

CSIC
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



**METABOLISMO DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO
EN PLANTAS DE GUISANTE (*Pisum sativum* L.)
Y EN PEROXISOMAS DE HOJAS
EN CONDICIONES DE ESTRÉS POR CADMIO**

María C. Romero Puertas

TESIS DOCTORAL

2002

**Metabolismo de especies de oxígeno reactivo
en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y en peroxisomas de hojas
en condiciones de estrés por cadmio**

Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Biológicas
María C. Romero Puertas para optar al grado de Doctor.

Fdo. María C. Romero Puertas

Vº Bº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

Fdo. Dra. Luisa M^a Sandalio González
Dra. en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Fdo. Dr. Luis A. del Río Legazpi
Dr. en Ciencias Químicas
Profesor de Investigación del CSIC

Granada, 2002

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín de Granada, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con ayuda de una beca del Plan de Formación del Personal Docente e Investigador de la Junta de Andalucía, y ha sido financiado por la DGEIC (proyecto PB98-0493-01), la Unión Europea (proyecto de redes HPRN-CT-2000-00094), y la Junta de Andalucía (grupo de investigación CVI 192).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

- *Winter Meeting of the Society for Free Radical Research (European Region) and Euroconference on "Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants"* (Granada, Diciembre 1998)
- V Reunión del Grupo Español de Radicales Libres (Granada, Diciembre 1998)
- XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VI Hispano-Portuguesa (Sevilla, Septiembre 1999)
- VI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres y II Latinoamericana (Puerto de Santa María, Cádiz, Junio 2000)
- XIV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VII Hispano-Portuguesa (Badajoz, Septiembre 2001)
- *Fifth Conference on "Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants"* (Niza, Noviembre 2001)

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

M.C. Romero-Puertas, I. McCarthy, L.M. Sandalio, J.M. Palma, F.J. Corpas, M. Gómez and L.A. del Río (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radical Research* **31**: S235-241

M.C. Romero-Puertas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, M. Gómez and L.A. del Río (2002) Cadmium causes the modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 677-686

L.M. Sandalio, H.C. Dalurzo, M. Gómez, M.C. Romero-Puertas and L.A. del Río (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115-2126

I. McCarthy, M.C. Romero-Puertas, J.M. Palma, L.M. Sandalio, F.J. Corpas and L.A. del Río (2001) Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant, Cell and Environment* **24**: 1065-1073

En los últimos cinco años he estado inmersa en la elaboración de este trabajo y durante este tiempo son muchas las personas que de una forma u otra han colaborado en su realización y otras muchas que lo han sufrido. A todas ellas mi más sincero agradecimiento. Espero que si se me olvida alguien se dé por aludido con este párrafo.

En primer lugar a mis directores de Tesis: el Dr. Luis Alfonso del Río por su confianza, orientación científica y por su rigor tan necesario en un trabajo como éste.

A la Dra. Luisa M^a Sandalio por su apoyo y por su continuo aporte de ideas que nos ha llevado por nuevos y diversos campos en la realización de la Tesis, lo que ha supuesto un gran estímulo para mí, y por su gran capacidad para llevarlo todo para adelante.

Al Dr. Manolo Gómez por su inestimable ayuda con las plantas y la estadística sin la cual gran parte de este trabajo no se hubiera podido realizar.

Al Dr. José Manuel Palma por ser como es, por su ánimo, ayuda y experiencia siempre que lo he necesitado y por su detector de erratas.

Al Dr. Javier Corpas que siempre ha sido un gran compañero de laboratorio, compartiendo sus conocimientos conmigo en todo momento y sobre todo por su apoyo y amistad.

A Iva por su trabajo con las proteasa peroxisomales y por los inicios de esta Tesis.

A Anita, compañera de fatigas en la biología molecular y sobre todo por ser tan mimosín y estar dispuesta siempre a dar un abrazo y a tirar pa'lante en este trabajo en el que NOS hemos metido.

A las últimas incorporaciones del grupo, Rosa, por su "shispa" y alegría, como si fuera de Rota, y a María (bis) compañera en la zona RNasa free del laboratorio, por su ayuda en la decoración de la Tesis y por estar dispuesta siempre a echar una mano, sobre todo en los últimos momentos en los que parece que esto no se acaba nunca. Espero que os vaya muy bonito a las dos.

A toda la gente que ha pasado por el grupo en este tiempo: Carmelo que me enseñó a hacer geles, extractos y actividad SOD con infinita paciencia, a Mariajo, las dos Inmas, Elena, Angelines y Marisol que han ayudado a que el laboratorio esté más o menos presentable. A Alejandro, por su tranquilidad y por su amistad. A Ana Z, navarrica pues, por su ayuda con los carbonilos y sobre todo por el queso. A Carmen, por su afición al cuarto oscuro y a Raquel por su tesón y a pesar del β -mercaptoetanol. A nuestra actual visita Lara, que me ha ayudado enormemente con esos pequeños detalles informáticos que nos joroban, sobre todo en el último momento.

A Silvia y a Mariam por su ayuda con mis constantes dudas sobre el ARN y más que nada por su amistad.

A los becarios de la EEZ, sobre todo a los que luchan por mejorar nuestra situación. A Carlota, por preguntarme como si yo lo supiera todo, gracias por tu confianza.

A la gente de Servicios Técnicos de la Universidad de Granada por su ayuda en la microscopía y en la fotografía.

A mis amigos que han aguantado estoicamente los peores momentos: a mamunoz por Ancazoberavina, a Carlos por esas excursiones por los ríos andaluces y por haber estado ahí más de media vida, a Inés por todos esos buenos momentos, por Isabel y Ana y por el bético. A Lola, MC Ropero y Fariba porque sin su apoyo esto habría sido muy difícil.

A mi familia que ha apoyado de forma incondicional todas mis decisiones por muy difíciles de entender que fueran. A la tita Pili y a Daniel, porque no se puede tener mejor madrina. A mi hermana Olga que sí es verdad que siempre ha estado ahí, incluso antes de que yo llegara, a Isra, por ser como un hermano para mí, por introducirme en el mundo de la música y por ser tan brasileirinho y a Pablo, por su sonrisa y por mi pasión por él. A mi hermana Cande, la peque de la casa, por que le vaya muy bien en su nueva vida con Carlos.

A mis padres

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El Cadmio	1
1.2. Fuentes de Contaminación de Cadmio	2
1.2.1. Emisiones Atmosféricas	2
1.2.2. Depósitos Directos.....	2
1.2.3. Contaminación Accidental.....	3
1.3. Paso del Cadmio a la Cadena Trófica	4
1.4. Translocación, Almacenamiento y Tolerancia al Cadmio	6
1.5. Toxicidad del Cadmio en Plantas.....	9
1.5.1. Alteraciones Estructurales y Ultraestructurales	9
1.5.2. Desequilibrios Nutricionales y de Crecimiento.....	10
1.5.3. Relaciones Hídricas y Función Estomática	12
1.5.4. Desajustes en la Fotosíntesis.....	12
1.5.5. Inhibición de otras Actividades Enzimáticas	13
1.5.6. Alteración de Componentes de Membranas.....	14
1.5.7. Especies de Oxígeno Reactivo	14
1.6. Recuperación de Suelos y Aguas Contaminados mediante la Utilización de Plantas Acumuladoras.....	15
1.7. La Molécula de Oxígeno.....	17
1.8. Especies de Oxígeno Reactivo (ROS).....	17
1.8.1. Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	19
1.8.2. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).....	20
1.8.3. Radical Hidroxilo ($OH\cdot$).....	20
1.8.4. Oxígeno Singlete (1O_2).....	21
1.9. Especies de Nitrógeno Reactivo (RNS).....	21
1.10. Producción de ROS en Sistemas Biológicos	22
1.10.1. Mitocondrias.....	22
1.10.2. Cloroplastos.....	23
1.10.3. Membrana Plasmática	24
1.11. Toxicidad de Especies de Oxígeno Reactivo	25
1.12. Papel de ROS y $NO\cdot$ como Señales Celulares.....	26
1.13. Sistemas Antioxidantes	29
1.13.1. Antioxidantes no Enzimáticos	29

Índice

1.13.2. Antioxidantes Enzimáticos.....	31
1.13.2.1. Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)	31
1.13.2.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)	34
1.13.2.3. Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation	34
Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)	35
Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4).....	35
Deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1).....	35
Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2).....	36
1.13.2.4. NADP-Deshidrogenasas	37
1.13.2.5. Otras Peroxidasas.....	37
1.13.2.6. Glutation-S-Transferasas (GST; EC 2.5.1.18)	38
1.13.2.7. Tiorredoxinas	38
1.14. Metabolismo de Peroxisomas.....	39
1.14.1. Principales Funciones Metabólicas	40
1.14.1.1 β -Oxidación de Ácidos Grasos.....	41
1.14.1.2. Ciclo del Glioxilato	42
1.14.1.3. Fotorrespiración.....	42
1.14.1.4. Metabolismo de los Ureidos.....	43
1.14.2. Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo y Sistemas Antioxidantes.....	44
1.15. Transición Metabólica Glioxisoma-Peroxisoma-Glioxisoma.....	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	49
3.1. Material Vegetal y Condiciones de Cultivo	49
3.2. Recolección y Preparación de las Muestras Vegetales.....	50
3.3. Análisis Químico de las Muestras	50
3.4. Determinación de Actividad Fotosintética y Parámetros Relacionados	50
3.5. Diseño Estadístico y Análisis de Resultados.....	51
3.6. Preparación de Homogenados	51
3.7. Aislamiento y Purificación de Peroxisomas	51
3.7.1. Gradientes de Sacarosa.....	51
3.7.2. Gradientes de Percoll.....	53
3.8. Determinación de la Integridad de Peroxisomas y de la Permeabilidad de la Membrana	53
3.8.1. Integridad de los Peroxisomas	53
3.8.2. Permeabilidad de la Membrana Peroxisomal	54

3.9. Desarrollos Electroforéticos.....	54
3.9.1. Geles de Poliacrilamida en Condiciones Nativas (EGPA).....	54
3.9.2. Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (EGPA-SDS) ..	54
3.9.3. Tinción de Proteínas en EGPA-SDS	55
3.9.3.1. Tinción con Azul Coomassie.....	55
3.9.3.2. Tinción con Plata	55
3.10. Transferencia de Proteínas e Inmunodetección (Técnica de Western).....	55
3.10.1. Transferencia de Proteínas	55
3.10.2. Inmunodetección.....	55
3.11. Determinación de Actividades Enzimáticas	57
3.11.1. Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)	57
3.11.1.1. Actividad en Solución	57
3.11.1.2. Actividad en Geles de Poliacrilamida	58
3.11.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6).....	58
3.11.2.1. Actividad en Solución	58
3.11.2.2. Actividad en Geles	58
Electroforesis nativa.....	58
Isoelectroenfoque (IEF).....	59
3.11.3. Ascorbato Peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11).....	59
3.11.4. Monodeshidroascorbato Reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)	60
3.11.5. Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2).....	60
3.11.6. Glutation-S-Transferasa (GST; EC 2.5.1.18)	61
3.11.7. Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49)	61
3.11.8. 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44)	61
3.11.9. Isocitrato Deshidrogenasa (NADP-ICDH; EC 1.1.1.42)	61
3.11.10. Glicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1).....	62
3.11.11. Hidroxipiruvato Reductasa (HPR; EC 1.1.1.29)	62
3.11.12. Xantina Oxidasa/Deshidrogenasa (XOD; EC 1.1.3.22).....	62
3.11.13. Peroxidasa Total.....	62
3.11.14. Malato Sintasa (MS; EC 4.1.3.2).....	63
3.11.15. Isocitrato Liasa (ICL; EC 4.1.3.1)	63
3.11.16. Actividad proteolítica.....	63
3.11.16.1. Aminopeptidasas	63
Actividad en solución.....	63
Actividad en geles.....	64
3.11.16.2. Endopeptidasas	64
Actividad en solución.....	64
Actividad en geles.....	64
3.12. Peroxidación Lipídica.....	65

Índice

3.13. Peróxido de Hidrógeno	65
3.14. Producción de Radicales Superóxido.....	66
3.15. Determinación de Proteínas	66
3.16. Determinación de Clorofila Total.....	66
3.17. Determinación de la Conductividad	67
3.18. Determinación de Densidad.....	67
3.19. Determinación de Grupos Carbonilo	67
3.19.1. Medida en Solución.....	67
3.19.2. Detección Inmunoquímica	68
3.19.3. Identificación de Proteínas Oxidadas.....	68
3.20. Determinación de Grupos Tiol (-SH).....	69
3.21. Determinación de Glutation Reducido y Oxidado	69
3.22. Determinación de Ácido Ascórbico	71
3.23. Microscopía Óptica y Electrónica.....	71
3.23.1. Preparación de las Muestras.....	71
3.23.1.1. Estudios Estructurales.....	71
3.23.1.2. Inmunocitoquímica	72
3.23.2. Detección de Muerte Celular (Técnica TUNEL).....	72
3.23.3. Detección de Óxido Nítrico (NO).....	72
3.23.4. Identificación Citoquímica de Peroxisomas	73
3.23.5. Citoquímica de H ₂ O ₂	73
3.23.6. Citoquímica de Radicales O ₂ ^{·-}	74
3.23.7. Microanálisis de Rayos-X	74
3.23.8. Microscopio electrónico de barrido.....	75
3.24. Detección Histoquímica de la Producción de Radicales O ₂ ^{·-} y de H ₂ O ₂ en Hojas Completas.....	75
3.24.1. Producción de Radicales O ₂ ^{·-}	75
3.24.2. Producción de H ₂ O ₂	75
3.24.3. Efecto de Moduladores sobre la Producción de H ₂ O ₂ y O ₂ ^{·-}	75
3.25. Ensayos de Muerte Celular en Hoja Completa	76
3.26. Extracción, Cuantificación y Análisis Electroforético del ADN	76
3.27. Extracción, Cuantificación y Análisis Electroforético del ARN	77
3.28. Detección de ARNm con Sondas de ADN Marcado Radioactivamente	79
3.28.1. Sondas de ADN Utilizadas.....	79
3.28.2. Transformación y Aislamiento de los Plásmidos.....	79
3.28.3. Marcaje de las Sondas	81
3.28.4. Proceso de Detección de ARNm.....	82

4. RESULTADOS	83
4.1. Efecto del Cadmio en Plantas Completas y Homogenados de Guisante	83
4.1.1. Parámetros Fisiológicos.....	83
4.1.2. Distribución de Nutrientes en la Planta	86
4.1.3. Estudios Ultraestructurales.....	89
4.1.3.1. Efecto del Cadmio sobre la Estructura y Ultraestructura de Hojas de Guisante.....	89
4.1.3.2. Localización de Acúmulos de Cadmio.....	92
4.1.4 Estudios en Homogenados.....	94
4.1.4.1. Efecto del Cadmio sobre el Contenido de Proteínas	94
4.1.4.2. Metabolismo del Oxígeno Reactivo en Hojas.....	94
4.1.4.3. Determinación de Grupos Tiol (-SH).....	99
4.1.4.4. Glutation Oxidado y Reducido	99
4.1.4.5. Ascorbato Reducido.....	100
4.1.4.6. Peróxido de Hidrógeno (H ₂ O ₂).....	101
4.1.4.7. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas	101
4.1.4.8. Efecto del H ₂ O ₂ sobre la Formación de Grupos Carbonilo	102
4.1.4.9. Identificación de Proteínas Modificadas Oxidativamente.....	103
4.1.4.10. Actividad Proteolítica	105
4.2. Efecto del Cadmio en Peroxisomas de Hojas de Guisante	108
4.2.1. Población Peroxisomal.....	108
4.2.2 Metabolismo de Peroxisomas.....	109
4.2.2.1. Concentración de Proteínas.....	109
4.2.2.2. Producción de Especies de Oxígeno Reactivo (ROS).....	110
4.2.2.3. Xantina Oxidasa (XOD), Glicolato Oxidasa (GOX) e Hidroxipiruvato Reductasa (HPR)	111
4.2.2.4. Mn-SOD y Catalasa.....	112
4.2.2.5. Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation.....	113
4.2.2.6. NADP-Deshidrogenasas.....	114
4.2.2.7. Enzimas del Ciclo del Glioxilato.....	115
4.2.3. Daños Oxidativos Causados por el Cadmio en Peroxisomas	115
4.2.3.1. Integridad de los Peroxisomas	115
4.2.3.2. Permeabilidad de la Membrana Peroxisomal	116
4.2.3.3. Peroxidación Lipídica de las Membranas	117
4.2.3.4. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas en Peroxisomas	118
4.2.4. Efecto del Cadmio en la Actividad Proteolítica de los Peroxisomas y la Degradación de Proteínas Endógenas	119

Índice

4.3. Localización Histoquímica de Producción de Especies de Oxígeno Reactivo y Muerte Celular en Hojas.....	122
4.3.1. Producción de Radicales Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	122
4.3.2. Producción de H_2O_2	124
4.3.3. Ensayos de Muerte Celular.....	126
4.3.4. Medidas de Conductividad	126
4.4. Localización Subcelular de Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo en Hojas	128
4.4.1. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).....	128
4.4.2. Radicales Superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	130
4.4.3. Óxido Nítrico (NO^{\cdot}).....	132
4.5. Estudios de Muerte Celular y Expresión de Enzimas Antioxidantes Inducidas por Cadmio.....	134
4.5.1. Ensayos de Apoptosis.....	134
4.5.2. Efecto del Cadmio sobre la Expresión de Enzimas Antioxidantes.....	135
4.5.3. Efecto de Moduladores de Procesos de Señalización Celular sobre la Expresión de Sistemas Antioxidantes	136
5. DISCUSIÓN.....	139
▲ Reducción del Crecimiento y Alteraciones Nutricionales en Plantas de Guisante.....	139
▲ Inducción de Estrés Oxidativo en Plantas de Guisante	144
▲ Alteraciones en el Metabolismo de Peroxisomas de Hojas de Guisante.....	155
▲ Modificaciones en la Estructura y Ultraestructura de las Hojas	160
▲ Senescencia y Muerte celular en Hojas de Guisante.....	162
▲ Producción Celular de ROS y NO^{\cdot}	165
6. CONCLUSIONES	171
7. BIBLIOGRAFÍA.....	173
8. ANEXOS	209
▲ Relación de Tablas	209
▲ Relación de Figuras.....	211
▲ Abreviaturas.....	217

INTRODUCCIÓN

1.1. EL CADMIO

El cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 por el químico y farmacéutico Friedrich Strohmeyer formando parte de la smithsonita ($ZnCO_3$) (Andersson y Petterson, 1981). Es un elemento de color blanco plateado, brillante y de elevada densidad ($8,65 \text{ g cm}^{-3}$ a 20°C) lo que hace que se incluya dentro del grupo de los metales pesados (Cabot y col., 1988a). El Cd pertenece al grupo del Zn en la tabla periódica (IIb) y presenta un estado de oxidación ordinario de II correspondiente a la pérdida de dos electrones de su última capa. Es bastante electronegativo lo que le da un carácter reductor. Algunos complejos del Cd^{2+} presentan propiedades parecidas a los correspondientes cationes de Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} (este último por su radio iónico parecido). El cadmio es capaz de formar complejos con una gran variedad de ligandos, preferentemente con donadores débiles como azufre, nitrógeno y selenio. Es por ello que interacciona fuertemente con los grupos sulfhidrilo, como los presentes en la cisteína, siendo ésta la característica más importante de la interacción del cadmio con los constituyentes bioquímicos (Cabot y col., 1988b; Wagner, 1993). El Cd es por tanto, uno de los metales pesados que atrae mayor atención por su potencial toxicidad para el hombre ya que se acumula en el suelo y se incorpora a la cadena trófica. Fue a partir de la enfermedad conocida como "Itai-Itai", causada por la acumulación de cadmio en suelos de cultivo de Japón y que originó serios problemas de salud a la población (Kobayashi, 1978; Tsuchiya, 1978), cuando se empezaron a estudiar los posibles efectos y acumulación de este metal en el suelo, su paso a plantas y animales, y finalmente, a humanos.

El cadmio es un elemento poco abundante en la corteza terrestre y hasta hace relativamente poco tiempo se le incluía entre los quince elementos menos frecuentes en La Tierra. Actualmente, sin embargo, ocupa el lugar 64, con una abundancia media que se sitúa en $0,098 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras que en la corteza oceánica se estima en $0,13 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cabot y col., 1988a). En la zona costera de California se encuentra una de las más altas concentraciones de Cd de forma natural, formada por rocas sedimentarias con $60\text{-}340 \mu\text{g g}^{-1}$ (Alloway, 1995).

1.2. FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE CADMIO

En general, se pueden reducir a tres las fuentes antrópicas más importantes que ocasionan contaminación en cadmio, que son las emisiones atmosféricas, los depósitos directos y las contaminaciones accidentales.

1.2.1. Emisiones Atmosféricas

Son las transportadas por el aire y se depositan sobre suelos y vegetales. Su origen son, fundamentalmente, las minas de metales, las emisiones industriales, la incineración de basuras sólidas municipales y la combustión del carbón. El cadmio se encuentra suspendido en el aire principalmente en forma de óxido, sulfuro, sulfato y cloruro (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992). Hay que destacar que en las últimas décadas se ha observado un aumento de las deposiciones de Cd desde la atmósfera al suelo (Johnston y Jones, 1992). Entre las principales fuentes de emisiones atmosféricas de cadmio se encuentran las minas metalíferas, que lo emiten tanto en forma particulada como soluble. Estas emisiones suelen tener partículas de tamaño grande y por tanto no afectan a grandes distancias (salvo rotura y escape de sus depósitos). La explotación del cadmio no es viable desde el punto de vista económico y el metal se obtiene generalmente como subproducto del Zn o como metal acompañante del Pb, del Cu y de otros metales (McLaughlin y Singh, 1999). El Zn y el Cd son elementos antagónicos lo que va a influir en el comportamiento fisiológico de los cultivos y en la toxicología de los propios elementos. En Bélgica y en Alemania algunas de las mayores concentraciones de Cd que se han encontrado en el aire (60 ng m^{-3} y 29 ng m^{-3} , respectivamente) ha sido en sitios próximos a fundiciones de metales (OECD, 1994). Se ha estimado que en 1979 Europa fue responsable de la emisión de 1.658 Tm de cadmio a la atmósfera (Pacyna, 1987).

El cadmio es usado en procesos industriales como son: protección del hierro, acero y otros metales frente a la corrosión, pigmentos para cristales, esmaltes, pinturas y plásticos, estabilizadores para plásticos, producción de insecticidas y baterías de Ni-Cd. Además, el Cd está presente en residuos que contienen Zn (gomos y neumáticos de coches). Por tanto, también se producen emisiones de Cd a la atmósfera como resultado de procesos industriales y residuos urbanos. La emisión de Cd debido a las incineradoras municipales de residuos sólidos también aumenta de modo significativo el contenido de este metal en la atmósfera (McLaughlin y Singh, 1999).

1.2.2. Depósitos Directos

Entre los depósitos directos encontramos los fertilizantes, especialmente los fosfatados que contienen hasta $300 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ (Fergusson, 1990) y son la fuente principal de contaminación de Cd en suelos agrícolas. El hecho de que este metal se incorpore a la cadena trófica y pueda llegar al hombre suponiendo un riesgo para su salud, ha obligado a imponer límites a la hora de utilizar fertilizantes fosfatados en suelos agrícolas que varían entre 35 y $450 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ (Mortvedt, 1996). Otro factor que contribuye a los depósitos directos son los fangos que resultan del tratamiento de aguas residuales antes

de su eliminación en ríos o mares. Éstos suelen sufrir tratamientos para su posterior utilización en tierra o para su eliminación por incineración o vertido al mar. Dependiendo de las aguas de las que proceda y su posterior tratamiento la concentración de cadmio en estos fangos puede variar desde 1 hasta 3,41 g kg⁻¹. Dado su alto contenido en N y P, aparte de la materia orgánica que puede beneficiar la estructura del suelo, estos fangos se están utilizando últimamente en agricultura, aunque con sus limitaciones por el alto contenido en metales pesados (Alloway y Steinnes, 1999).

1.2.3. Contaminación Accidental

Este proceso ocurre eventualmente debido a la contaminación de tierras por procesos industriales, residuos de la minería o corrosión de estructuras metálicas galvanizadas. Un ejemplo son los vertidos de Aznalcóllar en 1998 que llegaron a alcanzar 40 km de extensión entre los ríos Agrio y Guadiamar en la provincia de Sevilla (informe de la Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente, 1999).



Fig. 1.1 Vertido de Aznalcóllar en 1998

Como consecuencia de ello, resultaron degradados todos los hábitats que conformaban el cauce y sus riberas. Las pérdidas agrícolas calculadas fueron del orden de 11 millones de Euros, y además resultaron afectados todos los aprovechamientos primarios que se desarrollaban en la zona, con una paralización inmediata de la actividad minera, supresión de la agricultura, eliminación de las cosechas y prohibición de la pesca y la caza. El análisis de las zonas afectadas mostró que el principal elemento contaminante en el agua era el Zn (con una media de 73 mg/l) y en cantidades mucho menores estaban el Pb, Co, Ni y Cd (alrededor de 1 mg/l de media) (Simón y col., 1999). Las concentraciones de Ca, Cd y Cu superaban los valores máximos permitidos para poder usar un agua de riego (según Crook y Bastian, 1992). En los lodos se encontraron concentraciones mucho mayores que en las aguas.

Introducción

El accidente minero de Aznalcóllar no ha sido el único de los que han ocurrido en las últimas décadas en el mundo, lo que pone en evidencia la necesidad de mejorar las medidas de seguridad, prevención y los análisis de riesgos ecológicos de las explotaciones mineras. En 1996 se produjo un vertido tóxico de $235 \times 10^3 \text{ m}^3$ de desechos sólidos y líquidos al río Pilaya en la mina de pirita de Porco (Bolivia). Las consecuencias en este caso fueron catastróficas en términos de salud humana e impacto ecológico y sus efectos ya se extienden por tres países (Argentina, Bolivia y Paraguay). Otro accidente ocurrido recientemente, es el vertido de Baia Mare en Rumanía, que a través del afluente Tisza, llevó unos 10^5 m^3 de mercurio, cianuro y metales pesados al río Danubio, devastando la población de peces y dejando sin agua potable a dos millones y medio de personas.

1.3. PASO DEL CADMIO A LA CADENA TRÓFICA

Las plantas tienden a tomar y translocar el cadmio del suelo pasándolo a la cadena trófica (Aery y Tiagi, 1988), al contrario de lo que ocurre con el plomo (Chumbley y Unwin, 1982). En general, en los estudios llevados a cabo hasta ahora, la ingesta de cadmio en la dieta está por debajo de los límites impuestos por la FAO (Sherlock, 1984) o la CEE (Sánchez-Martín y col., 2000). Sin embargo, mientras se siga con las emisiones de cadmio al entorno habrá que continuar con el control de los niveles del metal en los alimentos y del efecto del mismo sobre los humanos, ya que es un peligro importante para la salud no sólo del hombre, sino también de los demás seres vivos. Además de ser un elemento tóxico, es acumulativo y no degradable por lo que debería evitarse al máximo su dispersión al medio ambiente. El cadmio está continuamente redistribuyéndose en los distintos compartimentos del medio ambiente depositándose finalmente en los sedimentos marinos. La estancia en el aire es relativamente corta (días-semanas) pero suficiente para recorrer grandes distancias especialmente en forma de vapor (McLaughlin and Singh, 1999).

Químicamente, el cadmio puede encontrarse en el suelo disuelto, adsorbido en superficies orgánicas o inorgánicas, dentro de minerales, precipitado con otros compuestos del suelo o incorporado en estructuras biológicas. Sin embargo, la disponibilidad del cadmio presente en el suelo para las plantas depende de procesos físicos, químicos y biológicos que controlan la solubilidad y estado del metal en la solución del suelo, especialmente en la rizosfera (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992; Helmke, 1999; Christensen y Haug, 1999). Por tanto, hay que tener en cuenta tanto factores no bióticos como bióticos. Entre los primeros está el pH, ya que se ha visto que la capacidad de adsorción del cadmio aumenta de dos a tres veces por cada unidad de pH (Jensen y Bro-Rasmussen, 1992). Pero también influyen el contenido de arcillas del suelo, la presencia de carbonatos y óxidos de hierro y manganeso, el potencial redox, el tipo y contenido de materia orgánica y ligandos, el contenido de agua, y finalmente las prácticas

de manejo del suelo (Alloway y col., 1990). Entre los factores bióticos está la especie de planta de la que se trate. Así, en cultivos hortícolas se ha observado que son las plantas de hoja ancha las que tienden a acumular más cadmio (Alloway y col., 1990; Rahlenbeck y col., 1999). Pero también es importante la actividad de la raíz, por lo que se refiere al flujo de protones, salida de elementos reductores, actividad de las NADPH-reductasas y de las ATPasas de la membrana plasmática, salida de ácidos orgánicos o aminoácidos no proteicos y absorción de macro y micronutrientes (Salt y col. 1995a; Gries y Wagner, 1998; Cabot y col., 1988b). Finalmente, también hay que tener en cuenta a los microorganismos asociados que influyen en la entrada de cadmio a las plantas (McLaughlin y Singh, 1999).

La absorción de cadmio por parte de la planta se realiza en su mayor parte a través de la raíz y parece ser que se lleva a cabo de un modo bifásico (Fujimoto y Uchida, 1979; Salt y Wagner, 1993; Cohen y col., 1998). Se han definido dos sistemas de entrada distintos:

1) A través de un transportador saturable de cationes de la membrana plasmática, que transportaría Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} o Fe^{2+} . En plantas de guisante crecidas con deficiencia en hierro se ha observado una mayor entrada de cadmio a través de la raíz que puede ser explicada por la inducción de la expresión de un transportador de hierro (Cohen y col., 1998). También se ha observado que cuando se expresa en levaduras la proteína IRT1, transportadora de hierro de *A. thaliana*, es capaz de transportar manganeso y esta entrada se ve disminuída en presencia de cadmio, lo que sugiere que este metal utiliza para su entrada el mismo transportador (Korshunova y col., 1999). Además, se ha encontrado que en el hiperacumulador *Thlaspi caerulescens* existe un gen que codifica un transportador de Zn/Cd en la membrana plasmática de raíces, cuya expresión es mucho mayor, tanto en tallo como en raíz, que en *T. arvense* que no es un hiperacumulador (Pence y col., 2000).

2) Una entrada por difusión a través de un canal de membrana para cationes divalentes (probablemente Mg^{2+} o Ca^{2+}) con una cinética lineal, y que parece ser usada para concentraciones altas de cadmio (Kochian y Lucas, 1988). También puede que existan interacciones con el apoplasto usadas para la entrada del metal al simplasto, como se ha observado en dos cultivares de trigo en un estudio llevado a cabo por Hart y col. (1998). Estas dos vías de acceso se han evidenciado en bacterias (Nies, 1995; Nies y Silver, 1989).

Introducción

Sin embargo, el mecanismo por el cual se absorben complejos inorgánicos de cadmio a través de la raíz no está muy claro. Podrían utilizarse canales de cationes monovalentes en el caso de CdCl^+ y para complejos no catiónicos podrían difundir a través de la membrana o vía transporte de proteínas (Welch y Norvell, 1999). La absorción de complejos orgánicos no está bien definida. Podrían formarse complejos con fitometalóforos tales como aminoácidos no proteicos, que libera la raíz en caso de deficiencia de hierro (Welch, 1995) e introducirse por regiones de la membrana plasmática de las células de la raíz específicas para estos compuestos. Sin embargo, esta hipótesis no está corroborada (Shenker y Crowley, 1997).

1.4. TRANSLOCACIÓN, ALMACENAMIENTO Y TOLERANCIA AL CADMIO

Son varios los mecanismos que se han propuesto en plantas para la desintoxicación de los iones de metales pesados potencialmente tóxicos. Debido a sus efectos negativos para la planta, su concentración intracelular debe mantenerse a concentraciones bajas, existiendo distintas estrategias para llevar a cabo este propósito. En *Euglena gracilis*, que es resistente al cadmio, se ha propuesto un mecanismo que consiste en la reducción de la entrada del metal (Bariaud y col., 1985). En algunas bacterias se ha descrito como mecanismo para evitar la toxicidad del cadmio el secuestro extracelular del cadmio y una posterior extrusión del metal (Mitra y col., 1975; Tynecka y col., 1981). En plantas, sin embargo, no se conoce un mecanismo similar, y se ha sugerido la compartimentación en la vacuola como uno de los principales mecanismos de desintoxicación (Woolhouse, 1983) (Fig. 1.2). Otro mecanismo relacionado con la tolerancia al metal es la formación de quelatos de Cd con moléculas orgánicas, disminuyendo así la concentración intracelular del ión tóxico (Krotz y col., 1989), o con péptidos ricos en cisteína, denominados fitoquelatinas (PCs), que son altamente inducibles por cadmio al que se unen con gran afinidad (Leita y col., 1992; Obata y Umebayashi, 1993; Rauser y Meuwly, 1995; Vögeli-Lange y Wagner, 1996). En la Fig. 1.2 se muestra un modelo en el que se proponen varios mecanismos de control de entrada, salida y acumulación de Cd en células vegetales.

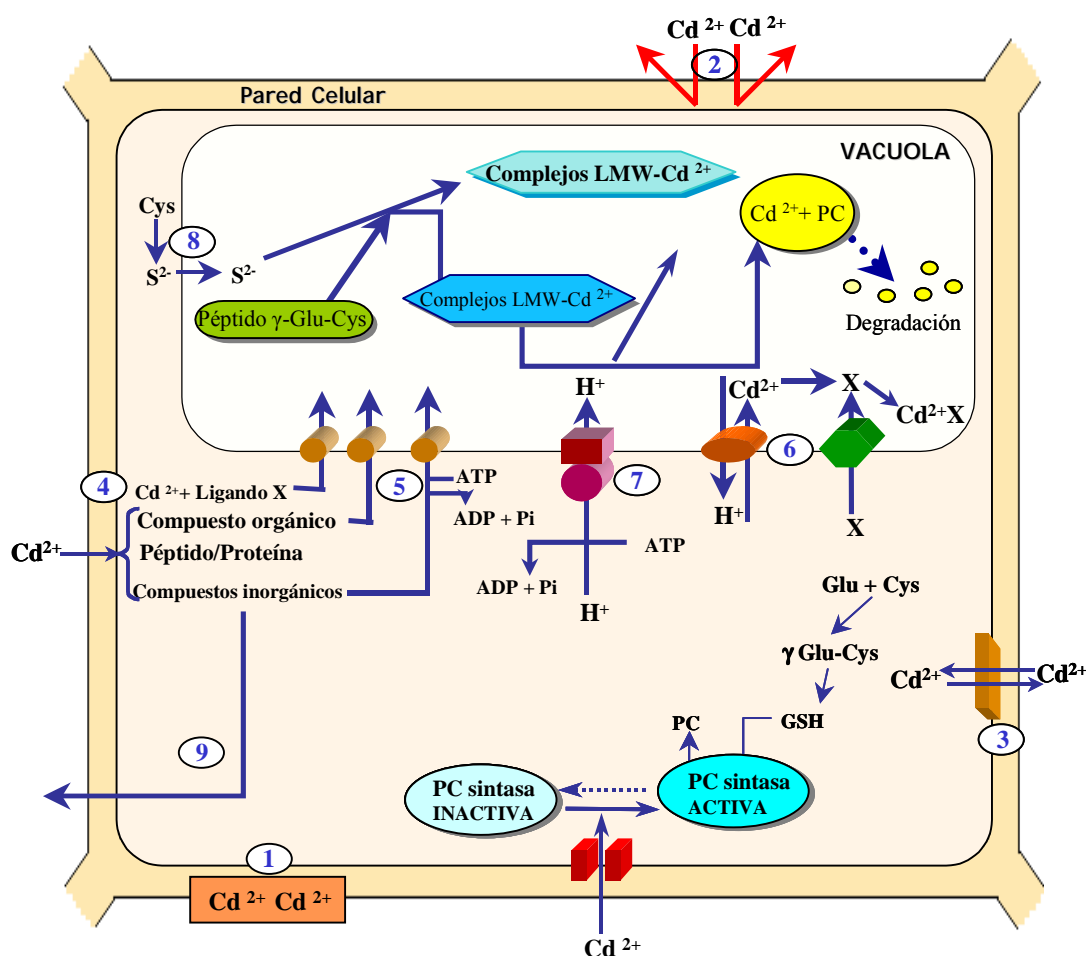


Fig. 1.2 Modelo que describe los mecanismos de entrada, exclusión y acumulación de cadmio en células vegetales (modificado de Wagner, 1993; Rauser, 1995; Zenk, 1996; Cobbett 2000). 1. Unión a la pared celular; 2. limitación del flujo de cadmio a través de la membrana plasmática; 3. salida activa de cadmio presente en bacterias; 4. acumulación y secuestro de cadmio con diferentes complejos; 5. entrada activa a la vacuola tipo casete, unido a ATP; 6. antiporte $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$; 7. ATPasa vacuolar generando un gradiente de protones; 8. mecanismo hipotético de entrada con S^{2-} a través del plasmalema; 9. Transporte de los complejos-Cd fuera de la célula.

Las PCs son moléculas ricas en cisteína que poseen grupos SH que actúan uniéndose a los metales. Las PCs tienen una estructura primaria que responde a la fórmula $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n suele estar entre 2 y 7 dependiendo del organismo. La síntesis de fitoquelatinas tiene lugar a partir del glutathion (GSH) con el que están relacionadas estructuralmente (Rauser, 1995; Cobbett, 2000). En raíces de *Brassica juncea* expuestas a una concentración de cadmio $25 \mu\text{M}$ se ha observado un incremento en la expresión de γ -glutamylcisteína sintetasa mitocondrial, implicada en la biosíntesis de GSH (Schäfer y col., 1998), y en *Arabidopsis* además, se activa la expresión de una GR citosólica (Xiang y Oliver, 1998). En ambos casos la regulación parece ser a nivel transcripcional.

Introducción

La sobreexpresión de una γ -glutamilcisteína sintetasa de *E. coli* en plantas de *Brassica juncea* incrementa la producción de PCs y glutatión, mejorando así la tolerancia al cadmio (Zhu y col., 1999). El mismo efecto se ha demostrado en plantas de tabaco que sobreexpresan una cisteína sintasa de arroz (Harada y col., 2001). Por otro lado, las enzimas implicadas en la biosíntesis de fitoquelatinas se encuentran de forma constitutiva en la naturaleza (Zenk, 1996), siendo la PC sintasa el primer punto de regulación, ya que se activa por la presencia de metales en el medio (Cobbett, 2000). Las PCs se comportan como metabolitos de tránsito con una capacidad de recambio bastante rápido, y parece ser que la razón está en su participación en procesos de homeostasis de metales en la planta, algo que se ha encontrado tanto en mono- como en dicotiledóneas, así como en algas pardas, verdes y rojas (Rauser, 1995). También se han descrito PCs en levaduras, como *Candida glabrata*, en la que coexisten con metalotioneínas (Zenk, 1996). Son numerosos los trabajos en los que se correlacionan la inducción de PCs y los compuestos tiólicos por efecto del cadmio (Leita y col., 1992; Obata y Umebayashi, 1993; Rauser y Meuwly, 1995; Vögeli-Lange y Wagner, 1996), aunque también existen otros metales capaces de inducir las PCs, como el Zn, el Cu y la Ag (Rauser, 1995; Zenk, 1996; Cobbett, 2000). Las PCs son necesarias para la tolerancia al cadmio (Clemens y col., 1999). Así, mutantes de *Arabidopsis thaliana*, deficientes en glutatión son sensibles al cadmio, probablemente por una reducción de la producción de PCs (Howden y col., 1995). Sin embargo, la existencia de fitoquelatinas por sí sola no es suficiente para la tolerancia al cadmio (Vögeli-Lange y Wagner, 1996).

