

UCH-TC
B. Ambiental
R 773
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LAS ISOENZIMAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN
HOJAS DE ALOE VERA (*ALOE BARBADENSIS* MILLER) SOMETIDAS A ESTRÉS
HÍDRICO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

por

Isabel Alejandra Ramírez Abarca



Director de Seminario de Título: Dra. Liliana Cardemil Oliva

Diciembre, 2008

Santiago, Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

ISABEL ALEJANDRA RAMÍREZ ABARCA

“EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LAS ISOENZIMAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EN HOJAS DE ALOE VERA (*ALOE BARBADENSIS* MILLER) SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Liliana Cardemil
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita de Dra. Liliana Cardemil en tinta negra, sobre una línea horizontal.

Dr. Michael Handford
Co-Director

Firma manuscrita de Dr. Michael Handford en tinta negra, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Tulio Núñez
Presidente Comisión

Firma manuscrita de Dr. Marco Tulio Núñez en tinta azul, sobre una línea horizontal.

Dra. Victoria Guixé
Correctora

Firma manuscrita de Dra. Victoria Guixé en tinta negra, sobre una línea horizontal.



Santiago de Chile, Diciembre de 2008

AUTOBIOGRAFÍA



Nací el 10 de octubre del año 1984 en el Hospital de la Universidad Católica, en lo que podría decir fue el primer gran logro de mi vida; esto porque, diez días antes de mi nacimiento, mi madre - que llevaba a mi hermano de 4 años y medio al doctor - rodó por las escaleras desde un cuarto piso. Mientras ella debió ser operada al romperse su brazo en la caída, yo ni siquiera adelanté el día para mi llegada al mundo, naciendo el mismo día que fue previsto por el doctor meses antes del accidente, en lo que hoy pareciera ser un adelanto de mi personalidad actual - claramente no tenía ningún apuro en llegar.

Desde aquel día he vivido junto a mi familia viviendo una infancia tranquila y sin grandes sorpresas. Algo de eso cambió en los siguientes años. Desde séptimo básico hasta cuarto medio estudié en el Liceo N°7 de Niñas de Providencia, en donde pasé los mejores años de mi vida, fue ahí donde conocí a las que hasta el día de hoy son mis mejores amigas, y donde mis ganas por aprender nuevos temas en las distintas áreas del conocimiento comenzaron a verse satisfechas aunque, junto con querer aprender alemán y muchas otras cosas, también aprendí a llegar tarde. Muchos de los recuerdos más felices que tengo se remontan a aquellos años, en compañía de mis amigas y sin las presiones ni responsabilidades que los años venideros traerían.

Llegado el momento de salir del liceo y decidir por el camino que seguiría los siguientes años de mi vida, podría decirse que seguí un protocolo poco convencional. El día de las postulaciones aun no tenía clara mi decisión y, debatiéndome entre las dos opciones que más llamaban mi atención (Biotecnología y Bioquímica), preferí dejar la decisión a un juego de cachipún entablado con una amiga en el lugar donde se realizaban las postulaciones. El resultado fue favorable para biotecnología, pero días después parecía que el azar había tomado una elección en conflicto con mi destino, ya que al salir los resultados de las postulaciones aparecí primera en la lista de espera para biotecnología. Casi de forma increíble el azar justificó su decisión cuando la lista corrió un lugar, permitiéndome matricularme en la carrera.

A la luz de los buenos resultados que he obtenido a lo largo de estos años en la Universidad, de todo aquello que he aprendido tanto en clases como dentro del laboratorio y, de la gente que me ha tocado conocer en el camino, y de todos los amigos que he hecho dentro de la universidad, parece claro que la opción fue realmente la mejor de todas.



*"A mis padres,
por toda la dedicación,
el esfuerzo y el cariño que han puesto en mí.
Los adoro"*



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, Ramón y Eliana, quienes no sólo me han dado su apoyo económico, financiándome los estudios en su totalidad, sino que han sido el soporte que me ha mantenido firme todos estos años, confiando plenamente en mí sin dejar de estar pendientes de mi bienestar. Ustedes son mi orgullo, los amo.

También quiero agradecer a mi hermano Daniel, quien ha sido un excelente hermano, siempre dispuesto a escucharme y quién sé, tiene plena confianza en mí y en lo que pueda lograr.

No puedo dejar de lado a la Maite, quien toda la vida ha estado pendiente de mí, y a quien supongo nunca lograré retribuir todo lo que me ha dado.

Agradezco a mis amigas: Pepa, Poly, Rubí, quienes siempre me han apoyado, no sólo ahora, sino que en todos los años de amistad que llevamos juntas. También a mis amigas Triny y Pilar quienes han tenido la paciencia de escucharme cada vez que tengo problemas.

A los amigos que he hecho dentro de la universidad, quienes han sido el mejor premio que hubiera podido obtener al entrar a la carrera: Yu, Darío, Lore, quienes no sólo han sido simples compañeros de estudio, sino excelentes amigos. Además a mis compañeros de universidad quienes han hecho más liviano el paso a través de la universidad.

Agradezco a compañeros del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, quienes han hecho grato el periodo de desarrollo de mi tesis, siempre dispuestos a alegrarme el día. También agradezco a Angélica por la ayuda otorgada en el desarrollo de mi tesis. A mi tutora: Dra. L. Cardemil por el apoyo en el desarrollo de mi seminario de título, y a los profesores miembros del laboratorio por estar siempre dispuestos a ayudar.



INDICE DE CONTENIDO

AUTOBIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CONTENIDO	1
INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE FIGURAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1.- INTRODUCCIÓN.....	10
1.2.- HIPÓTESIS	14
1.3.- OBJETIVOS	14
1.3.1.- Objetivo general.....	14
1.3.2.- Objetivos específicos	14
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1.- MATERIALES.....	15
2.1.1.- Material Biológico.....	15
2.1.2.- Reactivos	15
2.1.3.- Software.....	15
2.2.- MÉTODOS	15
2.2.1.- Tratamiento hídrico	15
2.2.2.- Secado de tejido	16
2.2.3.- Proteínas Totales.....	16
2.2.3.1.- Extracción de proteínas.....	16
2.2.3.2.- Cuantificación de proteínas.....	17
2.2.4.- Análisis electroforético de las proteínas totales.....	17



2.2.4.1.- Obtención y denaturación de proteínas.....	17
2.2.4.2.- SDS- PAGE	18
2.2.4.3.- Visualización de proteínas, tinción de Plata	18
2.2.5.- Actividad SOD.....	19
2.2.5.1.- Actividad Total.....	19
2.2.5.2.- Tinción de actividad SOD en gel	20
2.2.5.2.1.- PAGE nativo.....	21
2.2.5.2.2.- Tinción.....	21
2.2.5.2.3.- Tratamiento con KCN.....	22
2.2.5.2.4.- Tratamiento con H ₂ O ₂	22
2.2.6.- Western Blot Mn-SOD.....	22
2.2.6.1.- Elección anticuerpos	22
2.2.6.2.- Obtención de proteínas.....	23
2.2.6.3.- SDS- PAGE	23
2.2.6.4.- Transferencia	23
2.2.6.5.- Detección	24
2.2.7.- Análisis estadísticos.....	25
3.- RESULTADOS	26
3.1.- Porcentaje de agua presente en tejido fotosintético.....	26
3.2.- Efecto del estrés hídrico en la concentración de proteínas	27
3.3.- Efecto del estrés hídrico en la actividad específica de SOD	29
3.4.- Identificación de las isoformas de superóxido dismutasa	32
3.5.- Expresión Mn-SOD (Western-Blot)	35
4.- DISCUSIÓN	38
5.- CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS.....	46



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Porcentaje de H ₂ O en el tejido verde con distintos tratamientos hídricos.....	26
Tabla 2.- Concentración proteínas en tejidos de Aloe vera en distintos tratamientos hídricos.	28
Tabla 3.- Actividad específica de SOD en hojas de Aloe vera sometidas a 4 diferentes tratamientos hídricos.....	30
Tabla 4.- Actividad total de SOD en hojas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos.	32
Tabla 5.- Resumen de las isoformas de SOD detectadas en el análisis de actividad en gel.....	35



INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Cantidad de proteínas totales presentes en relación al tipo de tratamiento hídrico.	28
Fig. 2.- Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa en plantas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos.....	31
Fig. 3.- Patrón de isoformas de superóxido dismutasa en hojas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos.....	34
Fig. 4.- Expresión de Mn-SOD.....	36
Fig. 5.- Gráfico Western Blot Mn-SOD.....	37



LISTA DE ABREVIATURAS

Longitud	metro	m, mm, μ m, nm, etc.
Volumen	litro	l, ml, μ l, etc.
tiempo	hora	h, min, s, ms, μ s
masa	kilogramo	kg, g, mg, μ g, etc
concentración	mol/l	M, mM, μ M, %(p/v), %(p/p)
masa molecular	daltons	Da, kDa
Temperatura	grados celsius	$^{\circ}$ C
potencial eléctrico	watt	W
voltaje eléctrico	Volts	V

Abreviaturas standard y convenciones

SOD	superóxido dismutasa
BSA	seroalbúmina de bovino
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
DMF	dimetil formamida
CAM	metabolismo ácido de las Crassulaceae
ABA	ácido abscísico

Técnicas

PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
ANOVA	análisis de varianza

RESUMEN

Aloe vera, es una planta de gran interés comercial, debido a las grandes propiedades que se le han atribuido: favorece la cicatrización, posee acción antibacteriana, antioxidante. Su mayor uso se encuentra actualmente en la industria cosmetológica, farmacéutica y últimamente entrando fuertemente a la industria alimenticia.

Ésta es una planta monocotiledónea y de metabolismo CAM, por lo que está naturalmente adaptada a condiciones de bajo recurso hídrico siendo así cultivable en terrenos semiáridos del norte de Chile, donde la escasez de agua y las altas temperaturas son condiciones de estrés para cualquier organismo. Sin embargo, para optimizar su cultivo en esta zona, se debe estudiar los mecanismos de tolerancia que posee esta planta, sus límites de tolerancia y la mantención de sus propiedades bajo estas condiciones. Debido a que la falta de agua aumentará en los próximos años, estos estudios podrán determinar las condiciones letales y subletales que puede resistir Aloe vera, para aconsejar a los agricultores los niveles óptimos de riego para esta planta.

