme inactivation in the indolyl-3-acetic acid oxidation catalyzed by peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier* , 955: 194-202.
- Arbuznikov, A., Vasilyev, V., & Goursot, A. (1998). Relationships between the structure of a zeolite adsorption properties. *Surface Science* , 397: 395-405 .
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *J. Biotechnol.* , 53: 253-263.
- Banci, L., Bertiní, L., Pierattelli, R., & Tien, M. (1995). Factoring of the hyperfine shifts in the cyanide adduct of lignin peroxidase from *P. chrysosporium*. *J. Am. Chem. Soc.* , 117: 8659-8667.
- Barber, K. R., Rodríguez Marañón, M. J., Shaw, G. S., & van Huystee, R. B. (1995). Structural influence of calcium on the heme cavity of cationic peanut peroxidase as determined by 1H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* , 232: 825-833.
- Bednarek, S. Y., Wilkins, T. A., Dombrowski, J. E., & Raikhel, N. Y. (1990). A carboxyl terminal pro-peptide is necessary for proper sorting of barley lectin to vacuoles of tobacco. *Plant Cell* , 2: 1145-1155.
- Behling, J. P., Gabelman, W. H., & Gerloff, G. C. (1989). The distribution and utilization of calcium by two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines differing in calcium efficiency when grown under low Ca stress. *Plant Soil* , 113: 189-196.
- Bekkum, H. V., Flanigen, E. M., Jacobs, P. A., & Jansen, J. C. (1991). Introduction to Zeolite Science and Practice. Amsterdam: Elsevier.
- Bish, M. D., & Ming, D. W. (2001). Natural Zeolites: Mineralogy, Occurrence, Properties, Applications. Reviews in Mineralogy & Geochemistry. Washington, D.C.: *Mineralogical Society of America* Vol. 45: 551-587.
- Boyer, N., Desbiez, M. O., Hofinger, M., & Gaspar, T. H. (1983). Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.* , 72: 522-524.
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* , 39: 321-353.
- Cesarino, I., Araújo, P., Paes Leme, A. F., Creste, S., & Mazzafera, P. (2013). Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane. *Plant Physiol Biochem.* , 62: 1-10.
- Cherry, J. P., & Ory, R. L. (1973). Characterization of isoperoxidase activity in *Arachis hypogaea* cultivars. *Phytochem.* , 12: 1581-1583.
- Chibbar, N. R., & van Huystee, R. B. (1984). Characterization of Peroxidase in Plant Cells. *Plant Physiol.* , 75: 956-958.
- Chiku, H., Matsui, M., Murakami, S., Kiyozumi, Y., Mizukami, F., & Sakaguchia, K. (2003). Zeolites as new chromatographic carriers for proteins-easy recovery of proteins adsorbed on zeolites by polyethylene glycol. *Analytical Biochemistry* , 318: 80–85.



- Cosgrove, D. J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* , 125:131–134.
- Dannel, F., Pfeffer, H., & Marschner, H. (1995). Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. *J. Plant Physiol.* , 146: 273-278.
- De Jong, D., Olson, A., Hawker, K., & Jansen, E. (1968). Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension. *Plant Physiol.* , 43: 841-844.
- De la Rosa-Gómez, I., Olgúin, M. T., & Alcántara, D. (2008). Bactericides of coliform microorganisms from wastewater using silver-clinoptilolite rich tuffs. *Applied Clay Science* , 40: 45–53.
- Díaz-Nava, C., Olgúin, M. T., Solache-Ríos, M., Alarcón-Herrera, M. T., & Aguilar-Elguezabal, A. (2009). Phenol sorption on surfactant-modified Mexican zeolitic-rich tuff in batch and continuous systems. *Journal of Hazardous Materials* , 167: 1063–1069.
- Dietz, K. J. (1997). Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Prog. Bot.* , 58: 221-254.
- Dueñas, F. (1998). Caracterización molecular de un nuevo tipo de peroxidasa lignolítica. Tesis Doctoral . Facultad de ciencias Biológicas, Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Dunand, C. (2004-2012). *Peroxibase*. Obtenido de <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>
- Edwards, S. L., Xuong, N. B., Hamjin, R. C., & Kraut, J. (1987). Crystal structure of cytochrome-c peroxidase compound I. *Biochemistry* , 26: 1503-1511.
- Erdem, E., Karapinar, N., & Donat, R. (2004). The removal of heavy metal cations by natural zeolites. *Journal of Colloid and Interface Science* , 280: 309–314.
- Farhani, B. F. (2009). Protein purification using zeolite adsorbent. Malaysia: Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, Universiti Malaysia Pahang.
- Farooq, S., & Sayyed, H. (1999). Isozyme markers in cotton breeding-II: Inter and Intravarietal Variation in the activity of Isozymes of the Enzyme Peroxidase as Affected by Area of Cotton Cultivation. *Pak. J. Bot.* , 31(2): 347-359.
- Finzel, B. C., Poulos, T. L., & Kraut, J. (1984). Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution. *A. Biol. Chem.* , 259: 13027-13036.
- Flanigen, E. M., Pond, W. G., & Mumpton, F. A. (1984). Adsorption properties of molecular sieve zeolite: In agriculture use of natural zeolites in agriculture and aquaculture. Boulder, Colorado: Westview press pp: 55-69.
- Freedman, R. B. (1999). Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* , 57: 1069- 1072.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms. *Ann. Rev. Plant Physiol.* , 37: 165-186.
- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol. Dec.* , 4(12): 1032-1038.