Mediante técnicas de microanálisis de rayos-X se han observado gránulos de acúmulo de cadmio, densos a los electrones en el citoplasma, vacuola y núcleo de raíces de *Agrostis* y maíz (Rauser y Ackerley, 1987). En raíces de maíz, también se ha detectado cadmio en la pared de elementos cribosos y en la lamela que separa la endodermis del periciclo (Khan y col., 1984). Por otro lado, en el alga *Dunaliella bioculata*, tratada con altas concentraciones de cadmio, sólo se ha localizado el metal en la vacuola (Heuillet y col., 1986), al igual que en hojas de tabaco, en las que el metal se encuentra unido a PCs (Vögeli-Lange y Wagner, 1996). En estudios llevados a cabo en la planta acuática *Azolla* se han detectado grandes concentraciones de Cd formando agregados con fosfatos y calcio, la mayor parte de los cuales se localizaron en la pared celular de las células de la vaina y células que rodean al xilema (Sela y col., 1988). En el alga unicelular *Tetraselmis suecia*, capaz de acumular grandes cantidades de cadmio, se ha descrito que el metal se acumula en vesículas osmiofílicas que además contienen concentraciones elevadas de N y S (Nassiri y col., 1997). La localización subcelular del cadmio resulta difícil en aquellos casos en que no se encuentre formando agregados que puedan detectarse. Así se deduce del estudio en *Thlaspi caerulescens*, hiperacumulador de Zn y Cd, en el que se han empleado dos métodos diferentes para la detección de los metales, con resultados distintos, aunque se puede concluir que el cadmio se acumula

principalmente en el apoplasto de la raíz y, en menor medida, en las vacuolas, en las que se encuentra junto a calcio e hierro (Vázquez y col., 1992). Otro mecanismo de desintoxicación utilizado por algunas plantas es la acumulación del metal en los tricomas de la superficie foliar, como ocurre en *Brassica juncea* (Salt y col., 1995a), en la que además, se localiza el cadmio en raíces, ligado a PCs, en contraste con los complejos encontrados en el xilema, formados con ligandos de oxígeno o nitrógeno. También se ha detectado cadmio en los tricomas de *Arabidopsis halleri*, acompañado con P y S además de localizarse en la vacuola de las células del mesófilo (Küpper y col., 2000). Choi y col. (2001) han descrito que plantas de tabaco excretan cadmio a través de tricomas, junto con Mg y Mn, en forma de cristales formados a base de oxígeno, calcio y carbono. En plantas de lirio de agua se ha encontrado que el cadmio puede acumularse formando estructuras cristalinas junto con calcio, en las glándulas de la epidermis de la cara abaxial de las hojas, en peciolos y en rizoma (Lavid y col., 2001).

En definitiva, la tolerancia a un metal se puede atribuir a mecanismos fisiológicos que permiten a la planta funcionar normalmente incluso en presencia de altas concentraciones del metal. Las plantas tolerantes se pueden diferenciar de las sensibles por su funcionamiento a lo largo del crecimiento (supervivencia de semillas, biomasa, crecimiento de raíces y tallos, crecimiento del tubo polínico, etc.) (Baker y Walker, 1989). Una de las diferencias entre tolerancia y sensibilidad puede estar determinada por la acumulación y localización del cadmio, como ocurre en dos ecotipos de *Silene vulgaris*, en los que el almacenamiento en la vacuola juega un papel determinante (Chardonens y col., 1998), así como en *Thlaspi caerulescens* que parece acumular gran parte del metal en la pared celular antes de que ocurra su paso al simplasto (Nedelkoska, y Doran, 2000). Existen más de 400 especies hiperacumuladoras, término que fue introducido por Brooks y col. (1977) para definir aquellas plantas que acumulaban más de 1 mg Ni por g de peso fresco en sus tallos. Estas plantas pertenecen a 45 familias, de las cuáles el 75% son hiperacumuladoras de Ni. Normalmente, la tolerancia a metales pesados es específica y son raros los casos de co-tolerancia. Sin embargo, hay descritos algunos casos como los de *Thlaspi caerulescens* y *Arabidopsis halleri* que son hiperacumuladores de Cd y Zn (Vázquez y col., 1992; Küpper y col., 2000) o el de *Chloris barbata* que presenta co-tolerancia al mercurio, cadmio y zinc (Patra y col., 1994).

1.5. TOXICIDAD DEL CADMIO EN PLANTAS

1.5.1. Alteraciones Estructurales y Ultraestructurales

Como se ha indicado anteriormente la entrada del cadmio se produce fundamentalmente por la raíz, pero parte de este metal se va a translocar al resto de la planta. Sin embargo, la distribución del cadmio en la planta no suele ser homogénea, siguiendo, en general, el siguiente orden, de mayor a menor acumulación: raíz, tallo, hoja, fruto y semilla (Leita y col., 1992; di Cagno y col., 1999; Dixit y col., 2001).

Introducción

En monocotiledóneas como *Allium sativum*, se ha visto que se produce una gran acumulación de cadmio en la raíz, pasando muy poco metal al bulbo y mucho menos al tallo (Jiang y col., 2001). Aunque existen excepciones como son las de algunas plantas acuáticas en las que la acumulación en hojas es mayor que en los tallos (Saygideger, 2000).

Los cambios en los tejidos y las células son resultado de la interacción bien directa o indirecta del metal con componentes estructurales. Como la principal entrada del metal es a través de la raíz, es de esperar que los primeros efectos del cadmio sean en este tejido. En general, los principales cambios estructurales y morfológicos causados por el metal en este órgano vienen a ser: disminución de la elongación de la raíz, daño en el extremo de la raíz, disminución de pelos radicales, disminución de la biomasa radicular, disminución del diámetro de los vasos y alteraciones estructurales en la hipodermis y endodermis (Khan y col., 1984; Barceló y col. 1988; Ouzounidou y col., 1997; Vitória y col., 2001). Sin embargo, al aumentar la concentración del metal, se produce la distribución de éste a lo largo de toda la planta y, como consecuencia, se originan daños estructurales generalizados en la misma. Así, se produce una reducción en la multiplicación celular, una disminución del número de cloroplastos y un ensanchamiento de los mismos, una disminución y deformación de las membranas tilacoidales, una disminución del número de grana, un aumento de los gránulos de almidón y de plastoglobulos, lo que indica una liberación de lípidos desde la membrana tilacoidal y una desorganización de la estructura interna (Barceló y col. 1988; Ouzounidou y col., 1997; Barylá y col., 2001). Desde un punto de vista estructural, los cloroplastos parecen ser el orgánulo diana de la toxicidad del cadmio aunque en cultivos celulares también se han observado cambios en otros orgánulos como mitocondrias y retículo endoplasmático (Neumann y col., 1994)

1.5.2. Desequilibrios Nutricionales y de Crecimiento

Se han observado desajustes nutricionales en las plantas sometidas a concentraciones tóxicas o prolongadas de cadmio, con lo que algunos de los efectos del metal pueden estar relacionados con las deficiencias que este desequilibrio provoca. Como se observa en la Tabla 1.1 el efecto del cadmio varía según las condiciones experimentales (concentración del metal, periodo de tratamiento, etc.), el tipo de tejido y el nutriente considerado, además de la susceptibilidad de la especie estudiada.

En términos generales, la concentración de macronutrientes disminuye en presencia de cadmio, tanto en las raíces como en la parte aérea (Greger y Lindberg, 1987; Welch y col., 1993; Gussarson y col., 1996). Algo similar ocurre con el contenido de micronutrientes, como se puede observar en la Tabla 1.1. Alteraciones en el transporte de macro y micronutrientes en situaciones de toxicidad por cadmio podrían

deberse a varios procesos, entre ellos, cambios en las actividades H⁺-ATPasa y NADPH-reductasas de membranas, cambios en la selectividad de los transportadores y procesos de antagonismo entre el cadmio y los distintos elementos (Gussarsson y col., 1996; Korshunova y col., 1999).

Tabla 1.1 Algunos ejemplos de desequilibrios nutricionales causados por el cadmio. El asterisco indica especies hiperacumuladoras de metales

Nutriente	Efecto del Cd	Especie Vegetal	Referencias
Ca	Disminuye en la pared celular de epidermis de raíz	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
	Disminuye en tallo y hojas	<i>Triticum aestivum</i>	Ouzounidou y col. (1997)
	Aumenta en hojas	<i>Nymphaea</i>	Lavid y col. (2001)
K	Disminuye en la pared celular de epidermis de raíz	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
	Disminuye en tallo y hojas	<i>Triticum aestivum</i>	Ouzounidou y col. (1997)
Cl	Aumenta en células de la vaina	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
P	Aumenta 2 ó 3 veces en raíces	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
Mg	Disminuye en citoplasma de raíces y tallos	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
	Disminuye en tallos y hojas	<i>Triticum aestivum</i>	Ouzounidou y col. (1997)
Fe	Aumenta en pared celular de epidermis	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col. (1988)
	Disminuye en tallos	<i>Triticum aestivum</i> <i>Arabidopsis hallieri</i> *	Ouzounidou y col. (1997) Küpper y col. (2000)
	Disminuye en tallos y raíces	<i>Pisum sativum</i>	Hernández y col. (1998)
Mn	Disminuye en raíces y tallos	<i>Brassica juncea</i> * <i>Pisum sativum</i> <i>Arabidopsis hallieri</i> *	Salt y col. (1995) Hernández y col. (1998) Küpper y col. (2000)
	Disminuye en hojas	<i>Nymphaea</i>	Lavid y col., 2001

1.5.3. Relaciones Hídricas y Función Estomática

El daño provocado por el metal sobre la función de las membranas, el equilibrio iónico y las actividades enzimáticas, va a originar alteraciones en las relaciones hídricas de la planta, tanto a nivel celular como en la planta completa (Barceló y Poschenrieder, 1990). Uno de los primeros efectos que se observan como consecuencia de la toxicidad del metal es la inhibición de la expansión celular (Barceló y col., 1988; Poschenrieder y col., 1989; Saygideger, 2000), y una disminución de los espacios intercelulares (Barceló y col., 1988; Poschenrieder y col., 1989). El estado hídrico de la planta va a depender de tres factores fundamentalmente: la entrada de agua, el transporte, y la pérdida de la misma. La entrada de agua se realiza a través de la raíz principalmente, de modo que su daño o menor crecimiento puede afectar a este proceso. Sin embargo, éste puede no ser el único motivo para que disminuya la entrada de agua, ya que también puede haber un incremento de la resistencia al flujo del agua hacia la raíz y desde ésta hacia el resto de la planta (Barceló y Poschenrieder, 1990). El movimiento del agua a lo largo de la planta en presencia de cadmio puede verse afectado por una disminución del diámetro y número de los vasos, provocado quizás por una menor división celular (Barceló y col., 1988; Saygideger, 2000), así como por la obstrucción de los mismos debido a la presencia de complejos de cadmio (Salt y col., 1995a) o de deposiciones amorfas probablemente procedentes de la pared celular (Vázquez y col., 1989). Se ha encontrado que existe un efecto del cadmio sobre la apertura de los estomas que induce al cierre de los mismos, probablemente por problemas de pérdida o disminución de energía o por alteraciones en el flujo de iones potasio a través de la membrana o incluso por el incremento de estomas defectuosos o de menor tamaño (Barceló y Poschenrieder, 1990; Greger y Johansson, 1992). En respuesta a bajas concentraciones de cadmio o a exposiciones muy cortas al metal, puede darse el efecto contrario, la apertura estomática (Barceló y Poschenrieder, 1990). En cuanto a la tasa de transpiración, parece que se ve afectada por el metal de un modo complejo ya que existen estudios en los que se observa un incremento (Greger y Johansson, 1992; di Cagno y col., 1999), mientras que en otros se observa una reducción (Saygideger, 2000), o bien no se observan cambios con respecto al control (Chardonnens y col., 1998)

1.5.4. Desajustes en la Fotosíntesis

En general, la actividad fotosintética siempre se ve afectada por el cadmio, aunque los efectos del metal dependen del tiempo de tratamiento, concentración del mismo y especie vegetal de la que se trate. Como se ha descrito anteriormente, se han detectado daños en la arquitectura y organización del aparato fotosintético (Ouzounidou y col., 1997; Skórzynska y col., 1997; Jemal y col., 2000), y por otro lado, el cadmio provoca daños en las enzimas y metabolitos implicados en el proceso fotosintético. En un estudio

sobre el efecto del cadmio en el ciclo de Calvin realizado en plantas de *Phaseolus vulgaris*, se ha observado un incremento de tres metabolitos clave para este ciclo, la ribulosa-1,5-bifosfato, el ácido fosfoglicérico y el fosfato de dihidroxiacetato, así como en el ATP, quizás por un menor consumo de éstos, y una inhibición de la actividad Rubisco (Siedlecka y col., 1997). Además, se ha observado que el cadmio provoca la inhibición de otras enzimas, como la carboxilasa, la NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, la fructosa-1,6-bifosfatasa y la NADP-malato deshidrogenasa (Lakshaman y col., 1999). Parece ser que la actividad del fotosistema II (FSII) se ve más alterada que la del fotosistema I (FSI), tanto *in vivo* como *in vitro*, en cuyo caso, el primero llega a inhibirse hasta un 46% mientras que el segundo prácticamente no se altera (Greger y Ögren, 1991; Lakshaman y col., 1999). Sin embargo, hay casos en los que no se ve alterado en modo alguno el FSII, ni el transporte electrónico durante la fotosíntesis, ni la ultraestructura de cloroplastos, si bien se argumenta que la reducción de la disponibilidad de CO₂ en el cloroplasto puede ser uno de los efectos tóxicos del cadmio, aunque no es el único (Baryla y col., 2001).

No hay que olvidar los daños causados en los pigmentos necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis principalmente en la biosíntesis de éstos. Así, el cadmio provoca una disminución en el contenido de clorofila, a veces localizada en hojas jóvenes, como en el caso de *Brassica juncea* (Salt y col., 1995a), pero en otros casos esta pérdida se observa en toda la planta, así como en la relación clorofila *a/b* (Sheoran y col., 1990; Gallego y col., 1996; Lakshaman y col., 1999; di Cagno y col., 1999). También se ha visto en cotiledones de rábano que el Cd induce cambios en la composición y estructura del complejo proteínico 2 de la antena clorofila *a/b* (Krupa, 1988). Se ha encontrado que la sustitución del Mg central en la clorofila por Cd es un daño importante en el estrés causado por este metal. Esta sustitución evita la recepción de la luz por parte de los pigmentos interceptando, por tanto, la cadena de transporte fotosintética (Küpper y col., 1996).

Todo esto hace que la tasa fotosintética de las plantas tratadas con cadmio sea menor que la de las plantas control, lo que posiblemente está muy relacionado con la reducción de la biomasa (Lakshaman y col., 1999; Saygideger, 2000)

1.5.5. Inhibición de otras Actividades Enzimáticas

El cadmio ejerce su toxicidad a través de la inactivación de algunas actividades enzimáticas, posiblemente debido a su capacidad para reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las mismas. Entre estas enzimas están la anhidrasa carbónica, las carboxipeptidasas, la alcohol deshidrogenasa y la ARN y ADN polimerasas. Las proteínas con dedos de Zn juegan un papel importante en la regulación de genes y pueden verse afectadas también por el cadmio (Wagner, 1993). Otra enzima que se ve inhibida por el cadmio es la nitrato reductasa, lo que redundará en una reducción de la absorción de nitrato y su transporte

de la raíz al tallo (Hernández y col., 1996). Los efectos del cadmio pueden llegar incluso a actividades asociadas con membranas, como la H⁺-ATPasa (Fodor y col., 1995; Gries y Wagner, 1998).

1.5.6. Alteración de Componentes de Membranas

El cadmio también provoca cambios en la composición de las membranas, esenciales para el desarrollo de determinadas rutas metabólicas y para mantener la integridad de los distintos orgánulos y la propia célula. En plantas de tomate sometidas a diferentes concentraciones de cadmio se ha observado que existe una disminución de la cantidad de lípidos totales, tanto en hojas como en raíces. Así, disminuyen los contenidos de glicolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros, y estos últimos pueden asociarse a una pérdida de membranas intracelulares dando lugar a un menor número de orgánulos (Ouariti y col., 1997). Sin embargo, se ha observado un aumento en la fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina en hojas, lo que puede afectar a la estructura de las membranas tilacoidales (Jemal y col., 2000). Además, se ha encontrado un aumento en la actividad lipooxigenasa, cuyos productos son radicales libres, que pueden ocasionar daños en los lípidos de la membrana. En general, en hojas se reduce el grado de insaturación, lo que sugiere un aumento en la desaturación de ácidos grasos acelerando así la peroxidación lipídica. En cambio, en raíces parece existir una mayor estabilidad en las membranas (Gallego y col., 1996; Ouariti y col., 1997; Jemal y col., 2000). Se ha visto que la inducción de una proteína por un choque térmico (HSP) previene el daño causado por el cadmio a las membranas y a la ultraestructura. Algunas de estas proteínas juegan un papel importante en el ensamblaje de otras proteínas, lo que puede llevar a una reintegración de los complejos de proteínas en las membranas (Neumann y col., 1994).

1.5.7. Especies de Oxígeno Reactivo

Parece ser que el grado del daño celular producido en plantas crecidas con concentraciones tóxicas de cadmio, está relacionado con la formación de especies de oxígeno reactivo y con la eficiencia y capacidad antioxidante, así como con los mecanismos reparadores de la planta. Se ha descrito que los metales pesados estimulan la producción de radicales libres y especies de oxígeno reactivo (Foyer y col., 1997), bien de forma directa interfiriendo en la transferencia de electrones, bien de forma indirecta al inhibir determinadas reacciones metabólicas (Halliwell y Gutteridge, 1984). Así, se ha observado un incremento de la peroxidación lipídica en dos clones de *Holcus lanatus* uno sensible y otro tolerante al cadmio (Hendry y col., 1992), así como en hojas de girasol, judía y guisante expuestos a este metal (Gallego y col., 1996; Chaoui y col., 1997; Dixit y col., 2001). La reacción frente a esta situación de estrés difiere según la especie, la edad de la planta e incluso del tejido de que se trate, y además, hay que

tener en cuenta la concentración del metal y el tiempo del tratamiento. Una respuesta bastante generalizada consiste en la disminución de la cantidad de GSH y de la relación GSH/GSSG, lo que implica cambios en el estado de oxidación de la planta (Gallego y col., 1996; Dixit y col., 2001). En cuanto al efecto del cadmio sobre los antioxidantes enzimáticos como CAT, GR, APX, DHAR y SODs, se ha descrito una disminución de su actividad en algunos estudios (Gallego y col., 1996) mientras que en otros se ha observado un aumento (Dixit y col., 2001; Vitória y col., 2001). Sin embargo, se desconocen los mecanismos íntimos implicados tanto en la generación de especies de oxígeno reactivo, como en la modificación de la actividad de los sistemas antioxidantes enzimáticos.

1.6. RECUPERACIÓN DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADOS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE PLANTAS ACUMULADORAS

La contaminación de la biosfera con metales tóxicos se ha acelerado de forma extraordinaria desde la revolución industrial. Como se ha visto, la contaminación de suelos y aguas constituyen un grave problema para la salud humana y en general, para todos los seres vivos. Se ha observado que las plantas son capaces de absorber y concentrar determinados elementos del medio que les rodea, entre ellos los metales pesados, independientemente de que sean necesarios para su desarrollo y crecimiento. Lo ideal es encontrar plantas que sean capaces de tolerar y acumular grandes cantidades de estos metales pesados, a fin de poder retirarlos del medio ambiente (Salt y col., 1995b).

Existen principalmente tres tipos de técnicas que utilizan las plantas para la descontaminación de suelos y aguas:

- a) La fitoextracción, en la que la planta acumuladora se usa para transportar y concentrar metales desde el suelo hacia diferentes partes de la misma (fundamentalmente raíces o tallos). En este caso, la planta ideal debe tolerar y acumular grandes cantidades del metal, debe presentar un crecimiento rápido y una capacidad grande de producir biomasa en el campo.
- b) La rizofiltración, en la que las raíces de la planta absorben, precipitan y concentran metales pesados desde el agua. Una planta ideal para esta técnica sería aquella que presente un crecimiento rápido de raíces que retiren metales pesados de la solución por un largo periodo de tiempo, y muestren baja eficiencia en la translocación hacia los tallos.
- c) La fitoestabilización, que consiste en la reducción de la movilidad de los metales por parte de la planta, evitando así la salida de éstos hacia acuíferos o hacia la atmósfera. Es especialmente útil en zonas que han sido contaminadas y han perdido la vegetación existente. Esta técnica requiere plantas capaces de tolerar altos niveles de metales pesados e inmovilizarlos en el suelo, bien por su entrada a través de la raíz, bien por su precipitación o reducción (Salt y col., 1995b).

Introducción

Hasta ahora las técnicas utilizadas para descontaminar suelos consistían en la excavación, transporte y deposición de los suelos contaminados en zonas reservadas; o bien en el tratamiento del suelo con compuestos químicos para inmovilizar los metales, seguido de un procesamiento del suelo para evitar la penetración del agua; y finalmente, provocar la salida de los metales con soluciones ácidas. El método de recuperación del terreno con plantas es más deseable desde el punto de vista ecológico, puesto que se recicla el suelo de un modo estable por medios biológicos, y además, es menos costoso que las técnicas clásicas que utilizan métodos físico-químicos, más destructivos (Meagher, 2000; Mejáre y Bülow, 2001). En el caso de aguas contaminadas, las técnicas utilizadas consisten en la precipitación o floculación, seguida de la sedimentación con posterior extracción de los fangos resultantes (intercambio iónico, ósmosis reversa y finalmente, microfiltración). La rizofiltración presenta una ventaja basada en la capacidad de las plantas de extraer metales pesados hasta el 60% de su peso seco, reduciendo así, la generación y coste adicional de grandes cantidades de residuos tóxicos. Además, puede ser utilizada en los casos en los que la concentración de metales pesados no sea muy alta y el volumen de agua sea elevado (Salt y col., 1995b).

Aparte de la capacidad natural de las plantas para extraer metales del suelo, existen técnicas mediante las cuales se puede ayudar a esta acumulación, como son: la manipulación del suelo (utilización de quelantes, disminución de micronutrientes, reducción del pH, utilización de microrganismos, etc.) para aumentar la disponibilidad de los metales para la planta. En definitiva, una mejor comprensión de los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta relacionados con la entrada, transporte y acumulación de metales, así como de los mecanismos de resistencia a los mismos dará lugar a considerables mejoras en la recuperación de suelos y aguas contaminados mediante el uso de modernas aproximaciones de genética vegetal (Mejáre y Bülow, 2001). Estas técnicas están pensadas para concentrar metales en los tejidos vegetales, minimizando la cantidad de elementos peligrosos en suelos y aguas, metales que habrán de ser depositados en lugares de residuos peligrosos y con la idea futura de eliminarlos del tejido vegetal (Salt y col., 1995b; Meagher, 2000).

1.7. LA MOLÉCULA DE OXÍGENO

El elemento químico que conocemos como oxígeno existe en el aire en forma de molécula diatómica (O_2) y apareció en la atmósfera terrestre en cantidades apreciables hace unos 2.500 millones de años debido a la existencia de algas verdeazuladas capaces de realizar procesos fotosintéticos (Halliwell y Gutteridge, 2000). El oxígeno fue descubierto como un constituyente del aire, casi simultáneamente por el químico, filósofo y teólogo inglés Joseph Priestley y por el farmacéutico sueco Carl Scheele, a finales del siglo XVIII. Pero fue el químico francés Antoine Lavoisier, quien años más tarde le dio su nombre actual y estableció las bases de la química del oxígeno.

Desde que los organismos colonizaron la tierra han debido evolucionar con el incremento del nivel de oxígeno presente en la atmósfera, que actualmente se sitúa en un 21%. Esta evolución ha estado dirigida hacia dos aspectos fundamentales para los seres vivos actuales, uno de ellos es la producción, de modo eficiente, de energía a través de cadenas de transporte electrónico cuyo último aceptor es el O_2 y el otro, es el desarrollo de un mecanismo de defensa, que implica distintos sistemas antioxidantes, frente a la toxicidad del propio O_2 (Noctor y col., 2000). Si bien, actualmente existen organismos anaerobios que han evitado esta evolución y que residen generalmente en habitats en los que el oxígeno no puede penetrar fácilmente (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.8. ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO (ROS)

Los trabajos de Rebeca Gerschman y Daniel Gilbert realizados en 1954 fueron pioneros en proponer que la toxicidad de la molécula de oxígeno no se debe tanto a su efecto directo sobre determinadas enzimas, a las cuáles puede llegar a inactivar, sino a la formación de radicales libres de oxígeno.

Un radical libre es cualquier átomo o molécula, capaz de existir de forma independiente, que contiene, al menos, un electrón desapareado ocupando un orbital atómico o molecular (Halliwell y Gutteridge, 2000). La molécula de oxígeno es un radical libre, según esta definición, pero no todas las especies de oxígeno reactivo (ROS) lo son (Fig 1.3). Éstas, incluyen a los productos de su reducción, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y su forma excitada, el oxígeno singlete y son a las responsables de la toxicidad de la molécula de oxígeno (Fridovich, 1983; Elstner, 1987; Cadenas, 1989; Boveris, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000) (Fig. 1.3).

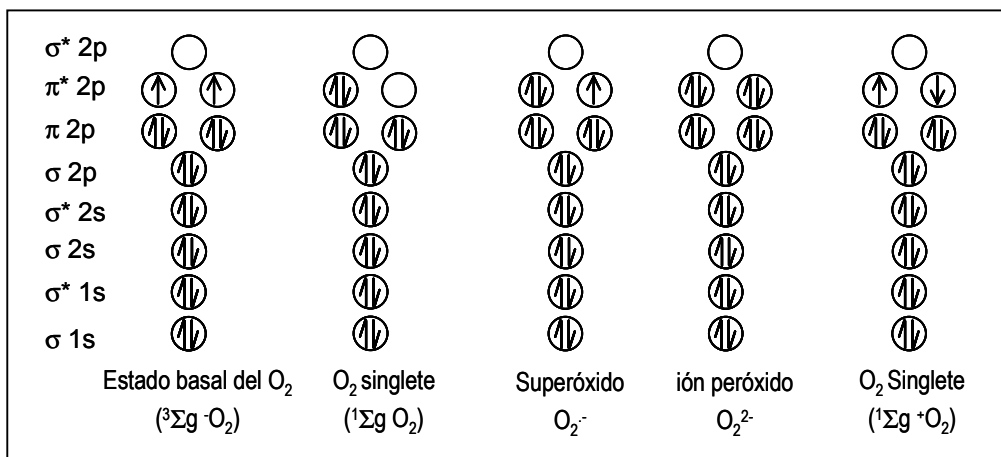


Fig. 1.3 Configuración electrónica de la molécula de oxígeno y de sus formas activadas

En la Figura 1.4 se muestra la secuencia de reacciones de transferencia de electrones a la molécula de oxígeno y la formación de especies de oxígeno reactivo, y en la Tabla 1.2 se muestran algunas de las especies más importantes.

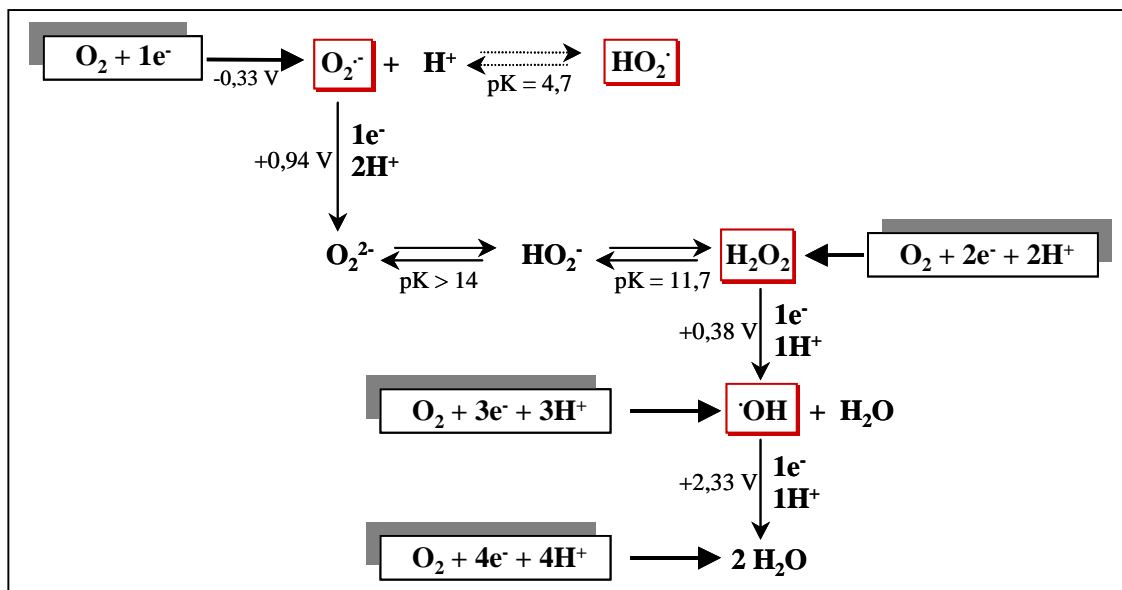


Fig. 1.4 Secuencia de reacciones de transferencia de electrones a la molécula de oxígeno

Tabla 1.2 Especies de oxígeno reactivo (ROS)^Y

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo ($\cdot OH$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Oxígeno singlete (1O_2)
Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	Peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$)

^YHalliwell y Gutteridge, 2000

1.8.1. Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ en soluciones acuosas tiene una vida media de milisegundos y es el radical de oxígeno mejor conocido. Su reactividad depende del medio en el que se encuentre y del pH, a menos que esté protonado como radical perhidroxilo (HO_2^{\cdot}) que es un agente reductor mucho más potente y capaz de atravesar membranas, además de iniciar la peroxidación de ácidos grasos (Halliwell y Gutteridge, 2000). El radical superóxido puede actuar como oxidante y como reductor, y en soluciones acuosas desaparece rápidamente por dismutación espontánea (Fridovich, 1986). De hecho, esta reacción espontánea de dismutación o desproporcionamiento domina toda la química de los radicales superóxido en medios acuosos. Estos radicales pueden disminuir la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y glutatión peroxidasa (Asada, 1994) e incluso provocar daños oxidativos a determinadas enzimas como la 6-fosfogluconato deshidratasa, la aconitasa, la fumarasa y la ribonucleótido reductasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). No obstante, la toxicidad de los radicales superóxido realmente proviene de su interacción con el H_2O_2 dando lugar, mediante la reacción de Haber-Weiss, a la producción del radical $\cdot OH$, uno de los oxidantes más potentes que se conocen (Fig.1.5).

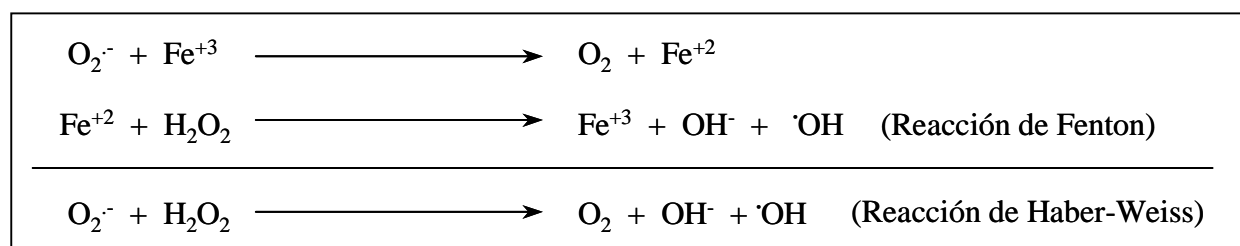


Fig. 1.5 Reacción química de Haber-Weiss catalizada por metales

Introducción

En sistemas biológicos el $O_2^{\cdot-}$ se origina como producto o intermediario en la reacción enzimática de oxidasas y oxigenasas, siendo la xantina oxidasa (XOD) uno de los principales sistemas generadores de $O_2^{\cdot-}$. También tiene lugar su formación durante la autooxidación de compuestos de importancia biológica, como la hemoglobina, la ferredoxina reducida, las flavinas, las catecolaminas e hidroquinonas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.8.2. Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

Es la única especie de oxígeno reactivo estable en solución, por lo que puede acumularse de forma apreciable en medios acuosos neutros y difundir a través de las membranas (Elstner, 1987). El H_2O_2 se ha encontrado en tejidos vegetales en concentraciones del orden de $2 \mu M$ pudiendo incrementarse hasta $30 \mu M$ en casos de infecciones por *Phytophthora megasperma* (Svalheim y Robertsen, 1993). También se han descrito concentraciones de $0,1 - 0,6 \mu mol g^{-1}$ de peso fresco (Patterson y col., 1984), que pueden aumentar entre tres y cuatro veces con bajas temperaturas (Okuda y col., 1991; Kingston-Smith y col., 1999). El H_2O_2 es un agente oxidante y reductor no muy fuerte pero a pesar de ello puede llegar a ser citotóxico.

1.8.3. Radical Hidroxilo ($\cdot OH$)

Este radical libre es uno de los agentes oxidantes más fuertes que se conocen (Buettner, 1989). Su vida media es muy corta, del orden de nanosegundos, de tal modo que, nada más producirse, reacciona inmediatamente con las moléculas más cercanas. Se origina en reacciones tipo Fenton y también en la clásica reacción de Haber-Weiss (1934) catalizada por trazas de metales, principalmente Fe^{3+} o Cu^{2+} (Halliwell y Gutteridge, 1992) (Fig. 1.5). En realidad, esta reacción está constituida por dos semirreacciones; en la primera de las cuales interviene el radical superóxido, que actúa reduciendo al Fe^{3+} o Cu^{2+} , mientras que la segunda es la reacción de Fenton, mencionada anteriormente. El radical $\cdot OH$ reacciona con la mayoría de los compuestos presentes en los sistemas biológicos, incluido el ADN, provocando daños en las bases y rotura de las cadenas (Packer y Glazer, 1990; Halliwell y Gutteridge, 2000), dando lugar a mutaciones como se ha observado en *E. coli* (Nunoshiba y col., 1999). Estos radicales también pueden producir daños oxidativos importantes en las proteínas y en las membranas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.8.4. Oxígeno Singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una especie muy reactiva que para formarse necesita un aporte de energía y se produce principalmente en reacciones fotodinámicas en el interior de los cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987). Al perder la restricción de spin, la capacidad oxidativa del oxígeno singlete es mucho mayor que la del oxígeno molecular (Halliwell y Gutteridge, 2000). Se ha observado que es capaz de oxidar determinadas enzimas como la catalasa (Lledías y col., 1998) y promover la peroxidación de lípidos (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.9. ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO (RNS)

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es un radical libre gaseoso, ligeramente soluble en agua y más soluble en solventes orgánicos, que puede difundir rápidamente en el espacio celular e intercelular. En contacto con el aire, puede reaccionar con el oxígeno dando lugar al dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$) mucho más reactivo que el $\text{NO}\cdot$ (Halliwell y Gutteridge, 2000) (Fig.1.6). La reacción del $\text{NO}\cdot$ con el $\text{O}_2\cdot^-$ da lugar a la formación de peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) que es un potente oxidante de moléculas biológicas, incluyendo los grupos -SH, los lípidos, los aminoácidos y los nucleótidos (Beckman y Koppenol, 1996). El $\text{NO}\cdot$ fue caracterizado en un principio como factor de relajación del tono endotelial (Moncada y col., 1991) y actualmente se sabe que es una molécula señal en células animales que regula varios procesos biológicos de los sistemas inmune, nervioso y vascular (Buchanan y col., 2000). Estudios recientes han llevado a pensar que el $\text{NO}\cdot$ actúa como una molécula señal también en plantas (Wendehenne y col., 2001). El $\text{NO}\cdot$, como regulador del desarrollo, promueve la germinación, la extensión foliar y el crecimiento de la raíz, y retrasa la senescencia foliar y la maduración del fruto (Leshem y col., 1998; Leshem, 2000). En la mayoría de los organismos el $\text{NO}\cdot$ es sintetizado por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS; EC 1.14.13.39), que catalizan la oxidación, dependiente de oxígeno y NADPH, de la L-arginina a $\text{NO}\cdot$ y citrulina, en una reacción compleja que requiere FAD, FMN y tetrahidrobiopterina, y en algunos casos también calcio y calmodulina (Knowles y Moncada, 1994). Hay tres tipos de NOS: la neuronal (nNOS), originariamente descubierta en el sistema nervioso; la endotelial (eNOS), que se expresa constitutivamente en células endoteliales; y la inducible (iNOS), identificada inicialmente en macrófagos y hepatocitos después de un tratamiento con endotoxinas o ciertas citoquinas. La nNOS y eNOS necesitan Ca^{2+} y calmodulina para su acción, mientras que la iNOS es independiente de Ca^{2+} (Knowles y Moncada, 1994; Halliwell y Gutteridge, 2000).

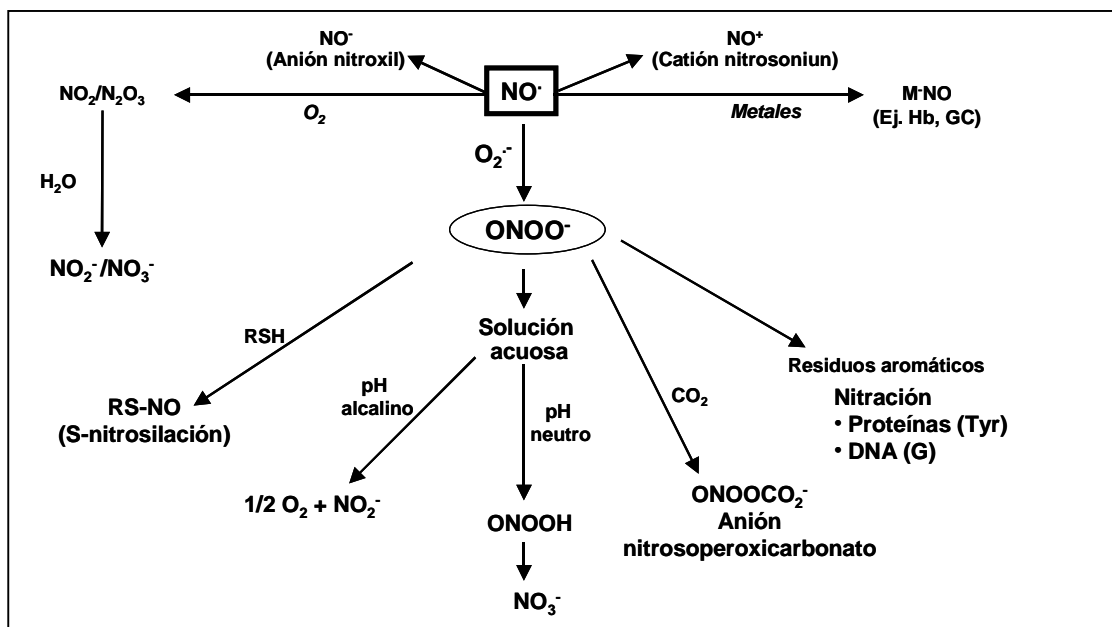


Fig. 1.6 Bioquímica del NO^\cdot en sistemas biológicos

1.10. PRODUCCIÓN DE ROS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

1.10.1. Mitocondrias

En mitocondrias tiene lugar la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en la NADH-deshidrogenasa, y en el complejo II en la región de la ubiquinona-citocromos *b* (González-Flecha y Boveris, 1995) (Fig. 1.7). Una fuente adicional de H_2O_2 la constituiría la superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial. En condiciones normales se estima que un 5% del flujo electrónico en mitocondrias se desvía hacia la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Rich y Bonner, 1978), aunque este porcentaje se incrementa en situaciones de estrés que provocan aumento de equivalentes de reducción, tales como salinidad (Hernández y col., 1993; Gómez y col., 1999) o sequía (Leprince y col., 1994), entre otros.

