

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA
FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA
DEPENDIENTE DE GLUTATIÓN DE
ARABIDOPSIS THALIANA Y SU FUNCIÓN
EN LA PATOGÉNESIS.**

Tesis Doctoral presentada por
Maykelis Díaz Solares



Universitat Autònoma de Barcelona

Marzo, 2004

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN
DE LA FORMALDEHÍDO DESHIDROGENASA
DEPENDIENTE DE GLUTATIÓN DE *ARABIDOPSIS
THALIANA* Y SU FUNCIÓN EN LA PATOGÉNESIS.**

Memoria presentada por **Maykelis Díaz Solares**, Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular.

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad de Ciencias, de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección de la Doctora **M. Carmen Martínez Gómez**.

Dra. M. Carmen Martínez Gómez

Maykelis Díaz Solares

Bellaterra, 5 de Marzo de 2004.

"La fuente del conocimiento es inagotable:
por muchos que sean los éxitos de la
humanidad en esa vía, los hombres tendrán
siempre que buscar, descubrir, y conocer."

José Martí

A mi familia.

A Gustavo.

AGRADECIMIENTOS

Esta etapa de mi vida ha llegado a su fin. Es difícil resumir todas las vivencias, sensaciones y sentimientos que me han acompañado durante estos años. La realización de esta Tesis Doctoral ha contado con el apoyo de muchas personas a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. M. Carmen Martínez por haberme acogido en su grupo de investigación. Le agradezco su paciencia, esfuerzo y dedicación en la dirección y corrección de esta Tesis.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), por la beca predoctoral que me ha permitido realizar gran parte esta Tesis.

Al Dr. Chris Lamb del John Innes Centre, Norwich, Reino Unido, por aceptarme en su grupo de investigación para realizar los estudios de interacción planta-patógeno.

A la Dra. Christine Rusterucci por supervisar mi trabajo en el John Innes Centre y por su amistad. Además por guiar tanto ella como Tim mis pasos en Norwich.

A la European Molecular Biology Organization (EMBO) por la beca que me permitió la estancia en el John Innes Centre.

A la Dra. Nuria Cortadellas y a su grupo del Servicio de Ultramicrotomía de la Universidad de Barcelona por toda la ayuda prestada.

A la Dra. M. Dolores Ludevid del CSIC por su ayuda en los experimentos de inmunolocalización de la FALDH por microscopía electrónica.

Al Dr. Benet Gunsé de la Unidad de Fisiología Vegetal de la UAB por su ayuda en la identificación de los diferentes tipos celulares de hoja y raíz y en la realización de las fotos de las plantas teñidas por actividad enzimática.

A los Drs. Xavier Parés, Jaume Farrés y Josep A. Biosca por interesarse en mi trabajo.

A Marta y Rubén por su ayuda con los temas estadísticos y los buenos ratos que hemos compartido.

A Hakima por ayudarme a conocer muchas técnicas del laboratorio y por ser una amiga excelente.

A Chari por su ayuda desinteresada en cada momento, su generosidad y por todas las agradables conversaciones que hemos mantenido.

A Nuria que acaba de llegar al laboratorio y a la que le deseo mucha suerte en esta etapa que inicia.

A Trini por todos estos años que hemos compartido tantas horas de trabajo de laboratorio, soluciones, risas y cotilleos.

A mis compañeras de laboratorio Carol, Sandra y Carme, por todo el tiempo que hemos compartido.

A Salva, por todos los ajustes técnicos e informáticos y por haberme sacado de unos cuantos apuros.

A Elena por estar siempre dispuesta a ayudar en todo lo que haga falta.

Agradecimientos

A todo el grupo de ADH, Sergio, Oriol, Xavi, Albert, Enma, Ana María y en especial a Silvia y Susana, por aportarme soluciones rápidas para casi todo.

Al resto de compañeros del Departamento por su compañía durante estos años, en especial a Inma, Mohamed, Zoran y Sandra por su disponibilidad en todo momento.

A mis compañeros de trabajo en Cuba, en especial a Iván por estar pendiente de mí a través del correo electrónico.

A Eliel por tener siempre un buen chiste cubano para contar y por su grata compañía.

A L.M. Santín (el Chino para los amigos), por hacer posible la comunicación con mi familia y darme ánimos desde Varadero.

A Valen, Loli, Arantxa, Marina, Pili y Sebas por hacer más agradable mi estancia en Barcelona.

A Teresa y José Luis por estar al tanto de mis alegrías y tristezas desde mi llegada a Barcelona en el año 98 y por estar siempre ahí cuando los he necesitado.

A Sandra y Carles por transmitir siempre tranquilidad.

A Paquita y Vicenç por acogerme en su casa como a una hija más, por sus sabios y oportunos consejos y por ese apoyo familiar tan importante que me ha permitido finalizar esta Tesis.

A Eva y David, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos. Mil gracias Eva por ser una persona tan especial a la cual quiero muchísimo, por todas esas horas que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, y sobretodo por tu sincera amistad.

A mi abuelo Pedro por inculcarme desde pequeña esa curiosidad por conocer acerca de todo lo que me rodea.

A mis padres por confiar en mi y por la admiración que sienten por mi mundo. Quiero hacer un reconocimiento especial a mi madre por su vitalidad y su lucha diaria por todo lo relacionado con sus seres más queridos.

A mi hermana Yesly por su espíritu de sacrificio y su gran corazón.

Al resto de mi familia y amigos, en especial a mi tía Mercy, por el afecto y el cariño que me han dado.

Y por supuesto, a Gustavo, por su incondicional apoyo moral, amor, comprensión y por ayudarme a seguir adelante. Este último año ha sido muy difícil para nosotros pero creo que ha merecido la pena llegar hasta el final.

ÍNDICE TEMÁTICO

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE TEMÁTICO	iii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	xiii
ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Características generales de las alcohol deshidrogenasas (ADHs)	3
1.1 Clasificación de las alcohol deshidrogenasas.	4
2. Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH)	6
2.1 Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) o alcohol deshidrogenasa clase III.....	6
2.2 Características cinéticas de la FALDH o alcohol deshidrogenasa clase III	9
3. Otras alcohol deshidrogenasas de plantas	11
3.1 Alcohol deshidrogenasa clase P.....	11
3.2 Cinamil alcohol deshidrogenasa.....	11

3.3 Benzil alcohol deshidrogenasa.	12
3.4 Geraniol deshidrogenasa.....	12
3.5 Sinapil alcohol deshidrogenasa.	12
3.6 Alcohol deshidrogenasa alílica.	13
4. Formaldehído.	13
4.1 Origen del formaldehído exógeno y endógeno.....	13
4.2 Metabolismo del formaldehído.....	16
4.3 Toxicidad del formaldehído.....	19
5. Glutati3n.....	21
5.1 Funciones del glutati3n en las plantas.....	23
6. Mecanismos de defensa en plantas.....	24
6.1 Estr3s oxidativo.	29
6.2 Características generales de algunos se3alizadores moleculares.	30
6.2.1 3cido Jasm3nico (JA).....	30
6.2.2 3cido Salic3lico (SA)	31
6.2.3 3cido absc3sico (ABA)	33
6.2.4 3xido n3trico.	34
7. Sistemas biol3gicos utilizados.	36
7.1 L3nea celular de tabaco BY2.....	36
7.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.	37
OBJETIVOS.	39
MATERIALES Y M3TODOS.	41
1. Reactivos.....	41
1.1 Reactivos de an3lisis de prote3nas.....	41
1.2. Reactivos de Biolog3a Molecular.	42
1.3. Reactivos de cultivos de plantas.	43
2. Material biol3gico.	43

2.1 Material biológico vegetal.....	43
2.2 Cepas de <i>E. coli</i>	43
2.3 Plásmidos.....	44
3. Medios de cultivo.....	44
3.1 Medios de cultivo para bacterias.....	44
3.1.1 Medio Luria-Bertani (LB).....	45
3.1.2 Medio de cultivo Terrific Broth (TB).....	45
3.1.3 Medio de cultivo 2xYT.....	46
3.1.4 Medio de cultivo KB para <i>Pseudomona syringae</i>	46
3.1.5 Medio de conservación de <i>E. coli</i>	46
3.2 Medios de cultivo del material biológico vegetal.....	47
3.2.1 Medio de cultivo para las células de tabaco BY2.....	47
3.2.2 Medio de cultivo líquido para plantas de <i>A. thaliana</i>	47
3.2.3 Medio de cultivo sólido (medio GM) para plantas de <i>A. thaliana</i> y de <i>R. sativus</i>	48
3.3 Utilización de antibióticos en los medios de cultivo.....	48
4. Condiciones de cultivo del material biológico.....	49
4.1 Mantenimiento de la línea celular BY2.....	49
4.2 Esterilización de las semillas de <i>A. thaliana</i> y de <i>R. sativus</i>	50
4.3 Germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas en medio líquido.....	50
4.4 Condiciones de crecimiento en tierra.....	51
5. Tratamientos.....	51
5.1 Tratamientos con ácido abscísico (ABA).....	51
5.2 Tratamientos con ácido salicílico (SA).....	51
5.3 Tratamientos con ácido jasmónico (JA) y metil jasmonato (MeJa).....	52
6. Extracción de proteínas totales.....	52
6.1 Extracción de proteínas de las células de tabaco BY2.....	53
6.2 Extracción de proteínas de <i>A. thaliana</i>	53
7. Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford.....	54
8. Métodos espectrofotométricos.....	54

8.1 Determinación de la actividad enzimática de la FALDH.	54
8.1.1 Preparación de formaldehído a partir de paraformaldehído.	56
8.2 Determinación de la actividad GSNO reductasa.	57
8.2.1 Preparación de S-nitrosoglutatión.	57
9. Métodos inmunológicos.	58
9.1 Purificación de anticuerpos específicos anti-FALDH.	58
9.1.1 Expresión y purificación de proteína FALDH recombinante.	58
9.1.1.1 Crecimiento del cultivo de células de <i>E. coli</i> y expresión del enzima FALDH de <i>A. thaliana</i>	58
9.1.1.2 Purificación del enzima FALDH de <i>A. thaliana</i>	59
9.1.2 Purificación del anticuerpo por cromatografía de afinidad.	60
9.1.2.1 Inmovilización del antígeno a la columna.	60
9.1.2.2 Absorción del anticuerpo a la columna.	62
9.1.2.3 Elución del anticuerpo.	62
9.2 Ensayo inmunoenzimático ELISA.	63
9.3 Análisis de proteínas mediante Western Blot.	64
9.4. Inmunolocalización en tejidos vegetales.	67
9.4.1 Preparación de los tejidos: fijación e inclusión en parafina.	67
9.4.1.1 Fijación del tejido.	67
9.4.1.2 Inclusión de los tejidos en parafina.	67
9.4.2 Preparación de los bloques de parafina	69
9.4.3 Preparación de los portaobjetos con poli-L-lisina.	70
9.4.4 Obtención de los cortes de tejidos.	70
9.4.5 Tratamiento de los cortes de tejidos.	71
9.4.6 Inmunohistoquímica.	72
9.4.7 Montaje de las preparaciones.	73
9.5. Localización de la FALDH por microscopía electrónica.	74
9.5.1 Ultraestructura.	74
9.5.1.1 Fijación del tejido.	74
9.5.1.2 Osmificación del tejido.	75