Los resultados de este seminario muestran, que en condiciones de estrés hídrico, sólo se produce una disminución en el contenido de agua en los tejidos fotosintéticos de las puntas de las hojas de Aloe vera cuando el estrés es extremo. Además, la disminución de la disponibilidad de agua produce una disminución en la cantidad de proteínas presentes en las hojas de las plantas.

Bajo condiciones de estrés se puede producir un aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROS), los cuales son removidos por diversos mecanismos de defensa en la célula vegetal. Uno de los componentes de este mecanismo corresponde a la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la conversión del anión

superóxido a peróxido de hidrógeno y agua. En este seminario, se encontró que Aloe vera posee 2 clases de isoenzimas de SOD del tipo Cu/Zn-SOD y Mn-SOD, encontrándose 5 isoformas del tipo Cu/Zn-SOD y una del tipo Mn-SOD. La actividad de la enzima fue medida como actividad específica (U/mg proteína) y como actividad total (U/g tejido seco), encontrándose que en general existe una mayor actividad SOD en las puntas de las hojas que en las bases, y se encontró que existe un aumento de la actividad en hojas de plantas cuando existe un mayor estrés hídrico. Por otra parte, se observa que el aumento de actividad SOD en las puntas de las hojas no es dada por el tipo Mn-SOD, dado que la acumulación de ésta disminuye en esta zona de la hoja; en cambio existe una mayor acumulación de esta isoenzima en las bases de las hojas que en las puntas, pero disminuye drásticamente en plantas sometidas al tratamiento hídrico más extremo.

Luego, el mayor nivel de actividad superóxido dismutasa ocurre en plantas con un nivel de riego medio. Un menor riego produce bajos niveles de acumulación de proteínas y agua en los tejidos fotosintéticos y una baja acumulación de isoformas Mn-SOD.

ABSTRACT

Aloe vera, is a plant with great commercial interest because of the amount of properties that have been described, like foster healing, antibacterial action and antioxidant. Their increased use is currently in the pharmaceutical and cosmetologic industries, and recently entering strongly to the food industry.

This is a monocotyledone plant with CAM metabolism, which is naturally adapted to low water conditions, and can be grown in semi-arid lands of north of Chile, where water shortages and the high temperatures are stress conditions for any organism. However, to optimize this plant's cultivation, studies about the tolerance to the water stress must be done. Due to the water will be more scarce in the next coming years, and we can know the sublethal and lethal limits of this plant to water deficits and to advise agriculture about irrigation regimes for A. vera.

This work determined that under maximum conditions of water stress, there was a decrease in the water content of photosynthetic tissues of the tips of the leaves of aloe vera. In addition, the decrease in the availability of water causes a reduction in the amount of protein present in the leaves of plants.

Under conditions of stress an increase in reactive oxygen species (ROS) can be produced, but the plants have mechanisms of defense against these, being one of its components the enzyme superoxide dismutase (SOD), which catalyzes the conversion of superoxide anion to hydrogen peroxide and water. In this work was found that Aloe vera has 2 types of multiple forms of SOD type Cu/Zn-SOD and Mn-SOD, while 5 isoenzymes are Cu/Zn-SOD type and only one is Mn-SOD type. In general there was a greater SOD total and specific activity in the tips of the leaves of plants than in the bases of these, and was found that there was an increase in this activity in leaves of plants

under water stress. Moreover, was found that the increase in SOD activity in the tips of the leaves is mainly by the Cu/Zn-SOD isoforms rather than Mn-SOD type, because this form has a decrease in its expression in water stress conditions as we saw by Western Blot analysis, but there is a bigger accumulation of this isoform in the bases of the leaves, but this accumulation decrease in plant with less water availability.

This way, the biggest activity of SOD occurs in plants with a medium water treatment. A low water availability produces low levels of water and protein concentration in the photosynthetic tissues and a low presence of Mn-SOD isoforms.

1.- INTRODUCCIÓN

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) ha ganado popularidad en los últimos años como planta terapéutica, desarrollándose una fuerte industria farmacéutica y cosmetológica alrededor de ella (Reynolds y Dweck, 1999), estando presente como ingrediente en variados productos cosméticos y farmacéuticos. De las hojas de *Aloe vera* es posible obtener tres productos principales: la aloína, proveniente de la zona vascular, funciona como droga natural por su efecto catártico; el gel, presente en el centro de las hojas, es usado principalmente en la industria cosmetológica y farmacéutica; y una fracción lipídica de las hojas que sirve para la industria cosmetológica como transportador de pigmento y agente sedante (Vega G., 2005).

Debido a la creciente importancia económica el cultivo de *Aloe vera* se ha visto incrementado, encontrándose cultivos a gran escala en los terrenos semiáridos del norte de Chile, donde la escasez de agua y las altas temperaturas son condiciones de estrés para cualquier organismo. *Aloe vera* es una planta monocotiledónea, con un tipo de metabolismo CAM, adaptada a regiones áridas y calurosas, lo cual hace interesante el estudio de los mecanismos de tolerancia en esta planta, sus límites de tolerancia y la mantención de sus cualidades bajo estas condiciones extremas.

Especies reactivas del oxígeno (EROs), como lo son por ejemplo, aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) y singletes de oxígeno (1O_2) son producidos en condiciones fisiológicas en todos los organismos aeróbicos, y particularmente en plantas; siendo sintetizados principalmente en organelos como mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas (Foyer y Noctor, 2003). Sin embargo, la pérdida de agua puede causar por varias vías la acumulación de especies reactivas del oxígeno: durante la desecación la fijación de carbono es inhibida, pero el flujo de

electrones continúa y, radicales superóxido y peróxido de hidrógeno pueden ser producidos en el fotosistema II (Kranner y Lutzoni, 1999). Por otra parte, el estrés hídrico inhibe la actividad fotosintética en los tejidos debido a un desbalance entre la captura de energía y su utilización (Foyer y Noctor, 2000), a su se producen cambios en la fotoquímica de los cloroplastos en hojas de plantas produciéndose una disipación de exceso de energía en el Fotosistema II, generándose así especies reactivas del oxígeno. Los radicales superóxido a nivel de la cadena transportadora de electrones, la cual se ve perturbada en condiciones de desecación, produciéndose una mayor reducción de oxígeno (Reddy et al., 2004). En los peroxisomas se producen $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en sus reacciones metabólicas (Del Rio et al., 2006) y, aunque en plantas verdes la mayor producción de EROs está dada en los cloroplastos y peroxisomas, en las mitocondrias también se produce $O_2^{\cdot-}$ a nivel de los complejos I y III (Foyer y Noctor, 2003).

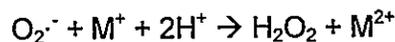
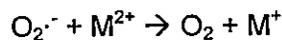
Las células de las plantas y sus organelos contienen sistemas para la reducción de la concentración de EROs, estos pueden ser sistemas enzimáticos, como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), glutatión reductasa (GR) y monodehidroascorbato reductasa (MDAR); y moléculas detoxificadoras, como: flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E y glutatión. Si los niveles de EROs aumentan por sobre la capacidad de remoción de la célula, se produce un estrés oxidativo, llegando a producirse múltiples daños en los distintos componentes celulares, una pérdida de función de los organelos, reducción en el metabolismo, mutaciones en el genoma y, finalmente, producir la muerte celular (Møller et al., 2007).

Sin embargo, las especies reactivas del oxígeno no siempre se deben asociar a daño celular, pues en plantas cumplen roles fundamentales en señalización, como es el caso de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en la superficie externa de la membrana plasmática en el

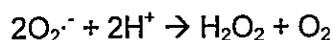
reconocimiento de patógenos (Torres y Dangl, 2005). Son estos mismos EROs los que actúan como señales para producir la respuesta de defensa de la planta; siendo ésta dependiente de diversos factores, como de la clase de ERO que estén aumentado, de la concentración, del sitio de producción, de las interacciones con otras moléculas y del estado en que se encontraba la célula previo al aumento de estos EROs (Gechev et al., 2006).

La defensa de la plantas frente a los EROs es distinta entre diferentes especies de plantas e inclusive entre variedades de la misma especie, pues el grado de actividad de cualquiera de la enzimas antioxidantes, o la cantidad de las moléculas detoxificadoras durante el estrés hídrico es variable (Reddy et al., 2004). Además, como probablemente, no todas las defensas de la planta son utilizadas al mismo tiempo, es posible que los organismos hayan desarrollado una combinación definida de estos mecanismos cuando los necesitan (França et al., 2007). Es por ello que es importante entender la fisiología y la participación bioquímica de la tolerancia a estrés hídrico en diferentes organismos y tejidos.

La defensa primaria frente a la toxicidad de EROs involucra la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra desde microorganismos hasta humanos al menos en uno de sus tipos. Esta enzima, es la encargada de la catálisis de conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno, por las siguientes reacciones parciales (Scandalios, 2005):



Siendo la reacción completa:



Donde M^+ se refiere al metal usado como cofactor por SOD en su forma reducida

y M^{2+} al cofactor en su forma oxidada.

El peróxido de hidrógeno también es un producto tóxico para las células, así que es rápidamente transformado a agua y oxígeno bajo una reacción catalizada por las catalasas.

Dado que las membranas de fosfolípidos son impermeables a moléculas de $O_2^{\cdot-}$ cargadas (Takahashi y Asada, 1983), es necesario que las enzimas de superóxido dismutasa se encuentren en los compartimentos donde los radicales superóxidos son producidos. Dependiendo del cofactor usado por la enzima SOD, se clasifican en tres grupos: SOD unido a hierro (Fe-SOD) ubicado en los cloroplastos, SOD unido a manganeso (Mn-SOD) encontrados en las mitocondrias y peroxisomas, y SOD unido a cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) ubicados en los cloroplastos y citosol (Alscher et al., 2002). Las enzimas Cu/Zn-SOD poseen una masa molecular alrededor de 32kDa consistente en dos subunidades idénticas, cada una contiene una molécula de Cu^{2+} y Zn^{2+} en su sitio activo. Las enzimas del tipo Mn-SOD tienen una masa molecular entre 40kDa y 46kDa, en general consiste en un dímero con subunidades idénticas y cada una posee una molécula de Mn^{3+} en su sitio activo; también se han encontrado formas tetraméricas de la enzima (Alscher et al., 2002). La isoforma Fe-SOD no se encuentra presente en animales, y se ha reportado su presencia en algunas plantas como *Arabidopsis thaliana* (Kliebenstein, 1998) y arroz (*Oryza sativa*) (Feng, 2006). A diferencia de muchos organismos que poseen solo una enzima de cada tipo en sus compartimentos celulares, las plantas poseen múltiples formas de cada tipo de SOD codificadas en más de un gen (Scandalios, 1997). En Aloe vera se ha reportado la presencia de cinco isoenzimas del tipo Cu/Zn-SOD y dos del tipo Mn-SOD (Sabeih, F. 1996).