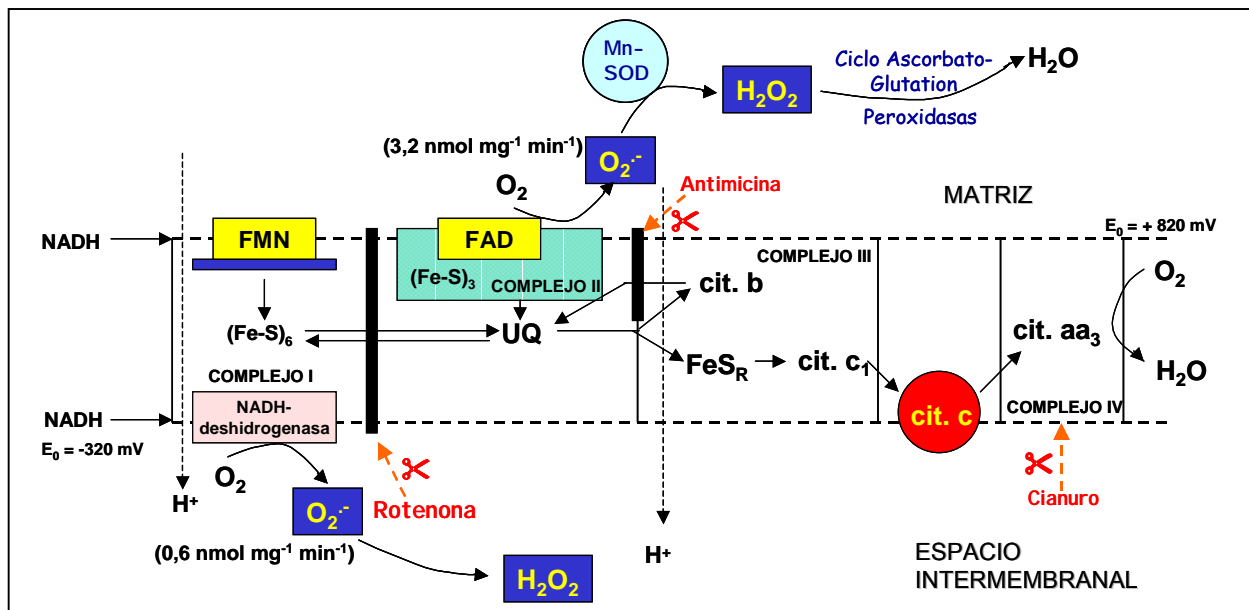


Fig. 1.7 Producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Fe-S: centros sulfoférricos del complejo II; Fe-S_R: proteína sulfoférrica de Rieske; Mn-SOD: Mn superóxido dismutasa; UQ: ubiquinona.

1.10.2. Cloroplastos

Los cloroplastos son unos de los orgánulos celulares más expuestos a la acción de los radicales $O_2^{\cdot-}$ en virtud de la elevada presión parcial de oxígeno existente en su interior. La producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se encuentra junto al lado reductor del fotosistema I (FSI), en los centros S-Fe (Asada, 1994) (Fig. 1.8). Otra vía alternativa de producción de $O_2^{\cdot-}$ consiste en la autooxidación de la ferredoxina y en la reacción de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (Asada y Takahashi, 1987). También se ha descrito la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el FSII y se ha propuesto al P₆₈₀, la feofitina y la proteína Q_A como responsables de la generación de superóxido (Ananyev y col., 1994; Navari-Izzo y col., 1999, 2001). Según Asada y Takahashi (1987) la tasa de reducción monovalente del O_2 en tilacoides constituye un 5-10% de la tasa de transporte electrónico total del cloroplasto y este porcentaje puede verse incrementado en situaciones de estrés, como se ha descrito en condiciones de salinidad (Hernández y col., 1995; Gómez y col., 1999), estrés hídrico (Price y Hendry, 1989), estrés térmico (Hodgson y Raison, 1991), herbicidas (Halliwell, 1987) y estrés medioambiental (Elstner, 1987). El H_2O_2 en cloroplastos puede originarse también en la reacción de la Fe-superóxido dismutasa (Fe-SOD) y la CuZn-superóxido dismutasa (CuZn-SOD).

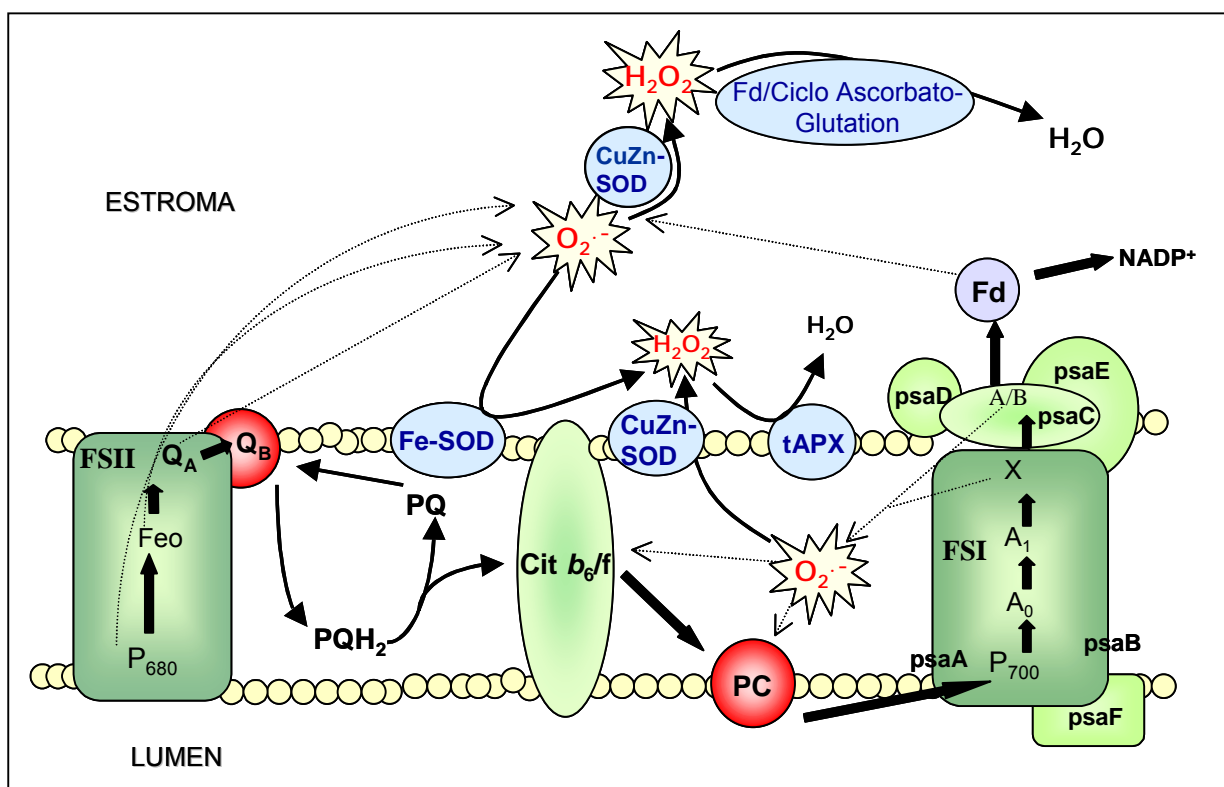


Fig. 1.8 Esquema de la producción y degradación de especies de oxígeno reactivo en cloroplastos (modificado de Navari-Izzo y col., 1999, 2001). CuZn-SOD: CuZn-superóxido dismutasa; Fd: ferredoxina; Feo: feofitina; FSI y FSII: fotosistema I y II; Fe-SOD: Fe-superóxido dismutasa; PC: plastocianina; PQ: plastoquinona; psaA-F: polipéptidos del FSI con función estructural; tAPX: ascorbato peroxidasa de tilacoides

1.10.3. Membrana Plasmática

En la membrana plasmática de células de raíces se ha descrito la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 asociada a cadenas de transporte electrónico en las que participan actividades NAD(P)H oxidorredoxas dependientes de Fe (Vianello y col., 1990, 1992). Quizás el sistema de producción de ROS asociado a la membrana plasmática más estudiado es el que se induce en procesos de infección por patógenos dando lugar a lo que se denomina “explosión oxidativa”, caracterizada por la producción masiva de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$. La producción de ROS parece ser dependiente de una NADPH-oxidasa similar a la descrita en neutrófilos compuesta por una flavina y un citocromo tipo *b* (Lamb y Dixon, 1997; Blumwald y col., 1998). Estas formas de oxígeno reactivo desempeñan un papel importante en el proceso de defensa frente al patógeno, bien actuando directamente como antifúngicos o antipatógenos, o indirectamente reforzando la pared celular o actuando como molécula señal en la inducción de la respuesta de defensa (Low y Merida, 1996; Grant y Loake, 2000).

1.11. TOXICIDAD DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

La toxicidad de las especies de oxígeno reactivo en sistemas biológicos se debe fundamentalmente a:

1) La inactivación de enzimas por la oxidación de grupos –SH en sus centros activos, o por cambios en el estado redox de los metales presentes en estos centros activos. No sólo pueden verse afectadas enzimas, sino también receptores y proteínas implicadas en el transporte, provocando alteraciones en el equilibrio iónico celular. La oxidación de proteínas catalizada por metales se ha identificado como una modificación postraduccional implicada no sólo en procesos fisiológicos sino también en procesos patológicos (Stadtman, 1992). Las proteínas dañadas por ROS/RNS son más susceptibles a la degradación proteolítica (Stadtman, 1992), aumentando así el reciclaje de aminoácidos en células sometidas a estrés oxidativo, aunque también puede darse el caso de proteínas altamente oxidadas que forman agregados resistentes al ataque proteolítico y que se acumulan en la célula contribuyendo a la toxicidad (Pacifici y Davies, 1990).

2) Daños en la molécula de ADN, bien a través de mecanismos indirectos, como pueden ser la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} , como consecuencia del incremento intracelular de Ca^{2+} , o la interferencia con enzimas encargadas de la reparación o de la replicación del ADN (Halliwell y Gutteridge, 2000). También puede ser a través de una acción directa sobre las bases y/o azúcares que componen las cadenas del ADN. En este sentido, el radical hidroxilo ($\cdot OH$) es el más peligroso ya que puede atacar a los azúcares y las bases, tanto púricas como pirimidínicas, generando multitud de productos que van a influir de forma negativa en la estructura tridimensional de la molécula de ADN y, en definitiva, de la cromatina, así como en la reparación, replicación y transcripción del mismo, provocando como efecto final mutaciones en las cadenas del ADN (Nunoshiba y col., 1999; Halliwell y Gutteridge, 2000).

3) La peroxidación de los lípidos de membrana, lo que altera la funcionalidad de las mismas (Halliwell y Gutteridge, 2000), siendo los ácidos grasos poliinsaturados los más susceptibles a este ataque. Los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) pueden iniciar la peroxidación lipídica, llevando a cabo la sustracción de un H de un grupo metileno dando lugar a agua y un radical carbonilo ($-C\cdot H-$) (Fig. 1.9). En condiciones aerobias, lo normal es que este radical carbonilo reaccione con una molécula de oxígeno dando lugar a un radical peroxilo ($ROO\cdot$). Éste, a su vez, es capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula lipídica adyacente, dando lugar a una cadena de reacciones que tienden a propagar la peroxidación lipídica, además de formar radicales lipídicos (Halliwell, 1987) (Fig. 1.9).

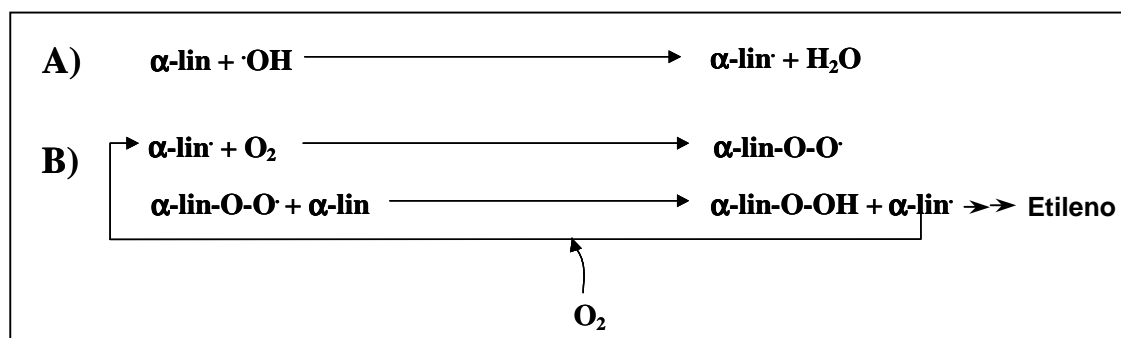


Fig. 1.9 Peroxidación lipídica en membranas. $\alpha\text{-lin}$: α -linoleato; $\alpha\text{-lin}\cdot$: radical linoleato; $\alpha\text{-lin-O-O}\cdot$: radical peroxo-linoleato; $\alpha\text{-lin-O-OH}$: peróxido de linoleato; $\alpha\text{-lin-O}\cdot$: radical alcoxi-linoleato

1.12. PAPEL DE ROS Y NO· COMO SEÑALES CELULARES

Además de ser citotóxicos, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 tienen también funciones positivas dentro de la célula. Así, se ha descrito que la infección avirulenta por patógenos provoca la activación de una batería de defensas que da lugar a lo que se conoce como “respuesta hipersensible” (HR), que resulta en la restricción de la lesión a una zona claramente delimitada por tejido sano. Por otro lado, está la “resistencia sistémica adquirida” (SAR) que resulta del ataque por patógenos virulentos y que afecta a toda la planta, caracterizada por la inducción de un conjunto de respuestas frente a este ataque. En ambos casos, la respuesta implica la generación de especies de oxígeno reactivo, dando lugar a la “explosión oxidativa”, con una producción masiva de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y sobre todo de H_2O_2 , como se ha mencionado anteriormente (Lamb y Dixon, 1997; Bolwell y Wojtaszek, 1997). El H_2O_2 participaría en procesos de reforzamiento de la pared celular, en la generación de especies más tóxicas que actuarían como antifúngicos y también como un disparador local de la muerte celular programada de las células implicadas en el ataque. Gracias a su difusibilidad, el H_2O_2 también actúa como una molécula señal que contribuye a la inducción de genes protectores en las células adyacentes (Desikan y col., 2000). Así, en la “explosión oxidativa”, el peróxido de hidrógeno juega un papel principal en el control de la respuesta hipersensible localizada (Levine y col., 1994; Low y Merida, 1996). Se ha descrito una respuesta similar a la “explosión oxidativa” en situaciones de estrés abiótico, tales como las debidas al ozono (Sharma y col., 1996), a daños físicos (Orozco-Cárdenas y col., 1999; 2001) o a radiaciones ultravioleta (Mackerness y col., 2001). El H_2O_2 también está implicado en el cierre estomático de plantas sometidas a estrés hídrico, a través del ácido abscísico (Pei y col., 2000).

El NO \cdot también actúa como una molécula señal en la resistencia de la planta a patógenos avirulentos, interviniendo en el proceso de resistencia asociado a la muerte celular de la zona implicada en la agresión (Delledonne y col., 1998). El proceso de resistencia no depende sólo de la acumulación de NO \cdot , sino que está determinado por la producción concomitante de otras especies de oxígeno reactivo y la relación entre ellas (NO \cdot /H $_2$ O $_2$ y NO \cdot /O $_2^{\cdot-}$) (Delledonne y col., 2001). Por otro lado, se ha implicado también a la molécula de óxido nítrico junto con las especies de oxígeno reactivo en la respuesta frente a diferentes tipos de estrés (Delledonne y col., 1998, 2001; Bolwell, 1999 a, b; García-Olmedo y col., 2001; Mackerness y col., 2001; Corpas y col., 2001).

Mediante el uso de inhibidores se ha demostrado que la “explosión oxidativa” está regulada, al menos en parte, por procesos de fosforilación/desfosforilación, y en mamíferos además se activa por fosfolipasas, aunque en plantas esto no está suficientemente claro (Blumwald y col., 1998; Grant y Loake, 2000). La NADPH-oxidasa también se induce por iones Ca $^{2+}$ del citosol, probablemente por cambios conformacionales o bien indirectamente elevando los niveles de NADPH por activación de la calmodulina o de la NAD quinasa (Grant y Loake, 2000). A su vez los niveles de Ca $^{2+}$ pueden estar regulados por GMPc (Durner y col., 1998). El NO \cdot activa la guanilato ciclasa, lo que lleva consigo un incremento de los niveles de GMPc, amplificando de esta forma la señal (Durner y col., 1998; Grant y Loake, 2000). Además de las ROS y el NO \cdot , también intervienen otras moléculas en el proceso de transducción de señales, entre ellas el etileno, el ácido jasmónico y el ácido salicílico (SA) existiendo procesos de sinergismo y antagonismo entre ellos y diferentes rutas metabólicas, lo que genera una compleja red que, de alguna forma, coordina las respuestas de defensa de la planta (Blumwald y col., 1998; Grant y Loake, 2000). Como resultado de ello tiene lugar la activación de factores de transcripción que activan procesos de apoptosis o muerte celular programada, genes de defensa (fenilalanina amonioliasa o PAL, proteínas de resistencia o PRs, glucanasas y quitinasas), o genes que codifican enzimas protectoras como la glutathion-S-transferasa, la glutathion peroxidasa y otras peroxidases. En la Fig. 1.10 se esquematizan los procesos implicados en la transducción de señales en la respuesta de la planta frente a patógenos.

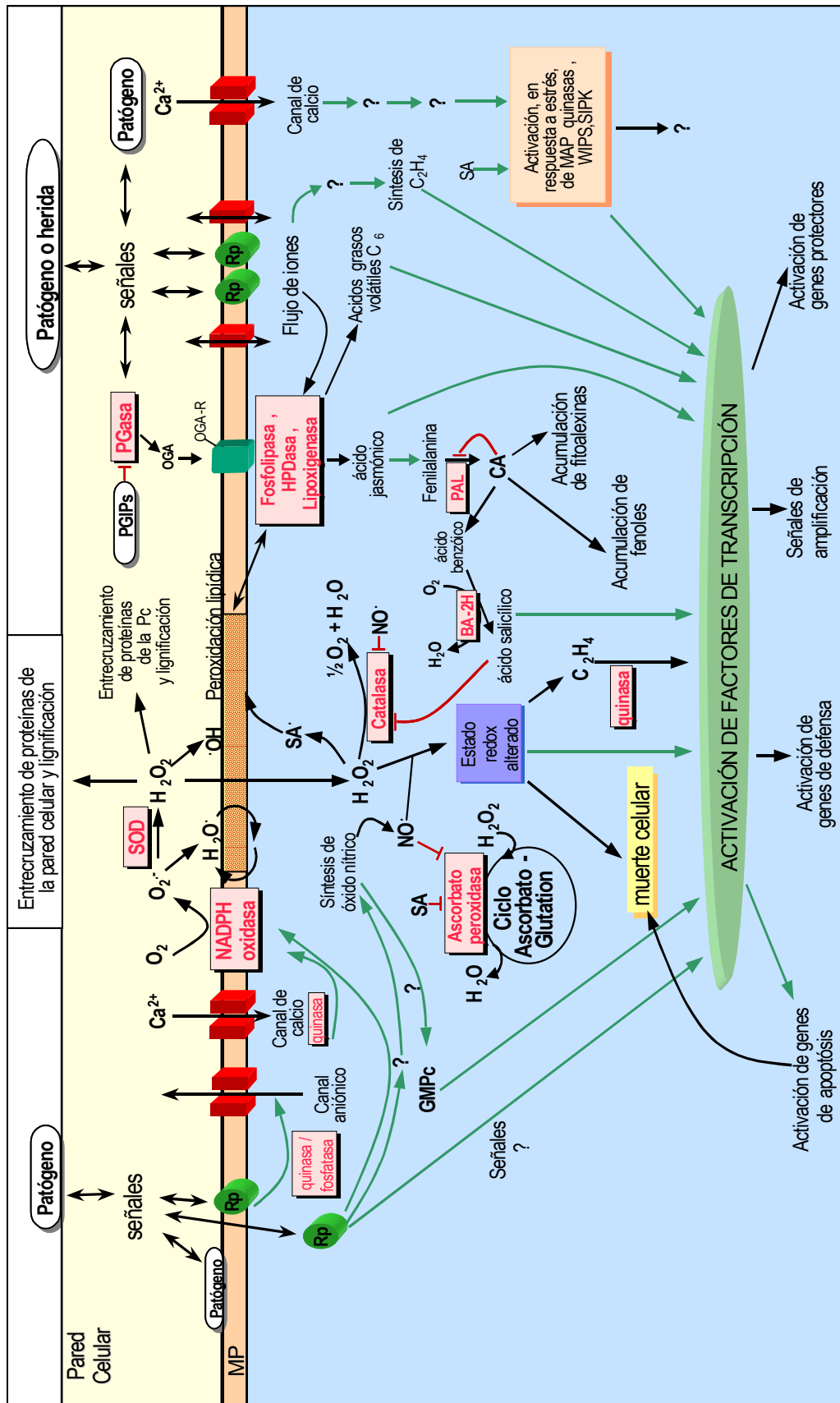


Fig. 1.10 Esquema de las rutas de transducción de señales en la respuesta de defensa de la planta (Buchanan y col., 2000). BA-2H: ácido benzóico-2 hidroxilasa; CA: ácido cinámico; HPDasa: hidroxiperóxido deshidrasa; MAP: proteína activadora de ; PGasa: poligalacturonidasa; Rp: receptores de OGA y OGA-R: fragmentos oligogalacturonidos y receptor; PAL: fenilalanina amonio liasa; Pasa: poligalacturonidasa; Rp: receptores de proteínas; SA: ácido salicílico; SIPK: quinasa inducida por SA; SOD: superóxido dismutasa; WIPK: quinasa inducida por herida; → : activación; → : inhibición

1.13. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como protección frente a las ROS y RNS, los organismos han desarrollado una batería de defensas antioxidantes. Se considera como antioxidante cualquier sustancia, que a baja concentración, comparada con el sustrato potencialmente oxidable, disminuye o previene de forma significativa la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 2000). Estos mecanismos de defensa incluyen moléculas de bajo peso molecular (antioxidantes no enzimáticos) y enzimas que degradan superóxido e hidroperóxidos (antioxidantes enzimáticos). Estos sistemas previenen la formación incontrolada de radicales libres y especies de oxígeno reactivo o inhiben su reacción con estructuras biológicas. Esta función antioxidante puede inducir cambios en el metabolismo y juega un papel importante en la regulación de la expresión de determinadas proteínas y en su actividad a nivel transcripcional y/o postranscripcional (Chaudière y Ferrarlliou, 1999).

1.13.1. Antioxidantes no Enzimáticos

También conocidos como antioxidantes estequiométricos por su capacidad de neutralizar un radical libre por molécula. Normalmente actúan a concentraciones relativamente elevadas (Halliwell y Gutteridge, 2000). Se pueden describir tres grupos:

1) Reductores hidrosolubles. Este grupo incluye compuestos como cisteína (N-acetilcisteína), glutatión (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, glucosa, manitol y albúmina (Arouma y col., 1989; Halliwell y Gutteridge, 2000). *In vivo*, los de mayor relevancia son el GSH y el ácido ascórbico (Ames y col., 1981; Chou y Khan, 1983; Cadenas 1989; Alscher, 1989; Packer y Glazer, 1990; Crystal y Bast, 1991).

La importancia del ascorbato en los sistemas biológicos reside en su capacidad reductora, siendo quizá el antioxidante más abundante (Smirnoff, 2000) y de especial relevancia en plantas ya que está implicado en la eliminación del H_2O_2 con la intervención de la ascorbato peroxidasa (APX) (Foyer, 1993). También puede actuar reduciendo directamente al radical superóxido, dando lugar al H_2O_2 y al ácido deshidroascorbato (DHA) (Takahama, 1988), y puede reaccionar el oxígeno singlete y con los radicales $\cdot OH$. En los sistemas biológicos, el ascorbato funciona normalmente como donador de un electrón dando lugar al monodeshidroascorbato (MDHA), siendo su oxidación completa a deshidroascorbato (DHA) rara por la constricción estructural de la molécula (Njus y col., 1990; Villalba y col., 1995). En células vegetales el ascorbato está presente en todos los compartimentos celulares, incluyendo el apoplasto, con una concentración media celular de 2-25 mM, encontrándose la mayor concentración en el estroma cloroplastídico. En los últimos años también se ha demostrado la implicación del ascorbato en la división celular y el crecimiento vegetal (Noctor y col., 2000; Smirnoff, 2000).

Introducción

El glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es un tripéptido tiólico cuya unión γ parece ser una protección frente a la degradación por aminopeptidasas (Sies, 1999). Funciona como reductor intracelular, generando el ambiente necesario para que algunas enzimas actúen. Es el principal compuesto tiólico de bajo peso molecular en plantas que contribuye también a la desintoxicación de xenobióticos, bien de forma espontánea, o a través de la actividad glutatión S-transferasa (GST), así como a la defensa frente a algunos metales pesados, siendo el precursor de las fitoquelatinas (Noctor y Foyer, 1998). Junto con el ascorbato forma parte del ciclo ascorbato-glutatión que elimina el H_2O_2 . El glutatión está implicado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta celular al estrés ambiental y a los ataques por patógenos (Creissen y col., 1992; Wingsle y Karpinski, 1995), y en el transporte por el floema de azufre reducido (Rennenberg, 1982). Esta molécula juega un importante papel en la regulación de la nutrición azufrada entre los distintos órganos de la planta (Rennenberg y Brunold, 1994), así como en el control del potencial redox en la división celular (Noctor y Foyer, 1998). Casi todas estas funciones las ejerce el glutatión reducido, mientras que la forma oxidada (GSSG) puede llegar a acumularse en condiciones de estrés oxidativo. El glutatión se puede sintetizar en el citosol y en el cloroplasto, y la concentración estimada en cloroplastos se sitúa entre 1-4,5 mM, aunque es difícil determinarla por su continuo intercambio entre los distintos compartimentos celulares, que parece realizarse a través de permeasas de aminoácidos (Noctor y Foyer, 1998). En los últimos años se ha implicado al glutatión en procesos de transducción de señales, expresión de genes y apoptosis, mediante la glucotionilación de proteínas (Sies, 1999; Noctor y col., 2000).

2) Reductores liposolubles. En este grupo está incluida la vitamina E (α -tocoferol) que reacciona con los radicales de oxígeno y peróxido o lipóxido formando un radical tocoferilo que, por ser estable, interrumpe la cadena de reacciones en cascada producida por los radicales libres. La vitamina E es el antioxidante más importante en las membranas lipídicas (Diplock, 1983; McCay, 1985; Fryer, 1992; Halliwell y Gutteridge, 2000). Los flavonoides también están incluidos en el grupo de reductores liposolubles y son una familia de polifenoles de origen vegetal (denominados como vitamina P) que pueden ser regenerados por la vitamina C. Actúan inhibiendo a las lipooxigenasas y a las ciclooxigenasas, e incluso a la xantina oxidasa (Hayashi y col., 1988; Bors y col., 1990). Otro miembro de este grupo es el β -caroteno que actúa, de forma no estequiométrica, como atrapador físico del oxígeno singlete utilizando su energía para interconvertir la forma *cis* del β -caroteno en la forma *trans* y viceversa (Kappus y Sies, 1981; Krinsky y Deneke, 1982; Halliwell y Gutteridge, 2000).

3) Quelantes de metales. Otro mecanismo antioxidante es el constituido por determinados componentes celulares que actúan atrapando a los iones metálicos, impidiendo de esta forma su participación en reacciones de tipo Fenton que generan radicales $\cdot OH$. A este grupo pertenecen proteínas como la

transferrina y la ceruloplasmina. Esta última, almacena cobre y cataliza la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} con formación de agua, evitando así la producción de radicales $\cdot\text{OH}$ (Gutteridge y col., 1980). Otros quelantes de metales son las fitoquelatinas.

1.13.2. Antioxidantes Enzimáticos

Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas ($\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2) (Winston, 1990).

1.13.2.1. Superóxido dismutasas (SOD; EC 1.15.1.1)

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta por primera vez por McCord y Fridovich en 1969, y juega un papel muy importante como mecanismo de defensa, al llevar a cabo la dismutación o desproporcionamiento catalítico de los radicales libres $\text{O}_2^{\cdot-}$ con formación de agua y peróxido de hidrógeno. La SOD aprovecha la capacidad oxidante y reductora del radical superóxido para llevar a cabo su función, usando un radical superóxido para oxidar a otro:



Las SODs son una familia de enzimas que se agrupan según el grupo prostético metálico ligado a la enzima: las que contienen cobre y zinc (CuZn-SODs), las que contienen manganeso (Mn-SODs) y finalmente, las que contienen hierro (Fe-SODs). Se han encontrado algunas SODs atípicas que contienen diferentes combinaciones de estos metales (SODs híbridas) en su molécula (Parker y col., 1984; Duke y Salin, 1985; Barkley y Gregory, 1990; Ciriolo y col., 1994) e incluso alguna que contiene níquel (Ni-SOD) en *Streptomyces* (Kim y col., 1998). Las distintas SODs se pueden identificar utilizando inhibidores (CN^- y H_2O_2): las Fe-SODs son sensibles al H_2O_2 (5mM) pero son resistentes al KCN (2mM), las CuZn-SODs son sensibles a ambos inhibidores, mientras que las Mn-SODs son resistentes.

Las SODs se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en organismos aeróbicos (procariotas y eucariotas) e incluso en algunas bacterias anaerobias estrictas y facultativas (Hassan, 1989). La distribución de los tres tipos fundamentales de SODs podría considerarse como una característica del estado evolutivo del organismo o compartimento celular en el que se encuentran ya que los datos filogenéticos de estas enzimas indican que las Fe-SODs aparecieron antes en la evolución, seguidas de las Mn-SODs y finalmente, las CuZn-SODs. Las dos primeras comparten un mayor grado de

Introducción

homología tanto en secuencia aminoacídica como en estructura. Todas las SODs se codifican en el núcleo y su localización subcelular se muestra en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Distribución subcelular de SODs en plantas superiores

Isoenzima	Nº de subunidades	Localización	Referencias
CuZn-SOD	2 x 16,5 kDa	Citoplasma	Sandalio y col. (1987) Palma y col. (1997) Kanematsu y Asada (1989ab)
		Cloroplastos	Hernández y col. (1994) Ogawa y col. (1995)
		Peroxisomas	Sandalio y col. (1987, 1988a, 1997) Bueno y del Río (1992)
		Mitocondrias	Duke y Salin (1985) Sandalio y col. (1987)
		Núcleo	Ogawa y col. (1996) Valderrama y col. (en prensa)
		Extracelular	Streller y Wingsle (1994) Ogawa y col. (1996)
Mn-SOD	4 x 27 kDa	Peroxisomas	del Río y col. (1983) Sandalio y col. (1987, 1988a) del Río y Donalson (1995) Palma y col. (1998)
		Mitocondrias	Sandalio y col. (1987) Sakamoto y col. (1992) Zhu y Scandalios (1995)
Fe-SOD	2 x 20-24 kDa	Citoplasma	Becana y col. (1989)
		Cloroplastos	Salin y Bridges (1980)
		Peroxisomas	Droillard y Paulin (1990)
		Mitocondrias	Droillard y Paulin (1990)

1.13.2.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Es una enzima hemínica que cataliza la descomposición del H₂O₂ con un mecanismo similar al de la SOD, una molécula de H₂O₂ es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O₂ según la reacción:



Esta reacción se encuentra favorecida en condiciones de concentración de H₂O₂ elevadas (Chance y col., 1979). Sin embargo, la catalasa también es capaz de llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas a pH básico, en presencia de H₂O₂, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (AH₂) (Butt, 1980; Halliwell y Gutteridge, 2000).

La mayoría de las células aerobias contienen actividad catalasa (Chance y col., 1979), y son pocas las que no la poseen, como las bacterias *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, el alga verde *Euglena*, algunos parásitos helmínticos y el alga verdeazulada *Gleocapsa*. La mayoría de los organismos anaerobios no contienen catalasa salvo algunos como *Propionibacterium shermanii* que sí tienen esta enzima (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La actividad catalítica de la catalasa es enorme, muy difícil de saturar y su velocidad catalítica sólo está limitada por la concentración de su sustrato en la disolución (Halliwell y Gutteridge, 2000). Es una enzima por tanto, implicada en procesos metabólicos en los que se genera H₂O₂ de forma importante, como son la β-oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato (Huang y col., 1983). Normalmente, es una proteína tetramérica con un tamaño de subunidad entre 55-59 kDa. En plantas está codificada por una familia multigénica (Ni y Trelease, 1991; Frugoli y col., 1996) lo que refleja su complejidad funcional durante el desarrollo de la planta (Kunce y Trelease, 1986) o en respuesta a diferentes tipos de estrés (Willekens y col., 1994). Son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto que la catalasa es una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés (Willekens y col., 1997), y se han descrito diferentes isoformas de catalasa (Eising y col., 1990; Havir y col., 1996; Corpas y col., 1999)

La actividad catalasa se encuentra localizada casi de forma exclusiva en peroxisomas/glioxisomas, por lo que se utiliza habitualmente como marcador de estos orgánulos celulares (Huang y col., 1983).

1.13.2.3. Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation

También denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un mecanismo eficiente de las células vegetales para la eliminación del H_2O_2 , especialmente en compartimentos celulares donde se produce este metabolito y no existe catalasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). Es un ciclo en el que participan cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutation reductasa (GR) que resulta en la eliminación del H_2O_2 usando ascorbato (ASC) y que implica la utilización de glutation reducido (GSH) y de poder reductor (NADPH) (Foyer y Halliwell, 1976; Asada, 1984) (Fig. 1.11).

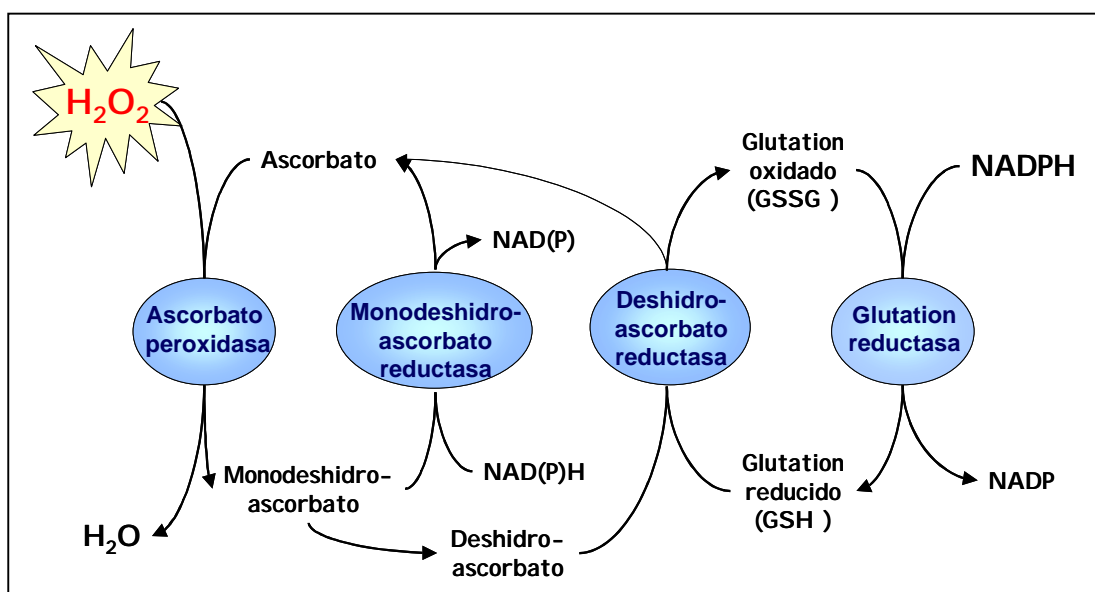


Fig. 1.11 Ciclo ascorbato-glutation o de Foyer-Halliwell-Asada

Las enzimas de este ciclo se han localizado en cloroplastos, citosol y mitocondrias de nódulos (Foyer y col., 1976, 1977; Jiménez y col., 1997), así como en peroxisomas de hojas de guisante (Jiménez y col., 1977). Existe un alto grado de complejidad en términos de compartimentación subcelular de los componentes de este ciclo, del tamaño de sus familias de genes y de la regulación de la expresión de los mismos. Esta complejidad, asociada al papel del glutation en procesos de señalización en respuesta a distintos tipos de estrés sugiere que el ciclo ascorbato-glutation es sólo una parte de la función de las enzimas que lo forman dentro de la célula (Creissen y Mullineaux, 2002).

Ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Es una enzima con un mecanismo de funcionamiento típico de una peroxidasa hemínica y lleva a cabo la primera reacción del ciclo, reduciendo el peróxido de hidrógeno a agua usando ascorbato como fuente de poder reductor. El papel de esta enzima en la eliminación del peróxido de hidrógeno y es esencial, al menos en cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987). Se ha localizado esta actividad en el estroma de cloroplastos (sAPX) así como unida a tilacoides (tAPX), en el citosol, mitocondrias y peroxisomas (Chen y Asada, 1989; Miyake y Asada, 1992; Foyer y col., 1997; Jiménez y col., 1997; López-Huertas y col., 1999a). Son enzimas monoméricas fundamentalmente, con una subunidad comprendida entre 30-40 kDa (Tanaka y col., 1991; Ishikawa y col., 1996; Morimura y col., 1996), aunque también se han descrito algunas formas diméricas (Mittler y Zilinskas, 1991).

En un principio se pensó que había un sólo gen que codificaba la APX citosólica en guisante y en *Arabidopsis*. Sin embargo, la base de datos de *Arabidopsis* muestra la existencia de 4 clases de APXs (que incluyen a 62 cDNAs con homología al centro activo de APX): APX1, APX3 y los que codifican las isoformas tAPX y sAPX. Todos ellos se expresan en los tejidos de la planta en condiciones fisiológicas. Además, se ha detectado un gen que sólo se expresa en condiciones de estrés (APX2) (Creissen y Mullineaux, 2002).

Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

Cataliza la reducción del MDHA para generar ascorbato usando NAD(P)H como donador de electrones (Asada y Takahashi, 1987). Por otro lado, el MDHA puede transformarse en ascorbato y DHA por dismutación espontánea. Es una enzima ampliamente distribuida en plantas, algas y animales, y está presente en el citosol, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas generalmente unida a la membrana (Hossain y Asada, 1984a; de Leonardis y col., 1995; Møller, 1998; Jiménez y col., 1997).

Se han clonado los cDNAs de la MDHAR en tres especies vegetales diferentes (pepino, tomate y guisante) que codifican un péptido similar de unos 47 kDa, y se supone que es la forma citosólica de la MDHAR para la que parece existir una sola copia del gen. Sin embargo, la detección de otras isoformas en otras especies y en compartimentos celulares diferentes sugiere la existencia de otros genes (Creissen y Mullineaux, 2002).

Deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1)

La actividad deshidroascorbato reductasa (DHAR) cataliza la reducción divalente del deshidroascorbato (DHA) a ascorbato (ASC) a expensas del GSH (Hossain y Asada, 1984b; Villalba y col., 1995). Es una enzima poco caracterizada debido a su baja estabilidad (Foyer y Halliwell, 1977; Trumper y

Introducción

col., 1994), lo que unido a su escasa afinidad por el sustrato (Minetti y col., 1992) ha llevado a sugerir que *in vivo* la DHAR no parece ser fundamental en el mantenimiento del ascorbato en su forma reducida e incluso se ha dudado de su existencia como enzima específica (Morell y col., 1997). Sin embargo, la DHAR se ha purificado casi a homogeneidad en hojas de espinaca y se sabe que es un monómero de unos 23 kDa (Foyer y Halliwell, 1977; Hossain y Asada, 1984b). También se ha purificado la enzima de tallos de guisante (Jablonski y Anderson, 1981), tubérculos de patata (Dipierro y Borranccino, 1991), y de una monocotiledónea como el arroz (Kato y col., 1997).