9.5.1.3 Deshidratación del tejido.	76
9.5.1.4 Inclusión en la resina Spurr.	76
9.5.2 Inclusión del tejido en la resina Lowicryl K4M.	77
9.5.2.1 Fijación del tejido.	78
9.5.2.2 Deshidratación del tejido.	79
9.5.2.3 Infiltración y polimerización.	79
9.5.3 Inmunolocalización.	81
9.5.4 Observación al microscopio electrónico.	82
10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.	82
10.1 Tinción de proteínas en geles SDS-PAGE con Coomassie Blue.	85
10.2 Conservación de los geles de SDS-PAGE.	85
11. Detección de la actividad enzimática FALDH por tinción por actividad de plántulas de Arabidopsis (técnica whole-mount).	86
12. Preparación, análisis y manipulación de DNA.	87
12.1 Material y soluciones.	87
12.2 Extracción de DNA plasmídico de bacterias.	88
12.2.1 Minipreparación de DNA plasmídico.	88
12.3 Digestión con enzimas de restricción.	89
12.4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	90
12.5 Desfosforilación de DNA con la fosfatasa alcalina.	92
12.6 Ligación de fragmentos de DNA.	92
12.7 Transformación de células de <i>E. coli</i>	93
12.7.1 Preparación de células competentes.	93
12.7.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	94
12.7.3 Análisis de los transformantes y selección de los clones.	95
12.8 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	95
12.8.1 Tinción de los geles de agarosa y visualización del DNA.	97
12.9 Marcaje radioactivo de sondas de DNA.	97
13. Preparación y análisis de RNA.	99
13.1 Manipulación en condiciones libres de ribonucleasas.	99

13.2 Extracción de RNA total células vegetales.	100
13.2.1 Extracción de RNA utilizando cloruro de guanidinio.	100
13.2.2 Extracción de RNA utilizando Trizol.....	101
13.3 Determinación de la concentración de RNA.	102
13.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa-formaldehído y transferencia a membrana.	103
13.5 Prehibridación, hibridación y lavados de las membranas.	105
13.6 Análisis de la señal radioactiva.....	106
14. Obtención de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>.	107
14.1 Clonaje en el vector pDH51.....	107
14.2 Construcción pBin19/FALDH.....	107
14.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	108
14.3.1 Preparación de células competentes.....	108
14.3.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	108
14.3.3 Infiltración de plantas de <i>A. thaliana</i> con cultivos de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Selección de semillas transgénicas.....	109
15. Infección de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con patógenos bacterianos y oomicetos	111
15.1 Crecimiento e inoculación de bacterias.	111
15.1.1 Contaje de bacterias de <i>Pseudomonas syringae</i>	111
15.2 Crecimiento e inoculación de oomicetos.	112
15.2.1 Contaje de esporas de <i>Peronospora parasitica</i> (Pp) Noco2.....	112
15.3 Análisis histoquímico de muerte celular en plantas y desarrollo de <i>Peronospora parasitica</i> mediante tinción con lactophenol-trypan blue.....	112
15.4 Medida de la resistencia sistémica adquirida (SAR).....	113
RESULTADOS	115
1. Evolución de la actividad específica de la FALDH a lo largo de la curva de crecimiento de las células BY2.	115

2. Regulación hormonal de la FALDH.....	117
2.1 Respuesta de la FALDH al ácido salicílico (SA).....	117
2.2 Respuesta de la FALDH al Ácido Abscísico (ABA).....	121
2.3 Respuesta de la FALDH al ácido jasmónico (JA).....	123
3. Represión transcripcional del gen ADH2 por herida.....	127
4. Obtención y análisis de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>.....	129
4.1 Clonación del cDNA en el vector pDH51.....	130
4.2 Clonación en el vector pBin19.....	131
4.3 Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> y selección de plantas transformadas homocigotas.....	132
4.4 Análisis de las plantas transgénicas mediante ensayos de actividad enzimática.....	134
4.5 Análisis de las plantas transgénicas mediante Western Blot.....	135
4.6 Estudio del fenotipo de las plantas transgénicas.....	135
4.7 Metabolismo de formaldehído exógeno por las líneas transgénicas antisentido.....	141
5. Expresión y purificación de la proteína recombinante FALDH de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	144
6. Purificación del anticuerpo anti-FALDH de <i>Arabidopsis thaliana</i>. Experimentos de competición para demostrar su especificidad.....	145
7. Localización celular de la FALDH en plantas.....	146
7.1 Inmunolocalización de la FALDH en secciones de raíz de <i>Raphanus sativus</i>	147
7.2 Inmunolocalización de la FALDH en secciones transversales de hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i>	154
7.3 Localización de la FALDH en hoja de <i>Arabidopsis</i> por técnicas de microscopía electrónica.....	160
8. Detección de la FALDH en plántulas de <i>Arabidopsis</i> mediante tinción por actividad enzimática.....	164
9. Papel de la FALDH en las reacciones de defensa de las plantas.....	169
9.1 Actividad GSNO reductasa en las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	170

9.2 Infección de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con patógenos bacterianos y oomicetos.	172
9.2.1 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en la resistencia basal.	173
9.2.1.1 Infección con <i>Peronospora parasítica</i>	173
9.2.2 Infección con <i>Pseudomonas syringae</i>	176
9.3 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en las interacciones incompatibles planta- patógeno.	177
9.3.1 Papel en la respuesta de hipersensibilidad (HR) con oomicetos.	177
9.3.2 Papel en la respuesta de hipersensibilidad (HR) con bacterias.	178
9.4 Papel de la FALDH / GSNO reductasa en el establecimiento de la resistencia sistémica adquirida (SAR).	180
DISCUSIÓN	183
1. La expresión de la FALDH está regulada por diferentes hormonas vegetales y por herida.	184
1.1 Ácido Abscísico (ABA)	186
1.2 Ácido Salicílico (SA).	187
1.3 Ácido Jasmónico (JA) y herida.	191
2. Utilización de plantas para la eliminación del formaldehído exógeno.	194
2.1 En las plantas transgénicas antisentido existe una relación directa entre la disminución de la actividad enzimática y los niveles de proteína	196
2.2 Las plantas transgénicas antisentido presentan una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno.	197
2.3 Las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados presentan un fenotipo diferente.	198
3. Localización celular de la FALDH en hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y en raíz de <i>Raphanus sativus</i>.	200
4. La FALDH está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto.	202
4.1 Posible función de la FALDH en núcleo.	203

4.2 Posible función de la FALDH en citoplasma.....	204
4.3 Posible función de la FALDH en cloroplastos.....	205
5. Detección de la actividad FALDH por tinción histoquímica.	207
6. FALDH y defensa.....	208
CONCLUSIONES	211
BIBLIOGRAFÍA	215

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1	Introducción	15
Tabla 2	Introducción	19
Tabla 3	Materiales y Métodos	68
Tabla 4	Materiales y Métodos	68
Tabla 5	Materiales y Métodos	71
Tabla 6	Materiales y Métodos	73
Tabla 7	Resultados	118
Tabla 8	Resultados	137
Tabla 9	Resultados	139
Tabla 10	Resultados	140
Tabla 11	Resultados	145
Tabla 12	Discusión	195

FIGURAS

Figura 1	Introducción	18
Figura 2	Introducción	22
Figura 3	Introducción	26
Figura 4	Introducción	27
Figura 5	Introducción	36
Figura 6	Introducción	38
Figura 7	Resultados	116
Figura 8	Resultados	116
Figura 9	Resultados	118
Figura 10	Resultados	119
Figura 11	Resultados	120
Figura 12	Resultados	121
Figura 13	Resultados	122
Figura 14	Resultados	123
Figura 15	Resultados	124
Figura 16	Resultados	126
Figura 17	Resultados	127
Figura 18	Resultados	128
Figura 19	Resultados	129
Figura 20	Resultados	130
Figura 21	Resultados	131
Figura 22	Resultados	132
Figura 23	Resultados	133
Figura 24	Resultados	134
Figura 25	Resultados	135
Figura 26	Resultados	136
Figura 27	Resultados	138

Figura 28	Resultados	141
Figura 29	Resultados	143
Figura 30	Resultados	144
Figura 31	Resultados	146
Figura 32	Resultados	147
Figura 33	Resultados	148
Figura 34	Resultados	151
Figura 35	Resultados	152
Figura 36	Resultados	153
Figura 37	Resultados	154
Figura 38	Resultados	157
Figura 39	Resultados	158
Figura 40	Resultados	159
Figura 41	Resultados	161
Figura 42	Resultados	162
Figura 43	Resultados	163
Figura 44	Resultados	164
Figura 45	Resultados	167
Figura 46	Resultados	168
Figura 47	Resultados	169
Figura 48	Resultados	170
Figura 49	Resultados	171
Figura 50	Resultados	172
Figura 51	Resultados	174
Figura 52	Resultados	175
Figura 53	Resultados	176
Figura 54	Resultados	177
Figura 55	Resultados	178
Figura 56	Resultados	179
Figura 57	Resultados	181

Figura 58	Discusión	186
Figura 59	Discusión	190
Figura 60	Discusión	193
Figura 61	Discusión	200

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
ADH	alcohol deshidrogenasa
AOC	aleno oxidasa liasa
AOS	aleno oxidasa sintasa
APAD	dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina
APX	ascorbato peroxidasa
<i>Avr</i>	gen de avirulencia
BA	ácido benzoico
BA2H	2-hidrolasa del ácido benzoico
BSA	albúmina de suero bovino
BY2	células de tabaco cv. Bright Yellow 2
CA	ácido cinámico
CAT	catalasa
cpm	cuentas por minuto
DF	dimetil formamida
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
FALDH	formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión
FDA	fluorescein diacetato

GSH	glutati3n reducido
GSNO	S-nitrosoglutati3n
GSNOR	S-nitrosoglutati3n reductasa
HR	respuesta de hipersensibilidad
JA	3cido jasm3nico
LA	3cido linol3nico
LOX	lipoxigenasa
MeJA	metil jasmonato
NAD ⁺	dinucle3tido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADP	dinucle3tido fosfato de nicotinamida y adenina
nm	nan3metro
NO	3xido n3trico
PAL	fenilalanina amonio liasa
R	gen de resistencia
RNA	3cido ribonucleico
RNAse	ribonucleasa
ROS	especies reactivas del ox3geno
rpm	revoluciones por minuto
SA	3cido salic3lico
SA*	radical libre del 3cido salic3lico
SAR	resistencia sist3mica adquirida
SDS	dodecil sulfato s3dico
SOD	super3xido dismutasa
TMV	virus del mosaico del tabaco
U	unidad internacional de actividad enzim3tica
VSP	prote3nas de almacenamiento vegetativo
wt	wild type

RESUMEN

La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) (EC 1.2.1.1), conocida también como ADH clase III, es un enzima ubicuo, presente en el reino vegetal y animal. La eliminación del formaldehído dentro de la célula se realiza principalmente mediante la FALDH, que utiliza NAD^+ como cofactor. El formaldehído es un intermediario del metabolismo celular normal, aunque puede tener también un origen exógeno, siendo un polucionante atmosférico y de aguas residuales. Por otra parte, el formaldehído se forma intracelularmente durante la peroxidación lipídica en situaciones de estrés oxidativo. La eliminación de este formaldehído, que es muy tóxico para la célula, es necesaria para su supervivencia.

Recientemente se ha descubierto que la FALDH tiene también actividad S-nitrosoglutatión reductasa. El S-nitrosoglutatión (GSNO) es uno de los más abundantes metabolitos endógenos del óxido nítrico (NO), que actúa como uno de los señalizadores moleculares en los mecanismos de defensa de las plantas.

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que la expresión de la FALDH está regulada por herida y por diferentes hormonas vegetales, tales como el ácido jasmónico y el ácido salicílico. También hemos generado plantas transgénicas de *A. thaliana*

portadoras de una construcción antisentido, que presenta una importante disminución de la actividad enzimática FALDH, directamente relacionados con los niveles de proteína. Dichas plantas transgénicas tienen una menor capacidad de metabolizar formaldehído exógeno y presentan un aumento de la resistencia basal a patógenos fúngicos y bacterianos. Por otra parte, las plantas transgénicas con niveles de FALDH modificados (tanto las antisentido como las de sobreexpresión) muestran un fenotipo diferente, principalmente en la raíz. La inmunolocalización en tejidos reveló que la FALDH presenta un patrón de expresión en hojas y en raíz que es específico del tipo celular. A nivel subcelular, la FALDH está presente en citoplasma, núcleo y cloroplasto. Esta es la primera vez que se describe la localización cloroplástica de la FALDH.