Debido quizás a la distinta ubicación dentro de la célula, se ha visto que cada tipo isoforma de superóxido dismutasa responde de forma distinta a los estrés a que pueda

ser sometida una planta (Drazkiewicz, 2007).

1.2.- HIPÓTESIS

“Aloe vera puede tolerar bien las restricciones de agua debido a que el estrés oxidativo inducido por el estrés hídrico es mitigado por un aumento de la actividad de superóxido dismutasa”.

1.3.- OBJETIVOS

1.3.1.- Objetivo general

Cuantificar la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa y determinar el patrón de actividad y presencia de sus distintas isoenzimas en hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico.

1.3.2.- Objetivos específicos

- 1 Identificación de los efectos del estrés hídrico en el contenido de agua del tejido fotosintético y concentración de proteínas en Aloe vera.
- 2 Identificación de las isoenzimas de Superóxido Dismutasa.
- 3 Cuantificación de la actividad de SOD en Aloe vera en distintas condiciones de riego.
- 4 Determinación de la acumulación de Mn-SOD en Aloe vera en distintas condiciones de riego.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- MATERIALES

2.1.1.- Material Biológico

El tejido utilizado proviene de plantas de *Aloe barbandesis* Miller de aproximadamente 3 años de edad, cultivadas en el Campo Experimental Las Cardas, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, en la IV Región.

2.1.2.- Reactivos

Los reactivos utilizados son de Merck y Sigma-Aldrich con calidad de análisis.

2.1.3.- Software

Para los análisis estadísticos y gráficos se utilizó el software Graphpad Prism 5. Para la determinación de la intensidad de banda mostrada en Western Blot, se utilizó la herramienta de análisis de densitometría del software ImageJ.

2.2.- MÉTODOS

2.2.1.- Tratamiento hídrico

Las plantas de Aloe vera fueron regadas cada 15 días, con un caudal de 1,6 L/h*planta. El tiempo de riego corresponde a los distintos tratamientos hídricos: T1- 60 min. T2- 45 min. T3- 30 min. T4- 15 min. Para este estudio, se utilizaron las hojas de cada planta sometida a estos tratamientos hídricos, utilizando dos zonas distintas de ella: las bases (zonas en crecimiento) y las puntas de las hojas. Así cada muestra es diferenciada por el tratamiento hídrico (T1, T2, T3 y T4) y por la zona de la hoja utilizada para la extracción de proteínas (P: punta, B: base). A su vez, se utilizó 3 replicas biológicas en

cada uno de los tratamientos hídricos.

2.2.2.- Secado de tejido

Para determinar la cantidad de agua presente en cada muestra de tejido vegetal utilizado para este estudio, se cortaron aproximadamente dos gramos de tejido fotosintético (sin gel) de las hojas de Aloe vera con cada tratamiento hídrico, tanto en bases como puntas de las hojas. El tejido fue pesado y colocado en tubos eppendorf por separado, para luego ser colocado durante 6 horas en una estufa de secado a 80°C. Después de este tiempo, y encontrándose el tejido completamente seco, se volvió a pesar. El porcentaje de agua se calcula utilizando como 100% el peso fresco, el peso seco corresponde a cierto porcentaje del peso fresco, y luego la diferencia indica el porcentaje de agua presente en el tejido.

2.2.3.- Proteínas Totales

2.2.3.1.- Extracción de proteínas

La extracción se realizó a partir de 2 gramos de tejido fotosintético de las hojas de Aloe vera sometidas a cada tratamiento hídrico, evitando extraer el gel; y se utilizó muestras separadas para las zonas de las puntas y de las bases de las hojas.

El tejido fue congelado rápidamente en N₂ líquido, para luego ser molido en un molinillo de café, con el cuidado de que el tejido no se descongele, utilizando N₂ líquido cuando sea necesario. Una vez que el tejido se encuentra bien molido, se traspasó a un tubo Corex de 30mL y se agregó 10mL de Búffer de Extracción (Fosfato de Potasio Monobásico 100mM, PVP-40 1% EDTA 2mM, pH 7,0) y se vortexeo a máxima velocidad durante 30 seg. PVP-40 o polivinilpirrolidona de peso molecular 40kDa, es un polímero que se asocia a compuestos fenólicos y alcaloides permitiendo su remoción, así éstos no

modifican las proteínas y no interfieren con la determinación espectrofotométrica del contenido de proteínas.

Una vez que el tejido fue homogeneizado se centrifugó a 8.500 rpm durante 12 minutos a 4°C, en una centrífuga Sorvall® RC-5B. El sobrenadante fue extraído y alicuotado en tubos eppendorf, para ser almacenado a -20°C hasta su utilización.

2.2.3.2.- Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales fueron cuantificadas en duplicado por el método de Bradford (Bradford, 1976). La solución de Bradford (Comassie Blue 0.01%, Etanol 5%, H₃PO₄ 8,5%) fue preparada con 100mg Coomassie Brilliant Blue G 250, disueltos en 50mL de etanol 95%, la mezcla se agitó durante 10 min para luego agregar 100mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85% p/v. Luego se diluyó hasta un volumen final de 1L con H₂O desionizada. Finalmente la mezcla fue filtrada utilizando un filtro Rundfilter MN 617 con calidad de análisis.

Se preparó una curva de calibración utilizando seroalbúmina de bovino (BSA), con concentraciones que van desde 0 a 10µg/mL. La medición de proteínas se realizó utilizando 5µL de cada extracto de proteínas, en un volumen final de 4 mL y la absorbancia fue leída a 595nm en un espectrómetro PerkinElmer Lambda EZ201 (UV/Vis).

2.2.4.- Análisis electroforético de las proteínas totales

2.2.4.1.- Obtención y denaturación de proteínas

La extracción para la proteínas se realizó del mismo modo descrito en el punto 2.2.3.1, una vez determinada la concentración de proteínas del extracto por el método de Bradford, se calculó el volumen necesario para obtener 10µg de proteínas totales, y se

colocó este volumen de cada muestra en un tubo eppendorf, agregando igual volumen de Búffer de Carga 2x (Tris-HCl 100mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 200mM; SDS 4% p/v, azul de bromofenol 0,2% p/v; glicerol 20% v/v). Luego, estos tubos se colocaron en un baño termostático a 60°C durante 15 minutos.

2.2.4.2.- SDS- PAGE

Se realizaron geles de poliacrilamida, a partir de una solución de acrilamida:bis-acrilamida 30:0,8. EL gel separador fue preparado al 12% (Tris 0,375M pH 8,8; SDS 0,1%) y el gel concentrador al 4% (Tris 0,125M pH 6,8 SDS 0,1%). Para la preparación del gel se utilizó como polimerizador TEMED, como catalizador se utilizó Persulfato de amonio 10%, y un Búffer Tris-HCl 0,5M pH 8,8 para el caso del gel separador y un Búffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8 para el gel concentrador. El búffer de corrida corresponde a un búffer Tris 0,025M pH 8,3, Glicina 0,19M, SDS 0,1%.

Se cargó todo el volumen de las muestras tratadas y se utilizó el estándar de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards #161-0373, Bio-Rad Laboratories. Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-Rad MiniProtein® TetraCell) a 100V durante 2 horas, siendo la dirección de migración del gel de cátodo a ánodo.

2.2.4.3.- Visualización de proteínas, tinción de Plata

La visualización de la totalidad de las proteínas se realizó mediante tinción de plata (Nielsen y Brown, 1984), tanto para geles nativos, como para geles en condiciones denaturantes. Primero, el gel fue fijado con una solución de Ácido Acético 10% v/v con Metanol 30% v/v, siendo incubado en éste durante 1 hora. Después el lavado se realizó con Etanol 30% v/v 3 veces, durante 15 minutos cada vez, en agitación continua; finalmente, se realizaron dos lavados con H₂O desionizada durante 10 minutos. La

sensibilización es realizada mediante la incubación con 100 mL de Ditionito de Sodio ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2$) 1,4mM durante 1 minuto, realizando, posteriormente, 3 lavados con agua desionizada durante 20 segundos. La tinción fue hecha incubando el gel con 100 mL de una solución de Nitrato de Plata (AgNO_3) 11,8mM con formaldehído 8,1‰ v/v durante 20 minutos. Luego, se lavó una vez durante 1 minuto con agua desionizada y se procedió al revelado con 100 mL de una solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) 0,57M con formaldehído 48,4‰ v/v. Una vez que las bandas fueron reveladas se realizó la fijación adicionando 100 mL de una solución de Ácido Acético 3,5% v/v y se incubó durante al menos 1 hora. Finalmente se lavó con H_2O desionizada 4 veces durante 30 minutos cada vez y el gel fue almacenado en Etanol 20% v/v a 4°C.

2.2.5.- Actividad SOD

2.2.5.1.- Actividad Total

La actividad fue determinada utilizando la capacidad de la enzima superóxido dismutasa de inhibir la reducción fotoquímica del nitroblue tetrazolium (NBT) a formazán, basado en el método de Giannopolotis y Ries con algunas modificaciones (Giannopolotis y Ries, 1977). El método se basa en la capacidad de los radicales superóxido para reducir el nitroblue tetrazolium (NBT) generándose formazán, un compuesto de color azul insoluble en agua. Estos radicales superóxido son producidos en una reacción mediada por TEMED, ya que éste es capaz de reducir la riboflavina, la cual rápidamente vuelve a oxidarse en cuyo proceso se libera $\text{O}_2^{\cdot-}$. La actividad de la enzima SOD es detectada por su capacidad de remover los radicales superóxido, impidiendo la formación de formazán. Una unidad enzimática es definida como la cantidad de proteína necesaria para disminuir en un 50% la reducción de NBT, considerándose para determinar dicho porcentaje que un 100% de reducción se produce en una reacción sin

extracto de proteínas.