Glutation reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Es una flavoproteína que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH como donador de electrones. Es una proteína dimérica con FAD en el centro activo de cada subunidad. Parece ser que el NADPH reduce a FAD, pasando sus electrones a un puente disulfuro (-S-S-) entre dos residuos de cisteína del centro activo. Los dos grupos -SH formados interaccionan con el GSSG reduciéndolo hasta 2 GSH, regenerando el puente disulfuro (Halliwell y Gutteridge, 2000). Esta actividad enzimática se encuentra ampliamente distribuida entre procariotas y eucariotas, estando implicada en procesos metabólicos de vital importancia para la célula, considerándose crucial en el mantenimiento de la capacidad antioxidante celular (Meister y Anderson, 1983; Creissen y col., 1994). La glutatión reductasa se identificó por primera vez en plantas hace unos 50 años y desde entonces se ha descrito en numerosas especies vegetales y tejidos (Rennenberg, 1982), habiéndose purificado en un gran número de plantas superiores (Mullineaux y col., 1994). Es una enzima importante en la protección de la planta frente a diferentes tipos de estrés, como los producidos por herbicidas, contaminantes, bajas temperaturas, alta intensidad lumínica y estrés hídrico (Rennenberg, 1982; Smith y col., 1989; Foyer y col., 1991; Oswald y col., 1992; Mullineaux y col., 1994; Navari-Izzo e Izzo, 1994).

Se clonó por primera vez a partir de hojas de guisante por Creissen y col. (1992). El ADNc codificaba un polipéptido con una alta homología con las GRs secuenciadas hasta entonces (GOR1), y se observó que presentaba un péptido señal con el que iba dirigido de forma simultánea a cloroplastos y mitocondrias. También se han clonado GRs de hojas de *Arabidopsis*, nódulos de soja y hojas de tabaco, presuntamente plastídicas (Aono y col., 1995; Creissen y Mullineaux, 2002). Por otro lado, se ha clonado un gen que codifica la GR sin péptido señal y todo parece indicar que puede tratarse de la enzima citosólica (GOR2). Sin embargo, estos genes no explican la cantidad de isoformas encontradas en determinadas especies vegetales, y parece lógico pensar que probablemente exista una familia multigénica similar a la de la APX, y que quizás las distintas isoformas sólo se expresan en determinadas condiciones de estrés (Creissen y Mullineaux, 2002)

1.13.2.4. NADP-Deshidrogenasas

Al ciclo ascorbato-glutation habría que sumar las actividades de una serie de enzimas que suministran el poder reductor (NADPH), tanto en animales como en plantas, y que pertenecen a la llamada ruta oxidativa de las pentosas fosfato. La primera enzima implicada en esta ruta es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49), seguida de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44). La G6PDH se ha localizado en el citosol, cloroplastos y peroxisomas (Schnarrenberger y col., 1973; Herbert y col., 1979; Corpas y col., 1998a), y ha sido purificada, caracterizada y clonada en tubérculos de patata (Graeve y col., 1994). La velocidad a la que esta ruta trabaja depende del suministro de NADP⁺ a la primera enzima, proporcionado por la misma GR, que al actuar oxida a el NADPH y disminuye la relación NADPH/NADP⁺ (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, el enzima málico (EM) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) también aportan poder reductor, y en cloroplastos existe una fuente adicional de NADPH que es la ferredoxin-NADP⁺ reductasa del fotosistema I.

1.13.2.5. Otras Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7; donador:H₂O₂ oxidoreductasas) constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es oxidar sustratos a expensas del H₂O₂, encontrándose en plantas, mamíferos, hongos y organismos procariontas (Asada, 1992). Las peroxidasas utilizan una gran variedad de donadores de electrones y, en general, se denominan guayacol peroxidasas por ser el guayacol el donador más utilizado en los ensayos de espectrofotometría. Están implicadas en un gran número de procesos fisiológicos como la biosíntesis de ligninas (Halbrock y Grisebach, 1979), el desarrollo y organogénesis por degradación del ácido indolacético (IAA) o la biosíntesis del etileno (Schneider y Wightman, 1974; O'Neil y Scott, 1987). Se han encontrado muchas isoenzimas de peroxidasas en plantas, y la expresión de algunas de ellas varía de forma específica en respuesta al desarrollo o estrés, tanto biótico como abiótico (Butt, 1980). En bacterias y organismos animales se han identificado y caracterizado diferentes enzimas dependientes de selenio, entre las que se incluyen la actividad glutacion peroxidasa (GPX) (Lauchli, 1993; Stadtman, 1990). La GPX es una seleno-proteína no hemínica que cataliza la siguiente reacción (Flohé y Günzler, 1985):



Introducción

En animales se han llegado a determinar hasta cuatro grupos de GPXs caracterizadas por su estructura, especificidad de sustrato y distribución en el tejido (Eshdat y col., 1997). Esta actividad se ha detectado también en cultivos celulares de espinaca y maíz, así como en plantas de *Lemna* (Drotar y col., 1985) y en semillas de guisante etioladas (Edwards, 1996). Además se ha caracterizado y clonado una enzima con actividad GST y GPX en plantas de *Arabidopsis* (Bartling y col., 1993)

1.13.2.6. Glutation-S-Transferasas (GST; EC 2.5.1.18)

Catalizan la reacción de compuestos de bajo peso molecular con grupos tioles y glutatión con una gran variedad de sustratos tanto hidrofóbicos como electrofílicos y, normalmente citotóxicos, formando tioésteres denominados S-conjugados (Marrs, 1996). Las GSTs se identificaron por primera vez por su capacidad de desintoxicación de herbicidas y se han caracterizado en numerosos cultivos (Cummins y col., 1997; Hatton y col., 1998 y 1999; Fujita y col., 1998). Sin embargo, hay otra subclase de GST que se ha implicado en numerosos casos de respuesta al estrés, incluido el producido por el ataque de patógenos, el estrés oxidativo, y la toxicidad por metales pesados. Además, en plantas las GSTs juegan un papel importante en la respuesta celular frente a auxinas y durante el metabolismo normal de la planta relacionado con productos secundarios como antocianinas y ácido cinámico (Marrs, 1996; Alfenito y col., 1998).

Todos los eucariotas tienen múltiples isoenzimas de GST, citosólicas o unidas a membranas. Se sabe que, al menos, seis familias de genes codifican las GSTs lo que da una idea de su alto grado de complejidad (Halliwell y Gutteridge, 2000).

1.13.2.7. Tiorredoxinas

Son polipéptidos de pequeña masa molecular (alrededor de 12 kDa), que se encuentran presentes tanto en procariotas como en eucariotas. Contienen dos grupos -SH adyacentes en forma reducida, que se convierten en un puente disulfuro (-S-S-) en su forma oxidada. Pueden establecer reacciones redox con múltiples proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2000). La proteína oxidada puede ser reducida *in vivo* por la tiorredoxín reductasa, una enzima que contiene un grupo FAD y utiliza NADPH, y que muestra similitud con la glutatión reductasa.

Las tiorredoxinas juegan un papel clave en el metabolismo de plantas y animales, ya que intervienen en numerosos procesos. Se sabe que puede reaccionar directamente con el H₂O₂ (aunque su función metabólica se desconoce), regulan actividades de las enzimas del ciclo de Calvin en el cloroplasto (fosforribulosa quinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y

sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa), regulan enzimas implicadas en la glucólisis (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), en la síntesis de ATP (factor de acoplamiento CF1), en la asimilación del carbono de plantas C₃ (NADP-malato deshidrogenasa), participan en la exportación de equivalentes de reducción al citosol en plantas C₃ e intervienen en la reparación de daños a residuos de metionina en proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Por último, también se pueden considerar como agentes antioxidantes secundarios aquellos encargados de la eliminación o reparación de componentes dañados que podrían acumularse alterando así el metabolismo celular. Entre éstos se pueden citar a los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando selectivamente proteínas dañadas por procesos oxidativos (Kelvin y Davies, 1986; Pacifici y col., 1989; Pacifici y Davies, 1990), a los sistemas reparadores de ADN y a las fosfolipasas, que eliminan los fosfolípidos oxidados dentro de las membranas (Demple y Halbrook, 1983; Sevanian y Kim, 1985).

1.14. METABOLISMO DE PEROXISOMAS

Fue Rhodin en 1954 quien por primera vez describió los peroxisomas estudiando los túbulos renales de ratón por microscopía electrónica, denominándolos entonces “microcuerpos”. Rouiller y Bernhard en 1956 identificaron unos orgánulos de similar morfología pero con una estructura cristalóide en su matriz. Pero no fue hasta principios de los años 60 cuando se llevó a cabo la caracterización bioquímica de los peroxisomas y su reconocimiento como orgánulos celulares distintos, gracias a los trabajos de Duve y col. (1960) en tejidos de mamíferos, en los que separaron los orgánulos mediante técnicas de centrifugación diferencial y gradientes de densidad. Por su alto contenido en H₂O₂, de Duve (1965) bautizó a estos orgánulos con el nombre de “peroxisomas”, que los define fisiológicamente. Además, se demostró la presencia en estos orgánulos de diferentes actividades enzimáticas: urato oxidasa, catalasa, α -hidroxiácido oxidasa y D-aminoácido oxidasa. En 1967 se estudiaron por primera vez estos orgánulos en tejidos vegetales, cuando Breidenbach y Beevers aislaron, mediante gradientes de densidad de sacarosa, unos orgánulos de gran densidad que contenían catalasa y las enzimas del ciclo del ácido glioxílico y que eran similares al microscopio electrónico a los “microcuerpos”, denominando a estos orgánulos con el nombre de “glioxisomas”. Los peroxisomas poseen un diámetro entre 0,1 y 1,7 μ m y están constituidos por una membrana simple que rodea a una matriz granular o fibrilar, y que en ocasiones presentan inclusiones amorfas o cuerpos cristalinos (Tolbert y Essner 1981b; Kindl y Lazarow, 1982; Huang y col., 1983). Son orgánulos celulares no autónomos ya que no poseen ADN intraorganular, ni ribosomas, ni sistemas de membrana internos, por lo que todas las proteínas peroxisomales están codificadas en el genoma nuclear

Introducción

(Kunau, 1998; Olsen, 1998; López-Huertas y Baker, 1999b). Desde un punto de vista fisiológico y bioquímico, los peroxisomas se pueden definir como unos orgánulos subcelulares ubicuos que contienen catalasa y flavín oxidasas productoras de H₂O₂ como constituyentes enzimáticos básicos (de Duve y Baudhuin, 1966; Tolbert, 1981a; Huang y col., 1983). En años recientes se ha demostrado la implicación de los peroxisomas en distintas funciones celulares importantes tanto en animales (Van den Bosch y col., 1992; Masters y Crane, 1995; Tabak y col., 1999; Fahimi y Baumgart, 1999) como en plantas (del Río y col., 1998, 2002b; Baker y Graham, 2002).

Los peroxisomas de plantas superiores se pueden clasificar en 4 tipos según su función metabólica específica y el tejido en el que se encuentren (Huang y col., 1983):

- 1) Glioxisomas, presentes en semillas oleaginosas y en los que se encuentran las enzimas necesarias para llevar a cabo la β -oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxilato, lo que permite la transformación de los lípidos de reserva de la semilla en azúcares que serán utilizados durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Tolbert, 1981a; Tolbert y Essner, 1981b; Beevers, 1982).
- 2) Peroxisomas de hojas, presentes en los tejidos fotosintéticos, y que llevan a cabo las reacciones más importantes de la fotorrespiración (Tolbert, 1981a; Huang y col., 1983; Douce y Heldt, 2000). Estos peroxisomas se hallan en estrecho contacto con mitocondrias y cloroplastos con los que cooperan para realizar la fotorrespiración (Huang y col., 1983).
- 3) Peroxisomas de nódulos de raíz, presentes en los nódulos de ciertas leguminosas tropicales y que están implicados en la síntesis de la alantoína, el principal metabolito para el transporte de nitrógeno en estas plantas (Schubert, 1986).
- 4) Peroxisomas no especializados. Se encuentran en una gran variedad de tejidos y contienen las enzimas básicas peroxisomales pero no desempeñan un papel fisiológico conocido (Tolbert, 1981a; Huang y col., 1983).

1.14.1. Principales Funciones Metabólicas

Muchos de los procesos metabólicos en los que intervienen los peroxisomas se encuentran compartimentados, lo que implica un flujo de sustratos entre distintos orgánulos celulares y un posible papel regulador indirecto de los peroxisomas sobre otras vías metabólicas, a través de la disponibilidad de sustratos o productos del metabolismo peroxisomal (Tolbert y col., 1987). A continuación se describen algunas de las principales rutas metabólicas en las que intervienen los peroxisomas vegetales:

1.14.1.1 β -Oxidación de Ácidos Grasos

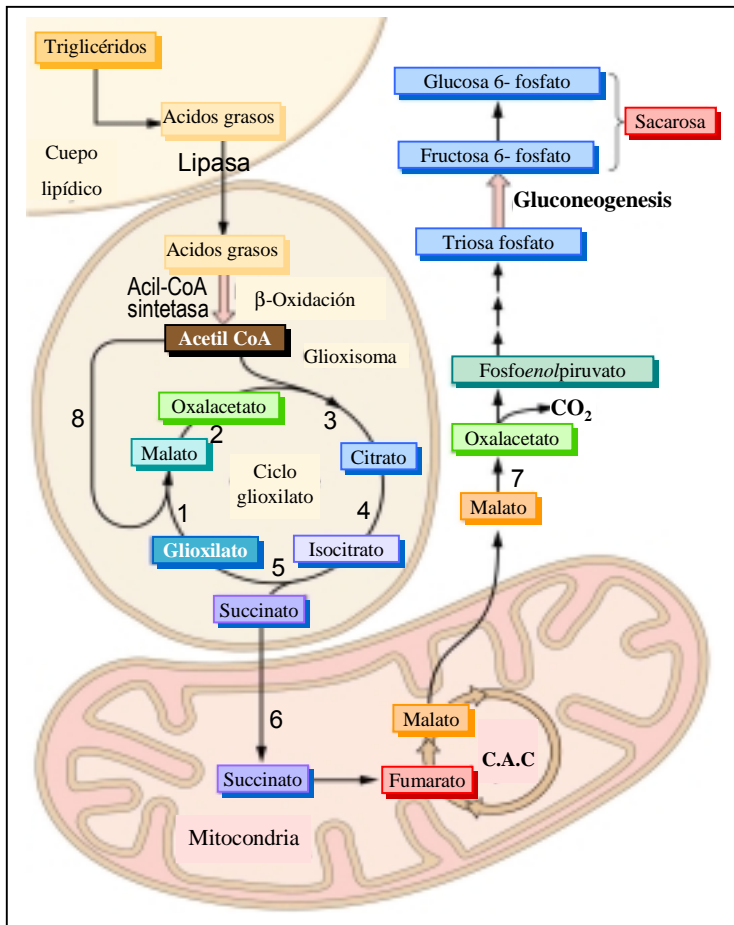


Fig. 1.12 Esquema de la β -oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato en peroxisomas (Buchanan y col., 2000). 1: malato sintetasa; 2: malato deshidrogenasa; 3: citrato sintetasa; 4: aconitasa; 5: isocitrato liasa; 6: succinato deshidrogenasa; 7: malato deshidrogenasa; 8: tiolasa, β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y acil-CoA oxidasa

En un principio se creía que la β -oxidación de ácidos grasos solo tenía lugar en peroxisomas de semillas oleaginosas (glioxisomas) pero hoy en día se sabe que este proceso se realiza, en mayor o menor medida, en prácticamente todos los tipos de peroxisomas vegetales (Gerhardt, 1987; Baker y Graham, 2002). La ruta de la β -oxidación comienza con la digestión de los triglicéridos almacenados en los cuerpos lipídicos, por la acción de lipasas presentes en la membranas de cuerpos lipídicos y glioxisomas (Mureau y col., 1980; González y col., 1987). El siguiente paso consiste en la activación del ácido graso por la acil-CoA sintetasa (en las membranas).

El producto final de la β -oxidación es un mol de acetil-CoA, cuyo destino varía según la fisiología del orgánulo, y un ácido graso con dos átomos de carbono menos, que comienza de nuevo el ciclo (Fig. 1.12). En peroxisomas de tejidos de reserva, el acetil-CoA entra en el ciclo del glioxilato y, tras sucesivas reacciones en el mismo orgánulo y en otros compartimentos celulares, dará lugar a la formación de sacarosa, fuente de carbono y energía para el crecimiento de la plántula (Buchanan y col., 2000; Reumann, 2000). En peroxisomas de hojas y en peroxisomas no especializados se desconoce el destino del acetil-CoA, que podría formar parte de una reserva citosólica relacionada con el recambio lipídico de las membranas del orgánulo (Gerhardt, 1987).

Introducción

1.14.1.2. Ciclo del Glioxilato

En plantas, este ciclo es exclusivo de tejidos de reserva (Huang y col., 1983) y se encuentra en estrecha relación con la β -oxidación, actuando ambos para suministrar glúcidos a la plántula durante su desarrollo. En la figura 1.12 se muestra un esquema de este ciclo. Las enzimas malato sintetasa e isocitrato liasa junto con las enzimas del ácido cítrico, utilizan el acetil-CoA procedente de la β -oxidación de los ácidos grasos para producir succinato, que entra en la mitocondria donde se convierte en malato y éste, a su vez, en oxalacetato que pasa al citosol donde se lleva a cabo la gluconeogénesis hasta la obtención de sacarosa (Donaldson, 1986)

1.14.1.3. Fotorrespiración

Es el principal proceso fisiológico en el que participan los peroxisomas de hojas y es específico de estos orgánulos celulares. La fotorrespiración o ciclo oxidativo fotosintético del carbono consiste en la incorporación del oxígeno, dependiente de la luz, con la liberación de una molécula de CO_2 por ciclo. Este proceso está compartimentado en cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Fig. 1.13), y su velocidad viene determinada por la intensidad luminosa, la temperatura y la relación O_2/CO_2 (Tolbert, 1980; Huang y col., 1983; Buchanan y col., 2000).

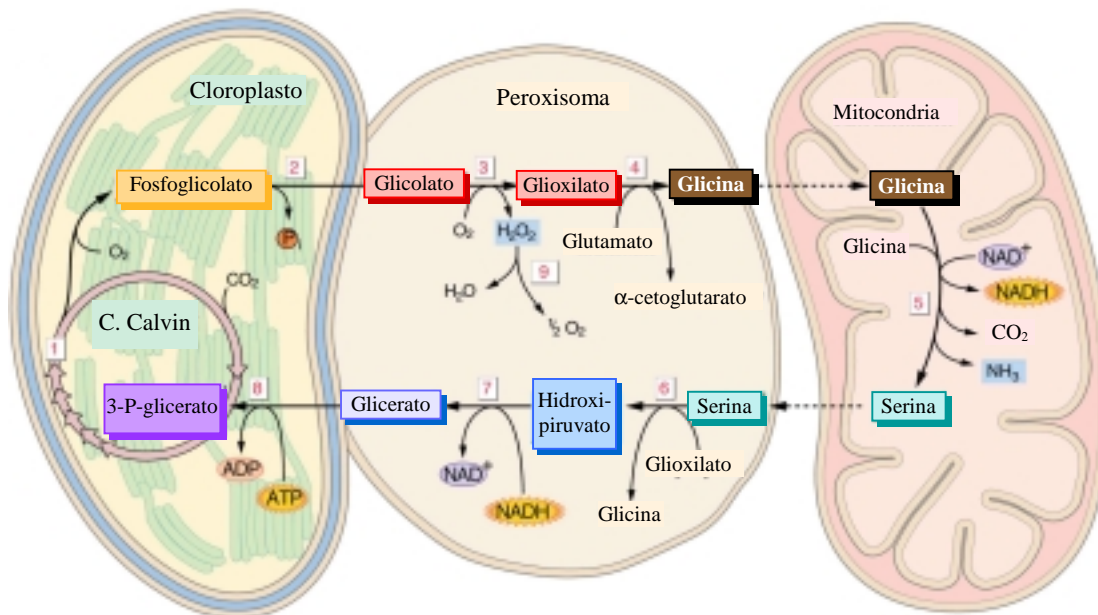


Fig. 1.13 Esquema de la fotorrespiración que implica a los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas (Buchanan y col., 2000). Enzimas: 1. Rubisco; 2. Fosfoglicolato fosfatasa; 3. Glicolato oxidasa; 4. Glutamato: glioxilato aminotransferasa; 5. Glicina descarboxilasa y serina hidroximetil transferasa; 6. Serin glioxilato aminotransferasa; 7. Hidroxipiruvato reductasa; 8. Glicerato quinasa; 9. Catalasa

El papel fisiológico de la fotorrespiración se desconoce, aunque este ciclo refleja la evolución de la Rubisco desde su origen en un ambiente anaerobio (Buchanan y col., 2000). Se ha propuesto que es un mecanismo de defensa de las plantas C_3 frente a los daños fotooxidativos que podrían producirse por una producción excesiva de radicales libres de oxígeno. De hecho, tan pronto como la concentración de CO_2 disminuye en el cloroplasto existe también una menor disponibilidad de $NADP^+$ para aceptar electrones del fotosistema I, lo que implica una reducción del oxígeno con la generación concomitante de especies de oxígeno reactivo (Halliwell y Gutteridge, 2000). Otra función podría ser la eliminación del glicolato, que en concentraciones altas es tóxico para la célula, así como la utilización del glicolato como fuente de aminoácidos (Huang y col., 1983). Este ciclo requiere la comunicación directa entre cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, y parece ser que el flujo de los metabolitos a través de los peroxisomas se realiza mediante canales en la membrana (porinas) lo que representa un transporte relativamente inespecífico, pero de gran eficiencia (Corpas y col., 2000; Reumann, 2000).

1.14.1.4. Metabolismo de los Ureidos

Los ureidos alantoína y ácido alantoico son metabolitos importantes para el transporte del nitrógeno en el xilema de algunas plantas leguminosas (Schubert, 1986). Aunque los nódulos de las raíces son considerados el lugar principal de la síntesis de ureidos (Schubert, 1986), este proceso también tiene lugar en las hojas (Corpas, 1992). La biogénesis de ureidos en raíces noduladas de leguminosas presenta compartimentación a nivel celular y subcelular. Parece ser que la asimilación de amonio y la síntesis de purinas se da en células infectadas, mientras que la subsiguiente conversión de xantina en alantoína y ácido alantoico tiene lugar en células no infectadas (Schubert, 1986). Uno de los pasos finales de la ruta es la conversión de urato en alantoína, catalizada por la urato oxidasa, que tiene lugar en los peroxisomas de los nódulos de la raíz (Huang y col., 1983, Olsen y Harada, 1995). La detección de actividad xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa en peroxisomas de hojas de guisante (del Río y col., 1989; Corpas y col., 1993a) y en peroxisomas de hojas de caupí (Corpas y col., 1989), unido al hecho de la presencia de urato oxidasa en estos orgánulos celulares, apunta a la implicación de los peroxisomas en la biogénesis de ureidos en hojas (Corpas, 1992). Asimismo, la presencia de xantina y ácido úrico, y de alantoína, producto de la reacción de la urato oxidasa, detectados en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas y col., 1997) implica que estos orgánulos tienen una función en el catabolismo de las purinas producidas como resultado de la renovación de nucleótidos, ARN y ADN (del Río y col., 1998).

1.14.2. Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivo y Sistemas Antioxidantes

Una característica importante de los peroxisomas es que tienen, esencialmente, un tipo de metabolismo oxidativo. A lo largo de estos últimos años se ha demostrado la producción de especies de oxígeno reactivo en peroxisomas y también la presencia de las enzimas antioxidantes encargadas de eliminar o regular la presencia de estas moléculas (Fig. 1.14). Ya se ha indicado que a partir del metabolismo peroxisomal se genera H_2O_2 que es eliminado por la actividad catalasa (Huang y col., 1983; del Río y col., 1992) y que las enzimas del ciclo ascorbato-glutation están presentes en peroxisomas de hojas de guisante así como los metabolitos implicados en el mismo, ascorbato y glutatión (Jiménez y col., 1997). Igualmente se han encontrado en peroxisomas de hojas de guisante las actividades de la ruta de las pentosas fosfato encargadas de suministrar poder reductor a este ciclo (G6PDH y 6PGDH) (Corpas y col., 1997), además de la actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Corpas y col., 1998a), anteriormente descrita por Yamazaki y Tolbert (1970) en peroxisomas de hojas de espinaca y por Donaldson en glioxisomas de ricino (1982) (Fig. 1.14).

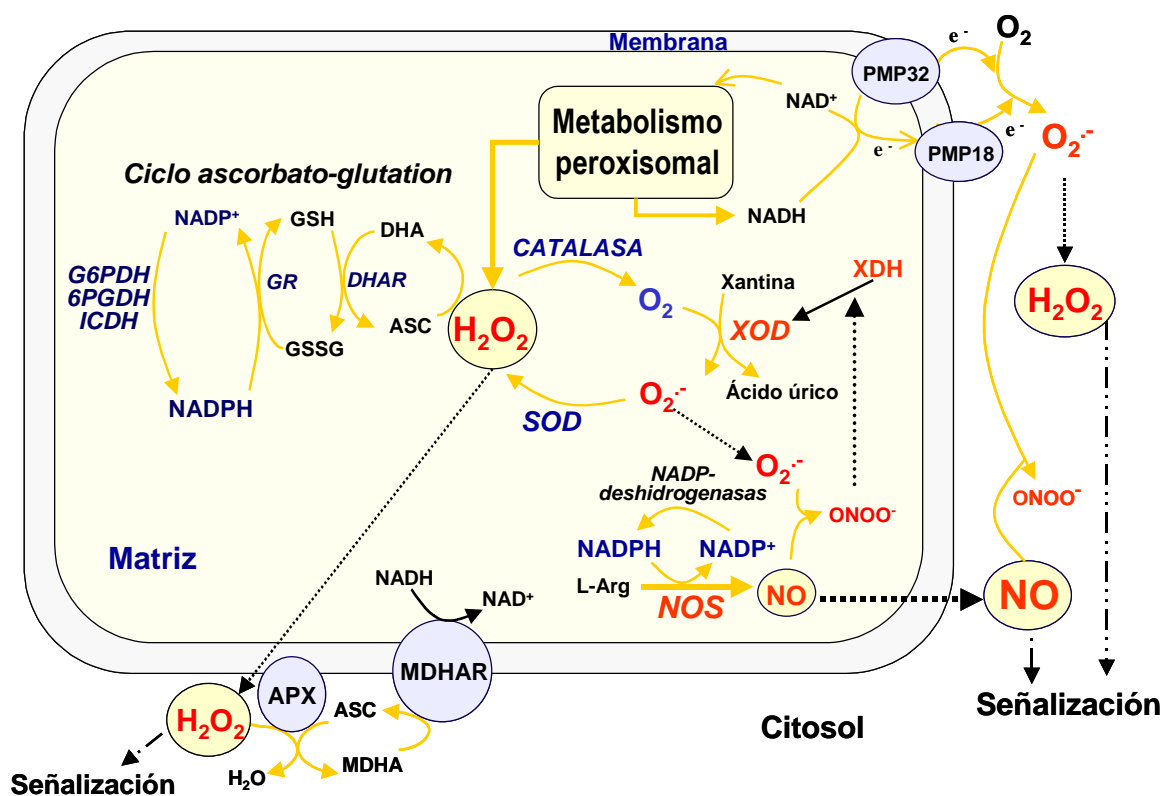


Fig. 1.14 Esquema de la producción de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) y de los sistemas antioxidantes presentes en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas y col., 2001). ASC: ascorbato; PMP: proteínas de membrana peroxisómica; XDH: xantina deshidrogenasa

Por otro lado, se ha demostrado la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peroxisomas de hojas de guisante y glioxisomas de cotiledones de sandía, al menos, en dos lugares del orgánulo: en la matriz, siendo la actividad xantina oxidasa la generadora de los mismos, y en la membrana del orgánulo, con una producción dependiente de NAD(P)H (Sandalio y col., 1988b; del Río y col., 1998), en la que parece estar implicada una pequeña cadena de transporte electrónico (Fang y col., 1987; López-Huertas y col., 1997, 1999a; del Río y col. 1998) (Fig. 1.10). Se han identificado los polipéptidos integrales de membranas de peroxisomas (PMPs) por EGPA-SDS (López-Huertas y col., 1995) y tres de estos polipéptidos, con masas moleculares de 18, 29 y 32 kDa han sido caracterizados y se ha demostrado que son los responsables de la generación de radicales superóxido (López-Huertas y col., 1997, 1999a). En la Tabla 1.4 se muestran las propiedades y posibles identidades de estos polipéptidos. La generación de $O_2^{\cdot-}$ en la membrana peroxisomal puede estar relacionada con la regeneración de NAD(P)⁺ a partir de NAD(P)H para ser utilizado en los procesos metabólicos del peroxisoma (del Río y col., 2002a).

Tabla 1.4 Polipéptidos de membranas peroxisomales implicados en la generación de radicales $O_2^{\cdot-}$ en peroxisomas de hojas de guisante

Masa molecular (kDa)	Donador electrónico	Propiedades	Identidad probable
32,0	NADH	Flavoproteína Hemoproteína Actividad ferricianuro reductasa	MDHAR
29,0	NADPH	Actividad citocromo c reductasa	Relacionado con el Cit P ₄₅₀ (?)
18,0	NADH	Actividad citocromo c reductasa	Citocromo tipo b

La actividad SOD es la encargada de eliminar los radicales superóxido y también está presente en peroxisomas. La existencia de esta actividad en estos orgánulos celulares fue demostrada por primera vez en tejidos vegetales (del Río y col., 1983; Sandalio y col., 1987; Corpas y col., 1998b), y desde entonces, la presencia de SODs en peroxisomas aislados se ha demostrado en, al menos, nueve especies diferentes de plantas, y también en células animales y humanas (del Río y col., 2002b). Recientemente, se ha demostrado la existencia de actividad oxido nítrico sintasa (NOS) en peroxisomas de hojas de guisante

Introducción

(Corpas y col., 2001), lo que parece implicar a las especies de nitrógeno reactivo (RNS) en el metabolismo peroxisomal (Fig. 1.14).

La presencia de actividad endo- y exo-proteolítica en peroxisomas vegetales fue demostrada por primera vez en hojas de guisante (Corpas y col., 1993b). En la fracción soluble del peroxisoma, se caracterizó una leucina-aminopeptidasa (Leu-AP) del tipo de las serín-proteasas con una masa molecular de 56,8 kDa y un *pI* de 5,3. Trabajos posteriores mostraron la presencia de otra Leu-AP en peroxisomas del mismo tejido (McCarthy y col., 2001). También se ha demostrado la presencia de actividad endoproteolítica en peroxisomas de hojas de guisante y se han caracterizado las distintas isoenzimas de endoproteasa (EPs) (Distefano y col., 1999). La actividad endoproteasa de peroxisomas aumenta notablemente durante la senescencia de hojas y se han llegado a diferenciar hasta 7 endoproteasas distintas mediante EGPA-SDS en hojas senescentes (Distefano y col., 1997). Las endoproteasas peroxisomales son proteasas neutras y las serín-proteasas representan el 70% de la actividad EP total. La actividad proteolítica de los peroxisomas puede estar implicada en la degradación de proteínas que tiene lugar durante la transición de glioxisomas a peroxisomas y viceversa, así como en las proteolisis parciales del extremo N-amino terminal de determinadas proteínas portadoras del péptido señal hacia el peroxisoma (PTS2), y probablemente también pueden tener una función en la conversión irreversible de la XDH en XOD (Distefano y col., 1999; McCarthy y col., 2001; Palma y col., 2002).

1.15. TRANSICIÓN METABÓLICA GLIOXISOMA-PEROXISOMA-GLIOXISOMA

Durante la germinación de las semillas oleaginosas tiene lugar la biogénesis de los glioxisomas, situación en la que las actividades de enzimas glioxisomales (isocitrato liasa y malato sintasa) aumentan rápidamente (Huang y col., 1983). Una vez agotados los lípidos de reserva, con la iluminación de los cotiledones se produce el cambio de un metabolismo heterótrofo a otro autótrofo, lo que origina una disminución progresiva de las actividades enzimáticas características de glioxisomas y un incremento en los niveles de actividad de las enzimas propias de peroxisomas de hojas, coexistiendo ambos tipos de metabolismo durante la transición (Buchanan y col., 2000). Esta transición se ha visto que es reversible en condiciones de senescencia; así en peroxisomas de hojas senescentes de guisante se encontró que las actividades marcadoras de la fotorrespiración (glicolato oxidasa e hidroxipiruvato reductasa) disminuían considerablemente mientras que las enzimas glioxisomales experimentaban un notable incremento (Vicentini y Matilde, 1993; Pastori y del Río, 1994; Nishimura y col., 1996).

OBJETIVOS

La bioquímica del oxígeno reactivo en células vegetales en condiciones de estrés abiótico, constituye una de las líneas de investigación del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada.

En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio se ha demostrado la generación de radicales libres superóxido en peroxisomas de hojas de guisante y se han caracterizado varios sistemas generadores de estos radicales, así como los antioxidantes enzimáticos presentes en estos orgánulos celulares. En plantas de guisante sometidas a condiciones de estrés abiótico, por NaCl, cobre y xenobióticos, se ha demostrado que tiene lugar la inducción de estrés oxidativo, caracterizado por un incremento en la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) y por la producción de daños oxidativos a macromoléculas en distintos compartimentos celulares. Como consecuencia, actualmente se sabe que los peroxisomas de las hojas desempeñan una función importante en el metabolismo celular de especies de oxígeno reactivo y que disponen de un conjunto de antioxidantes enzimáticos formado por SODs, los componentes enzimáticos y no enzimáticos del ciclo ascorbato-glutation, y tres deshidrogenasas dependientes de NADP (G6PDH, 6PGDH, ICH). Recientemente, se ha demostrado en nuestro laboratorio que los peroxisomas también contienen actividad óxido nítrico sintasa (NOS), lo que sugiere que estos orgánulos celulares pueden desarrollar un papel importante como emisores de señales celulares implicadas en numerosos procesos metabólicos.

El cadmio es un contaminante muy peligroso para la salud humana y animal, y también es tóxico para las plantas. Los aspectos más estudiados de la fitotoxicidad del cadmio son aquellos relacionados con alteraciones nutricionales y fisiológicas, mecanismos de transporte del metal, y la inducción de fitoquelatinas (PCs) como mecanismo protector frente al cadmio. En los últimos años se han acumulado evidencias de que la toxicidad del cadmio podría deberse, en parte, a la generación de estrés oxidativo. Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados se han centrado en indicadores de daños oxidativos y cambios en los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y son escasos los estudios bioquímicos y moleculares relacionados con el metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS) en plantas expuestas al cadmio.

Objetivos

En esta Tesis Doctoral, utilizando plantas de guisante (*Pisum sativum* L.), se ha abordado el estudio de los mecanismos de la toxicidad del cadmio relacionados con el metabolismo del oxígeno reactivo y la respuesta de la planta frente a este estrés. Este estudio se ha abordado utilizando aproximaciones fisiológicas, bioquímicas, celulares y moleculares, para tratar de conocer de una forma integrada la respuesta de la planta frente al estrés por cadmio. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Estudio del efecto de distintas concentraciones de cadmio sobre el crecimiento y algunos parámetros fisiológicos de plantas de guisante para conocer la sensibilidad de esta planta al cadmio, para su utilización en estudios posteriores.
2. Estudio del efecto del cadmio sobre distintos sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) de las hojas, así como marcadores de daños oxidativos a macromoléculas, tratando de identificar algunas de las proteínas más susceptibles de oxidación en situaciones de estrés por cadmio.
3. Estudios a nivel subcelular, en peroxisomas purificados de hojas de plantas tratadas con cadmio, de los cambios bioquímicos y metabólicos que tienen lugar en respuesta al metal, incluyendo enzimas marcadoras de distintas rutas metabólicas, sistemas de defensa frente a estrés oxidativo, identificación de proteínas oxidadas y procesos de degradación proteolítica dependientes de cadmio.
4. Análisis de la estructura y ultraestructura de la hoja, mediante microscopía óptica y electrónica, estudiando a nivel subcelular la producción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en respuesta al estrés por cadmio, mediante técnicas histoquímicas y observación al microscopio electrónico y confocal. De esta forma, se pretende identificar los orgánulos y células implicadas en la producción de especies de oxígeno reactivo y su posible función en la respuesta celular frente al estrés por cadmio.
5. Análisis de los cambios inducidos por el cadmio en la producción de especies de oxígeno reactivo y en la expresión de los sistemas antioxidantes, para obtener información sobre la modulación de la respuesta celular frente al estrés por cadmio, lo que podría tener una utilidad potencial considerable en el diseño de estrategias de fitorremediación.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se han utilizado hojas de guisante (*Pisum sativum* L. cv Lincoln) obtenidas a partir de semillas de la casa Royal Sluis (Enkhuizen, Holanda).

Las semillas de guisante fueron desinfectadas por inmersión en etanol al 96% (v/v) durante tres minutos, secándolas posteriormente al aire sobre papel de filtro (Rabie y col., 1980). Estas semillas, con poder germinativo superior al 90%, se germinaron en vermiculita humedecida con CaSO_4 0,5 mM, en cámara de cultivo a 25°C durante 4 días. Posteriormente, se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron durante diecisiete días, en condiciones óptimas para dicha especie vegetal. Una vez obtenido el estadio de crecimiento adecuado, las plántulas se extrajeron cuidadosamente del soporte de vermiculita para no dañar el sistema radical y se trasplantaron a botes de PVC (2,5 litros de capacidad; 4 plántulas por bote) que se distribuyeron según un diseño de bloques de parcelas al azar hasta la finalización del ensayo. Se utilizó un sistema de cultivo en medios líquidos (Hewitt, 1966) con aireación controlada de la solución nutritiva en cada unidad de cultivo.

Las condiciones de cultivo de las plantas (día/noche) fueron las siguientes: temperatura, $26 \pm 2^\circ\text{C}$ / $18 \pm 1^\circ\text{C}$; humedad relativa, $70 \pm 5\%$ / $80 \pm 5\%$, y un fotoperiodo de 14 h con un PAR mínimo de $420 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las soluciones nutritivas se prepararon con agua desionizada (resistividad $\geq 4 \text{ M}\Omega$) y reactivos específicos de pureza analítica, reponiéndose cada 24 horas el volumen perdido por transpiración con agua desionizada.

La composición de la solución nutritiva se basó en la de Hewitt (1966) modificada para un pH inicial de $5,5 \pm 0,1$ y una concentración iónica de 30 mg ion l^{-1} , siguiendo la técnica propuesta por Steiner (1961). Las concentraciones de nutrientes utilizadas fueron: macronutrientes, expresados en mM: NO_3^- , 12; H_2PO_4^- , 4,0; $\text{SO}_4^{=}$, 1,5; K^+ , 5,0; Ca^{2+} , 4,5; Mg^{2+} , 1,5; y los siguientes micronutrientes, expresados en μM : Fe, 91,3; B, 46; Cu, 1,1; Zn, 2,3; Mn, 9,3 (del Río y col., 1985). Durante 14 días las plantas crecieron en estas soluciones nutritivas completas. A lo largo del ensayo, la renovación total de las soluciones nutritivas se realizó semanalmente.

Posteriormente, las soluciones nutritivas se suplementaron con diferentes concentraciones de CdCl_2 : 0 (control), 10, 20, 30, 40 y 50 μM , que corresponden a los diferentes tratamientos aplicados, y se mantuvieron en estas condiciones durante otros 14 días.