- Gardner, H. W., Inglett, G. E., & Anderson, R. A. (1969). Inactivation of peroxidase as a function of corn processing. *Cereal Chem.* , 46: 626-634.
- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., & Greppin, H. (1982). Peroxidases 1970-1980: A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève: Université de Genève, Centre de Botanique.
- Gavel, Y., & von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng.* , 3: 433-442.
- Giannetto, G. P., Montes, R. A., & Rodríguez, F. G. (2000). Zeolitas. Características, propiedades y aplicaciones industriales. Venezuela: Innovación Tecnológica.
- Goodin, D. B., & Meree, D. E. (1993). The Asp-His-Fe triad of cytochrome c peroxidase controls the reduction potential, electronic structure, and coupling of the tryptophan free radical to the heme. *Biochemistry* , 32: 3313-3324.
- Grignon, C., & Sentenac, H. (1991). pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* , 42: 103-128.
- Gulen, H., & Eris, A. (2004). Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* , 166: 739-744.
- Güneş, T. (2000). Peroxidase and IAA-Oxidase activities during rooting in cuttings of three poplar species. *Turk J. Bot.* , 24: 97-101.
- Hamid, M., & Rehman, K. (2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* , 115: 1177-1186.
- Hinman, R. L., & Lang, J. (1965). Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochem.* , 4: 144-158.
- Hoyle, M. C. (1977). High Resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from Horseradish by Isoelectric Focusing. *Plant Physiol.* , 60: 787-793.
- Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., & Dutle, H. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* , 122: 179-188.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., & Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* , 162: 929-936.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* , 118: 1327-1335.
- Kawano, T., Sahashi, N., Takahashi, K., Uozumi, N., & Muto, S. (1998). Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increased in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol.* , 39: 721-730.
- Klement, Z. (1965). Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phytobacterial pathogens. *Phytopathology* , 55: 1033-1034.

- Klint, D., Arvidsson, P., Blum, Z., & Eriksson, H. (1994). Purification of proteins by use of Hydrophobic Zeolite Y. *Protein Expression and Purification* , 5: 569-576.
- Kong, F. J., Oyanagi, A., & Komatsu, S. (2010). Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1804: 124–136.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 227: 680-685.
- Lewis, N. G., & Yamamoto, E. (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* , 41: 455–496.
- Li, Z. C., McClure, J. W., & Hagerman, A. E. (1989). Soluble and Bound Apoplastic Activity for Peroxidase,  $\beta$ -D-Glucosidase, Malate Dehydrogenase, and Nonspecific Arylesterase, in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Oat (*Avena sativa* L.) Primary Leaves. *Plant Physiol.* , 90: 185-190.
- Liao, X.-R., Zhu, X.-C., & He, P.-C. (1999). A cationic peroxidase from leaves of *Vitis pseudoreticulata*. *Phytochemistry* , 51: 143-145.
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussman, M., & Muehling, H. (2001). Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* , 111: 457–465.
- Mader, M. (1976). Die Lokalisation des Peroxidase-Isoenzymgruppe G in der Zellwand von Tabak-Geweben. *Planta* , 131: 11-15.
- Maehly, A. C., Chance, B., & Glick (Ed), D. (1954). The assay of catalases and peroxidases. New York: Interscience Publ. Co.
- Masters, F. A., & Maschmeyer, T. (2011). Zeolites - From curiosity to cornerstone. *Microporous and Mesoporous Materials* , 142: 423-438.
- Meier, W. M., & Olson, D. H. (1987). Atlas of Zeolite structure Types. London: Butterworths.
- Morita, Y., Kameda, K., & Mizuno, M. (1962). Studies on phytoperoxidase. XVI. Aerobic destruction of indole-3-acetic acid catalyzed by crystalline japanese-radish peroxidase a and c. *Agr. Biol. Chem.* , 26: 442-446.
- Mumpton, F. A. (1984). In zeo-agriculture: Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture. En W. G. Pond, & M. F. A, Natural Zeolites (págs. pp 33-45). Boulder, Colorado: Westview press.
- Olguín, M. T. (s.f.). Zeolitas: Características y Propiedades. México, D. F., México: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Depto.de Química.
- Ouki, S. K., & Kavannagh, M. (1997). Performance of natural zeolites for the treatment of mixed metal-contaminated effluents. *Waste Management & Research* , 15: 383-394.
- Passardi, F., Bekalovic, N., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M., Penel, C., & Dunand, C. (2007). Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to Eukaryotes. *Genomics* , 89: 567-579.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep.* , 24: 255-265.

- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* , 65: 1879–1893.
- Pleniscar, M., Bonner, W. D., & Storey, B. T. (1967). Peroxidase associated with higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* , 42: 366-370.
- Pop, T., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin Control in the Formation of Adventitious Roots. *Not. Bot. Hort Agrobot. Cluj.* , 39(1): 307-316.
- Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1993). Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* , 268: 4429–4440.
- Rathmell, W. G., & Sequeira, L. (1974). Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.* , 53: 317-318.
- Renneberg, R., Scheller, F., & Mohr, P. (1978). Peroxidatic activity of cytochrome P-450 as compared with peroxidase. *Studia Biophys.* , 67: 141-142.
- Retig, N., & Rudich, J. (1972). Peroxidase and IAA oxidase activity and isoenzyme patterns in cucumber plants, as affected by sex expression and ethephon. *Physiol Plant* , 27: 156-160.
- Rivera-Garza, M., Olguín, M. T., García-Sosa, I., Alcántara, D., & Rodríguez-Fuentes, G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials* , 39: 431-444.
- Rohringer, R., Ebrahim-Nesbat, F., & Wolf, G. (1983). Proteins in intercellular washing fluids from leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* , 34: 1589-1605.
- Royo, J. B.; Cabello, F.; Miranda, S.; Gogorcena, Y.; González, J.; Moreno, S.; Itoiz, R. & Ortiz, J. M. (1997). The use of isoenzymes in characterization of grapevines (*Vitis vinifera*, L.). Influence of the environment and time of sampling. *Scientia Horticulturae* , 69: 145-155.
- Salzwedel, J. L., & Dazzo, F. B. (1993). pSym nod gene influence on elicitation of peroxidase activity from White clover and pea roots by rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol. Plant Microbe Interact* , 6:127–134.
- Schutzendubel, A., & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* , 53: 1351–1365.
- Scialabba, A., Bellani, L. M., & Dell'Aquila, A. (2002). Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Eur. J. Histochem.* , 46: 351–358.
- Semmens, M. J. (1984). Cation exchange properties of natural zeolite. En W. G. Pond, & F. A. Mumpton, In agriculture use of natural zeolites in agriculture an aquaculture (págs. pp 45-55). Boulder, Colorado: Westview press.
- Seregin, I. V., & Ivanov, V. B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* , 48: 523–544.
- Shiro, Y., Kurono, M., & Morishima, I. (1986). Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* , 261: 9382-9390.
- Siegel, S., Giumarro, C., & Daly, O. (1996). Micro-aerobic capabilities in land plants: observations on survival and growth of plants submerged in fresh and saline waters. *Nature* , 209: 1330-1334.

- Sivaraja, M., Goodin, D. B., Smith, M., & Hoffman, B. M. (1989). Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome-c peroxidase compounds ES. *Science* 18 , 245 (4919): 738- 740.
- Spanu, P., & Bonfante-Fasolo, P. (1988). Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol.* , 109: 119–124.
- Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H. S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H. S., & Sudhakar C. (1999). Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Science* , 141: 1-9.
- Sutherland G., R. J., & Aust, S. D. (1996). The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* , 332: 128-134.
- Sutherland G., R. J., Zapanta, L. S., Tien, M., & Aust, S. D. (1997). Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. *Biochemistry* , 36: 3654-3662.
- Terry, M. E., & Bonner, B. A. (1980). An examination of centrifugation as a method of extracting an extracellular solution from peas, and its use for the study of indoleacetic acid-induced growth. *Plant Physiol.* , 66: 321-325.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G., Matijašević, S., & Đuričić, M. (2003). Surfactant modified zeolites—new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* , 61: 173–180.
- Trinh, T. H., Gaspar, T., Tran Thanh van, V., & Marcotte, J. L. (1981). Genotype, ploidy and physiological state in relation to isoperoxidases in *Nicotiana*. *Physiol. Plant* , 53: 53-157.
- Vassilis, J. I. (2005). The concept of “capacity” in zeolite ion-exchange systems. *Journal of Colloid and Interface Science* , 281: 68–79.
- Viera-De-Silva, J. (1968). Le potentiel osmotique du milieu de culture et l'activité soluble et latente de la phosphatase acide dans le *Gossypium thurberi*. *C.R. Acad. Sc. Paris* , 67: 729-732.
- Vitello, L. B., Erman, J. E., Miller, M. A., Wang, J., & Kraut, J. (1993). Effect of Arginine-48 replacement on the reaction between cytochrome-c peroxidase and hydrogen peroxide. *Biochemistry* , 32: 9807-9818.
- Wang, S., & Peng, Y. (2010). Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* , 156: 11–24.
- Wariishi, H., & Gold, M. H. (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* , 265: 2070-2077.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* , 2: 388–393.
- Welinder, K. G., & Gajhede, M. (1993). Structure and evolution of peroxidases. En K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, C. Penel, & H. (Greppin, Plant peroxidases: biochemistry and physiology (págs. pp. 35–42). Geneva, Suiza: University of Geneva.
- Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H. P., & Mühling, K. H. (2011). Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods* , 7: 48.