Para la medición de actividad fue preparado un Búffer de reacción (Fosfato de Potasio Monobásico 50mM pH 7,8, EDTA 100mM), y soluciones separadas de Metionina 200mM, NBT 5mM y Riboflavina 1mM.

Se utilizaron tubos de ensayo de 3ml exactamente iguales entre sí, para que las diferencias en la cantidad de NBT reducido no estén dadas por la diferencia en la entrada de luz a los tubos. Se prepararon 6 tubos de reacción con 3mL de Fosfato de Potasio 50mM, EDTA 100mM, Metionina 13mM, NBT 75 μ M, y distintos volúmenes de extracto de proteínas de cada muestra, desde 0 μ L hasta la cantidad en que ya no ocurre variación en la absorbancia (30 μ L a 40 μ L). Para iniciar la reacción a cada tubo se le agregó Riboflavina con una concentración final de 2 μ M, se agitaron rápidamente y fueron colocados a 10cm de una luz blanca proveniente de una lámpara fluorescente de 20 W, durante 15 minutos.

Al finalizar los 15 minutos, la luz fue apagada, los tubos cubiertos de la luz, y la absorbancia de cada uno fue medida a 560nm. Se utilizó como blanco un tubo sin extracto de las plantas y sin irradiación con luz.

La absorbancia versus el volumen de extracto fue graficada y, considerando que a volumen 0 hay un 0% de inhibición por parte de SOD se calculó el volumen en que ocurre el 50% de inhibición, o sea el volumen en que la absorbancia disminuye a la mitad. Conociendo las concentraciones de cada extracto fue posible determinar la cantidad de proteínas necesaria para producir un 50% de inhibición en la reducción de NBT.

2.2.5.2.- Tinción de actividad SOD en gel

Para analizar la actividad de las distintas isoenzimas de superóxido dismutasa se utilizó el mismo principio utilizado para la medición de la actividad SOD descrito en el

punto 2.2.5.1. La metodología utilizada está basada en la metodología de Beauchamp y Fridovich (Beauchamp y Fridovich, 1971), con algunas modificaciones (Flohé L, y Ötting F., 1984).

2.2.5.2.1.- PAGE nativo

Se preparó un gel de poliacrilamida sin SDS, usando un gel separador al 12% (Tris 0,375M pH 8,8) y un gel concentrador al 4% (Tris 0,125M pH 6,8).

Las muestras de proteínas se descongelaron en hielo y se cargaron rápidamente 4µg de proteínas de cada una de las muestras. El gel se corrió en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-Rad MiniProtean® TetraCell) a una temperatura constante de 4°C durante 6 horas a 80V, siendo la dirección de migración de cátodo a ánodo. El Búffer de corrida utilizando corresponde a un buffer Tris 0,025M, Glicina 0,19M, pH 8,3.

2.2.5.2.2.- Tinción

Inmediatamente finalizado el tiempo de electroforesis, el gel fue incubado con agitación continua en 100ml de una solución de NBT 0,3mM y Riboflavina 0,27mM en oscuridad a 4°C durante 20 minutos, tiempo tras el cual el exceso de reactivo fue eliminado, y el gel lavado con agua destilada durante 10 segundos. Posteriormente, el gel fue colocado en una fuente de vidrio transparente y sobre un transiluminador de 100W, a la vez que se agregaron 100 ml de una solución de TEMED 1% v/v, el gel se mantuvo bajo esta fuente de luz durante 5 minutos, siendo este el momento cuando ocurre la reducción fotoquímica del NBT, quedando así el gel teñido por completo de un color azul, excepto en las zonas donde se encuentran las isoenzimas de superóxido dismutasa, generando unas bandas incoloras. Finalmente el gel fue lavado 2 veces durante 5 minutos con agua desionizada para eliminar el exceso de reactivos.

2.2.5.2.3.- Tratamiento con KCN

Para inhibir las isoformas de SOD que utilizan como cofactor Cobre y Zinc, posterior a la electroforesis el gel fue incubado en KCN 2mM, durante 10 minutos, siguiendo con un lavado con agua destilada durante 30 segundos, para proseguir con el proceso de tinción de actividad descrito anteriormente.

2.2.5.2.4.- Tratamiento con H₂O₂

Después de la electroforesis, el gel fue incubado en H₂O₂ 5mM, durante 30 minutos, con el fin de inhibir las isoformas de Fe-SOD. Luego, el gel fue lavado con agua destilada durante 10 segundos, para continuar posteriormente con el proceso de tinción de actividad descrito.

2.2.6.- Western Blot Mn-SOD

2.2.6.1.- Elección anticuerpos

Para la selección de anticuerpos comerciales se privilegió la elección de anticuerpos que reconocieran secuencias específicas y conservadas para poder analizarlos. Uno de los anticuerpos candidatos de Sigma-Aldrich fue desarrollado por ellos, utilizando como inmunogen un péptido sintético que corresponde a los residuos aminoacídicos 183-199 de la enzima MnSOD de humano; las secuencias de estos residuos aminoacídicos correspondientes se buscaron en la página web de National Center for Biotechnology Information (NCBI), con número de acceso [AAA36622](#), correspondiendo a la secuencia aminoacídica: DVWEHAYYLQYKNVRPD. Además, se realizó un Blast para determinar la posibilidad de que otras proteínas que contengan el péptido y el rango de organismos que lo posean, y se observó que sólo está presente en Mn-SODs de una gran variedad de organismos, incluyendo plantas monocotiledóneas como: *Oryza sativa* e *Triticum aestivum*. De esta forma este anticuerpo (S5069,

Sigma-Aldrich) fue seleccionado para la detección de Mn-SOD en Aloe vera. Este anticuerpo fue desarrollado en conejo, con una adición en el N terminal de cisteína.

2.2.6.2.- Obtención de proteínas

La extracción de las proteínas se realizó del mismo modo descrito en el punto 2.2.3.1. Una vez determinada la concentración del extracto por método de Bradford, se calculó el volumen necesario para obtener 10µg de proteínas para cada una de las muestras, y este volumen se trató con igual volumen de Búffer de Carga 2x (Tris-HCl 100mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 200mM; SDS 4% p/v, azul de bromofenol 0,2% p/v; glicerol 20% v/v), siendo incubados durante 15 minutos en un baño termoregulado a 60°C.

2.2.6.3.- SDS- PAGE

Se realizó del mismo modo que el SDS-PAGE descrito para la visualización de proteínas totales, utilizando un gel separador al 12% Tris 0,375M pH 8,8; SDS 0,1% y un gel concentrador al 4% Tris 0,125M pH 6,8 SDS 0,1%. Cada carril fue cargado con 10µg de proteínas de las 8 muestras y 3µl del estándar de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards #161-0373, Bio-Rad Laboratories.

La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-Rad MiniProtean® TetraCell) a 100V durante 3 horas, con una dirección de migración de cátodo a ánodo, y utilizando un búffer de corrida de Tris 0,025M pH 8,3, Glicina 0,19M, SDS 0,1%.

2.2.6.4.- Transferencia

La transferencia se realizó sobre una membrana de celulosa (MicroFiltration Systems). El gel, la membrana y los papeles filtro (Extra thick blot paper Bio-Rad), siendo

todos del mismo tamaño, se incubaron por separado durante 10 min en el Búffer de Transferencia (Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% v/v).

La transferencia se realizó en una cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad), con una dirección de transferencia de cátodo a ánodo, durante 15 min a 15V.

Una vez terminada la transferencia, se lavó la membrana con TBST (Tris-HCl pH 7,6; 20mM, NaCl 137mM, Tween20 0,1% v/v) durante 15 seg. Posteriormente, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0,1% p/v, Ácido Tricloroacético 7% p/v) para verificar la transferencia de las proteínas. Luego, la membrana fue lavada 3 veces durante 10 seg. con H₂O desionizada y finalmente se terminó de desteñir con un lavado con TBST durante 10 seg.

2.2.6.5.- Detección

La membrana fue bloqueada con un Búffer de Bloqueo (BSA 5% p/v en TBST), durante toda la noche a 4°C. Después ésta fue lavada 3 veces con TBST durante 10 min con agitación continua. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-MnSOD) en una dilución 1µg/ml en Búffer de Bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo la membrana fue lavada 3 veces con TBST durante 10 minutos y posteriormente fue incubada con el anticuerpo secundario unido a fosfata alcalina (anti-rabbit Sigma-Aldrich) en una dilución 1:10.000 en Búffer de Bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavó 3 veces durante 10 min con TBST y se incubó la membrana con el Búffer de Detección (Tris-HCl 0,1M NaCl 0,1 M pH 9,5) durante 15 minutos. Posteriormente, se reveló con 20ml de Búffer de Reacción (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl₂ 4mM, NBT 0,1% p/v, pH 9,5) y 200µl de una solución que contiene 5mg de BCIP 1ml de DMF (dimetil formamida).

2.2.7.- Análisis estadísticos

Los análisis fueron realizados mediante ANOVA de 1 vía. Para comparar diferencias entre los distintos grupos de tratamientos se utilizó Test de Tukey. Las comparaciones fueron consideradas significativas cuando se obtiene un valor de probabilidad igual o menor a 0,05.

3.- RESULTADOS

3.1.- Porcentaje de agua presente en tejido fotosintético

El secado del tejido permitió determinar la cantidad de agua presente en los tejidos fotosintéticos de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos hídricos (T1, T2, T3 y T4) (Tabla 1), encontrándose que, entre las plantas de Aloe vera sometidas a distintos regímenes hídricos, sólo se produce una disminución significativa del contenido de agua en el tejido fotosintético en las puntas de las hojas en plantas sometidas al tratamiento 4, produciéndose una disminución del 30,1% con respecto a la misma zona de la hoja en plantas control (tratamiento1).

Tabla 1.- Porcentaje de H₂O en el tejido verde con distintos tratamientos hídricos. Se presentan los promedios con sus desviaciones estándar. Las letras indican los resultados estadísticamente similares (indicados con a) y los distintos (b); los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA, puntas: $p \leq 0,00328$, bases: $p \leq 0,7$ con análisis a posteriori de Tukey ($p \leq 0,05$).