INTRODUCCIÓN

1. Características generales de las alcohol deshidrogenasas (ADHs).

Las alcohol deshidrogenasas (ADH, EC 1.1.1.1) constituyen un sistema enzimático de localización mayoritariamente citoplasmática, ampliamente distribuido en numerosos *phyla* que incluyen organismos pertenecientes a todos los reinos en los que se clasifican los seres vivos (Jörnvall et al., 1993). En vertebrados, todos los miembros de la familia ADH son metaloenzimas, que contienen zinc, y pertenecen a la superfamilia de las deshidrogenasas / reductasas de cadena media (MDR). Son dímeros compuestos por subunidades de unos 374 residuos aminoacídicos y de unos 40 kDa de masa molecular. Cada subunidad consta de dos dominios, un dominio catalítico y un dominio de unión al coenzima, separados ambos por una hendidura hidrofóbica que forma el bolsillo de unión al sustrato (Edenberg y Bosron, 1997).

Las ADHs catalizan la oxidación reversible de una amplia variedad de alcoholes primarios, secundarios y cíclicos, con un origen endógeno o xenobiótico, a sus correspondientes aldehídos y cetonas. La reacción de oxidación tiene lugar con la reducción concomitante del coenzima, que generalmente es el NAD^+ (Jörnvall y Höög, 1995; Edenberg y Bosron, 1997).

Diferentes formas de ADH, caracterizadas como isoenzimas, fueron inicialmente identificadas en humanos (Smith et al., 1971). La familia de las ADH ha ido aumentando con el descubrimiento de nuevas formas enzimáticas, lo que ha dado lugar al término de clase (Vallee y Bazzone, 1983). La agrupación de las distintas ADHs en clases se basa en su especificidad de sustrato y sus propiedades cinéticas, sensibilidad al inhibidor pirazol y sus derivados, movilidad en la electroforesis en gel de almidón (técnica que se utiliza de forma clásica para la detección e identificación de diferentes formas enzimáticas con actividad ADH), patrón de expresión, identidad de secuencia y análisis de árboles filogenéticos (Duester et al., 1999; Edenberg, 2000; Jörnvall y Höög, 1995; Vallee y Bazzone, 1983).

1.1 Clasificación de las alcohol deshidrogenasas.

La clase I (ADHI) es la forma enzimática cuantitativamente más importante y de distribución mayoritariamente hepática en todos los mamíferos, aunque también está presente en otros tejidos tales como intestino, riñón, pulmón, glándula adrenal, testículos, útero y ovarios. Además se encuentra en ciertas células de la corteza cerebral, cerebelo e hipotálamo y se expresa en algunos tejidos durante el desarrollo embrionario. En humanos, la duplicación génica ha dado lugar a la aparición de isoenzimas denominadas ADHIA, ADHIB y ADHIC que muestran una elevada identidad de secuencia (93-94 %), lo que hace posible la formación de homodímeros y heterodímeros, todos ellos con características cinéticas diferentes (Smith et al., 1971). La ADHI es la principal enzima responsable de la eliminación del etanol ingerido. Se caracteriza por presentar una amplia especificidad de sustrato y fuerte inhibición con pirazol y sus derivados (Fries et al., 1979; Tolf et al., 1982). Es activa con alcoholes alifáticos primarios y secundarios, alcoholes cíclicos y aromáticos (Von Wartburg et al., 1964; Pietruszko et al., 1973; Pietruszco, 1979), ácidos grasos ω -hidroxilados (Wagner et al., 1983; Björkhem et al., 1973), compuestos del metabolismo de la noradrenalina (Mardh et al., 1985), dopamina (Mardh y Vallee, 1986), serotonina (Consalvi et al.,

1986), retinoides (Boleda et al., 1993; Yang et al., 1994), ácidos biliares (Marschall et al., 2000) y esteroides (McEvily et al., 1988).

La clase II (ADHII) se divide en dos subgrupos, uno al que pertenece la enzima humana y la de conejo, y otro que incluye las formas de roedor (Svensson et al., 1999). Esta clase se encuentra en hígado, intestino delgado y piel. La ADHII muestra actividad con diversos alcoholes y aldehídos, alifáticos y aromáticos, aunque con una especificidad más restringida que la ADHI (Ditlow et al., 1984). También presenta actividad con intermediarios del metabolismo de la serotonina y de la noradrenalina (Consalvi et al., 1986; Mardh et al., 1985), así como con retinoides (Han et al., 1998; Popescu y Napoli, 2000; Yang et al., 1994).

La clase III (ADHIII) utiliza como sustrato el S hidroximetilglutación que se forma espontáneamente por la reacción entre el formaldehído y el glutatión (Uotila y Koivusalo, 1974). En 1989, se demostró que la ADH clase III era la misma enzima que la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (Koivusalo et al., 1989). Las características de esta clase se detallan ampliamente en el Apartado 2.

La clase IV (ADHIV) fue aislada, purificada y caracterizada por primera vez a partir de tejido ocular de rata (Julià et al., 1983; Parés et al., 1985). Se encuentra localizada en piel, ojo, glándula adrenal y en la mucosa de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. No se expresa en hígado pero sí en varios tejidos durante el desarrollo embrionario incluido el cerebro (Moreno y Parés, 1991; Yin et al., 1990). La ADHIV es la clase que presenta una actividad más elevada en términos de K_{cat} frente a alcoholes primarios alifáticos, incluido el etanol (Boleda et al., 1989; Crosas et al., 2000; Jörnvall et al., 2000). Esta enzima tiene actividad con sustratos de relevancia fisiológica como los ω -hidroxiácidos grasos, los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica y los retinoides (Boleda et al., 1993; Julià et al., 1986). De todas las clases, la ADHIV es la que presenta mayor actividad para los retinoides (Boleda et al., 1993; Crosas et al., 2000; Jörnvall et al., 2000; Yang et al., 1994). Se ha demostrado que la ADHIV de

ratón, rata y humano catalizan eficientemente la oxidación del retinol, tanto del isómero todo-*trans* como del 9-*cis*, pero no del 13-*cis* (Allali-Hassani et al., 1998; Crosas et al., 2000), en contraste con la ADHI que prefiere el todo-*trans*- retinol (Yang et al., 1994).

Las clases V y VI (ADHV y ADHVI) han sido poco estudiadas hasta el momento y no se sabe mucho acerca de su especificidad de sustrato (Höög y Brandt, 1995; Yasumani et al., 1991). La ADHV no se ha podido detectar a nivel proteico. Su mRNA se ha observado en estómago, hígado y tejidos fetales humanos (Yasumani et al., 1991). No hay evidencias hasta el momento de la presencia del enzima activo en estos tejidos, pero se ha conseguido la expresión *in vitro* de su cDNA. El enzima muestra una Km para el etanol superior a la de la ADHIV, y también tiene actividad con propanol y con alcohol benzílico (Chen y Yoshida, 1991). La ADHVI presenta una elevada expresión en hígado y algo menor en riñón y pulmón. Ha sido detectada solamente en roedores: el mRNA en rata y como proteína recombinante activa en *Peromyscus* (Höög y Brandt., 1995; Zheng et al., 1993).

2. Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH).

2.1 Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH) o alcohol deshidrogenasa clase III.

La formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (EC 1.2.1.1) (FALDH) fue purificada por primera vez en 1955 por Strittmatter y Ball a partir de hígado de buey y de pollo (Strittmatter y Ball, 1955). Estos autores demostraron que la oxidación del formaldehído hasta formato estaba catalizada por una enzima que dependía de NAD⁺, y que, al contrario de la aldehído deshidrogenasa inespecífica, dependía también de glutatión reducido para su funcionamiento. Durante casi 20 años no se supo el papel que jugaba el glutatión en esta reacción, hasta que, en 1974, Uotila y Koivusalo descubrieron que el sustrato real de la enzima era el compuesto S-hidroximetilglutatión,

formado espontáneamente por la reacción del formaldehído con glutatión reducido (Uotila y Koivusalo, 1974).

En 1981 Parés y Vallee descubrieron una nueva alcohol deshidrogenasa, la alcohol deshidrogenasa clase III (EC 1.1.1.1) que estaba implicada en el metabolismo de ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos ω -hidroxilados. La característica que diferenciaba esta nueva clase de ADH de las otras ADHs conocidas era su baja actividad frente a etanol debido a la alta K_m que presentaba ($> 3M$), y su insensibilidad a 4-metilpirazol, un inhibidor clásico de las ADH. En 1989 se encontró que la ADH clase III y la FALDH eran la misma enzima (Koivusalo et al., 1989).

La FALDH o ADH clase III parece ser el antecesor común de todas las clases de ADH de cadena media (Danielson y Jörnvall., 1992). Esta interpretación es coherente con la presencia universal de la FALDH en mamíferos (Kaiser et al., 1989), plantas (Shafqat et al., 1996; Martínez et al., 1996), levaduras (Rose y Racker, 1962; Sasnauskas et al., 1992) y procariotas (Gultheil et al., 1992; Ras et al., 1994; Barber et al., 1996), y con su gran conservación de secuencia a lo largo de la escala evolutiva.

Comparando la FALDH de bacalao y la humana, se puede deducir que la velocidad mutacional para la FALDH parece ser bastante constante durante varios períodos evolutivos, con aproximadamente un 5 % de diferencias observables por cada 100 millones de años (Danielsson et al., 1994; Kaiser et al., 1993; Sasnauskas et al., 1992; Wehner et al., 1993). Por ejemplo la FALDH humana y la de *E. coli* presentan una identidad de secuencia del 62 %, la de pulpo y la humana del 74 %, y la de *Drosophila* y la humana del 70 % (Farrés, 1985). La FALDH se considera una proteína antigua procedente de tiempos anteriores a la divergencia procariota / eucariota, que se estima que ocurrió hace 1800 millones de años.

La FALDH es un enzima ubícuo, presente en todos los tejidos animales estudiados hasta el momento (Uotila y Koivusalo, 1974, 1989; Juliá et al., 1987; Boleda et al., 1989;

Keller et al., 1990). También se encuentra en las plantas, habiéndose estudiado en *Arabidopsis thaliana* (Martínez et al., 1996), maíz (Fliegmann y Sandermann, 1997), arroz (Dolferus et al., 1997) y guisante (Shafqat et al., 1996). Además se ha caracterizado la FALDH de insectos (Luque et al., 1994), levaduras y bacterias Gram negativas. Curiosamente, en bacterias Gram positivas, donde se ha descrito que no hay glutatión (Farey et al., 1991), se ha encontrado una formaldehído deshidrogenasa que cataliza la oxidación del formaldehído en presencia de un factor de bajo peso molecular, estable al calor, llamado micotiol (Van Ophen et al., 1992; Norin et al., 1997).

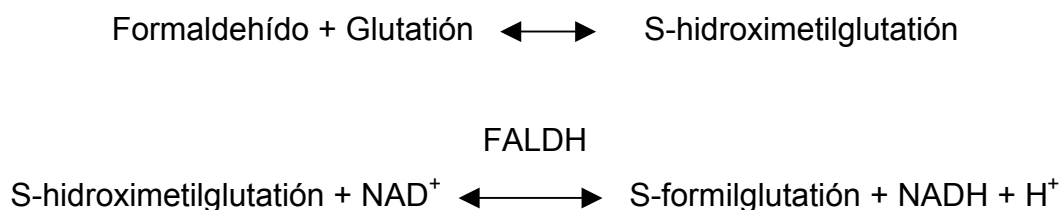
La existencia de la ADH clase III o FALDH en prácticamente todas las formas de vida estudiadas, sugiere que este enzima esté implicada en funciones metabólicas esenciales para la vida celular.