3.2. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS VEGETALES

Concluido el periodo de crecimiento en los tratamientos aplicados, se procedió a la recogida del material separando la parte aérea de la raíz. Las raíces fueron lavadas por inmersiones sucesivas en agua desionizada, hasta eliminar los restos de solución de cultivo. Las muestras vegetales recolectadas (hojas y raíces) correspondientes a cada tratamiento y repetición, fueron pesadas para determinar el peso fresco, y parte del material se destinó a realizar estudios bioquímicos según se describe más adelante.

Inmediatamente después, las diferentes muestras vegetales fueron secadas en estufa de aire forzado a 65°C durante 24 h y, posteriormente, tras enfriarlas en un desecador, se determinó su peso seco. Hojas y raíces de cada tratamiento fueron homogeneizadas en un molino de plástico y conservadas en bolsas de polietileno herméticamente cerradas y perfectamente identificables hasta su posterior análisis químico.

3.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS VEGETALES

Las muestras se sometieron a mineralización sulfúrica según Wolf (1982) teniendo la precaución de que el mineralizado de la muestra, una vez frío, permaneciera transparente, pues en ciertos mineralizados de raíces puede aparecer turbidez debido a la presencia de silicio. En el mineralizado obtenido se analizaron los siguientes macronutrientes: nitrógeno (Baethgen y Alley, 1989) y fósforo (CIIAF, 1969) por espectrofotometría (Beckman mod. 25) a 650 y 430 nm, respectivamente; potasio (CIIAF, 1969), por fotometría de llama (Corning mod. 400); y calcio y magnesio (CIIAF, 1969), por espectrofotometría de absorción atómica (IL 357).

La determinación de los metales Fe, Mn, Cu, Zn y Cd se llevó a cabo directamente sobre el mineralizado mediante espectrofotometría de absorción atómica (CIIAF, 1973).

3.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA Y PARÁMETROS RELACIONADOS

Las medidas de asimilación de CO₂ fueron realizadas al final del tiempo de cultivo, utilizando un ADC tipo LCA-3 (IRGA), con flujo de aire en un sistema de circuito abierto, siguiendo la técnica propuesta por Coombs y col. (1985). La tasa de transpiración y eficiencia en el uso del agua se determinaron según Ludlow y Muchow (1990), utilizando el mismo tipo de instrumental. Para todas las determinaciones se utilizaron condiciones ambientales similares (PAR, temperatura y humedad relativa) a las obtenidas en la etapa luminosa del periodo de cultivo.

3.5. DISEÑO ESTADÍSTICO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis matemático de los resultados experimentales se llevó a cabo mediante el análisis de la varianza considerando como fuentes de variación los tratamientos y las repeticiones, con objeto de calcular el nivel de probabilidad del efecto estudiado. La estimación múltiple de medias se efectuó por el cálculo de la mínima diferencia significativa (MDS), mediante la prueba de Duncan como criterio para estimar las diferencias entre medias.

3.6. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS

Todas las operaciones se efectuaron a 4°C. Las hojas de guisante se lavaron y homogeneizaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, 1,4-ditiotreitol (DTT) 2 mM, Triton X-100 al 0,2% (v/v) y PMSF 1 mM utilizando una relación peso/volumen de 1:4. El PMSF se omitió en extractos destinados a determinar actividad proteolítica. Los homogenados se filtraron a través de 2 capas de nylon y posteriormente se centrifugaron a 27.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para las distintas determinaciones enzimáticas.

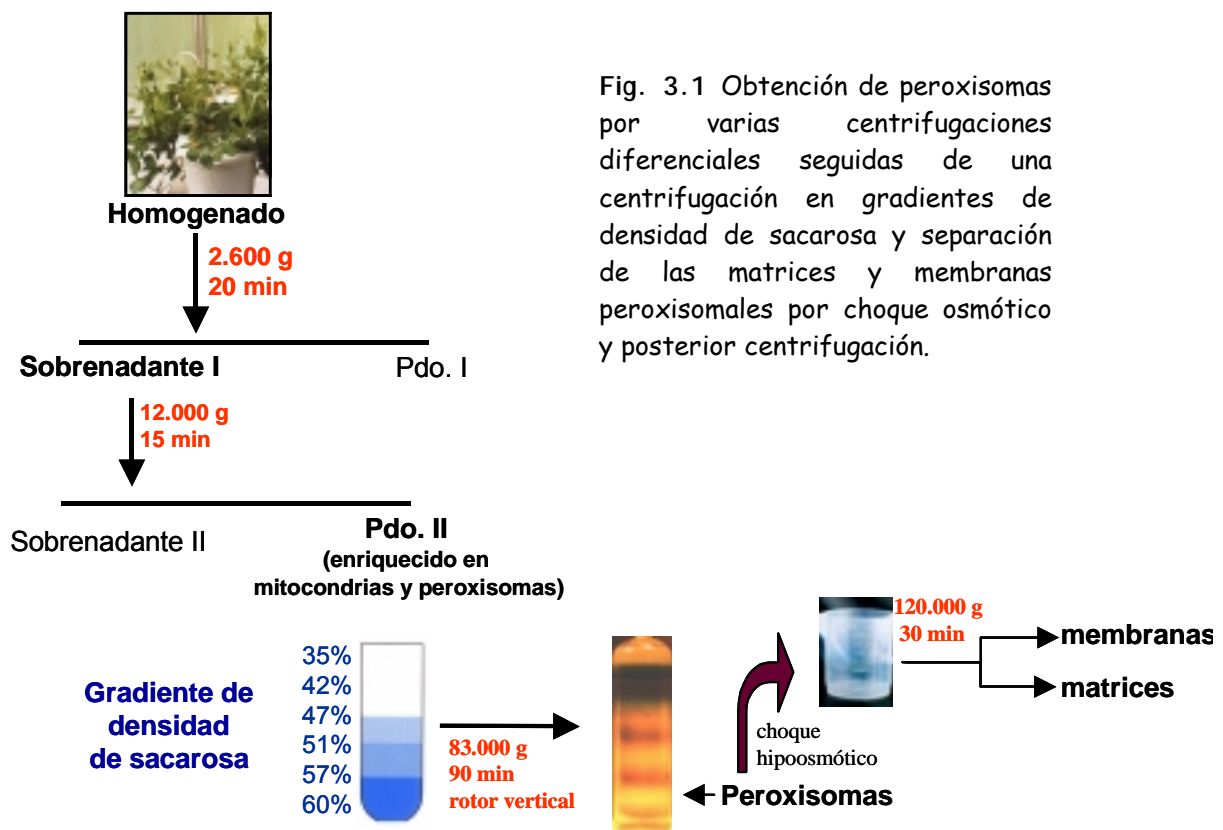
3.7. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PEROXISOMAS

3.7.1. Gradientes de Sacarosa

El proceso se llevó a cabo a 0-4°C. El método utilizado es el descrito por López-Huertas y col. (1995) que consiste en realizar varias centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Fig. 3.1). Se partió de 40 g de hojas de guisante que se homogeneizaron en 160 ml de un medio de extracción semicongelado, utilizando un Sorvall Omnimixer a velocidad máxima en tres golpes de tres segundos cada uno. El medio de extracción consistía en tampón Tricina-KOH 170 mM, pH 7,5, con sacarosa 1 M, EDTA-Na₂ 1 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, ASB al 0,3% (p/v) y DTT 5mM. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela y se centrifugó a 2.600 g durante 20 minutos para eliminar la mayor parte de los cloroplastos, núcleos y residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de un medio similar al de extracción pero con pH 7,0 y sin DTT, y la suspensión de orgánulos se depositó con ayuda de una jeringa, en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por: 3ml del 60%, 6 ml del 57%, 9 ml del 51%, 9 ml del 47 %, 6 ml del 42% y 3 ml del 35% de sacarosa (p/p). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa del 66% (p/p) preparada en EDTA-Na₂ 1 mM, pH 7,5. Los tubos (Quick seals de Beckman) una vez sellados, se centrifugaron a 83.000 g durante 1 hora y 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman usando un rotor vertical VTi50. Finalizada la centrifugación, los peroxisomas se situaban en la parte inferior

Material y métodos

del gradiente, en la interfase entre las capas de 57 y 51% de sacarosa (López-Huertas y col., 1995). La banda correspondiente a la fracción de peroxisomas se extrajo mediante perforación de los tubos con una jeringa. Las matrices peroxisomales (fracción soluble), se separaron de la fracción de membranas mediante choque osmótico, por dilución 1:5 con tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, con EDTA-Na₂ 1 mM, con agitación a 0-4°C durante 45-60 minutos y posterior centrifugación a 120.000 g durante 30 minutos en un rotor Beckman 60Ti. Para eliminar la sacarosa de las matrices peroxisomales, las muestras se pasaron por columnas PD-10 de Pharmacia equilibradas con tampón Tris-HCl 0,15 M, pH 8,0, y seguidamente el eluido se concentró por ultrafiltración usando una membrana PM-10 de Amicon. Para almacenar las muestras, los peroxisomas se congelaban a -20°C y para prevenir la acción de proteasas se adicionaba PMSF 1 mM a los mismos.



3.7.2. Gradientes de Percoll

Para el estudio de la integridad de orgánulos y de la permeabilidad de la membrana peroxisomal se aislaron peroxisomas de hojas de guisante mediante centrifugación en gradientes de Percoll del 15-53% (v/v) (Sandalo y col., 1987). El medio de extracción estaba compuesto por tampón Mops 30 mM, pH 7,5, manitol 0,35 M, EDTA-Na₂ 1 mM, ASB al 0,2% (p/v) y cisteína 4 mM (relación p/v = ¼). El homogenado se sometió a dos centrifugaciones diferenciales a 2.600 g y 12.000 g y el precipitado final, enriquecido en peroxisomas, se resuspendió en 10 ml de un medio de lavado compuesto por tampón Mops 20 mM, pH 7,2, conteniendo manitol 0,3 M, EDTA-Na₂ 1 mM y ASB al 0,2% (p/v) y se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 15 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de medio de lavado y se depositó sobre un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia) compuesto por 5,3 ml del 53%, 12,4 ml del 38%, 7,1 ml del 20% y 7,1 ml del 15% de Percoll preparado en tampón Mops 10 mM, pH 7,2, sacarosa 0,25 M y ASB al 0,2% (p/v). El gradiente se centrifugó en un rotor 60Ti a 13.000 g durante 35 minutos en una ultracentrífuga Beckman. Finalmente, la banda de los peroxisomas se separó del gradiente mediante succión con jeringa y se diluyó diez veces con medio de lavado sin ASB, para reducir la concentración de Percoll, recuperándose los orgánulos mediante centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos y recogiendo el precipitado.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE PEROXISOMAS Y DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA

3.8.1. Integridad de los Peroxisomas

La integridad de los peroxisomas purificados mediante centrifugación en gradientes de densidad de Percoll, se determinó por medida de la actividad hidroxipiruvato reductasa en un medio isoosmótico conteniendo sacarosa 0,25 M, en ausencia y en presencia de Triton X-100 (Sandalo y col., 1987). El porcentaje de integridad de los peroxisomas se calculó utilizando la expresión:

$$\% \text{ Integridad} = 100 - \left[\frac{\text{Actividad intactos}}{\text{Actividad rotos}} \times 100 \right]$$

3.8.2. Permeabilidad de la Membrana Peroxisomal

Para determinar daños en la membrana peroxisomal por efecto del tratamiento con Cd^{2+} , se determinaron cambios en la permeabilidad de la membrana de estos orgánulos monitorizando la salida de dos solutos con distinto grado de permeabilidad, el glicolato y el hidroxipiruvato. Para ello, se determinó la actividad glicolato oxidasa (Kerr y Groves, 1975), cuyo sustrato, el glicolato, atraviesa la membrana peroxisomal. Se utilizaron peroxisomas íntegros obtenidos en gradientes de Percoll y en condiciones isoosmóticas (sacarosa 0,25 M, Merck), adicionando glicolato oxidasa comercial (0,027 U, Sigma) a la suspensión de orgánulos y midiendo espectrofotométricamente a 324 nm la oxidación del glicolato. Las medidas se efectuaron durante 1 h y las pendientes de las rectas obtenidas se analizaron mediante el test de Duncan.

Utilizando la misma metodología también se realizaron medidas de actividad hidroxipiruvato reductasa, cuyo sustrato, el hidroxipiruvato, no es permeable a la membrana peroxisomal.

3.9. DESARROLLOS ELECTROFORÉTICOS

3.9.1. Geles de Poliacrilamida en Condiciones Nativas (EGPA)

Se utilizó un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad donde se prepararon geles de 7,5 x 8 cm y 0,75 ó 1,5 mm de grosor. Se preparó acrilamida al 10-12% (p/v) en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9, y se gelificó con 3-dimetilaminopropionitrilo (DAP) al 0,48 % (v/v) y persulfato amónico al 0,45% (p/v). Las muestras se prepararon en tampón de carga (sacarosa al 10 % preparada en tampón de geles y azul de bromofenol al 0,006%, p/v) y se cargaron en los geles. Se utilizó una intensidad de 10 mA por gel, durante 15-20 minutos y posteriormente, de 20 mA por gel, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del mismo. Se utilizó un tampón de electrodos compuesto por Tris 5 mM, pH 8,3, y glicina 38 mM.

3.9.2. Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes (EGPA-SDS)

Se siguió básicamente la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 ó 12% (p/v) de 7,5 x 8 cm y 0,75 ó 1,5 mm de grosor, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras para la electroforesis se prepararon en tampón Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8, conteniendo SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,006% (p/v), y DTT 10 mM, y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente, las muestras se cargaron en los geles y se aplicó un voltaje de 100 V durante 15 minutos y después 200 V durante 45 minutos utilizando como tampón de electrodos Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, con glicina 0,192 M y SDS al 0,1% (p/v). Se utilizaron marcadores de masas moleculares entre 14,4 y 97,4 kDa (Bio-Rad) que se trataron igual que las muestras.

3.9.3. Tinción de Proteínas en EGPA-SDS

3.9.3.1. Tinción con Azul Coomassie

Los geles de tñeron con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 al 0,1% (p/v) preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 minutos, tras lo cual se destñeron con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10%(v/v) hasta que quedan bandas azules sobre un fondo transparente.

3.9.3.2. Tinción con Plata

Se utilizó la técnica descrita por Jiang y col. (1994). Los geles se incubaron con etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 3 horas, después de lo cual se lavaron en repetidas ocasiones y se incubaron con una solución reductora de ferricianuro potásico al 1% (p/v) y tiosulfato de sodio al 1,6% (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron y se incubaron en una solución con nitrato de plata al 0,1% (p/v), en oscuridad, durante 30 minutos. El revelado se efectuó por inmersión en una solución conteniendo carbonato sódico 0,3 M y formaldehído al 0,02% (v/v) hasta aparición de las bandas de proteínas. La reacción se paró por adición de ácido acético al 3% (v/v).

3.10. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN (TÉCNICA DE WESTERN)

3.10.1. Transferencia de Proteínas

Los geles obtenidos por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore, utilizando un sistema de transferencia semi-seco de Bio-Rad. En la transferencia se utilizó un tampón Caps 10 mM, pH 11,0, conteniendo metanol al 10 % (v/v) y se llevó a cabo con una intensidad de 1,5 mA por cm² durante 2 horas, según Corpas y col. (1998a).

3.10.2. Inmunodetección

Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo en las membranas se emplearon dos métodos, según el grado de sensibilidad requerido:

1.- Método quimioluminiscente, utilizando luminol (Bunkelmann y Trelease, 1996). Se basa en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H₂O₂, formándose un intermediario que se estabiliza mediante la emisión de luz (Thorpe y col., 1985). Esta emisión de luz se potencia con la presencia de 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol (Rosell y col., 1978). Este método es de 10 a 100 veces más sensible que el método de la fosfatasa alcalina.

Material y métodos

2.- Método cromogénico, en el que se utiliza una anti-IgG ligada a fosfatasa alcalina y para el revelado se añade la solución sustrato de la misma (Amresco), que contiene NBT 0,51 mM y BCIP 0,48 mM, hasta la aparición de las bandas correspondientes de color azul-violáceo. La fosfatasa alcalina desfosforila al BCIP que se une al NBT para dar este color.

En ambos casos, tras la transferencia de las proteínas, las membranas se incubaron con metanol 100% (v/v) durante unos segundos, tras lo cual se lavaron con agua destilada. Con objeto de bloquear los lugares inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas, las membranas se incubaron de 1 a 3 horas a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, y NaCl 0,18 M), al que se le adicionó leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé) al 1,5% (p/v). Tras lavar las membranas con TBS, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, convenientemente diluido, de 1 a 3 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron las membranas con TBS y se incubaron durante 1 hora con anti-IgG ligada a peroxidasa de rábano o a fosfatasa alcalina, según el caso. Para el revelado con la peroxidasa de rábano, las membranas se incubaron en una solución que contenía 8 mg de luminol en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM, con 3,2 µl de H₂O₂ al 30% (v/v) y 200 µl de una solución de 4-yodofenol (10 mg/ml en DMSO), durante unos minutos. Posteriormente, las membranas se exponían en una película para autoradiografía tipo "Hyperfilm" (Amersham), con ayuda de un "cassette" para autorradiografía (Kodak). El tiempo de exposición variaba desde segundos hasta 30 minutos, dependiendo de la intensidad de la señal obtenida. Para el revelado con la fosfatasa alcalina, las membranas se sumergían en la solución que contenía su sustrato hasta la aparición de las bandas de proteínas.

Se han utilizado los anticuerpos policlonales siguientes: anticuerpo frente a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma), anticuerpos frente a la catalasa de calabaza y glicolato oxidasa de espinaca (cedidos por el Dr. M. Nishimura, del *National Institute of Basic Biology*, Okazaki, Japón), anticuerpo frente a la NADP-isocitrato deshidrogenasa (NADP-ICDH) (cedido por el Dr. P. Gadal, de la *Université de Paris-Sud*, Orsay, Francia), anticuerpo frente a la glutatión reductasa (GR) de guisante (cedido por el Dr. P. Mullineaux, del *John Innes Centre*, Norwich, Reino Unido), anticuerpo frente a la Cu,Zn-SOD de sandía (Bueno y col., 1995), anticuerpo frente a la Mn-SOD mitocondrial de guisante (Palma y col., 1998), anticuerpo frente a la FBPasa de guisante (cedido por la Dra. R. Hermoso, de la *Estación Experimental del Zaidín*, CSIC, Granada), anticuerpo frente a la xantina oxidasa de rata (XOD) cedido por el Dr. Moriwaki (Moriwaki y col., 1996) y anticuerpo frente a la dinitrofenilhidrazona (Sigma).

3.11. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.11.1. Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)

3.11.1.1. Actividad en Solución

Se empleó, esencialmente, el método de McCord y Fridovich (1969), basado en la medida de la tasa de inhibición, por la SOD, de la reducción del citocromo *c* por los radicales libres $O_2^{\cdot -}$ generados por el sistema enzimático xantina/XOD. La reacción se desarrolló a 25°C y la medida de la densidad óptica se realizó a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 640.

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 3 ml de una mezcla de reacción que contenía citocromo *c* $1,35 \times 10^{-5}$ M, xantina $9,67 \times 10^{-5}$ M en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM y 25-100 μ l de muestra. Para comprobar el estado de oxidación del citocromo *c* de esta mezcla, después de ajustar el cero del espectrofotómetro con la mezcla de reacción sin XOD y sin muestra, se añadía una pequeña cantidad de ditionito sódico, debiendo estar la lectura a 550 nm comprendida entre 0,22 y 0,24 unidades de absorbancia. Después se realizó una reacción control, adicionando XOD (Roche, 20U/ml) (4-15 μ l) a la mezcla de reacción hasta obtener una tasa de reducción del citocromo *c* entre 0,024 y 0,026 unidades de abs/min. Finalmente, en la reacción problema se añadió la muestra a la mezcla de reacción, así como el volumen de XOD determinado en la reacción control, midiéndose a 550 nm durante 2 minutos el cambio de absorbancia. En la determinación de actividad SOD en extractos crudos es conveniente incluir CN^- 10^{-5} M a fin de evitar posibles interferencias en la reducción del citocromo *c*.

Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la velocidad inicial de reducción del citocromo *c* en la reacción control a 25°C. La actividad enzimática se calculó según el tanto por ciento de inhibición:

$$\% I = \left[\frac{A_{550}/min (control) - A_{550}/min (probl)}{A_{550}/min (control)} \right] \times 100$$

$$\text{Unidades SOD/ml} = \frac{\% I}{50 \% \times v} \times f$$

donde *v* es el volumen de muestra utilizado, en ml, y *f* es el factor de dilución de la muestra.

Material y métodos

3.11.1.2. Actividad en Geles de Poliacrilamida

Las distintas isoenzimas de superóxido dismutasa fueron individualizadas mediante EGPA nativa en geles al 10% (p/v). La actividad enzimática se localizó mediante un método fotoquímico basado en la reducción del NBT por los radicales libres $O_2^{\cdot -}$ generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametiletilendiamina (TEMED) (Beauchamp y Fridovich, 1971). Así se obtiene una tinción azul de los geles debida a la formación de azul de formazano, excepto en aquellas zonas donde hay actividad SOD que permanecen acromáticas. Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron en una solución con NBT 2,45 mM preparada en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, durante 20 min en oscuridad tras lo cual, se incubaron en otra solución con riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM preparada en el mismo tampón, durante 15 min en oscuridad. Finalmente, los geles se enjuagaron en tampón y se expusieron a la luz durante unos minutos hasta que los geles se teñían de un color azul excepto en aquellas zonas donde había actividad SOD. La cuantificación de las distintas bandas de actividad obtenidas se llevó a cabo con un fotodensitómetro Shimadzu CS-9000.

3.11.2. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

3.11.2.1. Actividad en Solución

Se midió espectrofotométricamente tanto en homogenados como en peroxisomas, según el método descrito por Aebi (1984) basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm, ocasionada por la desaparición del H_2O_2 . La determinación se efectuó a 25°C en una mezcla de reacción que contenía H_2O_2 10,6 mM en tampón fosfato-K 50 mM a pH 7,0 y en un volumen de 2,9 ml. La reacción se inició añadiendo la muestra previamente diluida con el tampón de reacción conteniendo Triton X-100 al 0,2% (v/v). La actividad enzimática, expresada en μ moles de H_2O_2 \times min⁻¹ \times mg⁻¹ prot (o \times ml⁻¹), se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de 39,58 M⁻¹ \times cm⁻¹ (del Río y col., 1977).

3.11.2.2. Actividad en Geles

EGPA-nativa

La actividad catalasa se analizó mediante EGPA al 6% (p/v), y la actividad se localizó en los geles utilizando el método de Woodbury y col. (1971). La tinción se basa en la formación de un precipitado de color verde oscuro que se obtiene en la reacción del $[Fe(CN)_6] K_3$ con el Cl_3Fe . El gel se tiñe de color verde excepto en las zonas donde se encuentra actividad catalasa que se tiñen de amarillo. Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron en una solución de H_2O_2 al 0,003% (v/v) durante 10 min.

Tras varios lavados con agua destilada, los geles se incubaron en una solución de Cl_3Fe y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]\text{K}_3$, al 1% durante 10 min en oscuridad. Terminada la reacción se eliminó la solución de revelado y los geles se lavaron varias veces con agua destilada.

Isoelectroenfoque (IEF)

Las diferentes isoenzimas de catalasa se analizaron mediante la técnica de isoelectroenfoque, siguiendo básicamente el método descrito por Zelitch y col. (1991). Las muestras se prepararon en una solución que contenía glicerol al 15% (v/v) y anfolitos de pH 5-7 al 5% (v/v) de Pharmacia Biotech. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 5% (p/v) de 1,5 mm de grosor, conteniendo un 10% (v/v) de glicerol y un 2% (p/v) de anfolitos de intervalo de pH 5-7. Para prevenir inactivaciones por la solución del cátodo, sobre las muestras se colocó una solución de glicerol al 7% (v/v) y anfolitos de pH 5-7 al 5% (v/v). Las soluciones anódica y catódica fueron ácido acético 20 mM y NaOH 25 mM, respectivamente. La electroforesis se realizó a 4°C, con un voltaje de 200 V durante dos horas seguido de 400 V durante otras dos horas, en un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad. La actividad catalasa se localizó en los geles según la técnica de Clare y col. (1984). Los geles se lavaron con H_2O destilada y se incubaron en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0, conteniendo peroxidasa de rábano (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 45 minutos en oscuridad. Posteriormente, se añadió a la solución anterior H_2O_2 5 mM, manteniendo en agitación los geles durante 10 minutos tras lo cual se lavaron un par de veces con agua destilada y se incubaron en una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) 0,5 mg/ml, preparada en el mismo tampón. Transcurridos unos minutos los geles se teñían de un color marrón excepto en aquellas zonas donde había actividad catalasa que permanecían acromáticas. Los puntos isoeléctricos de las diferentes isoformas de catalasa detectadas se determinaron mediante marcadores de punto isoeléctrico (pI) en el intervalo de pH 5-7, de la casa comercial Bio-Rad. La cuantificación de las distintas bandas obtenidas se llevó a cabo utilizando un fotodensitómetro Shimadzu CS-9000. Para la transferencia de los geles a una membrana de PVDF se utilizó el sistema indicado en el apartado 3.10.1 aunque en este caso se utilizó una solución de ácido acético al 0,7% (v/v) como tampón de transferencia y se cambió la polaridad de los electrodos (Corpas y col., 1999).

3.11.3. Ascorbato Peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11)

Para llevar a cabo el análisis de esta actividad se utilizaron muestras (homogenados u orgánulos celulares) preparadas en un medio de extracción conteniendo ascorbato 2 mM, para prevenir la inactivación de la APX. La actividad se determinó según describe Jiménez y col. (1997), midiendo a 290 nm la oxidación del ácido ascórbico, durante un minuto.

Material y métodos

La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H₂O₂ 0,3 mM, y la muestra convenientemente diluida. La reacción (en un volumen final de 1 ml) se realizó a 25°C y se inició con la adición del H₂O₂. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el ácido ascórbico de 2,8 mM⁻¹ x cm⁻¹ (Hossain y Asada, 1984a). Se utilizaron tres controles, uno sin H₂O₂, otro sin ascorbato y otro sin muestra. Como control negativo de la reacción se utilizó un inhibidor de la APX, el *p*-cloromercurifenilsulfónico (pCMS).

3.11.4. Monodeshidroascorbato Reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

Para su determinación se utilizó el método de Jiménez y col. (1997) basado en la disminución de la absorbancia a 340 nm, debida a la oxidación del NADH. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, NADH 0,2 mM, ácido ascórbico 1mM, 0,5 unidades de ascorbato oxidasa y 50 µl de muestra, en un volumen final de 1 ml. Se comprobó que la mezcla de ácido ascórbico y ascorbato oxidasa, sistema generador del radical monodeshidroascorbato, conseguían un descenso de absorbancia a 265 nm comprendido entre 0,01 y 0,02 unidades por minuto.

La reacción se inició adicionando NADH, siguiendo su oxidación durante 1 minuto a 25°C frente a un blanco de muestra (sin ácido ascórbico ni ascorbato peroxidasa). La oxidación no enzimática de NADH se corrigió restando al valor obtenido la absorbancia en ausencia de extracto enzimático.

La actividad enzimática expresada en nmoles de NADH oxidado x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Jiménez y col., 1997).

3.11.5. Glutation Reductasa (GR; EC 1.6.4.2)

Para su determinación se empleó el método de Edwards y col. (1990), basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH. La mezcla de reacción contenía tampón Hepes-NaOH 100 mM, pH 7,8, EDTA 1 mM, Mg Cl₂ 3 mM, y glutatión oxidado 0,5 mM, en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba por adición del NADPH 0,2 mM, registrándose su oxidación durante 2 min a 25°C.

Se utilizó un blanco de reactivos (sin la muestra correspondiente) y un blanco para cada muestra en tampón de reacción sin glutatión oxidado. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADPH de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Jiménez y col., 1997).

3.11.6. Glutation-S-Transferasa (GST; EC 2.5.1.18)

La reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa se siguió espectrofotométricamente midiendo a 30°C el aumento de absorbancia a 340 nm, que correspondía a la formación de un complejo entre el glutatión reducido (GSH) y el cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) según Habig y col. (1974). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, conteniendo GSH 1mM, CDNB 1mM y muestra (5-50 µl de extracto), durante un minuto. Como controles se utilizaron un blanco de reactivos (sin muestra) y un blanco sin CDNB para cada muestra.

Una unidad enzimática ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$) se definía como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de producto conjugado por minuto. La actividad enzimática expresada en $\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el producto conjugado de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig y col., 1974).

3.11.7. Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49)

Se determinó espectrofotométricamente, midiendo la reducción del NADP^+ a 340 nm según Corpas y col. (1998a). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un volumen final de 1 ml que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, con MgCl_2 2 mM y NADP^+ 0,8 mM, iniciándose la reacción por adición de glucosa-6-fosfato (G6P) 5 mM.

Una miliunidad de actividad se definía como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP^+ min^{-1} a 25°C. Esta actividad se corrigió con la actividad 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

3.11.8. 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa (6PGDH; EC 1.1.1.44)

Para determinar esta actividad se utilizó un medio de reacción similar al usado para la actividad G6PDH, sustituyendo el sustrato por el 6-fosfogluconato (6PG) 5 mM (Corpas y col., 1998a). Una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP^+ min^{-1} a 25°C.

3.11.9. Isocitrato Deshidrogenasa (NADP-ICDH; EC 1.1.1.42)

Se midió espectrofotométricamente el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la reducción del NADP según describen Goldberg y Ellis (1983). La reacción se llevó a cabo a 25°C en un medio (1 ml) que contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, con MgCl_2 2 mM y NADP^+ 0,8 mM, iniciándose la reacción con la adición de 2R,3S-isocitrato. Una miliunidad de actividad se definía como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP^+ min^{-1} a 25°C.

Material y métodos

3.11.10. Glicolato Oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1)

Se midió espectrofotométricamente según el método de Kerr y Groves (1975). La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 8,3, fenilhidracina 10 mM y glicolato 5 mM. La reacción se inició por adición de la muestra, midiéndose la formación del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 324 nm durante 3 min. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el complejo de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kerr y Groves, 1975).

3.11.11. Hidroxipiruvato Reductasa (HPR; EC 1.1.1.29)

Se empleó el método de Schwitzguébel y Siegenthaler (1984) basado en la medida a 340 nm de la oxidación del NADH acoplada a la reducción del hidroxipiruvato a glicerato. El ensayo se realizó a 25°C en un volumen de reacción de 1,1 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,2, KCN 1 mM, NADH 0,2 mM, 25-100 μl de muestra e hidroxipiruvato 2 mM. La actividad enzimática en $\mu\text{moles NADH} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Vigil, 1983).

3.11.12. Xantina Oxidasa/Deshidrogenasa (XOD/XDH; EC 1.1.3.22/ EC 1.2.1.27)

La actividad XOD se determinó según describe Rajagopalan (1985), midiendo a 293 nm la formación, dependiente de O_2 , de ácido úrico. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1,05 ml a una temperatura de 25°C durante 10 minutos en una mezcla de reacción, saturada de oxígeno, que contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, con Triton X-100 al 0,1 % (v/v), KCN 0,1 mM, xantina 50 μM y la muestra (50-150 μl). La actividad enzimática en $\text{nmoles de ácido úrico} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el mismo de $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hong y Schopfer, 1981).

La actividad XDH fue determinada de forma similar a la XOD pero midiendo la formación de ácido úrico en presencia de NAD^+ 0,5 mM, en una solución tamponada en la que se había eliminado el oxígeno, por borboteo con N_2 .

3.11.13. Peroxidasa Total

Se siguió el método descrito por Quessada y Macheix (1984), basado en la detección a 470 nm del guayacol oxidado producido por la acción de las peroxidasas. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1,1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 6,1, guayacol- H_2 6,25 mM, H_2O_2 0,025 mM y la

muestra convenientemente diluida. La reacción se inició por adición de H₂O₂ y la actividad se expresó en unidades x min⁻¹ x ml⁻¹.

3.11.14. Malato Sintasa (MS; EC 4.1.3.2)

Se determinó la actividad de esta enzima siguiendo una modificación del método descrito por Hock y Beevers (1966) que mide la producción de coenzima A libre (CoA-SH). Para ello se empleó el reactivo DTNB [ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)] que forma un mercáptido con el grupo SH del CoA, que absorbe a 412 nm. La mezcla final, en un volumen de 1 ml, contenía tampón Mops-KOH 70 mM, pH 8,2, MgCl₂ 4 mM, DTNB 0,1 mM, Na-glioxilato 1,5 mM, acetil-CoA 0,1 mM y la muestra. La reacción se llevó a cabo durante 3 minutos y la actividad enzimática, en nmoles x min⁻¹ x ml⁻¹, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar de 13,6 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹ (Hock y Beevers 1966).

3.11.15. Isocitrato Liasa (ICL; EC 4.1.3.1)

Se siguió el método descrito por Archer y Ting (1996), basado en la medida espectrofotométrica de la producción del complejo glioxilato-fenilhidrazona a 324 nm. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón fosfato potásico 85 mM, pH 7,0, DTT 4 mM, MgCl₂ 4,5 mM, fenilhidracina 10 mM y la muestra. La actividad se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 1,7 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ (Archer y Ting, 1996). Una unidad de isocitrato liasa se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 μmol de glioxilato-fenilhidrazona por minuto a 25°C.

3.11.16. Actividad Proteolítica

3.11.16.1. Aminopeptidasas

Actividad en solución

Se determinó espectrofotométricamente utilizando L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato según Corpas y col. (1993b). La técnica consiste en medir a 410 nm la liberación de *p*-nitroanilida. La hidrólisis se llevó a cabo a 39°C durante 30 minutos en una mezcla de reacción (1,05 ml) que contenía tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,5, 2-mercaptoetanol 10 mM, L-leucina-*p*-nitroanilida 1 mM y la muestra. La reacción se paró por adición de ácido acético al 30% (v/v) y la actividad enzimática se determinó utilizando un coeficiente de extinción molar para la *p*-nitroanilida de 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ (Tuppy y col., 1962).

Material y métodos

Actividad en geles

La actividad aminopeptidasa también se determinó por electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida al 10% (p/v) y pH 8,9, en condiciones nativas (Davis, 1964). Después de la electroforesis los geles se incubaron a 37°C durante 30 minutos con L-leucina-4-metoxi- β -naftilamida 0,5 mM en tampón Tris-HCl 250 mM, pH 7,5. A continuación los geles se tiñeron con el colorante "Fast Black K" al 0,1% (p/v) en tampón acetato-NaOH 0,1 M, pH 4,2 (Corpas y col., 1993b). Las bandas de actividad aminopeptidasa, de color azul violáceo, se cuantificaron por registro de los geles en un densitómetro Shimadzu CS-9000. La actividad de cada isoenzima se calculó multiplicando el porcentaje de cada una de ellas, obtenido por densitometría de los geles teñidos, por la actividad total de las muestras medida en solución y se expresó en $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$.

3.11.16.2. Endopeptidasas

Actividad en solución

La actividad endopeptidasa se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato azocaseína, según describe Distefano y col. (1997). La hidrólisis de la azocaseína se llevó a cabo a 37°C durante 24 h en una mezcla de reacción (de volumen final 1 ml) que contenía tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, azocaseína al 0,5% (p/v) y 0,1 ml de muestra, tras lo cual la reacción se paró con 2 ml de ácido tricloroacético al 12% (p/v). La actividad endopeptidasa se expresó en unidades $\times \text{h}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$, considerando como una unidad la cantidad de enzima que causa un incremento de absorbancia de 0,01 a 340 nm en 2h.

Actividad en geles

Las distintas isoenzimas se separaron mediante EGPA-SDS utilizando geles al 8% (p/v) para extractos crudos y un gradiente del 6-12% (p/v) para matrices peroxisomales, tal y como se describe en Distefano y col. (1997), conteniendo en ambos casos gelatina al 0,05% (p/v). Tras la electroforesis el gel se transfirió a una solución acuosa conteniendo Triton X-100 al 2,5% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente, para eliminar el SDS y renaturalizar las endopeptidasas, y posteriormente, se incubó a 37°C durante 4 horas en tampón Tris-HCl 250 mM, pH 7,5. Después de la incubación, se tiñó el gel durante 1 hora con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 al 0,1% (p/v) preparado en metanol al 50% y ácido acético al 10%, tras lo cual se destiñó con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), hasta visualizar la actividad endoproteasa como bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel. Las distintas bandas se cuantificaron con un fotodensitómetro Shimadzu CS-9000.

Para los estudios de degradación de proteínas, tanto los extractos como las matrices peroxisomales fueron incubadas a 37°C durante 16 h, y después se cargaron en un gel de poliacrilamida con SDS y se tiñeron con nitrato de plata como se indica en el apartado correspondiente (3.9.3.2).

3.12. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La tasa de peroxidación lipídica se determinó midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico según el método de Buege y Aust (1978). Todos los reactivos de este ensayo se prepararon en agua Milli-Q. Para el ensayo se añadieron 200 µl de muestra a 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01% (p/v) preparado en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 minutos a 95°C con agitación, se dejó enfriar y se centrifugó a 2.000 g durante 5 minutos, efectuándose la lectura de la densidad óptica a 535 nm. La concentración de MDA en las muestras problema se calculó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de MDA dimetil acetal (0,1-10 µM).

3.13. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La concentración de peróxido de hidrógeno en los peroxisomas intactos se determinó según el método de Frew y col. (1983), basado en la medida a 505 nm de la formación de una quinona-imina como resultado de la oxidación, catalizada por peroxidasa, del fenol y de la 4-aminoantipirina. La mezcla de reacción (4 ml) contenía tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 6,9, 4-aminoantipirina 5 mM, fenol 2,5 mM, peroxidasa de rábano 2×10^{-9} M y H_2O_2 $2,5 \times 10^{-6}$ M, a la cual se le adicionaban 200 µl de muestra y se llevaba a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura. Después de 5 minutos, se efectuó la lectura de la densidad óptica a 505 nm. La concentración se determinó a partir de una recta de calibración con distintas concentraciones de H_2O_2 (0,625-10 µM).

Para la medida en extractos crudos de hojas se usó un método fluorimétrico descrito por Creissen y col. (1999). Los extractos crudos de hojas se prepararon en HCl 25 mM (1/3, p/v) usando un mortero, se filtraron por dos capas de nylon, y después al filtrado se le añadió carbón activo con objeto de eliminar pigmentos que pudieran interferir en la reacción. El carbón activo y los pigmentos se eliminaron por centrifugación a 5.000 g durante 5 min. El sobrenadante resultante se ajustó a pH 7,0 con NaOH y se utilizó para medir la concentración de H_2O_2 . La mezcla de reacción, en un volumen final de 3 ml, contenía tampón Hepes 50 mM, pH 7,6, ácido homovanilínico (HVA) 5 mM y 100 µl de muestra. La reacción comenzaba con la adición de peroxidasa de rábano 40 µM. La concentración de H_2O_2 se determinó

Material y métodos

midiendo la fluorescencia, en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, con excitación a 315 nm y emisión a 425 nm, frente a una curva patrón de peróxido de hidrógeno (1-20 μM).

3.14. PRODUCCIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDO

Se estudió la producción de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en las membranas de los peroxisomas aislados, según el método descrito por López-Huertas y col. (1999a). El método se basa en la medida a 550 nm de la reducción del ferricitocromo *c* por los radicales libres superóxido y su inhibición en presencia de SOD. El ensayo se llevó a cabo a 25°C en un volumen de reacción de 1,1 ml que contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, DETAPAC 0,1 mM, KCN 0,1 mM, Triton X-100 al 0,05% (v/v), ferricitocromo *c* 25 μM , y las membranas de peroxisomas. El tampón se borboteó previamente con aire. La reacción se inició adicionando NADH 100 μM y la reducción del ferricitocromo se registró a 550 nm frente a un blanco con idéntica composición pero conteniendo CuZn-SOD 2 μM . La cantidad de radicales superóxido producidos se calculó según el método de Asada (1984), utilizando un coeficiente de extinción molar para el citocromo *c* de $19 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Keister y San Pietro, 1963).