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Puntas	73,4 ± 4,7 a	76,2 ± 2,3 a	69,6 ± 10,1 a	51,2 ± 1,7 b
Bases	81,5 ± 2,9 a	83,6 ± 0,4 a	80,5 ± 5,2 a	79,9 ± 5,4 a

Con estos resultados se observa que el estrés hídrico no produce una disminución en la cantidad de agua presente en cualquiera de las zonas de la hoja, exceptuando en las puntas del tratamiento 4 donde vemos que se produce una reducción en el contenido de agua en las hojas de estas planta, este efecto sólo se produce en las puntas de las hojas y no así en las bases. Cabe destacar que estos resultados tratan sobre el tejido fotosintético, y no sobre los efectos en el contenido de

gel de la hoja, principal sitio de almacenaje de agua en la planta.

3.2.- Efecto del estrés hídrico en la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los tejidos fotosintéticos de las bases y puntas de las hojas de plantas de Aloe vera fue determinada, con el fin de determinar si el estrés hídrico produce un cambio en la acumulación de proteínas presentes. La concentración se determinó como mg de proteínas por gramo de tejido seco (tabla 2).

Como primer resultado se observa que se presenta una menor cantidad de proteínas en las puntas de las hojas que en las bases de éstas, en todos los tratamientos hídricos, encontrándose porcentajes de proteínas en los ápices que van desde 69% al 50% de la concentración presente en las bases, dependiendo del tratamiento hídrico.

Además, en ambos tejidos (puntas y bases) se produce una disminución significativa en la concentración de proteínas en plantas con los tratamientos 3 y 4 (regadas con 4 y 2 litros de agua cada 15 días respectivamente), tanto en las puntas como en las bases de las hojas. La concentración de proteínas en el tratamiento 4, en comparación con el tratamiento 1 (control) disminuye en un 60% en las puntas, mientras que en las bases de las hojas se produce una disminución del 45%.

En la Figura 1 se puede visualizar una clara tendencia de disminución en la concentración de proteínas cuando se produce una disminución de la cantidad de agua disponible, observándose que el tratamiento hídrico tiene un efecto sobre la cantidad de proteínas presentes, y que existe una diferencia de concentración dependiendo de la zona del tejido analizado.

Tabla 2.- **Concentración proteínas en tejidos de Aloe vera en distintos tratamientos hídricos.** La concentración se encuentra expresada en mg de proteínas por gramo de tejido seco, se muestran promedios con sus desviaciones estándar. Los resultados estadísticamente distintos se expresan con las distintas letras asignadas, teniendo asignada la misma letra los resultados estadísticamente similares entre sí. ANOVA, $p \leq 0,001$; análisis a posteriori de Tukey ($p \leq 0,05$).

	Tratamiento 1 mg/g p.s.	Tratamiento 2 mg/g p.s.	Tratamiento 3 mg/g p.s.	Tratamiento 4 mg/g p.s.
Puntas	8,301 ± 1,131 a	7,576 ± 1,272 a	5,789 ± 0,356 b	3,322 ± 0,928 c
Bases	12,100 ± 1,595 d	12,370 ± 1,344 d	8,871 ± 1,307 e	6,675 ± 2,248 e

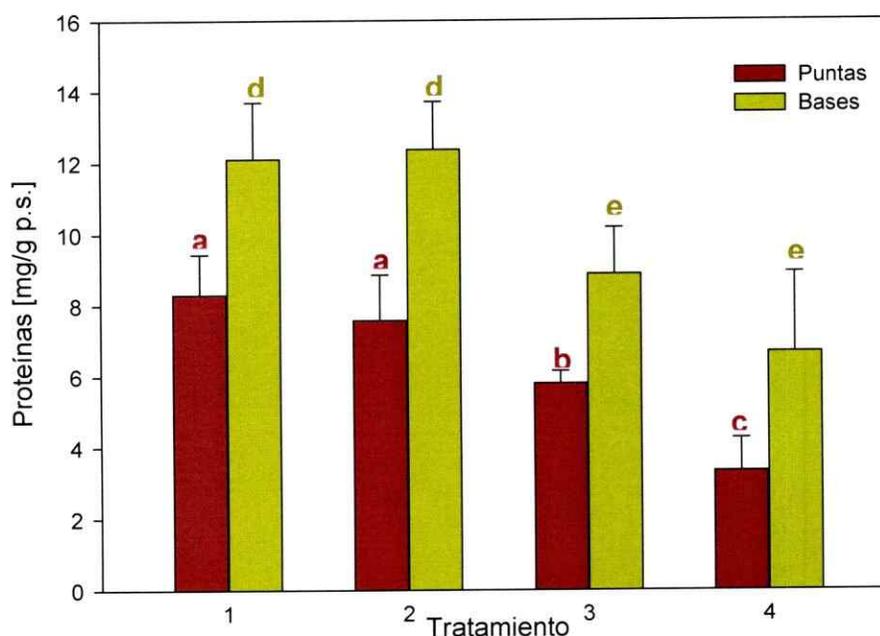


Fig. 1.- **Cantidad de proteínas totales presentes en relación al tipo de tratamiento hídrico.** La cantidad de proteínas están expresadas en mg de proteína por gramo de tejido seco, las barras representan valor promedio con desviación estándar (n=5) ANOVA ambos tejidos $P \leq 0,001$. Las letras sobre las barras indican si los resultados son estadísticamente similares o diferentes (análisis a posteriori de Tukey $p \leq 0,05$), letras iguales indican que el contenido de proteína es el mismo entre sí, mientras que letras distintas muestran los tejidos y tratamientos con un contenido de

proteínas distinto.

De este modo, en ambas zonas de las hojas (bases y puntas) se produce una disminución en la concentración de proteínas de las plantas que son sometidas a los tratamientos hídricos 3 y 4, produciendo, este último, una disminución de proteínas aun más radical. Por lo tanto, se observa que existe una relación entre la cantidad de proteínas y la disponibilidad de agua de las plantas, además de observarse una relación entre la cantidad de proteínas y la zona de la hoja analizada.

3.3.- Efecto del estrés hídrico en la actividad específica de SOD

Los niveles de actividad de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) fueron determinados en distintas zonas de la hoja de plantas sometidas a los diferentes tratamientos hídricos, con el fin de determinar si la falta de disponibilidad de agua cambia la actividad de SOD, la única enzima encargada de la eliminación de los radicales superóxido, parte de los radicales participantes del estrés oxidativo desencadenado por el estrés hídrico.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad es significativamente distintas en las diferentes zonas de la hojas utilizadas; es así como se puede observar que existe una mayor actividad en los ápices (puntas) de las hojas que en las bases en todos los tratamientos hídricos, encontrándose que esta diferencia es aun mayor en las plantas sometidas a los tratamientos 3 (Tabla 3).

Tabla 3.- Actividad específica de SOD en hojas de Aloe vera sometidas a 4 diferentes tratamientos hídricos. La actividad de SOD es expresada en U/mg (actividad por mg de proteína total). Se presentan valores promedios \pm desviación estándar (n=3). Las letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a análisis de Tukey. Análisis ANOVA $p \leq 0,03$; análisis a posterior de Tukey $p \leq 0.05$.

	Tratamiento 1 U/mg	Tratamiento 2 U/mg	Tratamiento 3 U/mg	Tratamiento 4 U/mg
Puntas	128,71 \pm 26,32 a	155,27 \pm 25,40 a	259,58 \pm 13,12 b	186,90 \pm 35,47 a
Bases	68,33 \pm 15,01 c	98,38 \pm 15,03 d	87,35 \pm 3,38 c/d	103,65 \pm 6,39 d

Por otra parte, en relación con el tratamiento hídrico ocurre un aumento de la actividad específica tanto en las puntas de las hojas como en las bases. En plantas sometidas al tratamiento 3 se observa que ocurre el mayor aumento de un 100% con respecto al control (tratamiento 1) en las puntas de las hojas. En las bases el mayor aumento ocurre en las plantas sometidas al tratamiento 4, aumentando aproximadamente un 50% con respecto al control (Fig. 2).

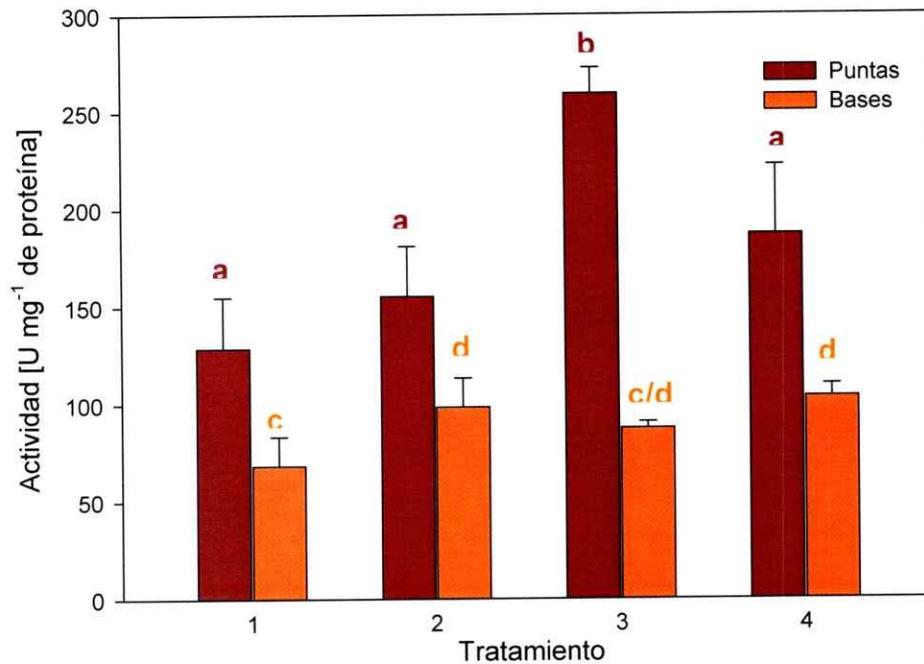


Fig. 2.- **Actividad específica de la enzima superóxido dismutasa en plantas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos.** La actividad está representada por unidad de actividad por mg de proteína, las barras representan valor promedio con su desviación estándar (n=3). ANOVA puntas $p \leq 0,002$, bases $P \leq 0,021$. Las diferentes letras (a, b, c y d) indican diferencias significativas, determinadas mediante análisis de Tukey $p \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos, muestran que al haber una disminución en la disponibilidad de agua se produce un aumento en la actividad total de la enzima superóxido dismutasa, este aumento resulta mayor en las puntas que en las bases en plantas sometidas al hídrico 3; mientras que en plantas bajo el tratamiento hídrico más extremo (T4) el aumento de la actividad SOD no resulta significativo y es menor que el nivel de actividad encontrado en las plantas sometidas al tratamiento 3. Los resultados encontrados para las bases de las hojas son diferentes, ya que el aumento de actividad

de SOD se produce ya en plantas sometidas al tratamiento 2, aunque estos niveles de actividad no llegan a ser tan altos como los encontrados en las puntas de las hojas.