Basándose en estudios bioquímicos y de localización subcelular se han propuesto las siguientes funciones para la FALDH:

- como enzima del sistema protector del DNA, ya sea a nivel de transcripción o de replicación, ya que ha sido localizada en núcleo de hepatocitos y de células astrogiales de rata (Iborra et al., 1992).
- como enzima detoxificador del formaldehído que se forma durante el metabolismo celular, ya que se encuentra también en citoplasma (Parés et al., 1984; Uotila y Koivusalo, 1989; Achkor et al., 2003).
- como enzima capaz de descontaminar el formaldehído medioambiental, presente en el aire y en aguas residuales. Se ha descrito que las plantas pueden actuar como “hígado verde” al ser capaces de reducir las concentraciones del formaldehído gaseoso y otros contaminantes presentes en espacios cerrados, captándolos por los estomas e incorporándolos a su metabolismo (Giese et al., 1994). En nuestro grupo hemos demostrado que las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan la FALDH son capaces de metabolizar concentraciones muy elevadas de formaldehído exógeno (Achkor et al., 2003).

2.2 Características cinéticas de la FALDH o alcohol deshidrogenasa clase III.

La FALDH se diferencia del resto de las ADHs por ser insensible a la inhibición por 4-metilpirazol y ser prácticamente inactiva frente al etanol a concentraciones bajas, así como frente a otros alcoholes o aldehídos de cadena corta (Vallee y Bazzone, 1983) frente a los que presenta altos valores de K_m . La característica fundamental de esta enzima es que es muy activa con formaldehído y glutatión. El formaldehído y el glutatión se combinan espontáneamente para formar el S-hidroximetilglutatión, que es oxidado a S-formilglutatión por la FALDH (Uotila y Koivusalo, 1989).



A pesar de que el sustrato de la FALDH es el formaldehído, es correcto considerar a esta enzima como una alcohol deshidrogenasa, puesto que el verdadero sustrato es un alcohol, el tiohemiacetal S-hidroximetilglutatión.

La FALDH se describió inicialmente como una enzima absolutamente específica para el cofactor NAD^+ ; sin embargo, la FALDH aislada a partir de hígado humano puede también utilizar NADP^+ en determinadas condiciones *in vitro*, aunque es posible que ello no tenga significación fisiológica alguna (Uotila y Koivusalo, 1974). Con el cofactor NAD^+ , la FALDH presenta su velocidad catalítica óptima a pH 8-8,5, mientras que a este rango de pH la FALDH es bastante inactiva con NADP^+ , a menos que se utilice a concentraciones muy altas. Con NADP^+ , la actividad óptima se obtiene a pH 6, aunque la velocidad es solo el 30 % de la que se obtiene con NAD^+ a pH 8 (Uotila y Koivusalo, 1989). Todas las FALDH caracterizadas hasta el momento son NAD^+ dependientes.

Holmquist y Vallee (1991) demostraron que el formaldehído conjugado con otros tioles como el 8-tioctanoato y 6-tiohexanoato puede ser también sustrato de la FALDH humana. Además de esta actividad formaldehído deshidrogenasa, la FALDH cataliza eficientemente la oxidación de alcoholes primarios de cadena larga, particularmente ácidos grasos ω -hidroxilados como el ácido 12-hidroxidodecanoico (Wagner et al., 1984; Giri et al., 1989; Moulis et al., 1991).

La FALDH puede ser activada por aniones hidrofóbicos, particularmente las bases conjugadas de ácidos grasos, que pueden llegar a estimular la oxidación de alcoholes de cadena corta hasta 30 veces (Moulis et al., 1991). El mecanismo por el cual ocurre esta activación, implica la unión simultánea del sustrato y del activador al bolsillo del sustrato, aumentando de esta manera la unión del mismo. El grado de activación es óptimo cuando la suma de la cadena carbonada del ácido graso y la del alcohol es de 9-10 carbonos. Así, la oxidación del etanol es activada a nivel máximo por octanoato, la del pentanol por pentanoato, y la del octanol por acetato. Se cree que esta complementariedad refleja la longitud del bolsillo de unión del sustrato de esta enzima.

Recientemente se ha descubierto que la FALDH tiene también actividad S-nitrosoglutación reductasa. El S-nitrosoglutación (GSNO) es uno de los más abundantes metabolitos endógenos del óxido nítrico (NO), formándose por nitrosación del glutatión. Se ha demostrado que en humanos y levadura la FALDH es muy activa en la reducción del GSNO, lo cual sugiere una participación importante de la FALDH en el metabolismo del GSNO y, por tanto, en la regulación de la concentración de NO libre en el citoplasma y en el núcleo de las células eucariotas (Fernández et al., 2003). También se ha estudiado la actividad FALDH / GSNO reductasa en rata (Jensen, et al., 1998), levadura, *E. coli*, humano (Liu et al., 2001) y *Arabidopsis* (Sakamoto et al., 2002). La FALDH utiliza como cofactor más específico para su actividad GSNO reductasa el NADH, aunque también puede utilizar el NADPH, aunque con menor eficiencia (Fernández et al., 2003; Hedberg et al., 2003).

3. Otras alcohol deshidrogenasas de plantas.

3.1 Alcohol deshidrogenasa clase P.

La alcohol deshidrogenasa clase P es el enzima activo con etanol correspondiente a la ADH clase I de animales. La clase P, a pesar de ser funcionalmente similar a la ADH clase I de vertebrados, presenta mayor homología de secuencia con la clase III que con la clase I de vertebrados. Este hecho sugiere que la clase I de vertebrados y la clase P de plantas tienen orígenes evolutivos diferentes, a partir de una FALDH ancestral, representando ser un caso de convergencia funcional (Shafqat et al., 1996; Martínez et al., 1996; Fliegmann y Sandermann, 1997; Dolferus et al., 1997).

3.2 Cinamil alcohol deshidrogenasa.

La cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD) cataliza la conversión de cinamilaldehídos a sus correspondientes alcoholes y tiene un papel muy importante en la biosíntesis de la lignina. La CAD es un enzima que tiene un peso molecular de aproximadamente 39 kDa, ha sido detectada en el xilema de angiospermas y se ha demostrado que regula la biosíntesis de guaiacil mognol (Li et al., 2001). Sus principales sustratos son el coniferilaldehído y el NADP, aunque también podría utilizar otros sustratos tales como el coumaraldehído y el sinapilaldehído pero con menor eficiencia catalítica (Li et al., 2001; Goffner et al., 1998). Recientemente se ha descrito que en *Arabidopsis* está presente en varias partes de la planta y tiene una elevada expresión en flores y en hoja, sugiriendo así que puede participar en otras rutas metabólicas o quizás en defensa frente a patógenos (Sibout et al., 2003).

3.3 Benzil alcohol deshidrogenasa.

La benzil alcohol deshidrogenasa (BAD) ha sido estudiada en *Arabidopsis thaliana*. Es una alcohol NADP oxidoreductasa aromática, con un peso molecular de 45 kDa. Muestra una fuerte preferencia por varios aldehídos aromáticos tales como el 2-metoxibenzaldehído, 3-metoxibenzaldehído, salicilaldehído y benzaldehído. Se ha reportado que es posible que al catalizar la conversión de derivados del benzaldehído a los correspondientes benzil alcoholes, podría estar involucrada en la formación de compuestos fenólicos relacionados con la defensa (Somssich et al., 1996).

3.4 Geraniol deshidrogenasa.

La geraniol deshidrogenasa (GeDH) utiliza como principales sustratos el geraniol y el NADP. Este enzima ha sido estudiado en jengibre. Su principal función es la oxidación de geraniol a geranial que es uno de los componentes involucrados en el olor de la planta de jengibre fresca. Su posible localización es en los rizomas, ya que allí se ha encontrado actividad GeDH. Los rizomas de jengibre quizás tengan un mecanismo peculiar de formación del aroma (Sekiwa-Iijuma et al., 2001).

3.5 Sinapil alcohol deshidrogenasa.

Otra de las ADH NADP dependientes es la sinapil alcohol deshidrogenasa (SAD). Cataliza la reducción del sinapalaldehído a siringil monolignol en angiospermas, etapa metabólica situada en la ruta de síntesis de compuestos derivados de la lignina. Es una proteína de aproximadamente 39 kDa. Se ha detectado en las células del floema, que están enriquecidas en siringil-lignina (Li et al., 2001).

3.6 Alcohol deshidrogenasa alílica.

La alcohol deshidrogenasa alílica ha sido aislada a partir de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum*. Dicha enzima está compuesta por 343 aminoácidos y presenta un peso molecular de aproximadamente 38 kDa. La alil-ADH fue encontrada gracias a su eficiencia en la deshidrogenación de alcoholes alílicos secundarios y a su especificidad por los S-estereoisómeros de los alcoholes. Es una alcohol deshidrogenasa NADP-dependiente y cataliza la reducción reversible del grupo carbonilo de las enonas al correspondiente alcohol alílico o viceversa (Hirata et al., 2000).

4. Formaldehído.

4.1 Origen del formaldehído exógeno y endógeno.

El formaldehído es un compuesto muy tóxico cuya eliminación es necesaria en todas las células vivas (Fernández et al., 1995; Uotila y Koivusalo, 1989). A temperatura ambiente es un gas inflamable, incoloro y muy soluble en agua. Este producto se puede encontrar dentro de la casa, en el medio ambiente, de forma natural o como resultado de la actividad industrial humana. Es también un producto de la combustión incompleta de combustibles fósiles como la gasolina diesel y se forma a partir de la combustión del humo del tabaco y de la leña y de los residuos de las centrales termoeléctricas. Se considera una materia prima excelente y es muy económico de producir, por lo que es muy utilizado en la construcción de materiales tales como la goma de pegar, revestimientos y contrachapados de madera, alfombras, productos de papel, cosméticos, desodorantes, champú, tintes de tejidos y desinfectantes. Por lo tanto, el número de productos donde se puede encontrar el formaldehído es tan grande como su efecto tóxico.

El formaldehído tiene también un origen endógeno. En humanos se ha detectado que el nivel de formaldehído en sangre varía entre 0,46 μM y 2,81 μM (Hallier et al., 1994). El formaldehído endógeno se origina como consecuencia de actividades metabólicas celulares. Por ejemplo, durante el metabolismo de serina, glicina, sarcosina, colina y metionina, que dan lugar, en presencia de tetrahidrofolato, a $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -Metilen-tetrahidrofolato, el cual está en equilibrio con formaldehído libre (Benkovic, 1980; Kvalnes-Krick y Jorns, 1987). En el sistema monooxigenasa dependiente del citocromo P-450 del retículo endoplasmático se genera formaldehído como resultado de catalizar dimetilaciones a partir de varias sustancias xenobióticas (Waydhas et al., 1978). También se ha demostrado que el citocromo P-450 está implicado en la producción, a partir de alcoholes polihidroxilados, de formaldehído más un aldehído con un átomo de carbono menos que el del sustrato original (Kukielka y Cederbaum, 1995; Rashba-Step et al., 1994). La peroxidación lipídica es fuente de productos citotóxicos como el formaldehído, malonaldehído y 4-hidroxinonenal (Bagchi et al., 1993; Shara et al., 1992; Moser et al., 1993). También se conoce que cuando se libera adrenalina, producto del estrés, ocurren una serie de reacciones que aumentan los niveles de formaldehído en sangre. Un incremento de formaldehído durante largos períodos de tiempo podría provocar un daño endotelial repetido y arteriosclerosis asociada a estados de estrés (Yu et al., 1997). Otra fuente endógena de formaldehído es el metanol, que es metabolizado a formaldehído principalmente por la alcohol deshidrogenasa en humanos (Cooper y Kini, 1962). Se ha observado que pocas horas después del consumo de frutas, la concentración de metanol en el cuerpo humano aumenta hasta un orden de magnitud. Concentraciones tan altas como 3 ppm en la respiración, correspondiente a aproximadamente 10 mg/L en sangre, han sido observadas en personas que han comido 0,75 kg de melocotones o manzanas. Esto es debido a la degradación de la pectina natural (que está esterificada con metanol) en el colon (Lindinger et al., 1997). En la Tabla 1 se muestra los valores de la concentración de formaldehído presente en algunas de las fuentes mencionadas.