3.15. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) empleando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón de calibración. Las muestras se prepararon en un volumen de 0,8 ml al que se le adicionaron 0,2 ml de una solución de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Reagent). Transcurridos 5 minutos, se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco con 0,8 ml de agua destilada.

3.16. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA TOTAL

La concentración de clorofila total se determinó siguiendo el método de Arnon (1949). La clorofila se extrajo con acetona al 80% (v/v), en oscuridad, centrifugándose después, en frío, a 2.400 g durante 10 minutos. La concentración de clorofila se determinó en los sobrenadantes midiendo la absorbancia a 652 nm frente a un blanco que contenía acetona al 80% (v/v), y mediante la expresión:

$$\text{clorofila (mg / ml)} = \frac{A_{652} \times 5}{34,5 \times v}$$

donde *v* es el volumen de muestra en ml y A_{652} la densidad óptica a 652 nm.

3.17. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD

Para determinar la salida de electrolitos en hojas de plantas de guisante tratadas con Cd, se estudiaron los cambios en la conductividad de discos foliares. Para ello se prepararon dos discos foliares de 10 mm de diámetro que se depositaron en tubos de vidrio conteniendo 2 ml de agua milli-Q, con la cara abaxial hacia arriba. Los discos se incubaron durante 3 horas y se midió la conductividad en un conductivímetro Crison, mod. micro pH 2001. Para cada tratamiento se utilizaron tres réplicas.

3.18. DETERMINACIÓN DE DENSIDAD

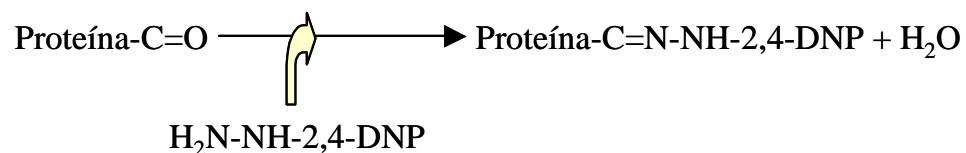
La determinación de la densidad de las soluciones de sacarosa se efectuó a partir de medidas de refractometría, a temperatura ambiente, utilizando un refractómetro Atago mod. 500 con capacidad para medir concentraciones en el intervalo 0-90% de sacarosa (p/p).

3.19. DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO

Tanto en homogenados como en peroxisomas de hojas purificados por centrifugación en gradientes de sacarosa se determinaron los grupos carbonilo como índice de las proteínas modificadas oxidativamente. Como control positivo, se utilizaron homogenados incubados, durante 2 h, con concentraciones crecientes de H₂O₂ (0-20 mM).

3.19.1. Medida en Solución

La cuantificación de grupos carbonilo se efectuó según el método de Levine y col. (1991) basado en la reacción de los grupos C=O con la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) con formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona que absorbe a 370 nm, según la reacción:



Se prepararon homogenados de hojas de guisante en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0.2% (v/v) y PMSF 1mM, con una relación p/v de 1/4. Los homogenados se filtraron y centrifugaron a 27.000 g durante 20 min y los sobrenadantes se utilizaron para las determinaciones.

Para cada tratamiento se usaron tres muestras (con dos réplicas a su vez, cada una) y su correspondiente blanco. Los extractos, conteniendo 0.5 mg de proteína se incubaron con sulfato de estreptomicina al 1% (p/v) durante 20 min para eliminar ácidos nucleicos y se centrifugaron a 2.000 g

Material y métodos

durante 10 min. Posteriormente, los homogenados se incubaron durante 1 h con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M. Los blancos se incubaron con HCl sin DNPH. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) y el exceso de DNPH se eliminó por lavados con etanol/acetato de etilo (1:1). Finalmente, el precipitado se resuspendió en guanidina 6 M preparada en KH_2PO_4 20 mM a pH 2,3 (ajustado con ácido trifluoroacético) y se midió la absorbancia a 370 nm. Como control del contenido de proteínas, al final del ensayo se midió la absorbancia de los blancos a 280 nm utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino (ASB) preparada en guanidina 6 M. El contenido de carbonilos se calculó usando un coeficiente de extinción molar para las hidrazonas alifáticas de $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Levine y col., 1990).

Para la cuantificación de grupos carbonilo en peroxisomas purificados, éstos se sometieron a choque osmótico por dilución (5 veces) con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, EDTA 1mM, y las muestras se mantuvieron en agitación durante 1-2 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se incubaron con TCA al 10% durante 15 minutos y las proteínas se recuperaron por centrifugación a 27.000 g durante 1 hora. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,4, y se incubó con DNPH continuando con el protocolo anteriormente indicado.

3.19.2. Detección Inmunoquímica

Se llevó a cabo según el método de Yan y col. (1998). Los homogenados o fracción peroxisomal se incubaron con DNPH 10 mM preparada en HCl 2 M durante 1 hora. Como controles se utilizaron blancos incubados en HCl sin DNPH. Posteriormente, se precipitaron las proteínas con TCA al 10% (p/v) y se lavaron con etanol/acetato de etilo (1:1) tres veces como se indicó anteriormente. Finalmente, las proteínas se resuspendieron en tampón fosfato-Na 10 mM, pH 7,4, y se cargaron 10 μg en dos geles de poliacrilamida-SDS, al 12% el gel separador y al 4% el gel concentrador. Uno de los geles se empleó para la inmunodetección, mediante la transferencia a una membrana de PVDF, y el segundo para tinción de proteínas como control. Las membranas de PVDF se incubaron con anticuerpos comerciales frente a la DNPH de Sigma (dilución 1:40.000) y las proteínas oxidadas se detectaron mediante quimioluminiscencia (Corpas y col., 1998a) o mediante el método de la fosfatasa alcalina, usando como sustrato el NBT.

3.19.3. Identificación de Proteínas Oxidadas

Los homogenados y las fracciones peroxisomales derivatizados con DNPH se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente al DNPH, según Small y col. (1987). Las muestras derivatizadas se incubaron toda la noche a 4°C en un tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,2, con NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM y el anti-DNPH diluido 1:1.000, en un volumen final de 170 μl . Posteriormente, las muestras se depositaron sobre un

gradiente de sacarosa de dos capas (0,5 y 1,25 M) y se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos, dos veces. El precipitado obtenido se resuspendió con 5 μ l de NaOH 0,1 N, a lo que se añadieron 40 μ l de tampón de muestra para geles de SDS, 4,25 μ l de HCl 0,1 N y finalmente, 1 μ l de DTT 0,5 M. Las proteínas se separaron mediante EGPA-SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF según se ha descrito con anterioridad. Las proteínas oxidadas se identificaron mediante el uso de anticuerpos frente a las siguientes enzimas: Mn-SOD, GR, CAT, CuZn-SOD y FBPasa. Como controles se ensayaron homogenados normales, homogenados inmunoprecipitados sin derivatizar y homogenados derivatizados sin inmunoprecipitar.

3.20. DETERMINACIÓN DE GRUPOS TIOL (-SH)

La medida de grupos -SH se realizó según el método de Patra y col. (1994), basado en la afinidad del 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) por los grupos -SH. Las hojas se homogeneizaron en mortero en 2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, con EDTA 1mM y Triton X-100 al 0,2% (v/v), utilizando una relación peso/volumen de 1:4. El homogenado se centrifugó a 27.000 g durante 25 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se utilizó para los ensayos. Para determinar los grupos -SH totales, 0,5 ml de sobrenadante se mezclaron con 50 μ l de DTNB 0,1 M y 0,95 ml de metanol, y tras centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos, se midió la absorbancia de la solución a 410 nm.

Para la estimación del contenido en grupos -SH no proteicos se procedió a la eliminación de las proteínas en los extractos por precipitación con TCA al 12% (p/v) y centrifugación a 12.000 g durante diez minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de grupos tiol en una mezcla de reacción que contenía 1 ml del sobrenadante, 2 ml de Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9, y 50 μ l de DTNB 0,1 M, midiendo la absorbancia a 410 nm después de 5 minutos de incubación.

La cuantificación de los grupos -SH totales y no proteicos se efectuó utilizando una curva patrón de L-cisteína (5-40 μ g/ μ l). El contenido de grupos -SH proteicos se obtuvo por diferencia entre los totales y los no proteicos.

3.21. DETERMINACIÓN DE GLUTATION REDUCIDO Y OXIDADO

Se siguió el método de Farris y Reed (1987) basado en la reacción del iodoacético con los grupos tioles libres para formar derivados de S-carboximetilo. Posteriormente se realizaba una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger con la consiguiente formación de derivados de 2,4-dinitrofenilo que se detectaban por HPLC. La separación se realizó por intercambio iónico en columna de fase reversa con superficie de grupos 3-aminopropilos y el solvente A (70% metanol/H₂O) se utilizaba para eluir rápidamente el exceso de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, los DNP derivados de aminoácidos

Material y métodos

básicos y neutros y el 2,4-dinitrofenol. Por otro lado, el ácido acético del solvente B, a pH 4,5-4,6, se utilizó para mantener los grupos amino de la columna en forma protonada, y así permitir la evolución selectiva de los dinitrofenil derivados (DNPd) de ácidos incrementando las concentraciones de sodio o acetato amónico.

Se obtuvieron extractos de hojas en ácido perclórico al 6% (v/v) preparado en H₂O Milli-Q conteniendo ácido batofenantrolindisulfónico (BPDS) 1mM y el glutation se extrajo de los mismos, incubando estos extractos durante 30 minutos en hielo, tras lo cual se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se congeló y se procedió a su derivatización tras su descongelación. De acuerdo con el método de Farris y Reed, y usando γ -glutamyl-glutamato (γ -Glu-Glu) como patrón interno, la derivatización se llevó a cabo mezclando: 250 μ l del extracto ácido descongelado, 50 μ l de γ -Glu-Glu 0,2 mM preparado en ácido perclórico 0,3% (v/v) y 25 μ l de ácido iodoacético 0,1 M preparado en una solución acuosa de m-cresol púrpura 0,2 mM. La mezcla se llevó a pH 8,5-9 con una solución de KOH 3M-Mops 0,3 M que se añadía gota a gota, agitando bien las muestras y comprobando el pH, y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 15.000 g durante 5-10 minutos a 4°C. Se recogieron 100 μ l del sobrenadante que se mezclaron con 200 μ l de fluorodinitrobenzeno (FDNB) (preparado al 1% v/v en etanol), y esto se realizó por duplicado para cada muestra. Tras la incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 12 horas, se añadió lisina 0,03 M para que reaccionara con el FDNB libre que pudiera dañar a la columna, y las muestras se sometieron a liofilización durante 4-5 horas. Al finalizar ésta, se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior cuantificación por HPLC. Para ello, las muestras se resuspendieron en 100 μ l de fase móvil A (70% metanol) y se les añadió lisina.

Usando estas condiciones de ensayo, menos del 0,5% del GSH se oxida a GSSG durante el proceso. Sin embargo, para prevenir esta interferencia, se extraía rutinariamente una alícuota de la muestra con el mismo ácido conteniendo BPDS y N-etilmaleimida (NEM) 40 mM, antes de la derivatización. El porcentaje de oxidación del GSH durante el proceso se calculaba de la diferencia de contenido de GSSG de la muestra extraída en ausencia y en presencia de NEM. La detección se realizó a 365 nm en un HPLC Shimadzu, pasando la muestra por una columna 3-aminopropilo de intercambio iónico y de fase reversa. Antes de inyectar, las muestras resuspendidas se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min para eliminar posibles partículas que pudieran obstruir la columna. Tras la inyección de la muestra derivatizada (20 μ l), la fase móvil A (70% metanol/H₂O) se mantenía en un 80% durante 7 min, correspondiendo el 20% restante a la fase móvil B (acetato sódico 0,5 M en metanol al 70%).

Posteriormente se mantenía un gradiente lineal creciente de la fase móvil B durante 15 minutos hasta alcanzar un 1 % del solvente A y un 99% del solvente B a un flujo de 1 ml/min. La fase móvil B se mantenía en un 99% durante 8 minutos hasta que eluía el GSSG. Tres minutos más tarde se volvía a la proporción de 80% de A y se mantenía durante 22 minutos antes de inyectar la siguiente muestra a fin de equilibrar la columna con esas proporciones.

3.22. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

El ascorbato se determinó a partir de extractos ácidos, obtenidos igual que en el apartado anterior, por HPLC tal y como describen Castillo y Greppin (1988). La fase móvil utilizada para la determinación consistió en $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ al 2% (p/v) en agua, a un pH 2,8. Antes de ser analizadas, las muestras eran pasadas a través de columnas Sepack C_{18} (Waters) y filtradas por un filtro de 0,5 μm (Millex GV₃, Millipore). Posteriormente se inyectaron en una columna Apex octadecil de 5 μm de diámetro y 25 cm de longitud, a un flujo de 1 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 254 nm en un HPLC Shimadzu LC-10 AS con un detector SPD-10AV. El sistema se calibró por medio de un patrón externo, utilizando una curva de calibración compuesta por distintas concentraciones de ácido ascórbico.

3.23. MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA

3.23.1. Preparación de las Muestras

3.23.1.1. Estudios Estructurales

Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente 1 mm² en una solución de glutaraldehído al 2,5% (v/v) preparada en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,8, y se mantuvieron durante 2 horas y 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron fijadas posteriormente en OsO_4 al 1% (v/v) preparado en tampón cacodilato sódico 50 mM, pH 7,2, tras lo cual se deshidrataron en una serie escalonada de etanol del 30 al 100% (v/v), y fueron embebidas en resina Spurr. Se prepararon cortes semifinos que se tiñeron con azul de metileno para su observación al microscopio óptico y cortes ultrafinos que se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

3.23.1.2. Para Inmunocitoquímica

Los cortes de hoja (1 mm²) se fijaron en una solución de glutaraldehído al 0,2% (v/v) y *p*-formaldehído al 4% (p/v) en tampón Pipes-KOH 50 mM, pH 7,4, durante 1 hora a 4°C. Los cortes se lavaron tres veces con el mismo tampón y se deshidrataron en series escalonadas de etanol (30-100%; v/v) con intervalos de 20 min. A partir del 70 % de etanol, las muestras se mantuvieron a -20°C. Después de la deshidratación, los cortes fueron infiltrados en series graduales de resina LR White (LRW) en etanol (25-100%; v/v) con intervalos de 4 horas e infiltración final de 12 horas. La polimerización se realizó a -20°C en luz ultravioleta.

3.23.2. Detección de Muerte Celular (Técnica TUNEL)

Para la detección de muerte celular se empleó la técnica TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labelling) utilizando el método de Boehringer Mannheim que permite la observación al microscopio óptico de apoptosis en células individuales. El método está basado en la detección de roturas de la cadena de ADN que ocurren en los primeros estadios de la apoptosis. Para ello se utilizaron muestras preparadas en resina LRW. Los cortes se permeabilizaron con proteinasa K (10-20 µg por ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual, se lavaron con tampón PBS (fosfato potásico 0,1 M, pH 7,4 y NaCl 150 mM) dos veces (10 min cada una). Posteriormente, los cortes se incubaron durante 75 min en una mezcla de reacción que contenía fluoresceína-dUTP y desoxinucleotidil transferasa (TdT), que cataliza la unión de los desoxirribonucleótidos al extremo 3' de las cadenas de ADN, tanto simples como dobles. En estas condiciones, la TdT cataliza la adición de los nucleótidos marcados con fluoresceína a los extremos 3' de las cadenas de ADN dañadas y, después de lavar con PBS, se puede observar la emisión de fluorescencia en estas zonas. Para amplificar la señal se puede utilizar un anticuerpo frente a la fluoresceína, conjugado con fosfatasa alcalina, y después se revela con el sustrato de esta enzima (NBT/BCIP) dando lugar a precipitados marrones que se pueden observar al microscopio óptico.

3.23.3. Detección de Óxido Nítrico (NO·)

Se incubaron cortes de hojas, de 25 mm², en una solución de 10 µM de diacetato de diaminofluoresceína (DAF2-DA) de Calbiochem, preparada en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. El tiempo de incubación fue de 1 h y se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los cortes con el mismo tampón dos veces (durante 15 min) y se incubaron en una solución de sacarosa al 30% (p/v) durante 12 horas. Una vez realizados los cortes, se observaron con el microscopio láser confocal a una longitud de onda de 495-515 nm según Pedroso y Durzan (2000).

Para inhibir una fuente endógena importante de NO[•], la actividad óxido nítrico sintasa (NOS), los cortes fueron preincubados 1 hora a temperatura ambiente con un inhibidor competitivo de la misma, (L-NAME), que se mantuvo durante la incubación con DAF2-DA.

3.23.4. Identificación Citoquímica de Peroxisomas

Para la identificación de peroxisomas en cortes ultrafinos se siguió un método basado en la actividad peroxidásica de la catalasa sobre la diaminobencidina (DAB), según describen Palma y col. (1991). El producto de la oxidación de la DAB por la catalasa y el H₂O₂ forma un precipitado con el OsO₄ que presenta una alta densidad electrónica fácilmente reconocible. Las muestras se fijaron inicialmente con glutaraldehído al 0,5% (v/v) preparado en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,8, durante 2,5 horas a temperatura ambiente, lavando después con el mismo tampón. Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad, durante 1 h, en una solución de DAB de 2 mg/ml preparada en Tris-HCl 50 mM, pH 9,0. Después, las muestras se incubaron a 37°C en oscuridad durante dos horas en una solución recién preparada de DAB (2 mg/ml) y H₂O₂ al 0,02% (v/v), tras lo cual, se lavaron con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,8, y se deshidrataron en una serie escalonada de etanol del 30 al 100% (v/v). Una vez embebidas las muestras en resina Spurr, se contrastaron los cortes igual que para el estudio de la ultraestructura y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss ME 10C.

3.23.5. Citoquímica de H₂O₂

Se utilizó el método descrito por Bestwick y col. (1997). Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente 1 mm² y se incubaron en una solución de CeCl₃ 5 mM en tampón Mops 50 mM, pH 7,2, durante 1 h y se siguió el mismo protocolo de preparación de muestras en resina Spurr descrito en el apartado 3.23.1.1. Como controles negativos, previamente a la incubación con CeCl₃, se incubaron cortes de hojas con catalasa de hígado bovino (25 µg/ml), y también se utilizaron cortes incubados en tampón y en ausencia de CeCl₃. Para determinar el efecto de inhibidores sobre la formación de precipitados de H₂O₂, las muestras se incubaron previamente con los mismos durante 30 min. Los inhibidores utilizados fueron azida sódica 1 mM y difeniliodonio (DPI) 10 µM. Los cortes ultrafinos se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para su observación al microscopio electrónico.

3.23.6. Citoquímica de Radicales O₂^{•-}

Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente 1 mm² y se incubaron en una solución de diaminobencidina (DAB) 2,5 mM y MnCl₂ 0,5 mM en tampón Hepes 0,1 M, pH 7,2, con azida sódica 1mM durante 30 min (Steinbeck y col., 1993). Como controles de la reacción se llevaron a cabo

Material y métodos

incubaciones en ausencia de Mn, en presencia y en ausencia de DAB, y en presencia de CuZn-SOD 10 μM para comprobar la especificidad de la reacción. Posteriormente, las muestras se procesaron según se ha descrito en el apartado anterior.

3.23.7. Microanálisis de Rayos-X

Para localizar la presencia de acúmulos de Cd a nivel subcelular en hojas de guisante, se prepararon muestras en resina Spurr, siguiendo básicamente el método descrito en el apartado 3.23.1.1. Para prevenir las movilizaciones de Cd durante el proceso, se utilizaron dos métodos de inmovilización de cationes: con piroantimoniato potásico y por fijación con Na_2S . En el primer caso, los cortes se incubaron durante 2 horas en una solución de piroantimoniato-K al 4% (p/v) (preparado en acético 0,02 N, pH 7,8-8), *p*-formaldehído al 2% (p/v) y fenol al 1% (p/v) (Vázquez y col., 1999). Posteriormente, los cortes se lavaron con agua Milli-Q y se deshidrataron en una serie escalonada de etanol para ser embebidas en resina Spurr.

En el caso de la utilización de Na_2S , los cortes se incubaron durante dos horas en una solución con glutaraldehído al 4% (v/v) preparado en tampón cacodilato-Na 50 mM, pH 7,2, con Na_2S al 4% (p/v). Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con tampón (15 min cada vez) y se deshidrataron en etanol para ser embebidas en resina.

Independientemente del método de inmovilización de cationes utilizado, se omitió la postfijación con OsO_4 para prevenir interferencias. Los cortes se recogieron en rejillas de níquel y se contrastaron exclusivamente con acetato de uranilo. La observación se realizó en un microscopio Philips HRT de 200 kV con sistema microanalítico EDAX.

3.23.8. Microscopio electrónico de barrido

Las hojas de guisante se fijaron en glutaraldehído al 5% (v/v) preparado en tampón cacodilato-Na 0,1 M (pH 7,2), se cortaron y deshidrataron en series de etanol (30-100%, v/v), llevándose al punto crítico con dióxido de carbono. Las muestras fueron sometidas a un baño de oro para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss DM950, a 20 kV.

3.24. DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES $O_2^{\cdot-}$ Y DE H_2O_2 EN HOJAS COMPLETAS

3.24.1. Producción de Radicales $O_2^{\cdot-}$

Hojas completas de plantas de guisante se infiltraron a vacío (dos golpes de 5 min) con tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6,4, con NBT al 0,1% (p/v) y azida sódica 10 mM. Posteriormente, las hojas se incubaron en la luz durante 30 minutos, hasta la aparición de manchas oscuras debidas a la formación de azul de formazano como consecuencia de la reducción del NBT por los radicales $O_2^{\cdot-}$ (Schraudner y col., 1998). Como control de la reacción se utilizó tetrametilpiperidonoxi (TMP) 1 mM que actúa como un secuestrador de radicales superóxido.

3.24.2. Producción de H_2O_2

Hojas enteras de plantas de guisante se infiltraron a vacío (dos golpes de 5 min) con tampón Mes 10 mM, pH 6,5, conteniendo DAB al 0,1% (p/v). Posteriormente, las hojas se incubaron en oscuridad de 3 a 8 horas y se expusieron a la luz durante 1h, tras lo cual se observaron unas manchas oscuras consecuencia de la oxidación del DAB por el H_2O_2 . Como control de la reacción, las hojas antes y durante la infiltración con DAB, se incubaron en presencia de ascorbato 1 mM que actúa eliminando el H_2O_2 .

3.24.3. Efecto de Moduladores sobre la Producción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$

Para determinar el efecto de distintos inhibidores y activadores sobre la producción de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, las hojas de guisante se incubaron por inmersión de los peciolo durante 3-18 horas, en distintas soluciones acuosas conteniendo los siguientes compuestos: cantaridina 5 μ M (inhibidor de protein quinasas), $LaCl_3$ 1mM (bloqueante de canales de calcio), ácido salicílico 1mM, N-acetil-cisteína 20mM (secuestrador de H_2O_2), nitroprusiato de sodio 0,5 mM (donador de NO), 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) 150 μ M (secuestrador de NO), 8-Br-cGMP 100 μ M (donador de GMP cíclico), 1H[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) 200 μ M (inhibidor de GMP cíclico) y tetrametil piperidinoxil (TMP) 1mM (secuestrador de radicales $O_2^{\cdot-}$). Tras la infiltración, se estudió la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 según se ha indicado anteriormente. Como controles se utilizaron hojas infiltradas con H_2O .

3.25. ENSAYOS DE MUERTE CELULAR EN HOJA COMPLETA

Como marcador de muerte celular en hoja se utilizó el colorante impermeable, "Evans blue", que sólo penetra en las células que tienen dañada la membrana. Se sumergieron los peciolo de las hojas de guisante en una solución de "Evans blue" al 0,25 % (p/v) en agua destilada durante 20 horas. Pasado este tiempo, las hojas se decoloraron por inmersión en etanol hirviendo para una mejor observación del colorante. Para la cuantificación del "Evans blue" que penetra en la hoja, se procedió a la extracción del mismo a partir de discos foliares procedentes de las hojas infiltradas, mediante maceración a 50°C en una mezcla de metanol al 50% (v/v) y SDS al 1% (p/v) durante 30 min (Levine y col., 1994). Los discos foliares se homogeneizaron en Potter y se centrifugaron para retirar los restos de hojas, midiendo después la densidad óptica del sobrenadante a 600 nm.

3.26. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ADN

La extracción de ADN de las hojas de guisante se realizó mediante un método comercial de la casa Qiagen ("DNeasy Plant Mini Kit") (Fig. 3.2). Las hojas se trituraron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Éste se pesó inmediatamente y se le añadió el medio de lisado precalentado a 65°C. Posteriormente, las proteínas y polisacáridos eran precipitados con altas concentraciones salinas y centrifugados en tubos de microcentrifuga con filtro obteniéndose un lisado con el ADN. Éste, se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo al que se le añadió tampón de unión y etanol que favorece la adhesión del mismo a la membrana de gel de sílice. Se centrifugó y se lavó para eliminar más eficientemente los polisacáridos y proteínas, y finalmente se obtuvo el ADN tras eluirlo con agua estéril o con tampón TE de baja concentración salina (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, con EDTA 1 mM).

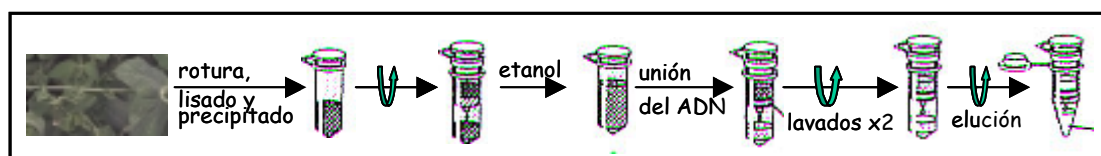


Fig. 3.2 Extracción del ADN de hojas según el protocolo de Quiagen (DNeasy Plant Mini Kit). El ADN se eluyó con H₂O.

La cuantificación del ADN en solución se estimó diluyendo el ADN con agua estéril y midiendo su absorbancia 260 nm, asumiendo que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda es equivalente a 50 µg /ml de ADN de cadena doble. Para comprobar la posible contaminación por proteínas se hizo un barrido entre 200-300 nm lo que permitió determinar la relación de las absorbancias A_{260}/A_{280} , indicativo de la pureza del ADN cuando este cociente tiene un valor entre 1,7-1,9.

La separación de fragmentos de ADN en base a su tamaño, con fines analíticos o preparativos, se llevó a cabo mediante electroforesis, bien en geles de poliacrilamida o de agarosa. Los geles de poliacrilamida al 7,5% (p/v) en condiciones no desnaturalizantes (como se indica en el apartado 3.9.1) eran preparados en tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 1mM, pH 8,0). Las muestras de ADN se mezclaron con 0,1 volúmenes de tampón de carga (10% (v/v) de glicerol, 0,001% (p/v) de azul de bromofenol y 0,001% (p/v) de xilenocianol) y se cargaron en el gel que se sometió a un voltaje de 75 V durante 1 hora. Finalmente, el gel se tiñó con plata como se indica en el apartado 3.9.3.2. Los geles de agarosa entre el 0,8 y el 1,5% (p/v) se prepararon en tampón TBE. A las muestras de ADN se les añadió 0,1 vol del mismo tampón de carga y se introdujeron en el gel al que se le aplicó un voltaje constante entre 40 y 60 V. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,025% (p/v) durante 30 min para visualizar el ADN con luz UV.

3.27. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ARN

El ARN total se extrajo de las hojas de guisante utilizando una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) disponible comercialmente como TRIzol (GIBCOBRL, Life Technologies). Las hojas de guisante (previamente congeladas con nitrógeno líquido y conservadas a -80°C) se homogeneizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Inmediatamente se pesó el polvo y se le añadió la solución de TRIzol (1 ml por cada 0,1 g de tejido) y se incubaron a 15-30°C durante 5 minutos. A continuación se añadió cloroformo (0,2 ml por cada ml de TRIzol) agitando vigorosamente durante 15 segundos e incubando durante 2-3 minutos a 15-30 °C, para después centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron dos fases, una orgánica, de fenol-cloroformo, y otra acuosa, donde se quedó exclusivamente el ARN. Esta fase se recuperó y se mezcló con isopropanol puro, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Así, se obtuvo un precipitado de ARN que se lavó con etanol al 75 % (v/v) (al menos 1 ml por ml de TRIzol utilizado) y posteriormente se volvió a precipitar centrifugando a 7.500 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se dejó secar el precipitado al aire durante unos minutos y se resuspendió el ARN en agua tratada previamente con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v) para inactivar posibles ARNasas (20-40 µl x 0,1 g⁻¹ de tejido).

La cuantificación del ARN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda equivale aproximadamente a 40 µg /ml de ARN. Para ello se realizó una dilución del ARN en agua tratada previamente con DEPC y se midió la absorbancia entre 200-300 nm para comprobar posibles contaminaciones de proteínas, además de

Material y métodos

determinar la relación de las absorbancias A_{260}/A_{280} , indicativo de la pureza del ARN cuando está entre 1,8 y 2,0.

El ARN procedente de las hojas de guisante se analizó en geles de agarosa-Mops al 1,2% (p/v) en presencia de formaldehído al 1,8% (v/v) según Sambrook y col. (1989). Las muestras de ARN se calentaron a 65°C durante 15 minutos y se prepararon en una solución de tampón Mops 20 mM, pH 7,0, acetato sódico 5 mM y EDTA 1 mM, formaldehído 6,5% (v/v) y formamida 50% (v/v), después de lo cual se calentaron a 55°C, durante 10 minutos y se les añadió 0,1 volúmenes de tampón de carga compuesto por glicerol 10% (v/v), EDTA 0,1mM, pH 8,0, azul de bromofenol 0,025% (p/v) y xilenocianol 0,025% (p/v). Se prepararon geles de agarosa al 1,2% (p/v) en el mismo tampón y con formaldehído al 1,8% (v/v). Para ello se disolvió la agarosa por calentamiento en 85 ml de agua, y después de haberse enfriado un poco la solución, se le añadió 10 ml de tampón Mops 10x y 5 ml de una solución de formaldehído al 37% (v/v). La electroforesis se llevó a cabo en tampón Mops a 40 V durante 3 horas aproximadamente, hasta que el azul de bromofenol del tampón de carga recorrió las $\frac{3}{4}$ partes del gel.

La transferencia de las muestras de ARN a membranas de nylon, después de la electroforesis (Northern), se llevó a cabo básicamente como se indica en Sambrook y col. (1989). Una vez terminada la electroforesis del gel de agarosa, éste se lavó y equilibró en SSC 10x (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M a pH 7,0) durante unos 20 minutos con un par de cambios de solución. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nylon (BioRad) por un proceso de capilaridad. Para ello, el gel se colocó sobre un puente de papel de filtro que se sumergió por ambos extremos en una solución SSC 10x. Sobre el gel se colocó la membrana de nylon, del mismo tamaño, y sobre ella 6 papeles de filtro (Whatman 3 MM) cortados con el mismo tamaño del gel, al igual que la pila de papel absorbente que se colocó encima. Se dejó transcurrir la transferencia capilar durante unas 12 horas (Fig. 3.5). Posteriormente, se recogió la membrana, se enjuagó con SSC 2x y se dejó secar al aire, tras lo cual se fijó el ARN a la membrana con un tratamiento de luz ultravioleta a 0,12 J/cm² (dos pulsos) con un transiluminador Vilbert-Lourmat (Bio-link BLX-254). Finalmente, la membrana se tiñó con azul de metileno 0,04% (p/v) preparado en acetato sódico 0,3 M, pH 5,6, para comprobar la eficiencia de la transferencia (Sambrook y col., 1989).

3.28. DETECCIÓN DE ARNm CON SONDAS DE ADN MARCADO RADIOACTIVAMENTE

Las membranas después de la transferencia del ARN se utilizaron para la detección y cuantificación de ARNm específicos mediante el uso de sondas de ADN marcadas radioactivamente (Fig. 3.5).

3.28.1. Sondas de ADN Utilizadas

A partir de los ADNc de diversas enzimas antioxidantes (Tabla 3.1) se obtuvieron, bien por PCR con cebadores específicos o por digestión con endonucleasas, los fragmentos que serían utilizados como sondas y que serían marcados con ^{32}P tal y como se indica en el apartado 3.28.3.

Tabla 3.1 Sondas que se marcaron con ^{32}P y se utilizaron en la detección del ARNm correspondiente. Todas ellas proceden de guisante excepto la APX que procede de algodón. Los clones fueron cedidos por los autores de las referencias que se citan en primer lugar.

Gen	Vector	Cebadores/Enzimas de restricción	Tamaño (pb)	Referencia
Mn-SOD	pBluescript	F: 5'-ACMMGAARCACCAYCARACTTA-3' R: 5'-TGSARGTAGTAGGCATGYTCCCA-3'	435	Dra. B Zilinskas, Rutgers Univ., New Jersey Ruíz-Lozano y col. (2001)
MDHAR	pBluescript	F: 5'-AACGTGGTTGTTGGAGG-3' R: 5'-ACGGGAATAGAAGTATGGAAGG-3'	550	Murthy and Zilinskas (1994)
CuZn-SOD	pUC	F: 5'-CCTGGACTTCATGGCTTCCAT-3' R: 5'-TCTTCCGCCAGCGTTTCCAGTG-3'	580	Isin y col. (1990)
GR	pKSII	<i>Bam</i> H I	1900	Stevens y col. (1997)
CAT	pUC	<i>Eco</i> R I	1200	Isin y Allen (1991)
APX	pGEM	<i>Eco</i> R II/ <i>Hind</i> III	1200	Bunkelmann y Trelease (1996)

M: (A/C); R: (G/A); Y: (T/C); S: (G/C)

3.28.2. Transformación y Aislamiento de los Plásmidos

El método utilizado para la transformación de bacterias fue el descrito por Lucotte y Baneyx (1993). Las bacterias competentes *E. Coli* DH5 α , se conservaron a -80°C, se sacaron y cuando empezaron a descongelarse se añadieron 20-200 ng del plásmido de interés (2-5 μ l) y se dejaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se calentaron las células a 42°C durante 90 segundos. Luego se añadieron 0,5 ml de medio Luria-Bertani 2x [LB 1x: Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0] y se incubaron a 37°C de 1-2 horas en un agitador orbital (Gallenkamp) a 170 rpm. Cuando se

Material y métodos

alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,6 se distribuyeron homogéneamente 50 μ l de suspensión en una placa de Petri con LB 1x, ampicilina 100 μ g/ml, y agar al 2% (p/v) y se dejaron crecer las bacterias durante 12-16 horas a 37°C.

Utilizando estos cultivos se inició el aislamiento del plásmido (Miniprep) con un método comercial de Promega ("Wizard Plus SV Minipreps, DNA Purification Systems") (Fig. 3.3). A partir de colonias individualizadas, se inocularon tubos de ensayo con 3 ml de LB y ampicilina (100 μ g/ml) que se mantuvieron en un agitador orbital a 170 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0,6. Los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a fin de romper las células y extraer y aislar el ADN correspondiente. El precipitado celular se resuspendió en 250 μ l de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, con EDTA 10 mM y 100 μ g/ml de ARNasa A. Posteriormente, se añadieron 250 μ l de solución de lisis (NaOH 0,2 M y SDS al 1% (p/v)), 10 μ l de una solución alcalina con proteasas (para inactivar endonucleasas y degradar proteínas) y 350 μ l de solución de neutralización (acetato potásico 0,759 M, guanidina-HCl 4,09 M y ácido acético glacial 2,12 M, a un pH aproximado de 4,2), y se centrifugó a 14.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a una columna suministrada por el método de Promega, con una resina a la que se unió el ADN, y se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después se añadieron 750 μ l de solución de lavado (acetato potásico 60 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 7,5, con un 60% (v/v) de etanol) y se volvió a centrifugar a 14.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se repitió el paso anterior con 250 μ l de solución de lavado y se centrifugó en las mismas condiciones durante 2 minutos. Finalmente, se eluyó el ADN con agua y se centrifugó a 14.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente, conservándose el ADN plasmídico a -20°C.

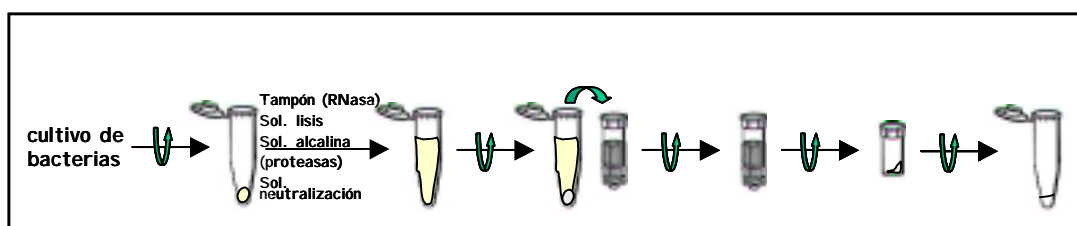


Fig. 3.3 Obtención del ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias. Todas las centrifugaciones se realizaron a 14.000 g y el último precipitado se lavó dos veces tras lo cual se recuperó el ADN plasmídico con H₂O

La comprobación de la presencia y del tamaño de los insertos se llevó a cabo, en unos casos, mediante el análisis de los mismos en geles de agarosa no desnaturizantes. Para ello, se digirió el ADN plasmídico con las enzimas de restricción correspondientes, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación: 7,5 μ l de agua, 1,0 μ l de ADN, 1,0 μ l de tampón 10x de la enzima de restricción y 0,5 μ l de

enzima de restricción (5 unidades y siempre considerando que el volumen de la enzima debe ser menor del 5% del volumen de digestión para evitar su inhibición). Se incubó la mezcla a 37°C, durante al menos 2 horas. En otros casos, se recurrió a la amplificación por PCR con cebadores específicos para las sondas correspondientes. Para la separación de los distintos fragmentos de ADN se recurrió a la electroforesis en geles de agarosa como se explica en el apartado 3.26. Junto a las muestras se utilizaron marcadores de ADN de Bio-Rad (“100 bp PCR Molecular Ruler”).

Para recuperar los insertos de ADN de los geles de agarosa, se utilizó un método de Qiagen (“Quiaex II”) (Fig. 3.4), basado en la extracción y purificación de ADN de los geles de agarosa en tampón Tris-acetato/borato con EDTA sin utilizar la extracción con fenol ni la precipitación con etanol como suele ser habitual. Se utilizan partículas de sílice optimizadas para recuperar fragmentos de ADN. Las moléculas de ADN se adsorben a las partículas de sílice en presencia de altas concentraciones salinas y el resto de moléculas se lavan en diferentes pasos, evitando así contaminaciones. Finalmente, el ADN se eluyó con agua.

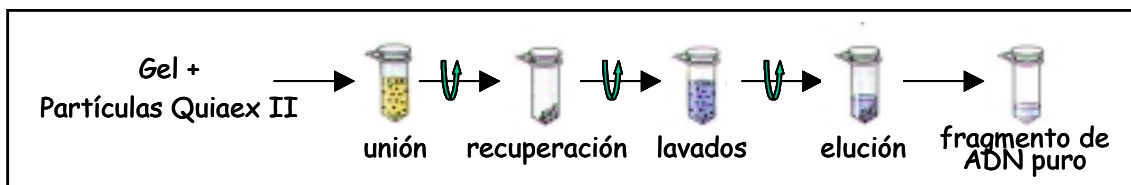


Fig. 3.4 Extracción y purificación de ADN de los geles de agarosa con partículas de sílice (Quiaex II) optimizadas para recuperar fragmentos de ADN. Las moléculas de ADN se adsorben a las partículas en presencia de altas concentraciones salinas y el resto de moléculas se lavaron en diferentes pasos, evitando así contaminaciones. Finalmente, el ADN se eluyó con agua.