Para determinar la actividad total en las hojas y por lo tanto el grado de protección por parte de SOD en las hojas (Tabla 4), se calculó la actividad por gramo de tejido seco, obteniéndose que la mayor actividad en la puntas de las hojas ocurre en plantas sometidas al tratamiento 3, mientras que con el tratamiento más extremo (tratamiento 4) la actividad disminuye. En las bases, la mayor actividad se encuentra en plantas sometidas al tratamiento 2, disminuyendo esta actividad en plantas sometidas a los tratamientos hídricos 3 y 4.

Tabla 4.- **Actividad total de SOD en hojas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos.** La actividad total se encuentra expresada en U/g p.s (actividad por g de peso seco). Los valores son expresados con su promedio \pm desviación estándar (n=3). Las letras contiguas a cada resultado son (a) promedios igual a los controles (tratamiento 1), (b) promedio significativamente mayor que el control, (c) promedio significativamente menor que el control. Analizados mediante análisis de Tukey $p \leq 0,05$.

	Tratamiento 1 U/g p.s.	Tratamiento 2 U/g p.s.	Tratamiento 3 U/g p.s	Tratamiento 4 U/g p.s
Puntas	1068,43 \pm 218,50 a	1176,29 \pm 192,42 a	1502,73 \pm 75,97 b	620,87 \pm 117,83 c
Bases	826,75 \pm 181,63 a	1216,98 \pm 185,94 a	774,85 \pm 29,95 c	691,85 \pm 42,67 c

3.4.- Identificación de las isoformas de superóxido dismutasa

Un siguiente paso, luego de observar el aumento de actividad total de la enzima superóxido dismutasa, fue determinar cuales son las isoformas de la enzima que actúan en estas condiciones, para ello se realizó un PAGE nativo, con el cuidado de mantener las enzimas activas, seguido de una tinción de actividad (Fig. 3a).

Una vez realizada la tinción de actividad, se puede observar que existe un patrón similar de bandas para todas las muestras, donde se pueden observar al menos 6 bandas de actividad. Los valores de Rf para cada una de las bandas son: 0,12 ; 0,21 ; 0,37 ; 0,53 ; 0,58 y 0,70 (Tabla 5). La primera banda de actividad con un Rf de 0,12 es ancha observándose más bien como una gran mancha de actividad, en cambio las otras 5 bandas se presentan bastante definidas; de todas estas bandas las que presentan mayor actividad son las bandas 3 y 6 de Rf 0,37 y 0,70 respectivamente. Se observa también que las bandas 4 y 5 (Rfs 0,53 y 0,58 respectivamente) pueden ser observadas con mayor facilidad en las muestras provenientes de las puntas que en las muestras proveniente de las bases.

Un tratamiento previo con KCN causa una inhibición en la actividad de las isoenzimas de SOD que utilizan como cofactor Cu y Zn, así es posible determinar que 5 de las 6 bandas de actividad previamente mencionadas corresponden a isoformas de Cu/Zn-SOD (Fig. 3b). La incubación con H₂O₂ permitió dilucidar la identidad de la isoenzima resistente a KCN, que ya el peróxido de hidrógeno inhibe las isoformas Fe-SOD, de este modo, luego del tratamiento con peróxido de hidrógeno se determinó que la isoforma resultante corresponde a una isoforma Mn-SOD (Fig. 3d).

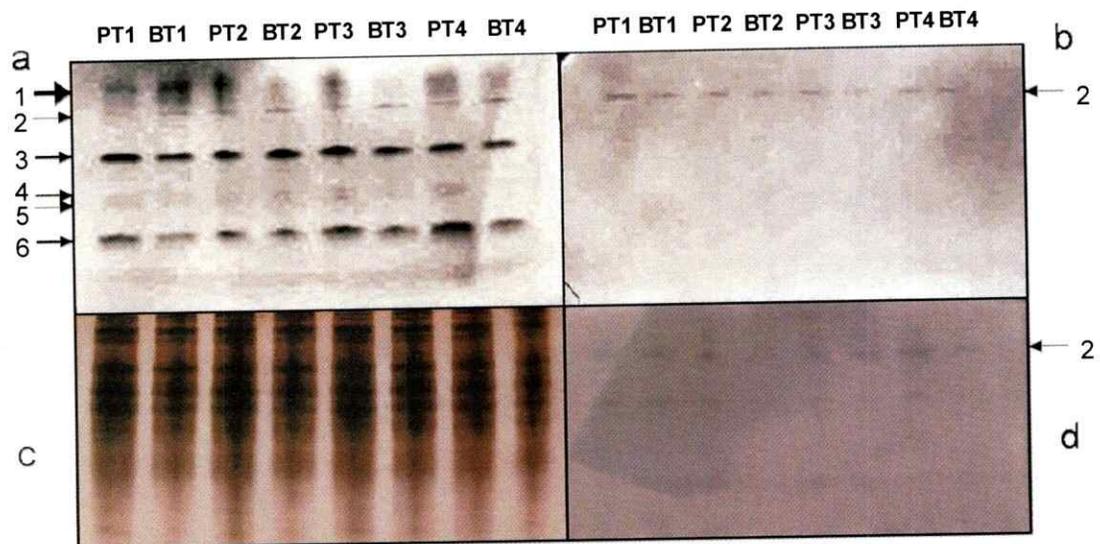


Fig. 3.- Patrón de isoformas de superóxido dismutasa en hojas de Aloe vera sometidas a 4 tratamientos hídricos. La nomenclatura en cada carril se refiere al tejido utilizado P: puntas, B: bases y al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta, T1: tratamiento 1, T2: tratamiento 2, T3: tratamiento 3 y T4: tratamiento 4. Cada carril cargado con 4 μ g de proteínas. (a) Isoformas de superóxido dismutasa, destacadas con flechas a la izquierda y numeradas. (b) Gel tratado con KCN. (c) PAGE nativo con tinción de plata. (d) Inhibición con H₂O₂, sólo se observa la isoforma de Mn-SOD.

De este modo se encontró que 5 de las 6 isoformas encontradas en Aloe vera son del tipo Cu/Zn-SOD; de ellas, las isoformas 4, 5 y 6 presentan variaciones en la intensidad de la banda de actividad con el tratamiento hídrico, la cuales aumentan al disminuir la disponibilidad de agua. Las bandas 4 y 5 presentan una mayor actividad en las puntas de la hoja, dado que se pueden observar más claramente en los tejidos provenientes de las puntas de las hojas que de sus bases.

Tabla 5.- Resumen de las isoformas de SOD detectadas en el análisis de actividad en gel. Se muestran las 6 bandas detectadas, el Rf de cada una y el cofactor que tiene unido, indicativo de la isoforma de SOD que corresponde.

Nº Banda actividad	Rf	Cofactor
1	0,12	Cu/Zn
2	0,21	Mn-SOD
3	0,37	Cu/Zn
4	0,53	Cu/Zn
5	0,58	Cu/Zn
6	0,70	Cu/Zn

3.5.- Expresión Mn-SOD (Western-Blot)

Para confirmar la presencia de la isoforma de Mn-SOD y determinar la expresión de esta proteína en plantas sometidas a los distintos tratamientos hídricos y las zonas de la hoja en que se expresa, se realizó un Western Blot, tal como se describió en materiales y métodos.

Como se observa en la Figura 4a, se encuentra que el anticuerpo reconoce una banda con un Rf de 0.625, lo cual corresponde a un peso molecular de aproximadamente 22 kDa, que es el tamaño esperado para un monómero de Mn-SOD. La banda aparece más intensa en las muestras correspondientes a las bases de las hojas que en las muestras obtenidas de las puntas.



Fig. 4.- **Expresión de Mn-SOD.** . La nomenclatura es: P: puntas, B: bases; T1: tratamiento 1, T2: tratamiento 2, T3: tratamiento 3 y T4: tratamiento 4. Cada carril fue cargado con 10 μ g de proteínas. (a) Western Blot Mn-SOD en plantas con diferentes tratamientos hídricos y distintas zonas de la hoja. (b) SDS-PAGE, con tinción de plata.

Se observa además, que el efecto del tratamiento no afecta de igual forma la expresión de la proteína en ambas zonas de la hoja, en las bases se aprecia que no ocurre un aumento notorio de la intensidad entre las bandas de las plantas control (Tratamiento 1) y las plantas sometidas al tratamiento 2 y 3, sin embargo ocurre una fuerte disminución de la intensidad en plantas con el tratamiento hídrico extremo (Tratamiento 4). En las muestras obtenidas de las puntas de las hojas ocurre algo distinto, ya que se aprecia una disminución en la intensidad de banda en plantas sometidas a los tratamientos hídricos 2, 3 y 4 con respecto al control. Estas intensidades de las bandas se muestran graficadas en la Figura 5.