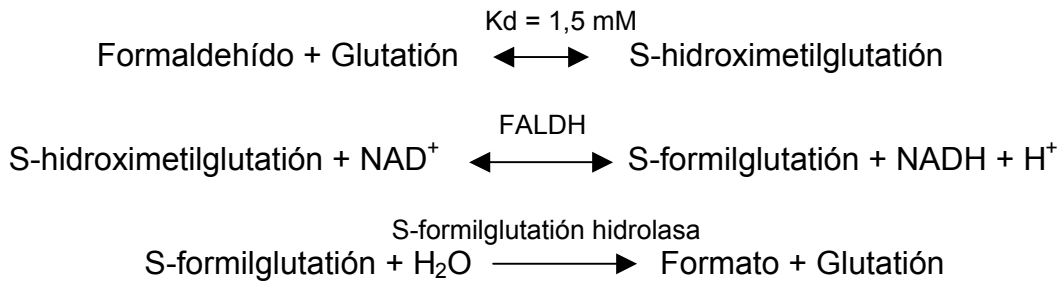
PROCEDENCIA	VALOR
Gas de escape de automóviles	35,7-52,9 mg/m ³
Casas prefabricadas	0,18-1,08 mg/m ³
Tomates	5,7-7,3 mg/kg
Manzanas	17,3-22,3 mg/kg
Espinacas	3,3-7,3 mg/kg
Zanahorias	6,7-10 mg/kg
Rábanos	3,7-4,4 mg/kg
Humo de cigarrillos	37,5-44,5 mg/cigarrillo

Tabla 1. Concentraciones de formaldehído en distintas fuentes. Extraído de la página web: www.payson.tulane.edu/spanish/

Es interesante comentar que el humo del tabaco constituye un factor de riesgo importante en las enfermedades coronarias. Se sabe que el humo del tabaco es capaz de estimular el sistema simpato-adrenal (Cryer et al., 1967). El incremento en la liberación de adrenalina conllevaría a la formación de metilamina, que también es considerada la mayor constituyente del humo del tabaco (US Dept Health and Human Services, 1982). Además, se ha descrito que la metilamina es uno de los productos finales del metabolismo de la nicotina (McKennis et al., 1962). La metilamina entraría en el sistema circulatorio donde sería metabolizada por la amino oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO) a formaldehído. Así pues, el aumento de los niveles de formaldehído en suero podría estar relacionado con enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares asociadas al hábito de fumar (Yu et al., 1997).

4.2 Metabolismo del formaldehído.

La vía principal de eliminación del formaldehído endógeno es por oxidación a ácido fórmico en la reacción catalizada por la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (FALDH). Mediante la reacción espontánea de formaldehído con glutatión se obtiene el hemiacetal S-hidroximetilglutatión que es hidrolizado por la FALDH a S-formilglutatión, en una reacción NAD-dependiente. El S-formilglutatión es a continuación hidrolizado por la S-formilglutatión hidrolasa a formato y glutatión (Uotila y Koivusalo, 1974).



El glutatión está presente en todas las células de plantas, animales y microorganismos (Meister, 1988). Puesto que el contenido en glutatión en las células eucariotas es alto (0,1-10 mM), se calcula que el 50-80 % del formaldehído de la célula estaría unido con glutatión, convirtiéndose así en sustrato de la FALDH (Figura 1 A).

Otra vía de eliminación del formaldehído es a través de la reacción con tetrahidrofolato para formar 5,10-metilen-tetrahidrofolato (Blakley, 1960). De esta manera pasaría a incorporarse a las vías de metabolismo de compuestos de un carbono dependientes del tetrahidrofolato, que sintetiza precursores para la síntesis de diversos compuestos carbonados en la célula. Esta vía ocurre en el citosol. En términos cuantitativos, la vía dependiente de tetrahidrofolato solo tiene un significado mínimo en el metabolismo del formaldehído. En la célula la mayor parte del formaldehído se estima que estaría en forma de derivado del glutatión y solo un 1-3 % estaría acomplejado con tetrahidrofolato, en forma de 5,10-metilen-tetrahidrofolato (Heck y Casanova-Schmitz, 1984).

La aldehído deshidrogenasa mitocondrial es también capaz de catalizar la oxidación de formaldehído a ácido fórmico (Cinti et al., 1976; Tamaki y Hama, 1980) (Figura 1 B). Dicker y Cederbaum describieron en 1986 que la utilización de inhibidores de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial, tales como la cianamida y el crotonaldehído, reducen la oxidación de formaldehído a CO₂ en un 30-40 % aproximadamente. A pesar de estos estudios, no parece que la aldehído deshidrogenasa mitocondrial pueda contribuir de manera importante a la oxidación del formaldehído a ácido fórmico, debido a las concentraciones fisiológicas a las que normalmente está el formaldehído y a la alta Km de la enzima para este sustrato.

La catalasa, presente en los peroxisomas, participa también en una vía secundaria de oxidación del formaldehído a formato, mediante su acción peroxidativa (Figura 1 C). Esta reacción es dependiente de la velocidad de regeneración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Wayhas et al., 1978).

La etapa limitante en la conversión del formaldehído a CO₂ es la oxidación del ácido fórmico (formato). En plantas, dicha reacción ocurre mediante una formato deshidrogenasa que utiliza el NAD como cofactor (Olson et al., 2000).

En animales, el formato puede también ser eliminado por la orina. En rata se ha visto que el 82 % del formaldehído es eliminado en forma de CO₂, mientras un 13-14 % se liberaba en la orina como metionina, serina y como un derivado de formaldehído y cisteína, la tialzolina-4-carboxilato (Neely, 1964). En plantas se ha estudiado que el formato también puede ser emitido a la atmósfera a través de las hojas (Gabriel et al., 1999).

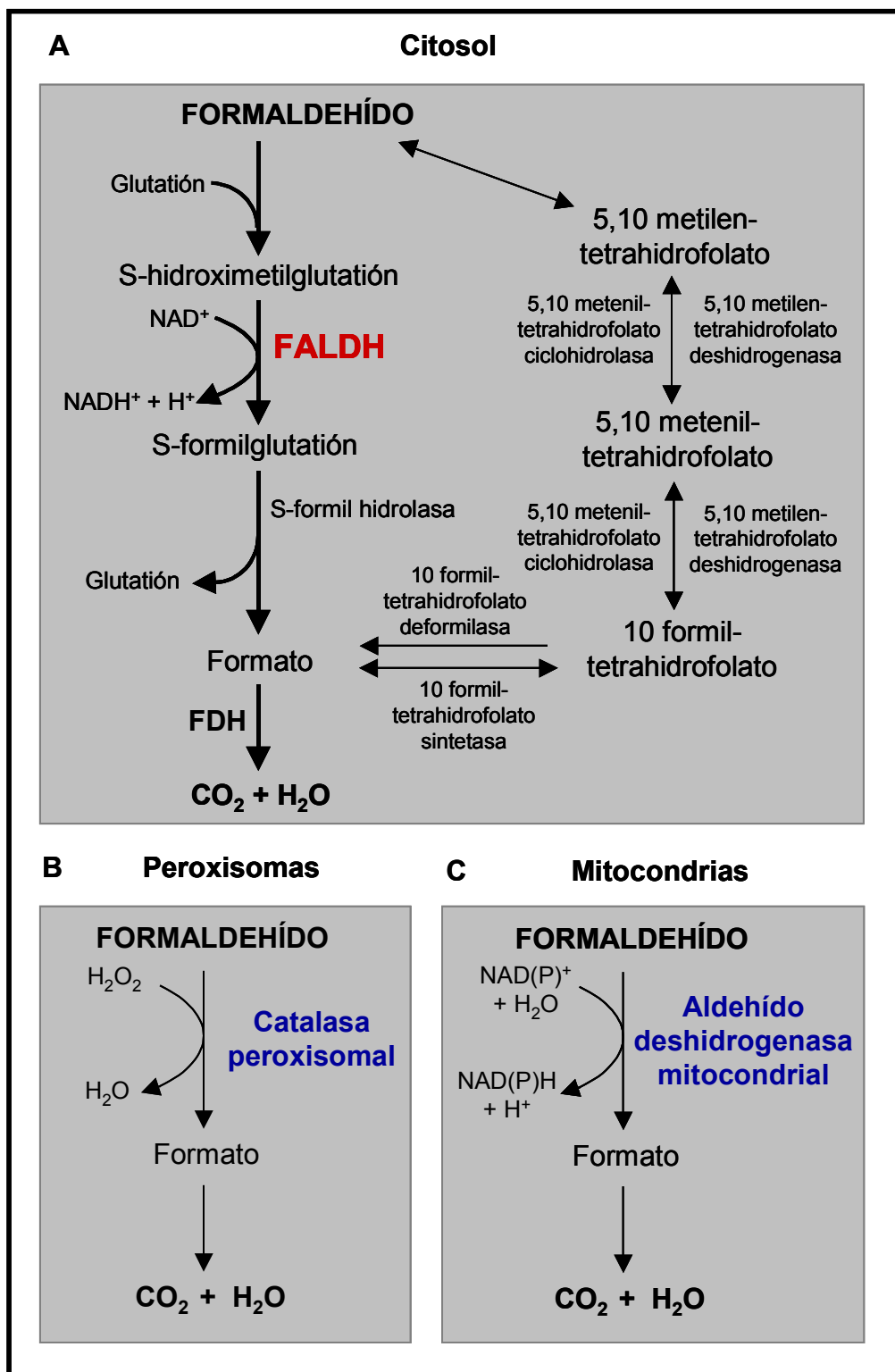


Figura 1. Diferentes vías de biotransformación del formaldehído.

4.3 Toxicidad del formaldehído.

Las manifestaciones clínicas experimentadas por la exposición al formaldehído dependen, por lo general, de la concentración del compuesto, y los síntomas son inmediatos y severos. En los casos graves, la muerte ocurre generalmente dentro de las primeras 10 horas de exposición. En el 50 % de los intoxicados la recuperación es rápida y el pronóstico es bueno, aunque de manera excepcional, en algunos pacientes se detecta la presencia de úlceras gástricas. Los síntomas de más baja exposición al formaldehído incluyen coriza, dolor de garganta, tos, dermatitis, insomnio, jaquecas, irritación de los ojos, fatigas, dificultades respiratorias, sinusitis, náuseas, bronquitis, y disminución transitoria de la capacidad pulmonar. Una elevada exposición al formaldehído provoca dolores abdominales, ansiedad, convulsiones, daño renal, piel pegajosa, diarreas y problemas respiratorios como neumonía y edema pulmonar. En casos extremos de intoxicación se puede originar colapso cardiovascular, acidosis metabólica, coma y muerte. En la Tabla 2 se resumen algunos de los efectos producidos por inhalación de formaldehído.

Concentración ambiental (ppm)	EFEECTO
< 0,05-1,5	No se observan efectos en el 50-70 % de las personas expuestas
0,05-2	Irritación ocular
0,1-25	Irritación de las vías respiratorias altas (nariz y garganta)
5-30	Irritación de las vías respiratorias bajas
50-100	Edema pulmonar, neumonía
> 100	Muerte

Tabla 2. Efectos por inhalación de formaldehído. (extraído de www.complucad.com)

Debido a su alta reactividad, el formaldehído sufre una serie de transformaciones biológicamente importantes, incluyendo la hidratación, la reacción con el hidrógeno activo de los tioles, nitroalcanos, cianuro de hidrógeno y fenol, y también las reacciones con el hidrógeno activo del amonio, aminas y amidas, resultando en la formación de puentes de metileno estables, que por tanto podrían afectar a las aminas de las proteínas y ácidos nucleicos (Feldman, 1973). El formaldehído reacciona con regiones de DNA de cadena sencilla debido a que en el DNA de cadena doble los grupos aminos no están accesibles.

Los entrecruzamientos entre DNA y proteínas son persistentes durante largos intervalos de tiempo tras la eliminación de los agentes entrecruzadores (Sugiyama et al., 1986), lo que unido a la baja capacidad reparadora existente durante la replicación del DNA, podría dar lugar a una pérdida de material genético. Este hecho ha dado lugar a que en algunos estudios se utilicen los entrecruzamientos DNA-proteína como un biomarcador de la exposición a formaldehído (Shaham et al., 1996).