3.28.3. Marcaje de las Sondas

Se utilizó un método comercial de Amersham Pharmacia Biotech (“Rediprime™ II”), que permite un marcaje aleatorio de una secuencia de nucleótidos a partir de un molde de ADN desnaturalizado. Este ADN se marcaba en numerosos sitios a lo largo de su longitud ya que en la mezcla de reacción que utiliza la enzima Klenow polimerasa se sustituyen nucleótidos no radioactivos por el equivalente marcado radioactivamente. El fragmento de ADN aislado, con una concentración de 2,5-40 ng en 45 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM), se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos y se colocó en hielo durante otros 5 minutos. Este ADN se añadió a la mezcla de reacción (enzima Klenow y nucleótidos) y 5 µl de la mezcla de nucleótidos marcados (Redivue [³²P] dCTP) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. La reacción se paró con 5 µl de EDTA 0,2 M. Los nucleótidos marcados no incorporados fueron eliminados con unas columnas de filtración por gel de Boehringer (“Mini Quick Spin™”). Antes de usar el fragmento de

Material y métodos

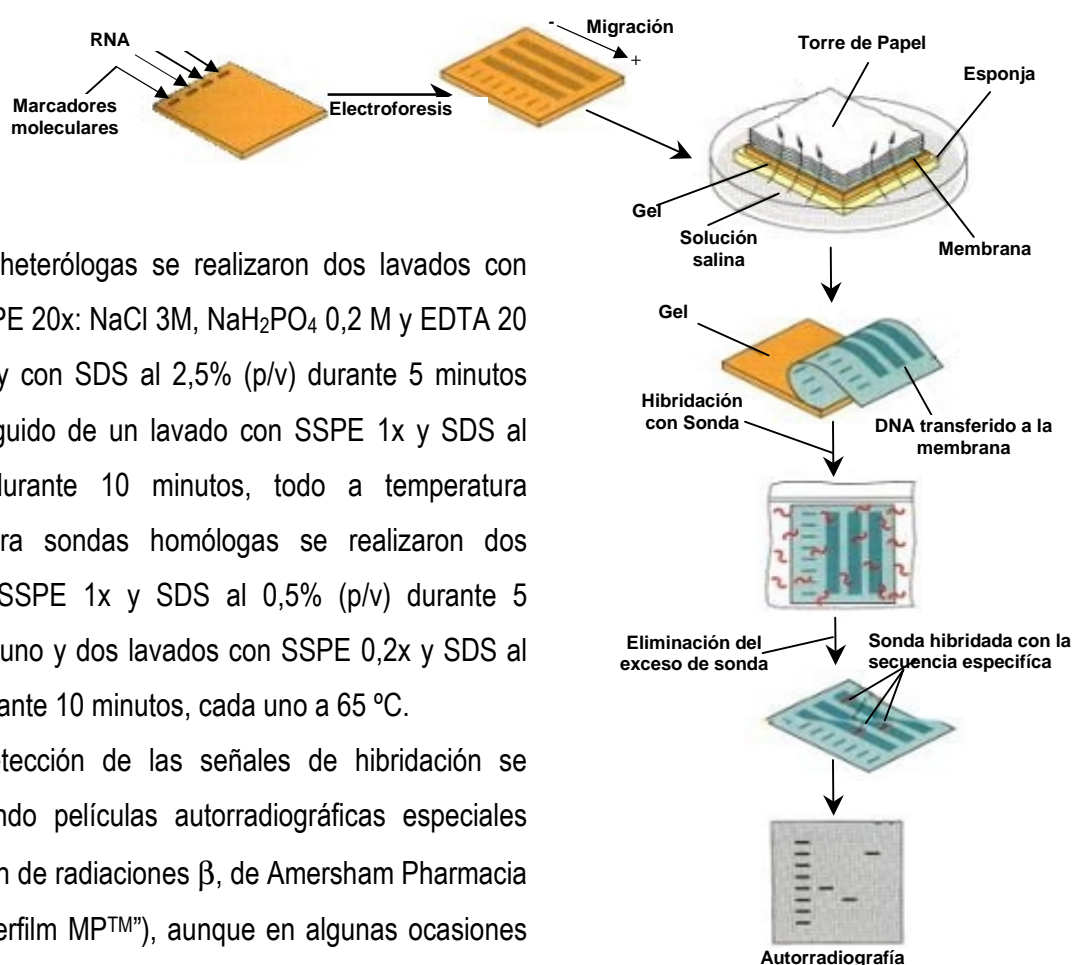
ADN marcado como sonda, se volvió a calentar a 95 °C durante 5 minutos y se puso en hielo otros cinco minutos. A continuación se añadió esta sonda marcada a la solución de hibridación (14 µl por cada 5 ml de solución de hibridación).

3.28.4. Proceso de Detección de ARNm

Para la prehibridación e hibridación se siguió el método de Church y Gilbert (1984) con algunas modificaciones. Las membranas se colocaron en los tubos de hibridación y se enjuagaron con agua-DEPC, tras lo cual se prehibridaron con 10-15 ml de solución de hibridación (fosfato sódico 0,5 M, pH 7,1, EDTA 2 mM, SDS 7% (p/v) y pirofosfato sódico al 0,1% (p/v)).

Los tubos se introdujeron en el horno de hibridación durante dos horas a una temperatura de 65°C (para sondas homólogas) o de 42°C (para sondas heterólogas). Después se sustituyó la solución por una nueva que contenía la sonda marcada con ³²P, obtenida tal y como se indicó en el apartado anterior, y se incubaron los tubos a la misma temperatura durante toda la noche.

Fig. 3.5 Técnica de Northern-blot



Para sondas heterólogas se realizaron dos lavados con SSPE 5x (SSPE 20x: NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0,2 M y EDTA 20 mM, pH 7,4) y con SDS al 2,5% (p/v) durante 5 minutos cada uno, seguido de un lavado con SSPE 1x y SDS al 0,5% (p/v) durante 10 minutos, todo a temperatura ambiente. Para sondas homólogas se realizaron dos lavados con SSPE 1x y SDS al 0,5% (p/v) durante 5 minutos cada uno y dos lavados con SSPE 0,2x y SDS al 0,1% (p/v) durante 10 minutos, cada uno a 65 °C.

La detección de las señales de hibridación se realizó utilizando películas autorradiográficas especiales para la emisión de radiaciones β, de Amersham Pharmacia Biotech ("Hyperfilm MP™"), aunque en algunas ocasiones se utilizó un "Fosfo-Imager" de la casa comercial Bio-Rad (GS-505) y un detector de la misma casa (GS-525).

RESULTADOS

4.1. EFECTO DEL CADMIO EN PLANTAS COMPLETAS Y HOMOGENADOS DE GUISANTE

Con el fin de seleccionar la concentración adecuada de Cd^{2+} para abordar posteriores estudios bioquímicos y subcelulares, se efectuó un análisis inicial del efecto de diferentes concentraciones de Cd^{2+} sobre algunos parámetros fisiológicos y el metabolismo oxidativo. Para ello, se cultivaron plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) con concentraciones crecientes de CdCl_2 (0-50 μM), según se ha indicado en el primer apartado de Material y Métodos.

4.1.1. Parámetros Fisiológicos

La producción de biomasa vegetal, expresada como peso fresco del brote junto con la raíz, se encontraba afectada de forma significativa ($P < 0,01$) por los niveles de Cd^{2+} aplicados en la solución nutritiva (Tabla 4.1). La mayor producción correspondía al crecimiento en ausencia de Cd, mientras que el mayor nivel aplicado de Cd^{2+} (50 μM) determinaba la menor cosecha y se observaba una disminución progresiva de la misma en función del nivel de cadmio aplicado a la solución nutritiva, si bien las diferencias de los tratamientos con 10 y 20 μM de Cd^{2+} no eran significativas con respecto al control. El efecto de los tratamientos sobre el desarrollo del área foliar resultaba ser altamente significativo ($P < 0,001$). También en este caso, la mayor superficie foliar correspondía a la ausencia de Cd^{2+} , mientras que la menor superficie correspondía al tratamiento con Cd^{2+} 50 μM (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Efecto del CdCl_2 sobre el crecimiento de plantas de guisante. Los resultados son medias de cuatro experimentos diferentes. Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0,05$) según el test de Duncan para variables múltiples. g.p.f., gramos de peso fresco; g.p.s., gramos de peso seco

CdCl_2 (μM)	Brote (g.p.f./planta)	Brote (g.p.s./planta)	Área foliar (cm^2)	Hojas (g.p.s.)	Tallos (g.p.s.)	Raíces (g.p.s.)
0	270,0 ^a	24,48 ^a	4340 ^a	9,95 ^a	8,54 ^a	5,98 ^{ab}
10	234,5 ^{ab}	22,04 ^{ab}	3861 ^a	8,69 ^a	7,21 ^b	6,14 ^{ab}
20	212,4 ^{abc}	18,74 ^{bc}	3013 ^b	6,98 ^b	5,51 ^c	6,76 ^a
30	201,7 ^{bc}	17,39 ^c	2633 ^b	6,23 ^{bc}	4,46 ^{cd}	6,70 ^a
40	170,6 ^{cd}	15,44 ^{cd}	2410 ^b	5,36 ^c	4,28 ^{cd}	5,80 ^{ab}
50	128,8 ^d	12,44 ^{cd}	1595 ^c	3,89 ^d	3,87 ^d	4,39 ^c

Resultados

La aplicación de diferentes niveles de cadmio a la solución nutritiva ejercía también un efecto altamente significativo ($P < 0,001$) sobre el peso seco de las hojas de guisante, así como de los tallos (Tabla 4.1). El mayor crecimiento correspondía al cultivo realizado en ausencia de cadmio, y su disminución empezaba a ser significativa en los tallos con $10 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , mientras que en hojas la reducción comienza con $20 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . Por el contrario, el crecimiento de la raíz en peso seco, no experimentaba ningún efecto significativo como consecuencia del tratamiento con cadmio, exceptuando la concentración de $50 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} que producía una disminución significativa con respecto a los demás tratamientos (Tabla 4.1). A esta concentración de cadmio se apreciaba una reducción especialmente de las raíces laterales, así como un oscurecimiento o pardeamiento de las mismas (Fig. 4.1 B).

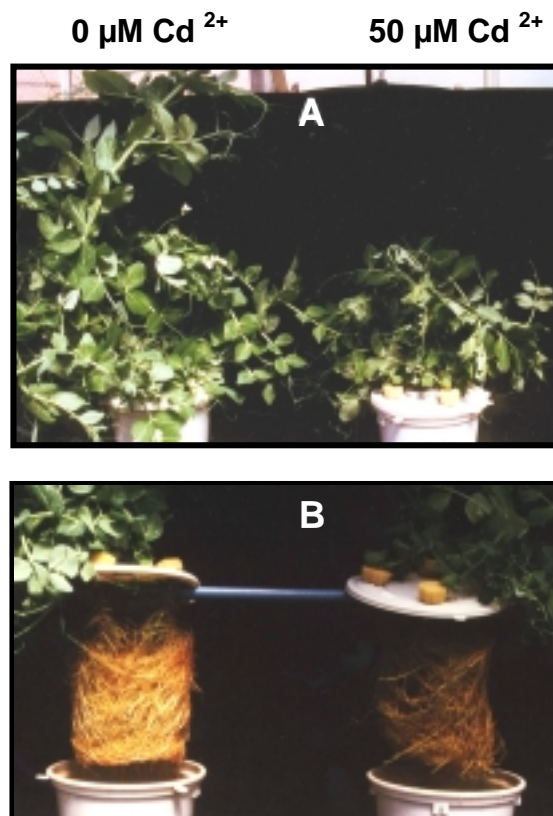


Fig. 4.1 Efecto del CdCl_2 sobre el crecimiento de plantas de guisante. A) Efecto sobre la parte aérea; B) Efecto sobre raíces

La inhibición del crecimiento iba acompañada de una disminución significativa en la tasa fotosintética, expresada en μM de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 4.2). A medida que se iba incrementando el aporte de Cd a la solución nutritiva, se manifestaba una progresiva disminución de la tasa fotosintética, que se encontró muy acusada (de hasta seis veces) en las plantas tratadas con $50 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . La transpiración de las plantas, expresada en mM de $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, también se veía afectada de forma altamente significativa

($P < 0,001$) por la concentración de Cd^{2+} en la solución nutritiva, existiendo una disminución progresiva de la misma a medida que se incrementaba el tratamiento (Tabla 4.2). La eficiencia del uso del agua por el cultivo, como consecuencia de una mayor concentración de Cd en el medio de cultivo, mostraba disminuciones altamente significativas ($P < 0,001$) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Efecto del tratamiento con CdCl_2 sobre la fotosíntesis neta, la eficiencia en el uso del agua y transpiración de plantas de guisante. Los resultados que se presentan son media de 12 réplicas y los valores seguidos de la misma letra no son diferentes de forma significativa ($P < 0,05$) según el test de Duncan.

CdCl_2 (μM)	Tasa fotosintética ($\mu\text{M CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Eficiencia en el uso del agua ($\text{nmol CO}_2 \text{ mM}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	Tasa de transpiración ($\text{mM H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
0	12,20 ^a	4872 ^a	2,52 ^a
10	8,48 ^b	3970 ^b	2,14 ^b
20	6,46 ^c	3625 ^c	1,79 ^c
30	5,03 ^d	3052 ^d	1,65 ^d
40	4,14 ^e	2492 ^e	1,66 ^d
50	1,84 ^f	1318 ^f	1,42 ^e

En las plantas tratadas con Cd^{2+} también se observó una reducción en el contenido de clorofila de las hojas que era dependiente de la concentración de Cd^{2+} en la solución nutritiva, y esta disminución era significativa a partir del segundo tratamiento (20 μM) con respecto al control (Fig. 4.2).

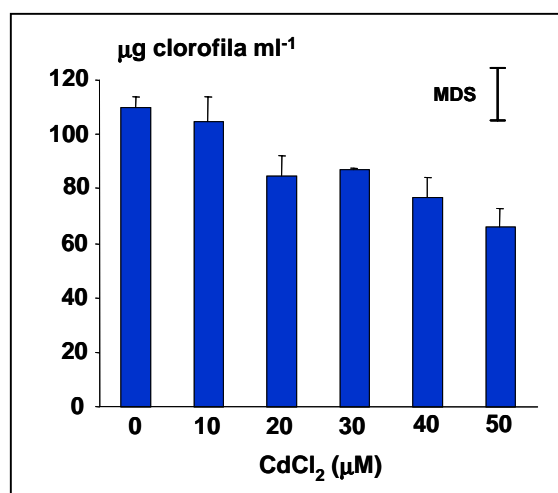


Fig. 4.2 Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila de las hojas de guisante. Cada valor representa una media de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la media (ESM). MDS es la mínima diferencia significativa según el test de Duncan ($P < 0,05$).

4.1.2. Distribución de Nutrientes en la Planta

En hojas y raíces de plantas de guisante, cultivadas con diferentes concentraciones de cadmio, se llevó a cabo el análisis del contenido de metales y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Efecto del tratamiento con CdCl₂ sobre el contenido de metales en hojas y en raíces de plantas de guisante. Los resultados se expresan como µg totales de metal en el tejido y son media de cuatro réplicas. Los valores seguidos de la misma letra no son diferentes de forma significativa (P<0,05) según el test de Duncan de variable múltiple.

		CdCl ₂ (µM)					
		0	10	20	30	40	50
		µg					
Hojas	Cd	6,00 ^c	59,31 ^{bc}	84,42 ^b	95,70 ^b	115,70 ^b	205,29 ^a
	Cu	33,85 ^a	40,02 ^a	35,22 ^a	32,24 ^{ab}	31,76 ^{ab}	24,58 ^b
	Zn	121,06 ^a	99,92 ^b	86,29 ^{bc}	68,29 ^{cd}	68,90 ^{cd}	53,51 ^d
	Fe	973,51 ^a	914,78 ^{ab}	843,71 ^{ab}	795,24 ^{ab}	779,03 ^{ab}	695,82 ^b
	Mn	4209,42 ^a	3449,55 ^b	2730,26 ^c	2490,16 ^{cd}	21000,98 ^d	1451,85 ^c
Raíces	Cd	17,4 ^d	6868 ^c	13050 ^b	17600 ^a	19000 ^a	19500 ^a
	Cu	113,41	125,03	140,43	135,36	132,66	117,32
	Zn	760,94 ^b	1022,09 ^{ab}	1265,05 ^a	1050,93 ^{ab}	1017,85 ^{ab}	782,19 ^b
	Fe	3938,8	4205,5	4595,1	4596,1	4132,5	3430,4
	Mn	3788,5 ^a	3786,7 ^a	4049,8 ^a	3964,3 ^a	3445,5 ^{ab}	2475,1 ^b

El cadmio se acumulaba preferentemente en la raíz aunque la capacidad para acumular el metal dependía de la concentración de Cd^{2+} en el medio. Así, las plantas cultivadas en presencia de Cd^{2+} $10 \mu\text{M}$ eran más eficientes acumulando el metal que las plantas cultivadas con concentraciones superiores, en términos de concentración, esto es, considerando los μg de Cd^{2+} presentes por g de peso seco. Pero, en términos de acumulación, expresados como concentración de Cd^{2+} por g de peso seco, la acumulación de Cd^{2+} en raíces experimentaba un aumento lineal entre 0 y $30 \mu\text{g}$ de Cd^{2+} , alcanzando una meseta entre 30 y $50 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} . En hojas también se observó que la acumulación de Cd^{2+} se incrementaba con la concentración del metal en la solución nutritiva, si bien los valores obtenidos eran del orden de 100-180 veces inferiores a los observados en raíces. El análisis de cadmio en frutos de plantas cultivadas en Cd^{2+} $50 \mu\text{M}$ mostró un acúmulo preferente, de 1,5 veces en el fruto en comparación con la vaina (Tabla 4.4), si bien, esta acumulación suponía un 0,25% del cadmio acumulado en la raíz, en términos de concentración ($\mu\text{g Cd}^{2+} \text{ g}^{-1}$ peso seco).

CdCl_2 (μM)	Fruto	Vaina
	$\mu\text{g Cd g}^{-1}$ p.s.	
0	0,28	0,16
50	4,60	2,98

Tabla 4.4 Contenido de Cd en frutos y vainas de plantas de guisante control y cultivados con Cd^{2+} ($50 \mu\text{M}$)

El contenido de Zn en hojas disminuía conforme aumentaba el Cd^{2+} en la solución nutritiva, aunque en raíces no había diferencias significativas con respecto al control. El contenido total de Fe experimentaba una disminución con concentraciones crecientes de Cd^{2+} aunque las diferencias fueron significativas sólo en las hojas del tratamiento con cadmio $50 \mu\text{M}$, mientras que en raíces no se apreciaron diferencias significativas. El contenido total de Mn en hojas mostraba una disminución lineal y significativa con el tratamiento de Cd^{2+} , mientras que en raíces sólo se observó una reducción significativa con la mayor concentración de cadmio. El contenido total de Cu no experimentaba cambios significativos en raíces, y en hojas sólo se observó una reducción significativa con el tratamiento de CdCl_2 $50 \mu\text{M}$.

Resultados

La distribución de macronutrientes también experimentaba cambios dependientes del cadmio como se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de macronutrientes en hojas y en raíces de plantas de guisante. Los resultados se expresan como mg totales y son media de cuatro réplicas. Los valores seguidos de la misma letra no muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) según el test de Duncan de variable múltiple.

		CdCl ₂ (μM)					
		0	10	20	30	40	50
		mg					
Hojas	N	526,11 ^a	344,22 ^b	299,06 ^{bc}	269,05 ^{bc}	235,90 ^{cd}	169,20 ^d
	P	46,55 ^a	34,16 ^b	20,84 ^c	25,63 ^{bc}	27,70 ^{bc}	18,37 ^c
	K	441,93 ^a	428,19 ^a	305,60 ^b	304,17 ^b	226,51 ^c	117,60 ^c
	Ca	230,15 ^a	179,94 ^b	162,32 ^{bc}	133,53 ^{cd}	132,90 ^{cd}	99,51 ^d
	Mg	50,35 ^a	47,62 ^{ab}	41,42 ^{bc}	35,95 ^c	34,86 ^c	26,53 ^d
Raíces	N	180,31 ^c	260,11 ^{ab}	295,96 ^a	283,54 ^a	222,84 ^{bc}	199,94 ^{bc}
	P	50,48 ^{abc}	52,28 ^{ab}	62,64 ^a	55,22 ^{ab}	43,05 ^{bc}	37,04 ^c
	K	532,40 ^{ab}	489,00 ^{ab}	625,82 ^a	568,74 ^{ab}	470,59 ^b	304,28 ^c
	Ca	147,13 ^{ab}	149,15 ^a	156,16 ^a	140,99 ^{ab}	108,46 ^{ab}	96,13 ^b
	Mg	68,17 ^a	40,26 ^{bc}	44,45 ^{abc}	50,74 ^{ab}	34,73 ^{bc}	23,36 ^c

El contenido total de Mg se encontraba disminuído de forma significativa, tanto en hojas como en raíces con los distintos tratamientos de Cd²⁺. El contenido de Ca sólo disminuía de forma significativa en hojas. En raíces el N aumentaba ligeramente con el tratamiento, pero en hojas su contenido disminuía de forma significativa y progresiva con el tratamiento de cadmio. Los contenidos de K y P en hojas disminuían con todos los tratamientos de cadmio, mientras que en raíces el contenido de P aumentaba entre 0 y 30 µM de Cd²⁺, aunque no de forma significativa, y se reducía con Cd²⁺ 40 y 50 µM. A su vez, el K en raíces disminuía de forma significativa con la mayor concentración de Cd²⁺ (50 µM).

4.1.3. Estudios Ultraestructurales

4.1.3.1. Efecto del Cadmio sobre la Estructura y Ultraestructura de Hojas de Guisante

Con objeto de determinar posibles daños en la estructura foliar de las plantas, se realizaron cortes transversales de las hojas procedentes de plantas control y tratadas con cadmio 50 µM, para su posterior observación a microscopía óptica. Como se puede apreciar en la Fig. 4.3, se producía una disminución del espacio intercelular en los cortes procedentes de plantas tratadas, así como un aumento del tamaño de las células, en especial, de las del tejido en empalizada, como se deduce del estudio citométrico (Tabla 4.6). Además, se observa un descenso en el número y tamaño de los cloroplastos como consecuencia del tratamiento con el metal (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Efecto del tratamiento con cadmio sobre el tamaño de las células y el número de cloroplastos de hojas de guisante. Los valores presentados son media de tres cortes transversales de hojas de guisante diferentes \pm ESM (error estándar de la media). Los resultados seguidos de la misma letra no son diferentes de forma significativa ($P < 0,05$) utilizando el test de Duncan para variables múltiples. El tamaño de las células está expresado en unidades arbitrarias (u.a.).

CdCl ₂ (µM)	Tipo de célula	Tamaño celular (u.a.)	Número de cloroplastos por célula
0	Empalizada	1,46 \pm 0,09 ^b	12,18 \pm 0,35 ^a
50	Empalizada	2,52 \pm 0,17 ^a	9,06 \pm 0,39 ^b
0	Mesófilo	1,18 \pm 0,04 ^b	9,56 \pm 0,08 ^a
50	Mesófilo	1,54 \pm 0,04 ^a	8,20 \pm 0,27 ^b

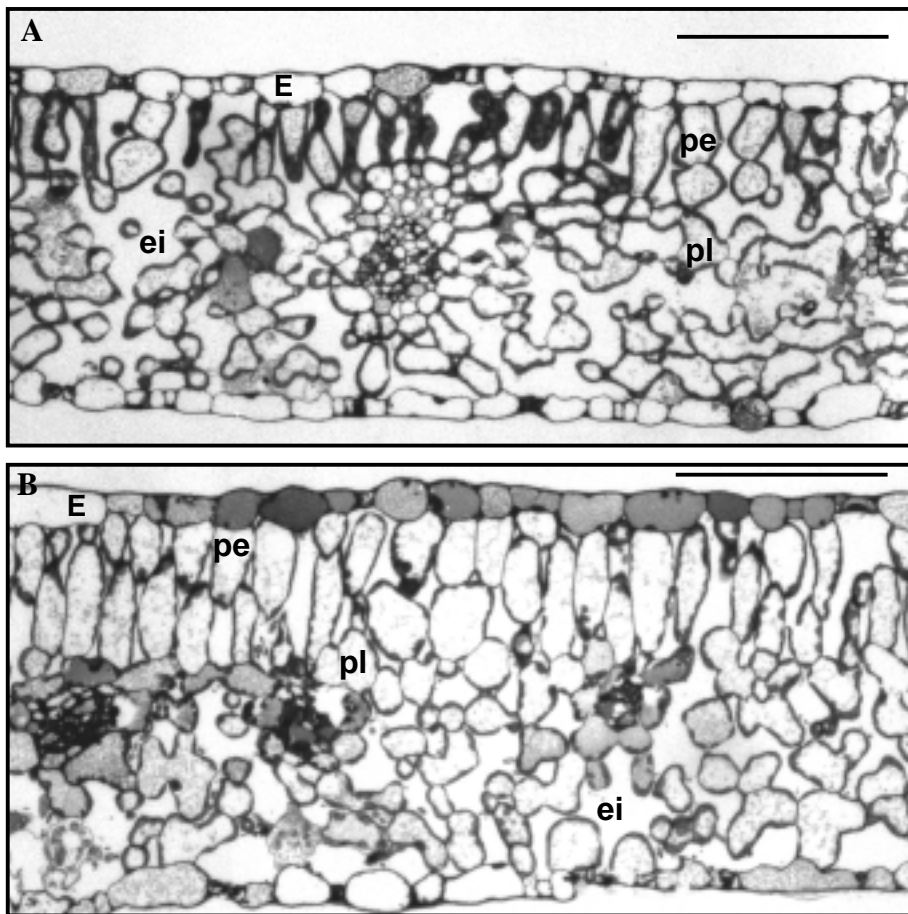


Fig. 4.3 Efecto del tratamiento con cadmio en la estructura de las hojas de guisante. Fotografías de un corte transversal de hojas de guisante al microscopio óptico. A) corte de hojas de plantas control y B) corte de hojas de plantas crecidas con CdCl₂ 50 μM. E: epidermis, pe: parénquima en empalizada, pl: parénquima lagunar, ei: espacio intercelular. La barra representa 100 μm.

Para profundizar un poco más en estos daños observados en la estructura, se realizó un estudio a microscopía electrónica donde se pusieron de manifiesto las alteraciones causadas por el tratamiento, como son: desorganización de las membranas tilacoidales (Fig. 4.4 C), incremento del número y tamaño de los plastoglóbulos (Fig. 4.4 B y C) y del tamaño de los gránulos de almidón en cloroplastos (Fig.4.4 B y C). Además, se observaron invaginaciones del tonoplasto (fig. 18 D), formación de bandas de mielina (Fig. 4.4 E) y condensación del núcleo como consecuencia del tratamiento con Cd²⁺ (Fig. 4.4 F).

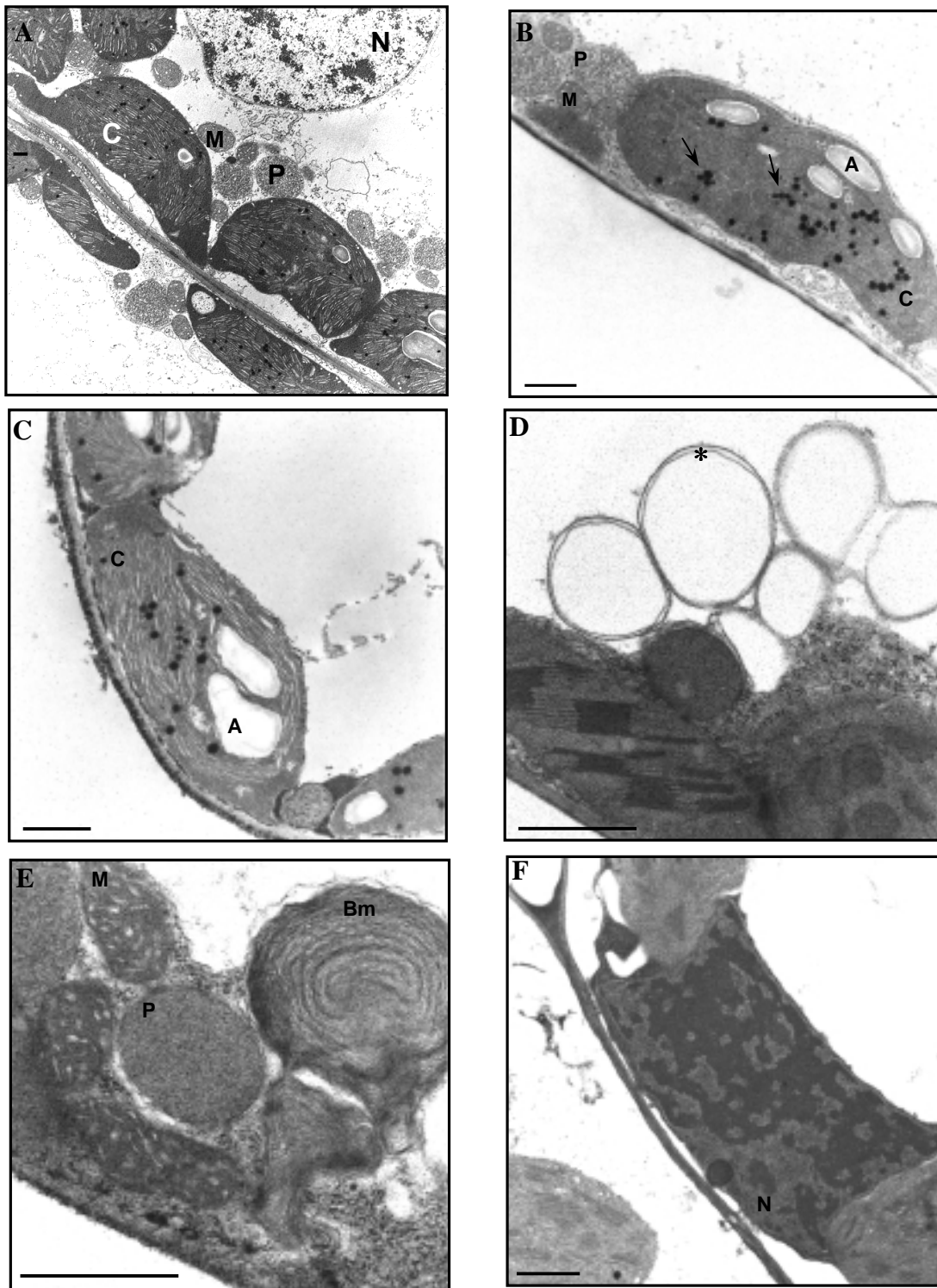


Fig. 4.4 Efecto del tratamiento con CdCl_2 $50 \mu\text{M}$ en la ultraestructura de hojas de guisante. A) Micrografía al microscopio electrónico de transmisión de un corte de hoja de guisante control. B-F) Micrografías al microscopio electrónico de transmisión de cortes de hojas de guisante cultivadas con Cd ($50 \mu\text{M}$). C: cloroplasto; M: mitocondria; Bm: bandas de mielina; N: núcleo; P: peroxisoma; A: gránulos de almidón; la flecha señala plastoglóbulos y el asterisco, invaginaciones del tonoplasto. La barra representa $1 \mu\text{m}$.

Resultados

El análisis de la cara abaxial de las hojas de guisante con el microscopio electrónico de barrido muestra un mayor número de estomas cerrados en las hojas procedentes de las plantas tratadas con cadmio comparado con las hojas control, como se aprecia en la Fig. 4.5.

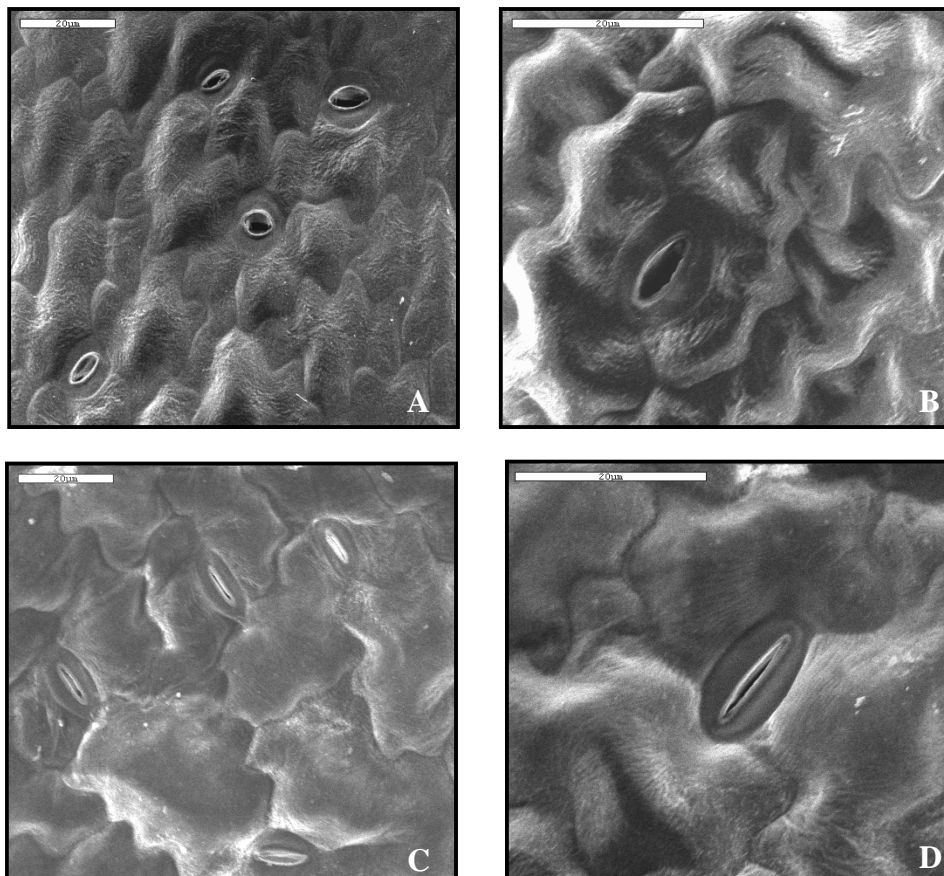


Fig. 4.5 Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de la superficie abaxial de hojas de guisante control (A y B) y tratadas con Cd^{2+} (C y D). La barra representa 20 μm

4.1.3.2. Localización de Acúmulos de Cadmio

Para localizar la presencia de acúmulos de cadmio a nivel subcelular en hojas de guisante, se prepararon muestras para su observación en un microscopio Philips HRT de 200 kV con sistema microanalítico EDAX, tal y como se indica en el apartado 3.27.3 de Material y Métodos.

Se procedió a la inmovilización de cationes, bien con piroantimoniato potásico, o con Na_2S . El tratamiento con piroantimoniato dio lugar a la formación de precipitados densos a los electrones que se observaron tanto en hojas como en raíces procedentes de plantas control y tratadas con Cd^{2+} . Sin embargo, el número de estos precipitados era mayor en las plantas tratadas con el metal (Fig. 4.6 A-F), aunque no se detectó la presencia de cadmio en estos precipitados al realizar el microanálisis, probablemente debido a que la concentración de cadmio era inferior al umbral de detección del HRTM

(Fig. 4.6 G y H). En las plantas tratadas con Na_2S , no se detectaron precipitados específicos por lo que tampoco fue posible determinar acúmulos de cadmio.

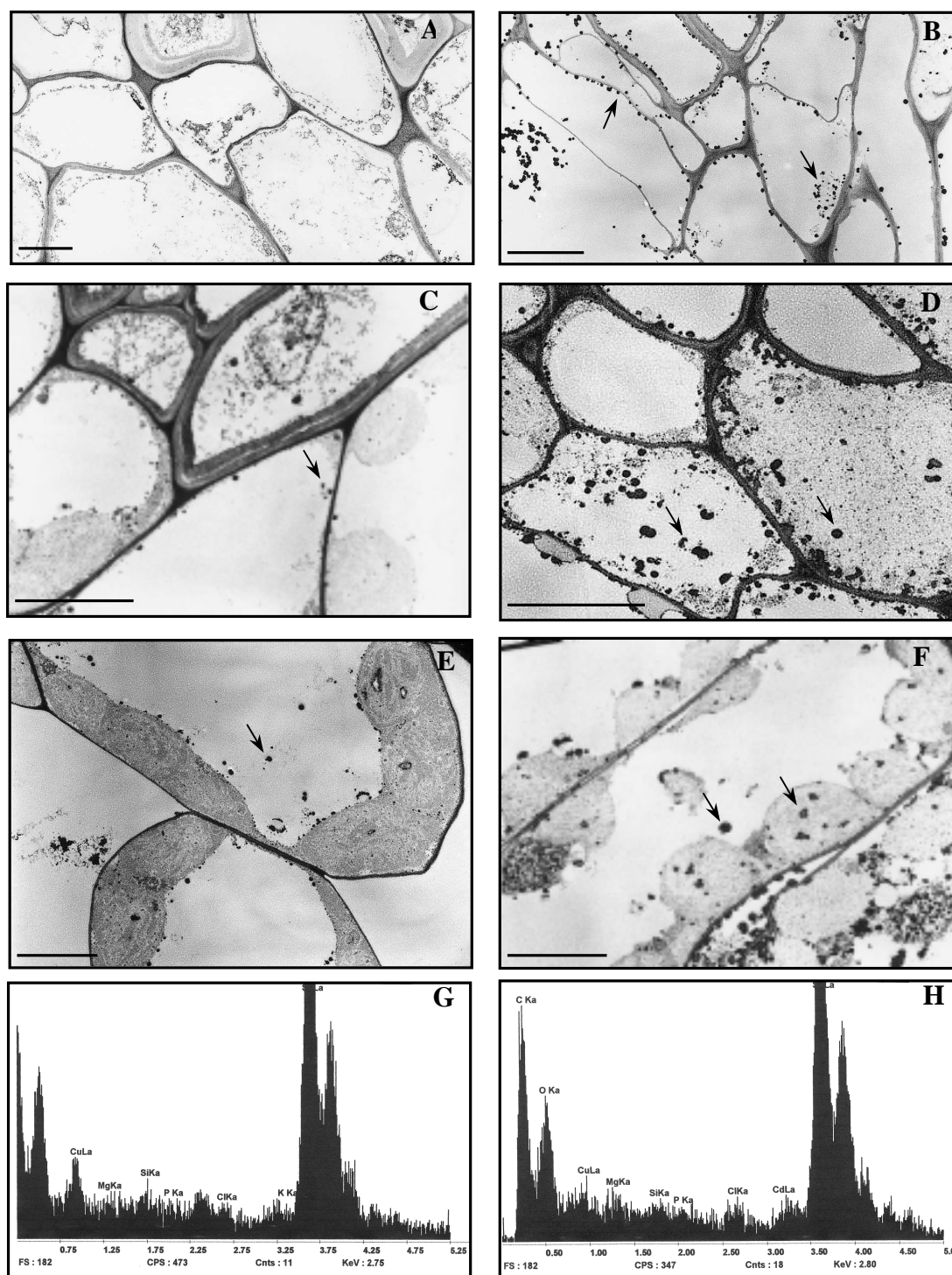


Fig. 4.6 Micrografías electrónicas de raíces control (A) y tratadas con Cd (B), y hojas de guisante control (C y E) y tratadas con cadmio (D y F). G y H: análisis microanalítico de un acúmulo representativo, tras las inmovilización de cationes en hojas control y tratadas con Cd, respectivamente. En C y D se muestran células de transferencia, y en E y F células del parénquima en empalizada. Las flechas indican estos acúmulos y la barra representa 5 μm

4.1.4 Estudios en Homogenados

4.1.4.1. Efecto del Cadmio sobre el Contenido de Proteínas

En homogenados de hojas de plantas tratadas con las concentraciones mayores de cadmio (40 y 50 μM) se encontró un incremento significativo en el contenido de proteínas (Fig. 4.7 A). Sin embargo parece que este incremento no era específico ya que el patrón de proteínas en todos los tratamientos era muy similar según se observaba en la tinción de proteínas separadas por EGPA-SDS al 12% (Fig. 4.7 B). Incluso se observó una reducción en la intensidad de las bandas de proteínas entre 20 y 40 kDa en los extractos de plantas crecidas con 40 y 50 μM de Cd^{2+} .