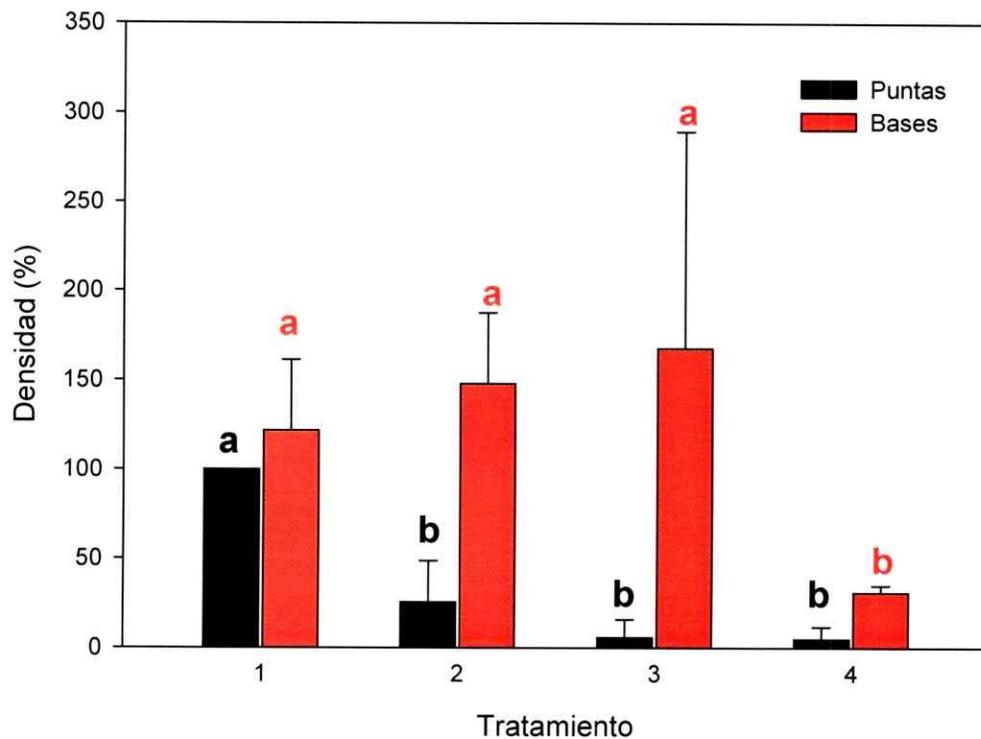


Fig. 5.- **Gráfico Western Blot Mn-SOD.** La intensidad de banda de Mn-SOD detectada por Western Blot fue determinada por densitometría, utilizando como un 100% de densidad la intensidad de banda encontrada en puntas de las hojas de plantas sometidas al tratamiento 1. Las barras corresponden a los valores promedios con su desviación estándar (n=3). Las letras (a) sobre las barras corresponden a resultados estadísticamente similares a las muestras control, mientras que las letras (b) corresponden a intensidades significativamente menores a las muestras control, determinado mediante análisis de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.- DISCUSIÓN

El estudio sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa de este seminario se encuentra enmarcado dentro del proyecto de estudio del efecto de la disponibilidad de agua sobre la fisiología de *Aloe barbadensis* Miller, con el enfoque de optimizar el consumo de agua en la agricultura del Norte de Chile. Los efectos del estrés hídrico en las plantas, y más importante aún, las respuestas de las plantas a nivel celular frente a este estrés, han sido motivo de mucho interés, dado por su importancia económica ya que se afecta directamente la productividad de la industria agronómica. Dado que Aloe vera es una planta adaptada naturalmente a regiones áridas es interesante estudiar posibles moléculas que estarían relacionadas a la tolerancia a una pluviometría limitada.

En este trabajo se ha encontrado que al proporcionarle una menor cantidad de agua a las plantas de Aloe vera no se produce una disminución en el contenido de agua del tejido verde de las hojas, a excepción de las puntas de las hojas de plantas que han sido tratadas con una cantidad mínima de agua (Tratamiento 4: 0,4L de agua cada 15 días). Aunque *a priori* se podría esperar que ocurriera una disminución ya en plantas bajo el tratamiento hídrico 3 (0,8L de agua cada 15 días) el hecho de que no ocurra una disminución puede deberse a que Aloe vera es una planta CAM adaptada a ambientes áridos y posee un parénquima (gel) que funciona como almacenaje de mayoritariamente agua (Ni Y., 2004), así frente a una baja disponibilidad de agua se puede esperar que ocurra una disminución en las reservas de agua antes que en la corteza; esto es algo que ha visto nuestro grupo de trabajo, determinándose que ocurre una disminución en la cantidad de gel de las hojas de plantas sometidas al tratamiento 4. En plantas con un menor régimen hídrico se produce una disminución significativa del contenido de agua,

pero solamente en la corteza de las puntas de las hojas, cabe destacar que en éstas la cantidad de gel ha disminuido casi completamente; así la disminución de agua en el tejido fotosintético puede deberse al transporte de agua (desde un mayor potencial hídrico hacia un menor potencial hídrico). Si el contenido de agua del suelo disminuye, las puntas al no poseer gel, no tienen reserva de agua ni la cantidad de polisacáridos para realizar un ajuste osmótico, produciendo que el tejido fotosintéticamente activo tenga en general menos agua. Las bases, en cambio, al estar más cercanas al suelo con mayor contenido de gel y polisacárido de reserva tiene mayores reservas de agua, efectivamente Salinas y col. (2007) han encontrado una mayor cantidad de azúcares y polisacáridos como polifruktanos en las bases de las hojas.

Por otra parte, la cantidad de proteínas presentes en las hojas de las plantas no es igual en todas las zonas de la hoja, encontrándose que existe una mayor concentración de éstas en las bases de las hojas. Estas diferencias podrían ser explicadas porque las bases son zonas de crecimiento de la planta y, dado que estas células deben estar en constante crecimiento y división, la cantidad de proteínas que poseen puede ser más elevada que en células ubicadas en las puntas de hojas.

En relación a los tratamientos hídricos a los cuales se han sometido las plantas, se encontró que la cantidad de proteínas totales disminuye en plantas con una menor disponibilidad de agua (tratamientos 3 y 4) en ambas zonas de la hoja. La disminución de la cantidad de proteínas, en plantas sometidas al tratamiento 3, puede ser deberse a los cambios que ocurren en todo organismo en respuesta al estrés hídrico. Se ha visto que en algunas plantas la disminución en la disponibilidad de agua induce la expresión de varios genes involucrados en la tolerancia al estrés, en la regulación de la expresión de genes que otorgan tolerancia y en señales de transducción en respuesta al estrés (Ingram J. y Bartels D., 1996). También se ha observado que ocurren cambios en el

metabolismo: como una disminución de la fotosíntesis al producirse un déficit hídrico, debido principalmente al cierre de los estomas, y una disminución considerable en la síntesis de almidón (Chaves et. al, 2003). Es así como todos estos cambios en el sistema pueden provocar una disminución en la cantidad de proteínas; además en toda planta bajo un estrés se activa el sistema ubiquitina-proteasa que degrada proteínas que se han dañado irreversiblemente con este estrés (Kurepa y Smalle, 2008). En cambio, una mayor disminución de proteínas en plantas con un déficit hídrico extremo (tratamiento 4) puede explicarse por el daño general producido por el déficit de agua, como: marchitez de las hojas, reducción en el tamaño de las células, daños mecánicos en las membranas (Chaves M. y Oliveira M., 2004) (Crowe et al., 1992) y aceleración de la senectud (Lim et al. 2007). Además se observa que también la disminución en la cantidad de proteínas es mayor en la punta de la hoja de la hoja que en la base y, tal como se discutió anteriormente, es la punta de la hoja la que sufre la mayor disminución de agua, así que una baja cantidad de proteínas totales puede ser debido al daño más intenso producido por la falta de agua.

Es conocido que el estrés hídrico produce un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS), los cuales producen denaturación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño a los ácidos nucleicos, con múltiples consecuencias en el metabolismo (França et al. 2007), por ello es de esperar que los sistemas de detoxificación cumplan un importante rol en la tolerancia a la deshidratación. Uno de los mecanismos de defensa que poseen las células para protegerse del daño oxidativo, es mediante enzimas detoxificadoras, una de las cuales es la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual es la única enzima que elimina los radicales superóxido, esta enzima cataliza la reacción de conversión de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, y se encuentra presente desde microorganismos a humanos al menos en una

de sus formas (Pereira et. al, 2003). Los resultados obtenidos muestran que efectivamente ocurre un aumento en la actividad superóxido dismutasa, aunque el comportamiento es diferente en puntas y bases de las hojas, ya que se encontró que las puntas de las hojas tienen mayor actividad que las bases. Esto puede deberse a que en las puntas de las hojas se encuentran células de más edad y, además, es una zona más alejada de la raíz, por lo cual su disponibilidad de agua es menor. Sin tener reservas de agua a causa de que las puntas de las hojas casi no poseen gel, hay en ellas una mayor actividad de los mecanismos detoxificadores para mantener un balance oxidativo adecuado. Las bases, en cambio, pueden estar más protegidas por las reservas de agua en el gel y sus componentes. Efectivamente, en relación a los tratamientos hídricos, se observó que existe un aumento de la actividad SOD en la puntas de las hojas de las plantas sometidas a tratamiento 3, sin embargo con el tratamiento más extremo (tratamiento 4) pese a ocurrir un aumento con respecto al control, no es significativo y es aun menor que el observado en las plantas sometidas al tratamiento 3. Esto se explica porque la deshidratación produce denaturación de las proteínas, reduciendo la actividad biológica (Prestrelski et al, 1993), por lo tanto los sistemas enzimáticos de defensa frente a estrés oxidativo sólo se pueden activar en condiciones de suficiente agua (Vertucci y Farrant, 1995), lo cual se correlaciona con los resultados de este seminario, en que hay una mayor actividad de SOD en el tratamiento 3 en comparación al tratamiento 4, siendo posible considerar al tratamiento 4 como un nivel ya dañino para la planta y al tratamiento 3 como límite. En las bases de las hojas se observa un aumento en la actividad SOD ya en plantas sometidas al tratamiento 2 (1,2L de agua cada 15 días), y es igual en plantas sometidas a tratamiento 3 (0,8L de agua cada 15 días) y tratamiento 4 (0,4L de agua cada 15 días), lo que indicaría que el tratamiento 4 no es tan dañino para las bases de las hojas.