Estudios *in vivo* han demostrado que el formaldehído induce roturas de cadena sencilla en el DNA (Magaña-Schwencke et al., 1978), transversiones de pares de bases AT a CG (Liber et al., 1989) y deleciones (Le et al., 1990). También se han descrito anomalías cromosómicas *in vivo*, tales como aberraciones cromosómicas (Levy et al., 1983), y se ha detectado la formación de micronúcleos en tejidos expuestos a formaldehído (Migliore et al., 1989; Sureda et al., 1993).

La agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha manifestado que existen suficientes pruebas acerca de la carcinogenicidad del formaldehído en animales, aunque en humanos las pruebas son aún insuficientes. Sin embargo, es muy posible que el formaldehído sea también carcinogénico para el hombre (IARC, 1995).

5. Glutación.

El glutatión (GSH), presente en plantas, animales y en algunas bacterias, a menudo en altas concentraciones, puede considerarse como un amortiguador de la oxidación-reducción. Es el compuesto azufrado soluble más abundante en las células vegetales. Su concentración en hojas es muy superior a la que existe en la raíz. Se forma a partir de la glicina, glutamato y cisteína (Figura 2).

La síntesis de glutatión ocurre en dos etapas consecutivas. En la primera de ellas, catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa, se sintetiza el dipéptido γ -glutamilcisteína a partir de glutamato, cisteína y ATP. A continuación, la enzima glutatión sintetasa cataliza la adición de una molécula de glicina al extremo C-terminal del dipéptido anterior, con la consiguiente formación de glutatión. La glutatión sintetasa se encuentra tanto en los cloroplastos como en el citosol, por lo que se deduce que el glutatión se puede formar en ambos compartimentos. Sin embargo su síntesis ocurre en mayor medida en los cloroplastos (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

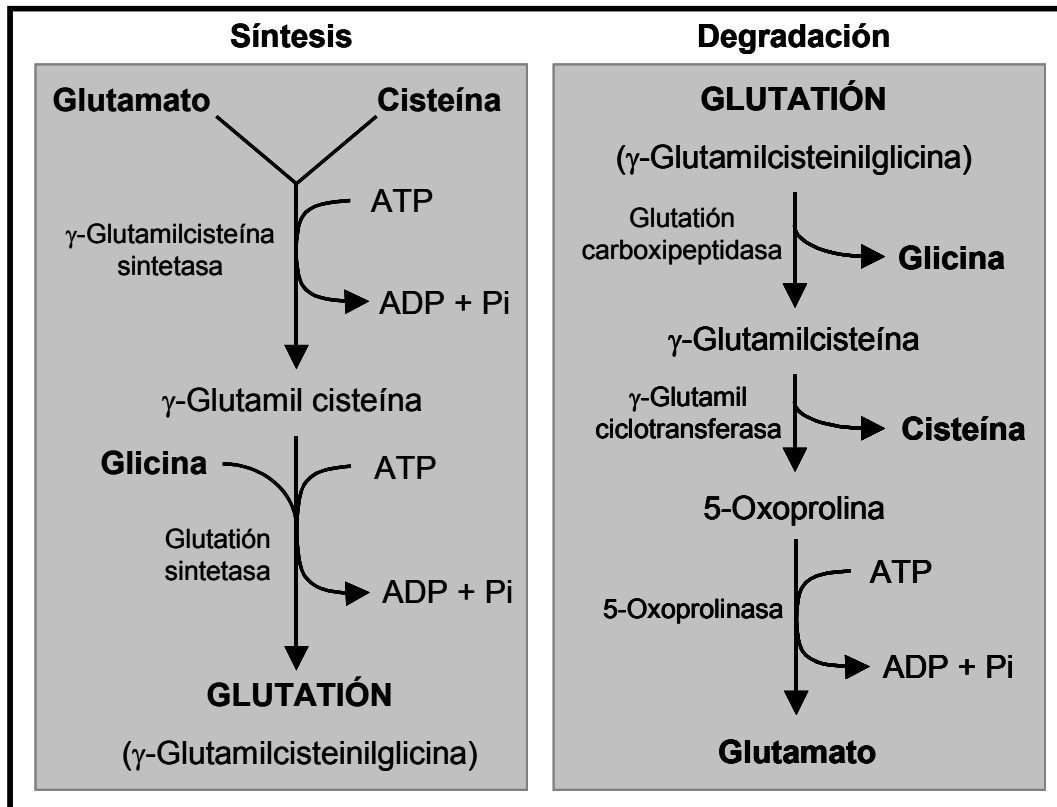


Figura 2. Síntesis y degradación del glutatión en las plantas.

Parte del glutatión sintetizado en los tejidos fotosintéticos es exportado a la raíz y a las zonas de crecimiento del tallo con el objetivo de suministrar a dichos tejidos azufre reducido. En ellos, el glutatión es degradado en sus componentes aminoacídicos, los cuales posteriormente son metabolizados. La degradación del glutatión en las plantas transcurre a través de una vía distinta de la que opera en animales. El proceso se inicia con la separación del residuo de glicina por acción de la glutatión carboxipeptidasa. A continuación, la enzima γ -glutamil ciclotransferasa cataliza la separación de la cisteína. Finalmente la 5-oxoprolina resultante es convertida en glutamato por la 5-oxoprolinasa en una reacción dependiente de ATP. La cisteína producida en la degradación del glutatión en los órganos importadores constituye la fuente de azufre orgánico para la síntesis de proteínas y metabolitos azufrados en dichos órganos (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

5.1 Funciones del glutatión en las plantas.

El glutatión desempeña en las plantas diversas funciones, entre las que destacan las siguientes:

1. Almacenamiento y transporte de azufre reducido.

Cuando se suministra abundante SO_4^{2-} a cultivos de células en suspensión, la concentración intracelular de glutatión aumenta considerablemente e incluso una gran parte del glutatión sintetizado es excretado al medio. Una vez que el SO_4^{2-} del medio se agota, el glutatión excretado es tomado por las células y reutilizado como fuente de azufre para la síntesis de proteínas. El glutatión también actúa como compuesto de transporte a larga distancia del azufre reducido. Las hojas suelen asimilar más SO_4^{2-} del que normalmente requieren. El exceso de azufre asimilado es translocado en forma de glutatión por el floema a otros órganos.

2. Reducción de grupos disulfuros de proteínas.

Muchas proteínas enzimáticas poseen grupos sulfhidrilos (-SH) que son esenciales para su actividad catalítica. La oxidación por cualquier agente oxidante, como por ejemplo el oxígeno, de grupos sulfhidrilos próximos origina la formación de puentes disulfuros (S-S), lo que suele ocasionar la pérdida de la actividad enzimática. El glutatión reducido (GSH), protege a las enzimas de dicha inactivación. Como resultado de esta acción se produce la forma oxidada del glutatión (GSSG), la cual está constituida por dos moléculas de glutatión unidas entre sí por un puente disulfuro. Su forma reducida se regenera con NADPH, a partir de la forma oxidada, en una reacción catalizada por la glutatión reductasa (Azón-Bieto y Talón, 1993).

3. Detoxificación del peróxido de hidrógeno en los cloroplastos.

Los cloroplastos contienen una vía de disipación del O_2 y del H_2O_2 en la que el ascorbato y el glutatión actúan como intermediarios. La enzima superóxido dismutasa, que es muy abundante en los cloroplastos, cataliza la dismutación del O_2^- a H_2O_2 . Sin embargo, los cloroplastos apenas contienen catalasa, por lo que la mayor parte del

H₂O₂ generado en dichos orgánulos es reducido a H₂O por el glutatión reducido (GSH) por la vía del ascorbato (Foyer y Halliwell, 1976). Ambos metabolitos se encuentran en el estroma del cloroplasto a concentraciones suficientemente altas. Los niveles de GSH son mantenidos por reducción del glutatión oxidado (GSSG) con NADPH.

4. Conjugación con pesticidas.

El glutatión reducido tiene la capacidad de formar conjugados, a través de su átomo de azufre, con muchas sustancias electrofílicas entre las que se encuentran diversos compuestos químicos que se emplean como pesticidas en la agricultura. Dichas reacciones de conjugación son catalizadas por un conjunto de isoenzimas denominadas glutatión-S-transferasas. Se ha encontrado que la mayor tolerancia de algunas especies vegetales a herbicidas del tipo de las triazinas y de las cloroacetamidas es el resultado de una mayor capacidad de conjugar el glutatión con los mencionados herbicidas, debido a que dichas especies poseen niveles más altos tanto de glutatión como de glutatión-S-transferasas (Rennenberg y Lamoureux, 1990).

6. Mecanismos de defensa en plantas.

Las plantas son capaces de activar una amplia gama de mecanismos de defensa en respuesta a los ataques de agentes patógenos. Un factor crucial que determina el éxito de estos mecanismos es la velocidad de dicha activación. Como consecuencia, existe un gran interés en comprender como las plantas reconocen el ataque de patógenos y controlan la expresión de los mecanismos de defensa.

Los principales organismos causantes de condiciones desfavorables para las plantas son los agentes patógenos como bacterias, hongos, virus y viroides, aunque los insectos, los nemátodos e, incluso, las mismas plantas pueden ser también fuente de estrés. La interacción entre el patógeno y la planta puede ser compatible o incompatible. En la interacción compatible, el patógeno es virulento y consigue invadir a

la planta. Su entrada en la planta huésped está ligada a la secreción de una mezcla de enzimas (cutinasas, celulasas, pectinasas y proteasas) que hidrolizan las estructuras protectoras, como la cutícula y la pared de las células epidérmicas, y degradan las toxinas preexistentes. Una vez dentro de la planta, los patógenos segregan sustancias fitotóxicas con el fin de matar células y nutrirse de ellas, o compuestos de tipo hormonal para manipular y redirigir la maquinaria celular en su propio beneficio. En la interacción incompatible, el patógeno no tiene éxito en su ataque. La falta de virulencia puede deberse a que la planta atacada no sea el huésped adecuado, a que el patógeno no pueda superar las barreras estructurales o químicas, o a que su reconocimiento por la planta dispare mecanismos de defensa adecuados (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

Algunos patógenos potenciales activan en la planta huésped una rápida respuesta de defensa, que es muy específica. En muchos casos, esto ocurre cuando el patógeno porta un gen de avirulencia (*Avr*) que interacciona específicamente con el correspondiente gen de resistencia del huésped (*R*). Este mecanismo se conoce con el nombre de interacción “gen a gen” y es el responsable de muchas de las reacciones de defensa inducidas por patógenos específicos (Figura 3). En muchos casos, los genes *Avr* y *R* son dominantes, lo que sugiere que sus productos génicos podrían interaccionar directamente en un tipo de unión ligando-receptor (Glazebrook J, 1999). Los genes *R* han sido muy estudiados en los últimos años (Jones y Jones, 1997; Ronald, 1998).

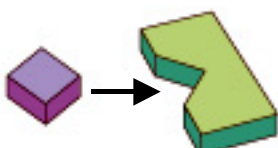
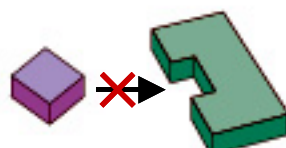
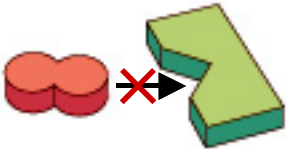
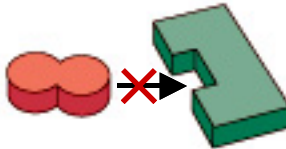
Genotipo del patógeno	Genotipo de la planta huésped	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 Proteína R1 Planta no enferma (Planta y patógeno son incompatibles)</p>	 <p>Avr1 Proteína r1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 Proteína R1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)</p>	 <p>avr1 Proteína r1 Planta enferma (Planta y patógeno son compatibles)</p>

Figura 3. Modelo de interacción “gen a gen”. La figura fue extraída del libro Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Buchanan, Gruissem and Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. ISBN 0-943088-40-2.

Una de las primeras manifestaciones de las reacciones de defensa en las plantas es la llamada respuesta de hipersensibilidad o HR que implica una muerte celular localizada en el lugar de la infección, dando lugar a lesiones necróticas. La activación de la HR resulta en el confinamiento del patógeno en el lugar de la infección, impidiendo su avance hacia el resto de la planta y contribuyendo así a la supervivencia de ésta. A nivel celular, la activación de la HR incluye la producción de especies reactivas del oxígeno, peroxidación lipídica y fuga de electrolitos, debido a la ruptura de membranas (Figura 4).

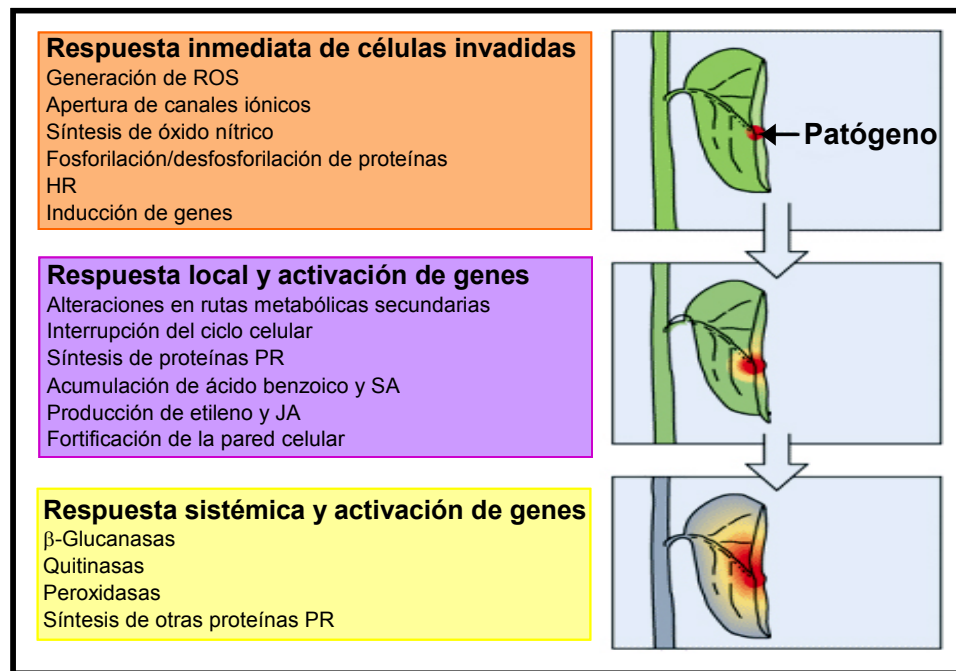


Figura 4. Representación esquemática de la respuesta de la planta provocada por el ataque del patógeno. La figura fue extraída del libro *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan, Gruissen and Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. ISBN 0-943088-40-2.

Otras respuestas de defensa incluyen el refuerzo de la pared celular que rodea a la región infectada (por deposición de lignina, callosa y otros) y la producción de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas) y enzimas líticas.

Muchas de estas respuestas están controladas por una rápida activación transcripcional de los llamados “genes de defensa”, que incluyen los genes de la vía de los fenilpropanoides (implicados en la síntesis de lignina, fitoalexinas y ácido salicílico, entre otros), y los genes relacionados con la patogénesis (genes PR). Los productos de estos últimos genes, las proteínas PR, fueron definidas en principio como un grupo de proteínas ácidas que se acumulaban en respuesta a la infección por agentes patógenos, se localizaban en espacios intercelulares y presentaban una gran resistencia frente a las degradaciones proteolíticas (Van Loon, 1990). Este concepto fue ampliado posteriormente para incluir también a una serie de proteínas homólogas de

carácter básico, presentes principalmente en las vacuolas, y sintetizadas también como respuesta al estrés o incluso en ciertas condiciones normales del desarrollo (Bol et al., 1990). Entre las PRs se encuentran formas básicas y ácidas de hidrolasas (quitinasas y β -1,3 glucanasas), así como ciertas proteínas asociadas al estrés osmótico llamadas osmotinas (Singh et al., 1989; Bol et al., 1990). La interacción planta-patógeno induce también, además de lo anteriormente dicho, la respuesta de resistencia que actúa en toda la planta, incluídos los lugares que no han estado en contacto con el patógeno. A este fenómeno se le llama Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), y se relaciona con la inducción de un conjunto de genes de defensa (los genes SAR) en hojas no infectadas de plantas inoculadas. La SAR reduce la severidad de los síntomas causados por un amplio espectro de patógenos. Existen muchos datos experimentales que indican que el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) son señalizadores moleculares de la SAR.

Las plantas reaccionan a las heridas mecánicas –ya sean producidas por agentes bióticos o abióticos- activando un sistema de respuestas que incluye muchos de los genes activados por la interacción planta-patógeno, y otros específicos de este daño particular, como por ejemplo los relacionados con la cicatrización de las heridas (Bowles, 1990). Entre los genes de defensa inducidos específicamente por herida se encuentran los inhibidores de proteinasas Inh I e Inh II, que inhiben específicamente la actividad de las serin-endopeptidasas. Se ha demostrado que, entre otros, los oligosacáridos, el péptido sistemina, el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido salicílico, están implicados en la complicada red de señalizaciones que conlleva a la activación de los inhibidores de proteinasas y otros genes de respuesta a heridas (Doares et al., 1995; O'Donnell et al., 1996; Pearce et al., 1991; Peña-Cortés et al., 1995; Shulaev et al., 1995).

6.1 Estrés oxidativo.

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos aeróbicos, pero algunos de sus derivados son reactivos, y están implicados en muchos procesos patológicos. Estos derivados han sido denominados por muchos autores como especies reactivas del oxígeno (conocidos también como ROS por sus siglas en inglés). Las condiciones de estrés en general, tanto biótico como abiótico, producen un estrés oxidativo, ya que provocan directa o indirectamente la formación de ROS.

El funcionamiento de la maquinaria metabólica aeróbica genera y consume, de forma continua y controlada, una amplia variedad de ROS, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el oxígeno en estado de singlete (1O_2). Las ROS reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas más importantes: en contacto con los ácidos grasos poliinsaturados de los glicerolípidos de las membranas forman peróxidos, y modifican los aminoácidos que componen las proteínas. Las ROS también inducen la ruptura y la agregación de las proteínas, haciéndolas más susceptibles al ataque de las proteasas, y causan mutaciones y deleciones en los ácidos nucleicos.

Prácticamente todas las situaciones de estrés alteran el metabolismo celular y modifican el equilibrio producción / eliminación de ROS, provocando su acumulación e imponiendo condiciones de estrés oxidativo. Frente a estas condiciones las plantas estimulan: a) la síntesis de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, el ascorbato y el α -tocoferol; y b) la síntesis de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa, la glutatión reductasa y la catalasa. El glutatión, el ascorbato y el α -tocoferol actúan como antioxidantes o como sustratos en las reacciones de detoxificación. En el estroma del cloroplasto, en la matriz mitocondrial y en el citosol, se localiza un ciclo de regeneración de antioxidantes denominado ciclo de Halliwell-Asada, en el cual el ascorbato y el glutatión se vuelven a reducir utilizando el NADPH como donador de electrones (Azcón-Bieto y Talón, 2001).

6.2 Características generales de algunos señalizadores moleculares.

6.2.1 Ácido Jasmónico (JA)

El ácido jasmónico (JA) es un derivado ciclopentanona del ácido linolénico que presenta las características de una hormona de plantas (Sembdner y Parthier, 1993). Cuando se produce un daño mecánico, aumentan los niveles endógenos de JA (Creelman et al., 1992), por una síntesis de *novo*, lo cual provoca la activación transcripcional de diversos genes (genes inducibles por herida). El JA aplicado exógenamente es capaz de inducir estos mismos genes en plantas no dañadas (Farmer et al., 1992; Hildmann et al., 1992). Entre estos genes se encuentran inhibidores de proteasas, y genes de la vía de los fenilpropanoides (CHS, PAL, HMGR) (Dittrich et al., 1992; Creelman et al., 1992), que dan lugar a la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y acumulan en las plantas después de la exposición a microorganismos. Este hecho establece una relación entre las respuestas de defensa por lesión y el ataque por patógenos.

La aplicación de jasmonato exógeno a las plantas produce grandes cambios en la traducción, transcripción y en las poblaciones de mRNA (Sembdner y Parthier, 1993). En hojas de cebada tratadas con JA, se observó una reducción en la síntesis de las subunidades de la Rubisco así como de otras proteínas (Weidhase et al., 1987). También se ha demostrado que el JA aplicado en hojas disminuye la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis (Bunker et al., 1995) y causa clorosis, lo que sugiere que este compuesto juega un papel en la senescencia de las plantas (Ueda et al., 1981).

El JA también juega diversos papeles en el desarrollo normal de las plantas. Por ejemplo, en la tuberización de la patata (Pelacho y Mingo-Castel, 1991), induciendo, en hojas, la acumulación de proteínas de almacenamiento vegetativo (VSP) que actúan como reservorios transitorios de nitrógeno en plantas (Mason y Mullet, 1990). La

caracterización reciente de mutantes de *Arabidopsis thaliana* insensibles a JA o deficientes en la producción de JA también sugiere que esté implicado en la producción de polen (Feys et al., 1994).

En la actualidad se conoce muy poco sobre la forma en que el JA es percibido por la célula. Se han aislado varios mutantes de *Arabidopsis thaliana* que tienen alterada su sensibilidad a JA, entre ellos tres mutantes no alélicos denominados *jin1*, *jin4* (Berger et al., 1996) y *coi1* (Feys et al., 1994). La disponibilidad de mutantes insensibles a JA en *Arabidopsis thaliana* es de gran utilidad para el estudio molecular de la vía de señalización del JA y de su implicación en la expresión de genes inducidos por herida.

6.2.2 Ácido Salicílico (SA)

El ácido salicílico (SA) se encuentra tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas (Cleland y Ajamy, 1974; Raskin et al., 1990). Las plantas sintetizan el SA a partir del ácido benzoico, un intermediario de la vía de los fenilpropanoides, a través de una reacción catalizada por una citocromo P450 monooxigenasa llamada 2-hidrolasa del ácido benzoico (BA2H), que es inducida por patógenos (Chadha y Brown, 1974; Rao et al., 1997).

Está ampliamente demostrado que el SA juega un papel fundamental en la resistencia a las enfermedades en las plantas (Klessig y Malamy, 1994; Hung et al., 1996). Por ejemplo la aplicación exógena del SA activa la expresión de los genes relacionados con la patogénesis (genes PR) y aumenta la resistencia a enfermedades en las plantas (White, 1979). En un gran número de especies vegetales se ha asociado altos niveles de SA con resistencia a un patógeno invasor (Uknes et al., 1992). Curiosamente, el estrés oxidativo producido por ozono o por luz ultravioleta provoca una síntesis de SA en tabaco (Yalpani et al., 1994). En los últimos años, estudios genéticos y moleculares han demostrado que el SA es esencial para la respuesta de hipersensibilidad (HR) inducida por patógenos (Levine et al., 1994; Shirasu et al., 1997),

aunque no se conoce bien si el incremento de SA es la causa o la consecuencia de la misma.

En cultivos de células de tabaco, el SA induce la generación del anión superóxido, provocando la formación de H_2O_2 intracelular y la alteración del estado redox celular (Kawano et al., 1998). La alta concentración de radicales libres favorece la interacción de SA con catalasas y ascorbato peroxidasa, dando lugar a un radical libre del SA, el SA^* , que provoca peroxidación lipídica (Rao et al., 1997).