El hecho de que las plantas posean múltiples formas de superóxido dismutasas, permite la posibilidad de que cada una de los tipos pueda actuar de forma diferente frente a variados tipos de estrés. Mediante electroforesis nativa, seguido por ensayo de actividad mediado por NBT, se logró reconocer 6 isoformas de SOD en Aloe vera, de las cuales se determinó, por sensibilidad a cianuro (CN^-) y a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que 5 de las isoformas corresponden a Cu/Zn-SODs y una a Mn-SOD. Aunque es posible que se encuentren una o dos isoformas más de Cu/Zn, dado que la gran actividad encontrada a bajo R_f , puede que no corresponda a solo una isoenzima del tipo Cu/ZN-SOD, sino a más de una que no pueda ser resuelta. Estudios previos han determinado que Aloe vera posee 7 isoformas de SOD, de las cuales 5 son Cu/Zn y dos del tipo Mn-SOD (Sabeh et al., 1996), esta inconsistencia entre los resultados obtenidos en este seminario y los determinados por el grupo de Sabeh pueden ser explicados por que las plantas pueden tener distintas condiciones de crecimiento, o que sean variedades distintas las utilizadas que expliquen las variaciones bioquímicas encontradas. Las diferencias encontradas pueden deberse también al tipo de procedimiento de extracción de las enzimas. En este estudio tampoco se encontró que alguna de las isoformas correspondiera a Fe-SOD.

Los resultados de la actividad SOD en geles, muestran que 3 de las bandas de actividad, específicamente las 3 de mayor R_f aumentan su actividad en plantas que son sometidas a tratamientos de menor régimen hídrico, siendo estas 3 bandas correspondientes a enzimas del tipo Cu/Zn-SOD, y estas mismas isoenzimas presentan mayor actividad en muestras obtenidas de las puntas de las hojas que en las bases, lo cual se correlaciona con la actividad de la enzima que es mayor en las puntas que en las bases, indicando que es posible que esa diferencia de actividad sea dada mayormente por éstas isoenzimas.

Posiblemente las isoenzimas que aumentaron su actividad en plantas con bajo régimen hídrico son isoenzimas que mitigan mejor el estrés oxidativo inducido por el estrés hídrico y que tengan una regulación positiva mediada por este estrés. En *A. thaliana* se han encontrado 7 isoenzimas de SOD: 3 del tipo Fe-SOD, 3 Cu/Zn-SOD y una Mn-SOD (Kliebenstein et al., 1998), y dos de ellas del tipo Cu/Zn-SOD y Fe-SOD tienen secuencias río arriba de unión a factores de transcripción tipo ABRE (ABA responsive element) que está asociada a respuestas a cambios osmóticos (Alscher et al., 2002).

Aunque el método de reconocimiento del patrón de isoenzimas de superóxido dismutasa por electroforesis nativa es bastante utilizado, a veces este método puede conducir a error, pues en los extractos crudos pueden haber compuestos fenólicos y peroxidasas que pueden alterar la actividad SOD (Michalski, 1996), así, para realizar análisis de expresión es preferible combinar la técnica con otras de reconocimiento, como inmunodetección. Por ello se realizó Western Blot para la enzima Mn-SOD, se sabe que entre las plantas esta enzima tiene un 65% de similitud, con una alta similitud con la isoforma Mn-SOD de origen bacteriano (Bowler et al., 1994), por lo tanto, aún sin saber la secuencia de esta proteína en Aloe vera, es posible reconocerla utilizando anticuerpos dirigidos contra la misma enzima de otras especies. El anticuerpo utilizado creado originalmente para la isoforma Mn-SOD de humano, reconoce una banda de alrededor de 22kDa, el tamaño reconocido concuerda con lo esperado y reportado previamente, de 21kDa (Sabeih et al., 1996). En relación al estrés hídrico se ve un leve aumento, aunque no significativo, en la acumulación de Mn-SOD en las bases de las hojas, y una drástica disminución en las plantas bajo el tratamiento 4. Se sabe que el estrés hídrico induce un gran estrés oxidativo en los cloroplastos (ya que el principal afectado por la falta de agua es el proceso de fotosíntesis), aumentando

considerablemente la acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno debido al aumento en la tasa de reducción de O_2 en el cloroplasto (Robinson y Bunce, 2000). Debido a que Mn-SOD es un tipo de superóxido dismutasa que se encuentra en las mitocondrias, es posible que no sea ésta la que aumente su actividad, sino que de los tipos Cu/Zn-SOD que se encuentran en cloroplastos y citoplasma. La acumulación de Mn-SOD disminuye en las puntas de las hojas, lo cual podría denotar que esta isoforma no estaría regulada positivamente frente a un estrés hídrico, y que la disminución en la disponibilidad de agua afecte la expresión del gen que la codifica. Para comprobar este punto se hace necesario realizar estudios de estado oxidativo de las plantas, para determinar en qué punto la generación de ROS sobrepasa los mecanismos de defensa y se genera el estrés oxidativo.

Además, sería interesante analizar la acumulación de las isoformas Cu/Zn-SOD, que según los resultados obtenidos deberían ser las que producen el aumento de actividad total de SOD en las puntas de las hojas, sin embargo estas isoenzimas presentan mayor variabilidad entre las especies, por lo cual es difícil encontrar un anticuerpo de otra especie que tenga inmunoreacción cruzada con las isoformas de Aloe vera.

5.- CONCLUSIONES

El estrés hídrico genera una serie de cambios en las plantas. En este trabajo se ha mostrado que una disminución en la disponibilidad de agua genera ciertos cambios en los tejidos fotosintéticos de las hojas de Aloe vera.

- Se encontró que una disminución en la disponibilidad de agua no genera una disminución en el contenido de agua, excepto cuando la baja disponibilidad de agua es extrema.
- Existe una diferencia en la concentración de proteínas en las distintas zonas de la hoja, siendo mayores en las bases de las hojas que en las puntas. Sin embargo una disminución en la disponibilidad de agua produce una disminución de la concentración de proteínas en el tejido fotosintético de ambas zonas.
- En relación a la actividad superóxido dismutasa, en Aloe vera la actividad específica de SOD es mayor en las puntas de las hojas que en las bases, actividad que está dada por la presencia de 5 isoformas de Cu/Zn SOD y una isoforma de Mn-SOD en Aloe vera.
- Una baja en la disponibilidad de agua produce un aumento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa.
- La acumulación de la isoforma Mn-SOD es mayor en las bases de las hojas que en las puntas, cuando el déficit hídrico es bajo. Sin embargo, cuando la baja disponibilidad de agua es extrema la acumulación de esta isoforma disminuye.

REFERENCIAS

- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.** 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. **53**(372): 1331-1341.
- Beauchamp y Fridovich.** 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. **44**: 276-287.
- Bradford M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Chaves M.M., Oliveira M.M.** 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficit: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. **55** (407): 2365-2384.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereria J.S.** 2003. Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. **30**: 239-264.
- Crowe J.H., Hoekstra F.A., Crowe L.M.** 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review Physiology*. **54**: 579-599.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signaling. *Plant Physiology*. **141**: 330-335.
- Feng W., Hongbin W., Bing .L, Jinfa W.** 2006. Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*. **24**(12):734-42.
- Flohé L. y Ötting F.** 1984. Superoxide Dismutase Assays. *Methods in enzymology*. **105**: 93-104.

- Foyer C.H., Noctor G.** 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* **119**: 355-164
- Foyer C.H., Noctor G.,** 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist.* **146**: 359-388.
- França M. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A.** 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* **146** (4): 621-631.
- Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C.** 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays.* **28**: 1091-1101.
- Giannopolitis y Ries.** 1977. Superoxide Dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology.* **59**: 309-314.
- Ingram J., Bartels D.** 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology.* **47**: 377-403.
- Kliebenstein D.J., Monde R., Last R.L.** 1998. Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiology.* **118**: 637-650.
- Kranner I., Lutzoni F.** 1999. Evolutionary consequences of transition to a lichen symbiotic state and physiological adaptation to oxidative damage associated with poikilohydry. *En Lerner, H.R (Ed.). Plant Response to Environmental Stress: From Phytohormones to Genome Reorganization.* pp. 591-628. Marcel Dekker Inc., New York.
- Kurepa J., Smalle J.A.** 2008. Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie.* **90**(2): 324-35.
- Lim P.O., Kim H.J., Nam H.G.** 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology.* **58**: 115-36.

- Michalski W.P.** 1996. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography B*. **684**: 59-75.
- Møller I.M., Jensen P.E., Hansson A.** 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. **58**: 459-481.
- Ni Y., Turner D., Yates K.M., Tizard I.** 2004. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *International Immunopharmacology*. **4**: 1745-1755.
- Nielsen B. L., y Brown L.** 1984. The basis for colored silver protein complex Formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **141**: 311-315.
- Pereira M.D., Herdeiro R.S., Fernandes P.N., Eleutherio E.C.A., Panek A.D.** 2003. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1620**: 241-251.
- Prestrelski S. J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J. F.** 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*. **65**: 661-671
- Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M.** 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*. **161**: 1189-1202.
- Reynolds T., Dweck A.C.** 1999. Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*. **68**(1-3): 3-37.
- Robinson M., Bunce J.A.** 2000. Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate-dehydroascorbate level and redox status. *Int J Plant Sci*. **161**: 271-279.
- Sabeh F., Wright T., Norton S.J.** 1996. Isozymes of Superoxide Dismutase from *Aloe vera*. *Enzyme Protein*. **49**: 121-221.
- Salinas C., Ramírez, I., Huerta C., Sagardía S., Vega A., Silva H., Stange C.,**

- Handford M., Cardemil L.** 2007. Sugar and fructan synthesis and superoxide dismutase activity as protection mechanisms for water deficit and heat shock stress in *Aloe barbadensis* (Miller, Aloe vera). Libro de resúmenes de la II Reunión de Biología Vegetal, p: 68.
- Scandalios J.G.** 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **38**: 995-1014.
- Scandalios J.G.** 1997. Molecular genetics of superoxide dismutases. *En Scandalios J.G* (ed.), *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. pp 527-568. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Takahashi M.A., Asada K.** 1983. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast tylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **226**: 558-566.
- Torres M.A., Dangl J.L.** 2005. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 397-403.
- Vega A.G., Ampuero N.C., Díaz L.N., Lemus R.M.** 2005. El Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición*. **32**(3): 208-214.
- Vertucci C.W., Farrant J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *En*: Kigel J., Galili G. (Eds), *Seed development and Germination*. pp 237-271. Marcel Dekker Inc., UK.