Además de los estudios moleculares y bioquímicos, se han aplicado algunas estrategias genéticas a la investigación de las vías de transducción de señales de SA, habiéndose obtenido mutantes insensibles al SA en *Arabidopsis*. Estos mutantes no pueden expresar los genes PR en respuesta al tratamiento con SA o sus análogos funcionales, como el ácido 2,5-dicloroisonicotínico y el benzotiodiazol (Shah et al., 1997). Además, muestran un aumento en la sensibilidad a bacterias y hongos patógenos. En los últimos años se ha demostrado que la resistencia del tabaco al TMV (virus del mosaico del tabaco) es inducida por el SA (Chivasa et al., 1997).

La acumulación endógena de SA es una de las condiciones necesarias para que se produzca la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Malamy et al., 1990; Métraux et al., 1990). Se han obtenido plantas transgénicas que expresan el gen bacteriano *nahG* que codifica para la salicilato hidroxilasa, enzima que convierte el SA en catecol. Dichas plantas transgénicas son conocidas como “plantas NahG” y contienen menor cantidad de SA intracelular. Las plantas NahG en contacto con un patógeno son incapaces de desarrollar SAR, sugiriendo que la acumulación de SA es un paso crucial en la vía de traducción de señales que llevan a desencadenar esta respuesta (Gaffney et al., 1993). La expresión del gen *nahG* por las plantas transgénicas también elimina la inducción de varios genes involucrados en la defensa de las plantas (Ryals et al., 1996).

6.2.3 Ácido abscísico (ABA)

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona reguladora del crecimiento que se encuentra en pequeñas cantidades en todos los tejidos vegetales. ABA es un sesquiterpenoide que se sintetiza a partir del isopentenilpirofosfato, que a su vez deriva del ácido mevalónico. Algunos hongos fitopatógenos también sintetizan ABA, pero la ruta biosintética es diferente de la de las plantas (Zeervart y Creelman, 1988).

El ABA está también relacionado con la adaptación al estrés. Diversos tipos de estrés, tales como el déficit hídrico, la salinidad, el frío, las condiciones de encharcamiento o los agentes patógenos, producen un incremento en la síntesis de ABA (Zeervart y Creelman, 1988). Además, el ABA induce una serie de respuestas que se consideran adaptaciones de las plantas al estrés, tales como la reducción del crecimiento caulinar, la senescencia foliar, el cierre estomático, el ajuste osmótico, el aumento en la conductividad de las raíces, y la inducción de la expresión de determinados genes (Zeervart y Creelman, 1988; Skriver y Mundy, 1990). La señal de ABA probablemente se percibe a través de un hipotético receptor que aún no ha sido caracterizado (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

Entre los genes inducidos por ABA, a nivel transcripcional, se encuentran muchos relacionados con la adaptación a situaciones de estrés hídrico en procesos de desarrollo -proteínas RAB en maíz (Kriz et al., 1990), LEA de cebada (Bartels et al., 1988)- ó provocadas por situaciones medioambientales -osmotinas (Singh et al., 1989)-. Algunos autores proponen que el ABA puede actuar como señalizador primario en la cascada sistémica de señales provocada por herida. Por ejemplo, en mutantes de patata y tomate deficientes en ABA no se observa una acumulación de mRNA de *Inh II* en respuesta a herida (Herde et al., 1996; Peña-Cortés et al., 1989, 1996) mientras que, en los mismos mutantes de tomate previamente tratados con ABA sí se observó la acumulación de mRNA del *Inh II* (Peña-Cortés et al., 1989, 1996; Wasternack et al., 1996). Otros experimentos muestran que en hojas de tomate heridas, los niveles de

ABA aumentaron de 2 a 50 veces (Peña-Cortés et al., 1989, 1996; Herde et al., 1996). Como consecuencia de estos resultados, se planteó una hipótesis que situaba al ABA como factor fundamental en la cascada de transducción de señales que activa genes de defensa (Peña-Cortés et al., 1996; Wasternack y Parthier, 1997).

No obstante, se había reportado con anterioridad que ABA no podía inducir la acumulación de las proteínas Inh I e Inh II al ser suministrado a través de un corte en el tallo en plantas de tomate jóvenes (Ryan, 1974; Schaller y Ryan, 1996). En callos de tabaco (Kernan y Thornberg, 1989) y suspensiones celulares (Rickauer et al., 1992) tratados con ABA, tampoco se observó que se acumularan dichos inhibidores de proteinasas.

Para poder examinar detalladamente estas discrepancias y comprender con mayor claridad el papel del ABA en la respuesta a heridas se realizó un estudio de los efectos del ABA en la acumulación de transcritos y proteínas de Inh I e Inh II en hojas de plantas de tomate jóvenes. Los resultados obtenidos concluyen que el ABA no juega un papel primordial en las vías de transducción de señales para la activación de genes de defensa en respuesta a heridas o elicitores. Sin embargo, todo hace pensar que el ABA es necesario para mantener las condiciones fisiológicas de las plantas en un estado que permita que su respuesta a herida funcione eficazmente (Birkenmeier y Ryan, 1998).

6.2.4 Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es una molécula bioactiva que ejerce un gran número de funciones en especies filogenéticamente distantes.

NO ha sido una de las moléculas más estudiadas en los últimos 15 años. Ejerce funciones reguladoras cruciales en un amplio espectro de procesos fisiológicos,

incluyendo neurotransmisión, vasodilatación, defensa contra la invasión de microorganismos y apoptosis (Schmidt y Walter, 1994).

En mamíferos, la enzima óxido nítrico sintasa (NOS; EC 1.14.23.29) es la principal responsable de la producción de NO. Se han encontrado 3 isoformas de NOS, dos de ellas de expresión constitutiva, NOS neuronal (nNOS) y NOS endotelial (eNOS), y una de expresión inducible (iNOS) (Griffith y Stuerhr, 1995). Hasta el momento no se ha encontrado en plantas ninguna proteína con homología de secuencia a las NOS de mamíferos. Existen pruebas indirectas de la existencia de una NOS en plantas a través de experimentos con anticuerpos anti-NOS de diferentes especies (Beligni y Lamattina, 2001), y con inhibidores de la NOS de mamíferos (Delledonne et al., 2001).

El óxido nítrico está involucrado en numerosos procesos durante el ciclo vital de las plantas. Interviene en el crecimiento y la diferenciación celular (Leshem y Haramaty, 1996), en la estimulación de la germinación de las semillas (Grubisic y Konjevic, 1990; Keeley y Fotheringham 1997; Beligni y Lamattina, 2000), en el crecimiento de la raíz (Gouvea et al., 1997), en la maduración del fruto (Leshem et al., 1998), en el cierre estomático (García y Lamattina, 2001) y en la senescencia (Leshem y Haramaty, 1996).

Existen numerosos datos que indican que el NO y los metabolitos relacionados con el NO, tales como los S-nitrosotioles, juegan un papel importante en la transducción de señales de las reacciones de defensa de las plantas (Wendehenne et al., 2001; Delledonne et al., 1998). Uno de los metabolitos endógenos más abundantes del NO es el S-nitrosoglutatión (GSNO), formado por reacción del NO con el glutatión en presencia de oxígeno (Gaston et al., 1993). El NO es esencial para que se produzca la respuesta de hipersensibilidad (HR) que es inducida por patógenos (Wendehenne et al., 2001; Delledonne et al., 1998). Además, muchos genes de defensa tales como el que codifica para la fenilalanina amonio liasa (PAL), glutatión S-transferasa (GST) y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR1), son inducidos por la administración de donores de NO o por microinyección de NOS recombinante de mamíferos (Durner et

al., 1998; Delledonne et al., 1998). Estos resultados confirman el papel del NO o de los metabolitos derivados del NO como señalizadores moleculares en los mecanismos de defensa de las plantas.

7. Sistemas biológicos utilizados.

7.1 Línea celular de tabaco BY2.

La línea celular BY2 fue establecida a partir de callos obtenidos de células del mesófilo de la hoja de *Nicotiana tabacum* L. Cv. Bright Yellow 2, en el Instituto Central de Investigaciones de tabaco de Japón y la Corporación de Salud Pública (Kato et al., 1972). Estas células presentaban el interés de tener un rápido crecimiento y de la ausencia de nicotina, por lo que se trataba de estudiar la posibilidad de ser usadas como materia prima para cigarrillos. Ese proyecto fracasó por el costo de la operación y por algunos problemas relacionados con la calidad del producto final.

Entre las características más importantes de las células BY2 están su rápido crecimiento, ya que se obtiene la saturación del cultivo en una semana, y la posibilidad de ser sincronizadas con buena eficacia (Nagata et al., 1992). En la Figura 5 se puede observar el aspecto de las células BY2, teñidas con DAPI.

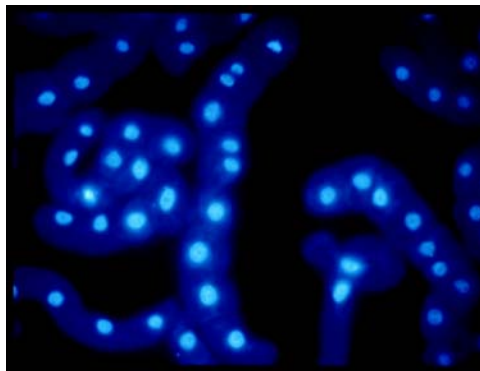


Figura 5. Células de tabaco BY2 teñidas con DAPI.

Actualmente constituyen un buen sistema modelo en el estudio de biología molecular y celular de plantas. La congelación de células como método de preservación a largo plazo aún no ha sido puesta a punto para células vegetales. Por esta razón, la suspensión celular de BY2 debe mantenerse continuamente en cultivo, resultando muy tedioso su mantenimiento.

7.2 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo.

Arabidopsis thaliana es una planta con flores de la familia Cruciferae (Figura 6), que ofrece muchas ventajas como modelo experimental para la genética de plantas (Redel, 1975). A lo largo de la década de los 80, esta pequeña planta cosmopolita, sin ningún interés aparente, vino a convertirse en la estrella de los genetistas moleculares, precisamente por tener algunas propiedades de las que el tabaco carecía (Meyerowitz, 1989). Esta hierba crece rápidamente bajo una amplia gama de condiciones de cultivo, pudiendo completar su ciclo en solo 5 o 6 semanas, y su tamaño es tan pequeño que pueden cultivarse varios individuos en un área de 1cm². Una planta desarrolla unas 10 flores, que son bisexuales, y cada silicua contiene entre 30 y 60 diminutas semillas. Como la planta continúa produciendo flores durante varios meses, es posible obtener del orden de 10 000 semillas de un solo individuo. La planta adulta puede llegar a medir 20 o 30 cm.



Figura 6. Plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis puede transformarse muy fácilmente por las técnicas más sencillas de transformación genética. Tiene un genoma relativamente pequeño, entre 70 000 y 100 000 kilopares de bases, de los que solo 18 000 corresponden a secuencias de DNA repetitivo.

Su genoma está totalmente secuenciado y accesible en bancos de datos de uso público. Además, existe un gran número de mutantes, muy útiles para la investigación en biología molecular.

Por las razones expuestas, *Arabidopsis thaliana* es actualmente la planta modelo por excelencia para estudios de genética y biología molecular.

OBJETIVOS

Con el objetivo general de realizar un estudio funcional de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Arabidopsis thaliana* nos propusimos los siguientes objetivos parciales:

- 1- Estudiar la respuesta de la FALDH a herida y a diferentes señalizadores moleculares relacionados con la defensa frente a insectos herbívoros, tales como el ácido abscísico y el ácido jasmónico.
- 2- Estudiar la respuesta de la FALDH frente al ácido salicílico, el cual provoca una situación de estrés oxidativo en la célula y está relacionado con las reacciones de defensa de la planta y con el establecimiento de SAR.
- 3- Obtención de plantas transgénicas antisentido de *A. thaliana* y estudio de su resistencia al formaldehído exógeno.
- 4- Estudiar la localización celular y subcelular de la FALDH en diferentes tejidos de la planta.

- 5- Estudiar las interacciones planta-patógeno en líneas transgénicas con niveles de FALDH modificados.