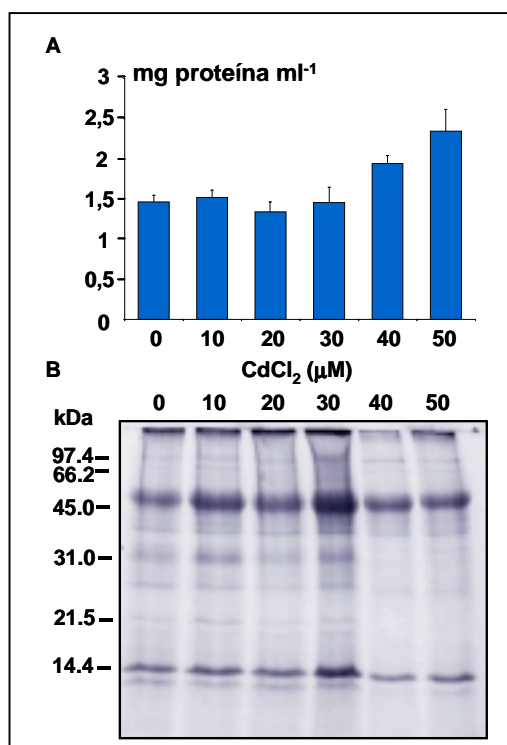


Fig. 4.7 Efecto del tratamiento con Cd^{2+} sobre el contenido de proteínas en hojas de plantas de guisante.

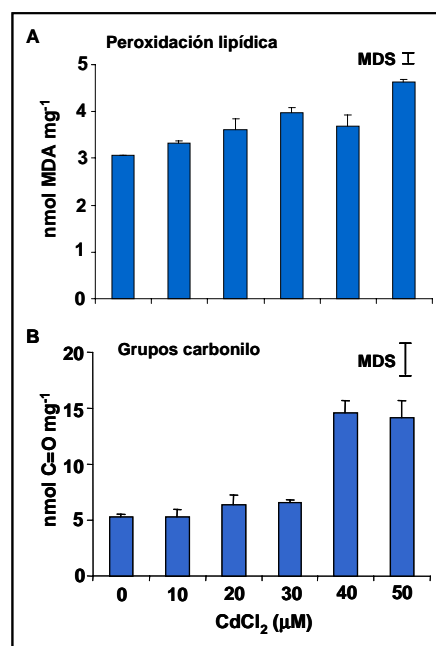
A) Concentración de proteínas medidas por el método de Bradford. Los valores son media de cuatro medidas independientes \pm ESM, siendo las diferencias significativas en los dos últimos tratamientos con respecto a los anteriores ($P < 0,001$),

B) Patrón de proteínas de extractos de hojas de guisante. Las proteínas (20 μg) se separaron mediante EGPA-SDS al 12% y se tiñeron con azul de Coomassie. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda

4.1.4.2. Metabolismo del Oxígeno Reactivo en Hojas

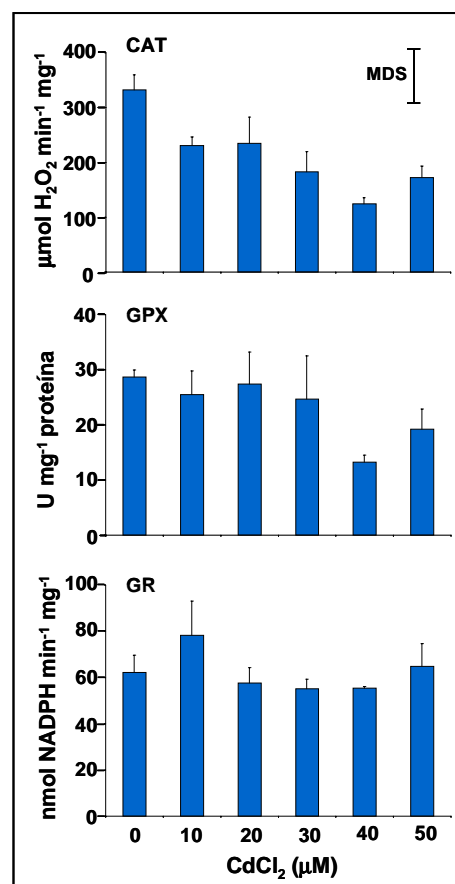
Como marcador de estrés oxidativo se determinó la tasa de peroxidación lipídica. Para ello se analizó el contenido de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). En la Fig. 4.8 A se puede apreciar un aumento lineal del contenido de TBARS con la concentración de cadmio aplicada a la solución nutritiva. Como un índice adicional de estrés oxidativo, se estudió el contenido de grupos carbonilo en proteínas, como marcador de la modificación oxidativa de las mismas. El contenido en grupos carbonilo se incrementaba ligeramente en los tratamientos de 20 y 30 μM de Cd^{2+} y de una forma significativa en los tratamientos de 40 y 50 μM de Cd^{2+} con respecto al control y tratamientos inferiores (Fig. 4.8 B).

Fig. 4.8 Efecto del tratamiento con cadmio sobre la tasa de peroxidación lipídica (A) y sobre el contenido de grupos carbonilo (B) en extractos de hojas de guisante. Cada valor representa una media de cuatro medidas independientes \pm ESM. MDS es la mínima diferencia significativa con $P < 0,05$, en ambos casos.



En extractos crudos de hojas de guisante las actividades enzimáticas antioxidantes catalasa y guayacol peroxidasa mostraban una disminución al aumentar la concentración de cadmio en la solución nutritiva aunque estos cambios fueron significativos sólo en el caso de la catalasa (Fig. 4.9). Por otro lado, la actividad glutatión reductasa no se veía afectada de forma significativa por el tratamiento de cadmio, si bien experimentaba un ligero aumento con Cd 10 μM, como se observa en la Fig. 4.9.

Fig. 4.9 Efecto del tratamiento con cadmio sobre enzimas antioxidantes en extractos crudos de hojas de guisante (CAT: catalasa; GPX: guayacol peroxidasa; GR: glutatión reductasa). Cada valor representa la media de cuatro réplicas \pm ESM. MDS es la mínima diferencia significativa con $P < 0,05$. En el caso de las actividades GR y GPX, las diferencias entre tratamientos no son significativas.



Resultados

El análisis de la actividad catalasa en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, mostró una única banda amplia que disminuía ligeramente con el tratamiento de Cd^{2+} (Fig. 4.10 A). Las bandas de actividad correspondientes a los extractos de Cd^{2+} 40 y 50 μM experimentaban además un ligero cambio de movilidad hacia la zona más catódica. El análisis de las muestras mediante IEF reveló la existencia de tres bandas (CAT) con puntos isoeléctricos (pI) comprendidos entre 6,0 y 6,5 según se muestra en la figura 4.10 B y que serán estudiadas con mayor profundidad en el apartado de resultados de peroxisomas. El tratamiento con Cd^{2+} 40 y 50 μM producía una reducción de las bandas más ácidas. El análisis del contenido de proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos mostró una disminución de catalasa proporcional a la concentración de Cd^{2+} , llegando a disminuir hasta un 50 % con 50 μM de cadmio (Fig. 4.10 C).

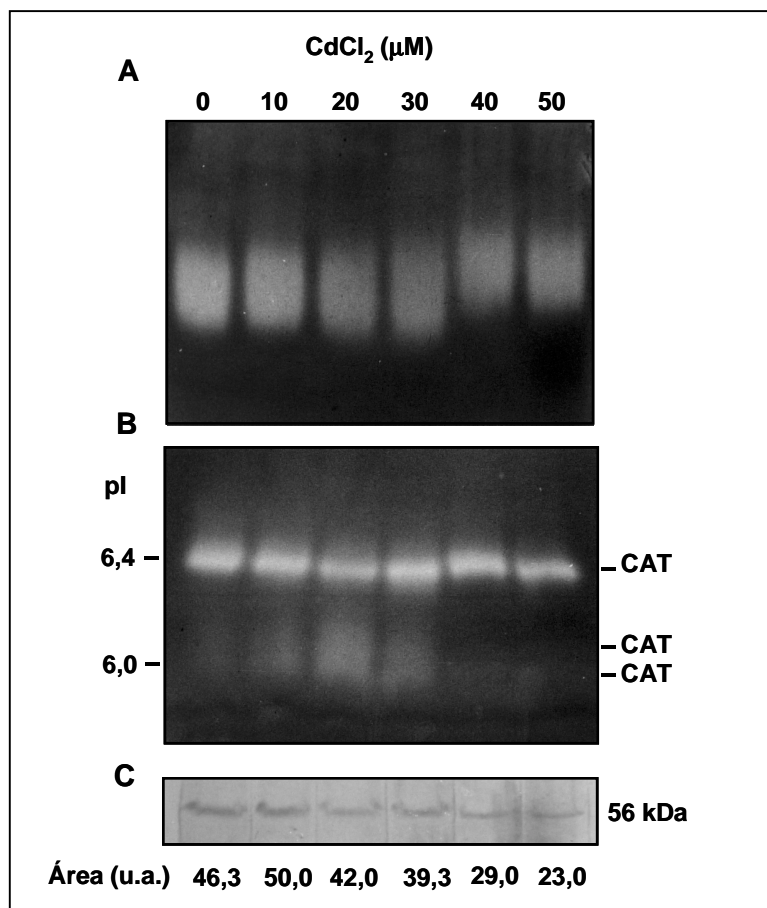


Fig. 4.10 Efecto del cadmio sobre la actividad catalasa en extractos de hojas de guisante. A) EGPA nativa en geles al 6%. Se cargaron 4 μg de proteínas y la actividad de catalasa se localizó con el método del ferricianuro. B) IEF en gel de poliacrilamida al 5% de extractos crudos (4 μg de proteína). La actividad catalasa se detectó con DAB. C) Detección de la proteína mediante Western utilizando un anticuerpo frente a catalasa de pepino (1/1000). El área se presenta en unidades arbitrarias y es resultado de la densitometría de las bandas obtenidas.

Respecto a la actividad SOD, la medida de la actividad total en extractos crudos mediante el método del citocromo *c* estaba sujeto a interferencias por algún componente del extracto dado que, en ausencia de xantina oxidasa el citocromo *c* era reducido, aumentando la tasa de reducción con concentraciones crecientes de Cd^{2+} (Fig. 4.11). Sin embargo, el análisis del patrón de isoenzimas mediante EGPA nativa, mostró que el cadmio producía una disminución de la actividad de todas las isoenzimas, incluso a la concentración más baja, como se muestra en la Fig. 4.12 A. Las isoenzimas más afectadas eran las dos CuZn-SOD, especialmente la citosólica (CuZn-SOD I) cuya actividad disminuía un 80% con el tratamiento con Cd^{2+} 10 μM y casi desaparecía con Cd^{2+} 40 μM . La actividad de la CuZn-SOD II (cloroplastídica) se reducía en un 60% y un 95% con Cd^{2+} 10 μM y 50 μM , respectivamente. Esta disminución de la actividad iba acompañada de una reducción de la cantidad de proteína, detectada mediante Western usando el anticuerpo frente a la CuZn-SOD de sandía (Fig. 4.12 B). La actividad Fe-SOD también experimentaba una reducción con la concentración de Cd, aunque menos acentuada que la de la CuZn-SOD. A su vez, la isoenzima Mn-SOD era la más resistente y tan sólo experimentaba una reducción de un 40% con 40 y 50 μM de cadmio.

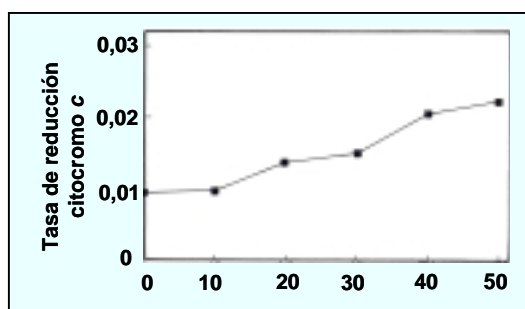


Fig. 4.11 Tasa de reducción del citocromo *c* en extractos crudos de hojas de guisante cultivados con distintas concentraciones de Cd^{2+}

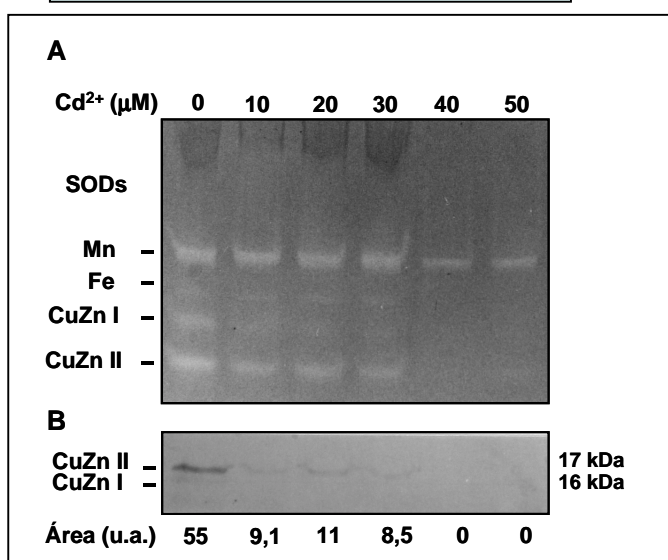


Fig. 4.12 Efecto del cadmio sobre la actividad de las isoenzimas de SOD de hojas de guisante.

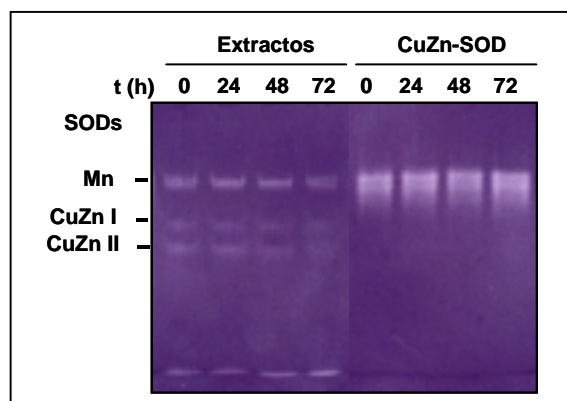
A) EGPA nativa al 10%. Se cargaron en el gel 90 μg de proteínas por pocillo y la actividad SOD se localizó mediante un método fotoquímico.

B) Detección de la proteína CuZn-SOD mediante Western y con el anticuerpo frente a la enzima de sandía (dilución 1/500). El área se calculó por fotodensitometría y se expresa en unidades arbitrarias.

Resultados

Para determinar si el cadmio podría ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la actividad SOD, se procedió a la incubación de CuZn-SOD comercial, de eritrocitos bovinos (Sigma), así como de extractos crudos de hojas de guisante, con CdCl_2 100 μM durante 24, 48 y 72 h. El análisis de la actividad SOD mediante EGPA nativa mostró la ausencia de cambios en las isoenzimas de SOD por efecto de la incubación con Cd^{2+} (Fig. 4.13).

Fig. 4.13 Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad SOD de extractos crudos de hojas de guisante y de la CuZn-SOD pura de eritrocitos bovinos. Las muestras se incubaron 24, 48 y 72 horas con el metal (100 μM).



Sobre la base de los resultados anteriores se seleccionó una concentración de cadmio de 50 μM como la más adecuada para llevar a cabo estudios posteriores bioquímicos y subcelulares, ya que a esta concentración se detectaron cambios importantes en todos los parámetros estudiados sin que la planta mostrara síntomas graves de toxicidad. Hay que mencionar que también se hicieron tratamientos con concentraciones superiores de Cd^{2+} , hasta 400 μM , pero las plantas no eran viables después de pocos días de tratamiento.

En homogenados procedentes de plantas control y cultivadas con Cd^{2+} 50 μM se estudió el efecto del metal sobre las actividades APX y GST. Como se observa en la Fig. 4.14, el cadmio producía un ligero aumento en ambas actividades como consecuencia del tratamiento, si bien las diferencias no eran significativas en el caso de la APX.

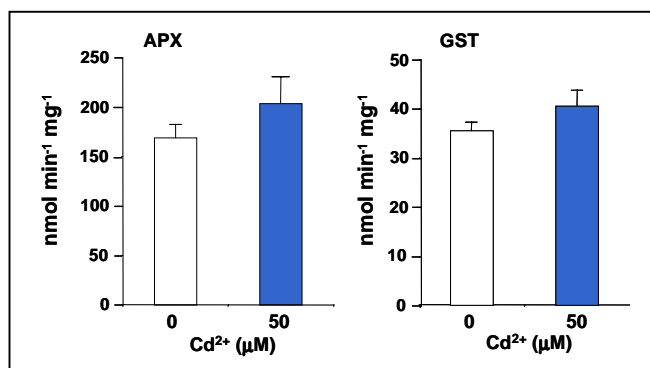


Fig. 4.14 Efecto del tratamiento con cadmio sobre las actividades APX y GST en extractos crudos de hojas de guisante. Los valores presentados son media de tres réplicas \pm ESM y las diferencias son significativas según el test de Duncan ($P < 0,05$) en el caso de la GST. La actividad APX aumenta ligeramente pero las diferencias no son significativas.

4.1.4.3. Determinación de Grupos Tiol (-SH)

En homogenados de hojas de guisante procedentes de plantas control y tratadas con cadmio (50 μM) se estudió el efecto del metal sobre el contenido de grupos tiol proteicos y no proteicos mediante el método del DTNB. En la Tabla 4.7 se observa un ligero aumento en el contenido de grupos tiol totales en las plantas crecidas con el metal. Este incremento era debido fundamentalmente al incremento de los tioles no proteicos, que aumentaban en un 30% respecto a los tioles proteicos, que sólo experimentaban un incremento del 6% con respecto a las plantas control.

Tabla 4.7 Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de grupos tiol totales (proteicos y no proteicos) en extractos de hojas de guisante. Los resultados presentados son media de tres extractos independientes \pm ESM, las diferencias existentes son significativas según el test de Duncan con $P < 0,05$ en el caso de tioles totales y $P < 0,01$ para el resto.

CdCl₂ (μM)	Tioles totales ($\mu\text{g/ml}$)	Tioles no proteicos ($\mu\text{g/ml}$)	Tioles proteicos ($\mu\text{g/ml}$)
0	150,0 \pm 4,5	7,14 \pm 0,45	143,0 \pm 4,5
50	161,9 \pm 2,2	10,01 \pm 0,27	151,85 \pm 2,5

4.1.4.4. Glutation Oxidado y Reducido

En extractos crudos de hojas de guisante se detectaron las formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión mediante HPLC. Como paso previo, se inyectaron patrones comerciales de GSH, GSSG y γ -glutamil glutamato (γ -glu-glu), después de someterlos a tratamiento ácido y derivatizarlos tal y como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Como patrón interno se utilizó γ -glu-glu. Se observó una reducción de algo más del 50% en el contenido de GSH con el tratamiento con cadmio (Tabla 4.8), al igual que ocurre con el contenido total de glutatión (GSH+GSSG). Se encontró también una disminución de la relación entre el glutatión reducido y el oxidado del 47% (Tabla 4.8)

Resultados

Tabla 4.8 Contenido en glutation reducido (GSH), oxidado (GSSG), y total en extractos de hojas. Los valores presentados son media de tres medidas independientes \pm ESM. Las diferencias existentes son significativas según el test de Duncan con $P < 0,001$ para la razón GSH/GSSG y $P < 0,01$ para el resto.

Cd (μ M)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSH/GSSG
	nmol ml ⁻¹			
0	49,33 \pm 4,17	4,77 \pm 0,09	54,10 \pm 4,25	10,30 \pm 0,70
50	22,00 \pm 2,00	3,60 \pm 0,06	25,60 \pm 2,00	6,10 \pm 0,57

4.1.4.5. Ascorbato Reducido

Para la determinación del ácido ascórbico también se utilizó un método de HPLC. Se emplearon diferentes concentraciones de ácido ascórbico comercial como patrones para determinar la concentración del mismo en los extractos ácidos de hojas de guisante. Se observó una ligera, aunque significativa disminución ($P < 0,05$) de la cantidad de ácido ascórbico en las plantas cultivadas con cadmio frente al control (Tabla 4.9).

Cd ²⁺ (μ M)	Ascorbato reducido (μ g ml ⁻¹)
0	9,49 \pm 0,39
50	8,58 \pm 0,32

Tabla 4.9 Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de ascorbato reducido en extractos crudos de hojas de guisante. Los resultados presentados son media de cuatro extractos independientes \pm ESM y las diferencias son significativas según el test de Duncan ($P < 0,05$).

4.1.4.6. Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

Se midió la concentración de H₂O₂ en extractos crudos de hojas de guisante control y problema, mediante un método fluorimétrico utilizando ácido homovanilínico. Como se muestra en la Tabla 4.10, el tratamiento con Cd²⁺ provocaba un aumento del contenido de H₂O₂, de más de 6 veces, respecto a las plantas control.

Tabla 4.10 Efecto del cadmio sobre el contenido de H₂O₂ en extractos crudos de hojas de guisante. Los resultados que se presentan son media de cuatro extractos independientes \pm ESM y las diferencias son significativas según el test de Duncan (P<0,05).

Cd ²⁺ (μ M)	H ₂ O ₂ (μ M)
0	0,23 \pm 0,13
50	1,50 \pm 0,51

4.1.4.7. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas

Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento de las plantas en presencia de Cd²⁺ provocaba un incremento en el contenido de grupos carbonilo de proteínas que llegaba a ser hasta de un 50% con la máxima concentración de Cd²⁺ (50 μ M). Para determinar si el daño oxidativo a proteínas era selectivo, se siguió un método de detección inmunoquímico utilizando un anticuerpo comercial frente a la dinitrofenilhidrazona (DNPH). Para ello, las proteínas de los extractos se derivatizaron con DNPH y se separaron mediante EGPA-SDS tras lo cual fueron transferidas a una membrana de PVDF. La detección de las proteínas derivatizadas se efectuó utilizando el anticuerpo comercial (Sigma) frente a la DNPH. Como se observa en la Fig. 4.15, tanto en homogenados de hojas de plantas control como en los de plantas tratadas con Cd²⁺, se detectaron proteínas conteniendo grupos carbonilo en un intervalo de peso molecular de 30-120 kDa. Sin embargo, a igualdad de cantidad de proteínas (10 μ g) como lo demuestra la tinción del gel con azul Coomassie, la intensidad de las bandas obtenidas era considerablemente mayor en las plantas tratadas con Cd (Fig. 4.15). La especificidad del anticuerpo se comprobó mediante el uso de controles consistentes en proteínas sin derivatizar con DNPH, las cuales no dieron reactividad alguna con el anticuerpo. El análisis densitométrico de las bandas de reacción con el anticuerpo mostraba un incremento de 1.9 veces en las plantas tratadas con Cd²⁺ frente a las plantas control, próximo al obtenido por el método espectrofotométrico. Tanto en control como en las plantas tratadas, la banda de mayor reactividad era la de 55 kDa, seguida de las bandas de 42, 60, 70 y 120 kDa, siendo las de 42 y 120 kDa las proteínas más afectadas por el tratamiento con Cd.

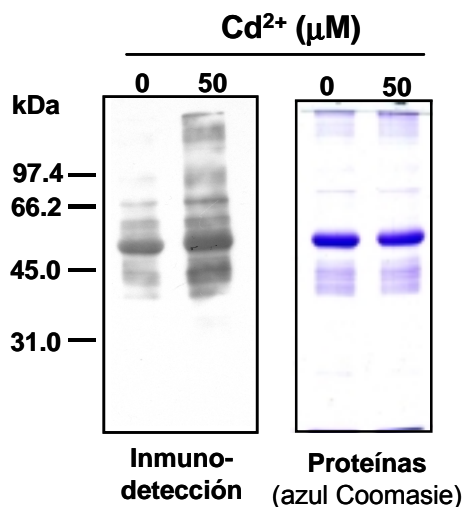


Fig. 4.15 Modificación oxidativa de proteínas en extractos crudos de hojas de plantas control y tratadas con Cd²⁺. Se efectuó la detección inmunoquímica de los grupos carbonilo con un anticuerpo frente a la DNPH (1:40.000) y se usó luminol para el revelado de la reacción. En cada tratamiento se utilizó la misma cantidad de proteínas (10 μg), según se observa en la tinción con azul de Coomassie. Los marcadores moleculares se sitúan a la izquierda.

4.1.4.8. Efecto del H₂O₂ sobre la Formación de Grupos Carbonilo

El peróxido de hidrógeno es un oxidante conocido y uno de los principales productos del metabolismo en distintos orgánulos celulares, lo que hace que sea un buen candidato para participar en los procesos de oxidación de proteínas que estamos estudiando. Para comprobar su relación con el contenido en grupos carbonilo de los extractos, se estudió el efecto de la incubación de extractos de hojas de guisante control, durante dos horas a temperatura ambiente, con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0-20 mM). En la Fig. 4.16 A se observa que con concentraciones crecientes de H₂O₂ tiene lugar el aumento significativo del contenido de grupos carbonilo. El análisis inmunoquímico con el anti-DNPH mostraba un patrón de proteínas oxidadas similar al determinado espectrofotométricamente (Fig. 4.16 B). La intensidad de las bandas de reactividad se incrementaba con la concentración de H₂O₂ añadido al extracto.

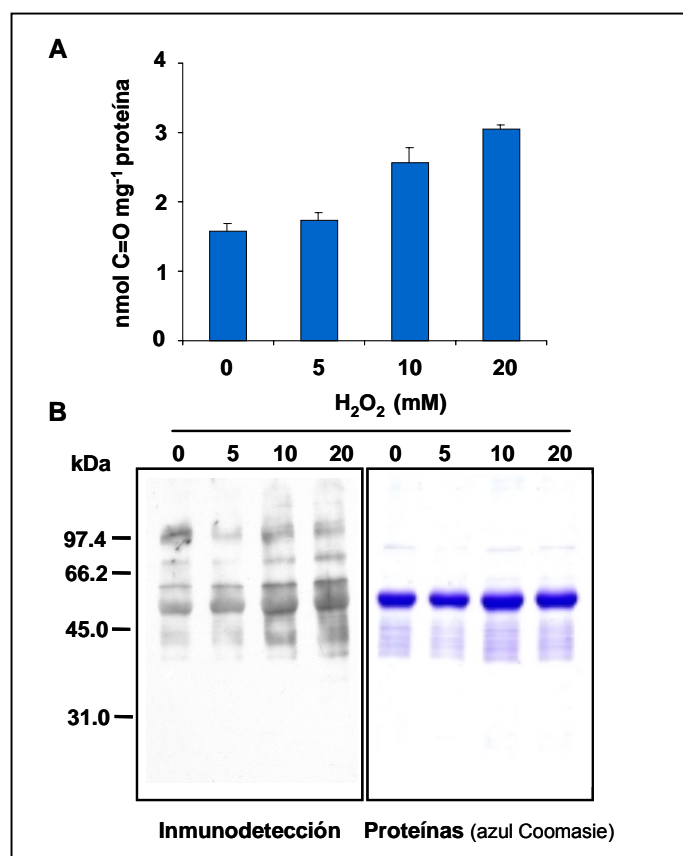


Fig. 4.16 Oxidación de proteínas en extractos crudos de hojas de guisante. Los extractos se incubaron durante dos horas con concentraciones crecientes de H₂O₂ (0-20 mM), tras lo cual se derivatizaron con DNPH. A) Contenido en grupos carbonilo medido por el método espectrofotométrico. Los valores presentados son media de tres muestras diferentes \pm ESM, y las diferencias son significativas para los dos últimos tratamientos con respecto al control con $P < 0,05$. B) Detección inmunoquímica de grupos carbonilos utilizando el anticuerpo frente a DNPH. En todos los tratamientos se utilizó la misma cantidad de proteínas (10 μ g) como se observa en la tinción con azul de Coomassie. Los marcadores de masa molecular se indican en la izquierda.

4.1.4.9. Identificación de Proteínas Modificadas Oxidativamente

Con objeto de profundizar en la identificación de las proteínas oxidadas, se procedió a la inmunoprecipitación con el anti-DNPH de los extractos derivatizados como se indica en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Posteriormente, este precipitado se aplicó en un gel de acrilamida-SDS y se transfirió a una membrana (PVDF) a fin de poder identificar las diferentes proteínas oxidadas con anticuerpos específicos. Como controles se utilizaron muestras sin derivatizar y sin inmunoprecipitar (extractos crudos), muestras sin derivatizar inmunoprecipitadas y muestras derivatizadas sin inmunoprecipitar. En la Fig. 4.17 (carril 4) se puede observar que los anticuerpos frente a GR (57 kDa),

Resultados

CAT (53 kDa) y Mn-SOD (27 kDa) dieron reacción en las proteínas derivatizadas e inmunoprecipitadas procedentes de extractos crudos de hojas tratadas con cadmio, lo que nos hace pensar que estas proteínas están modificadas oxidativamente. La catalasa también dio marcaje en extractos crudos de hojas control (Fig. 4.17, carril 3). Sin embargo, los anticuerpos frente a la CuZn-SOD y la FBPasa no reconocieron ninguna proteína en los inmunoprecipitados de las proteínas derivatizadas ni en plantas control ni en aquéllas cultivadas con cadmio. Excepto en los extractos crudos, no se observó reacción alguna en los controles realizados.

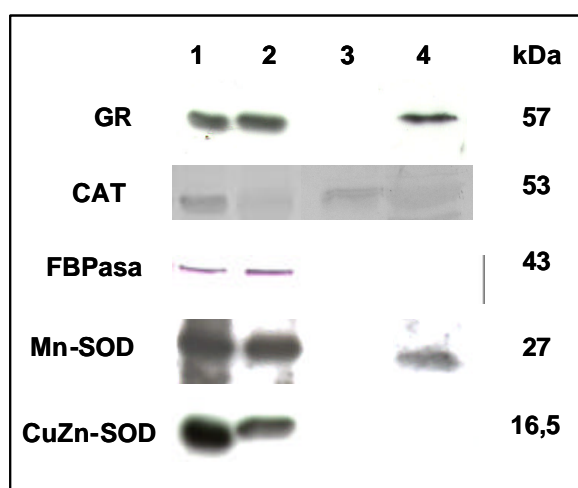


Fig. 4.17 Identificación de proteínas oxidadas en extractos de hojas de guisante. Los extractos fueron derivatizados e inmunoprecipitados con anti DNPH-IgG. Estas proteínas inmunoprecipitadas se cargaron en un gel de poliacrilamida-SDS (12%) y se transfirieron a una membrana de PVDF donde se identificaron diferentes proteínas con sus anticuerpos correspondientes. Líneas 1 y 2, extractos de hojas de plantas control y tratadas con cadmio sin derivatizar, respectivamente; líneas 3 y 4, extractos de hojas de guisante control y cadmio, derivatizados e inmunoprecipitados. Catalasa y FBPasa se revelaron con NBT/BCIP y el resto con luminol. La masa molecular de cada enzima se muestra a la derecha

Por otro lado, según su masa molecular y los datos obtenidos por Western utilizando anticuerpos frente a la Rubisco en extractos de hojas de guisante, la banda mayoritaria de 55 kDa podría corresponder a la subunidad mayor de esta enzima (SM). Como se observa en la Fig. 4.18, numerosas bandas dan reacción positiva frente al anticuerpo de Rubisco tanto en extractos de hojas de guisante control como en los tratados con Cd, y la de 16 kDa que correspondía a la subunidad menor (Sm), también era detectada por el anticuerpo. Los polipéptidos que se detectan entre las dos subunidades podrían corresponder a fragmentos proteolíticos de la subunidad mayor de Rubisco. El contenido de proteína, de la subunidad mayor, detectado por el anticuerpo disminuye en las plantas tratadas con Cd²⁺ frente al control, mientras

que el contenido de la subunidad menor parece no variar con el metal. Sin embargo, la banda que da reacción con el anti-DNPH situada a 55 kDa es mayor en las plantas tratadas con Cd^{2+} que en las controles lo que podría indicar un mayor grado de oxidación de la Rubisco en las plantas expuestas al cadmio.

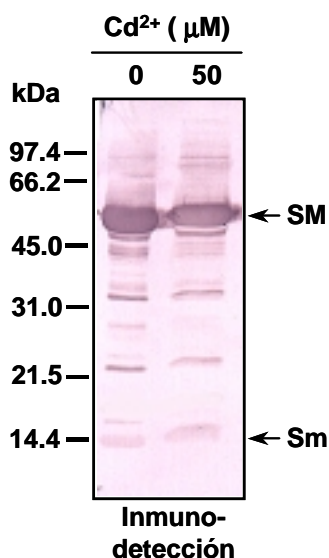


Fig. 4.18 Inmunodetección de Rubisco en plantas control y tratadas con cadmio. Las proteínas de extractos de hojas de guisante se individualizaron por EGPA-SDS, se transfirieron a una membrana de PVDF y se ensayaron con anti-Rubisco (1:1000). El revelado se llevó a cabo con NBT/BCIP. SM: subunidad mayor de la Rubisco; Sm: subunidad menor. Los marcadores moleculares se sitúan a la izquierda

4.1.4.10. Actividad Proteolítica

Debido a que las proteínas oxidadas pueden ser una diana para las proteasas se ha estudiado la actividad endoproteasa en plantas control y tratadas con cadmio y la posterior degradación de proteínas. Para ello se midió espectrofotométricamente la actividad endoproteasa (EP) en extractos de hojas de guisante, siguiendo la hidrólisis de la azocaseína a 340 nm. Como se observa en la Fig. 4.19 A no hay diferencias en la actividad total como consecuencia del tratamiento con Cd^{2+} (Fig. 15 A). No obstante, para descartar la posibilidad de interferencias por los extractos crudos en el método espectrofotométrico utilizado, se realizó un estudio de la actividad endoproteasa en EGPA-SDS con gelatina, detectando *in situ* la actividad EP en plantas control y en plantas cultivadas con Cd^{2+} . Se obtuvieron tres bandas de actividad endoproteasa (EP1-EP3) (Fig. 4.19 B) cuya densitometría mostró un incremento de más de tres veces en las isoenzimas EP2 y EP3 como resultado del tratamiento con Cd^{2+} (Fig. 4.19 B).

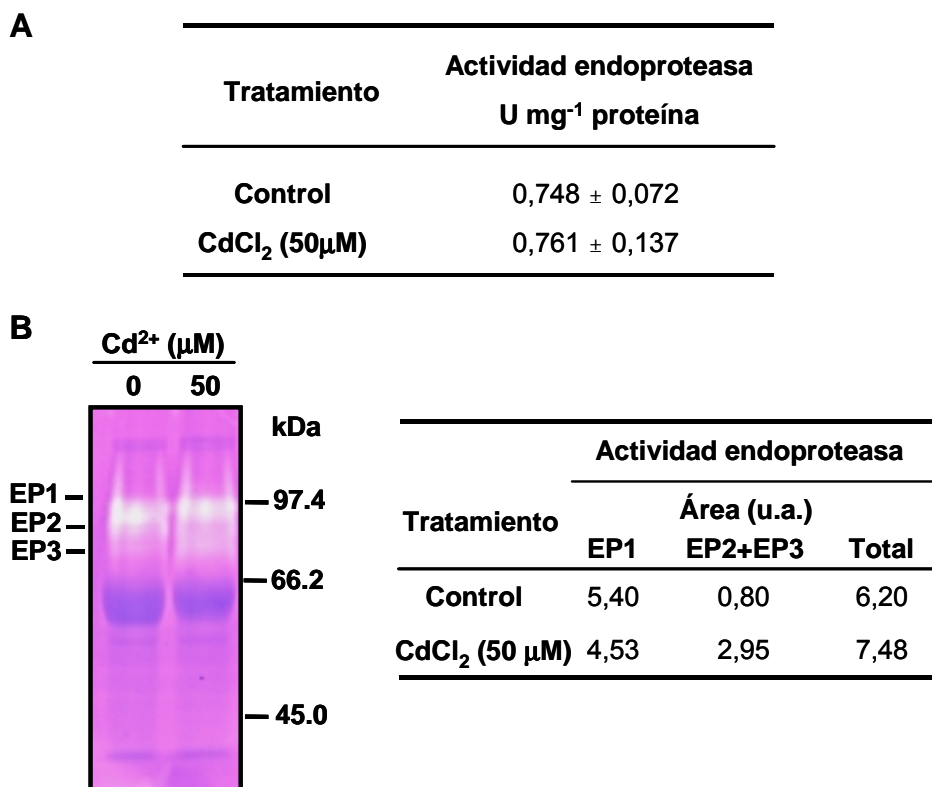


Fig. 4.19 Actividad proteolítica de extractos crudos de hojas de guisante. A) Actividad proteolítica total determinada por el método de la azocaseína y medido espectrofotométricamente. Los resultados son media de tres ensayos diferentes ± MDS. B) Detección de isoenzimas con actividad endoproteasa (EP) en geles de poliacrilamida-SDS (8%) conteniendo gelatina (0,05%) y tinción con azul de Coomassie. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la derecha. La actividad proteolítica en los geles se cuantificó por densitometría y se expresa como unidades arbitrarias (u.a.) en la tabla de la derecha.

En extractos crudos de hojas de guisante se estudió la degradación proteolítica como consecuencia de la actividad proteasa endógena, utilizando desarrollos electroforéticos y detección inmunoquímica. Los extractos se incubaron durante 16 h a 37°C, tras lo cual se desarrollaron en un gel de poliacrilamida-SDS y se tiñeron con plata. Como se observa en la Fig. 4.20 A, el patrón de proteínas mostraba un ligero cambio en intensidad y número de bandas tanto en control como en plantas con Cd. La zona más afectada era la comprendida entre 20 y 60 kDa. También se observó un cambio de movilidad y ligera disminución de la subunidad mayor de la Rubisco. Paralelamente, se llevó a cabo una tinción de grupos carbonilo en extractos incubados durante 16 h a 37°C, y como se puede ver en la Fig. 4.20 B, se

producía una reducción de la reactividad frente a este anticuerpo del 77% en plantas control (carril 4 frente al 1) y del 78% en plantas tratadas con Cd^{2+} (carril 6 frente al 2). La proteína más afectada era la de 60 kDa que prácticamente desaparecía después de la incubación durante 16h.

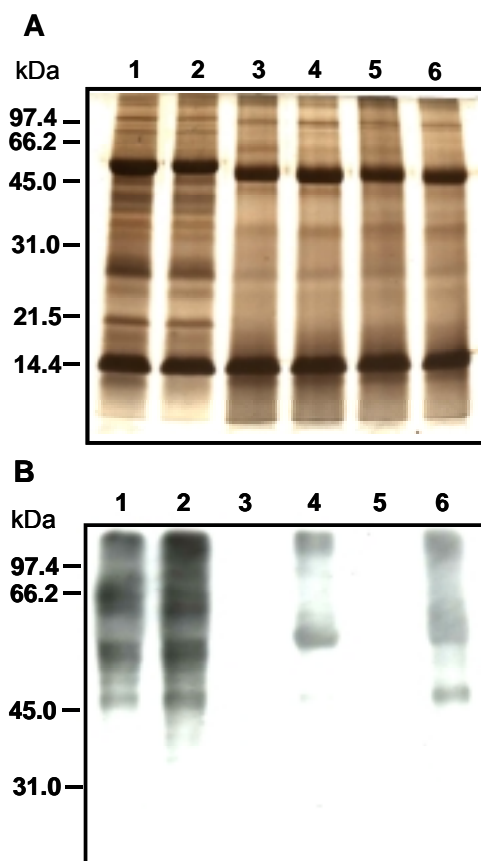


Fig. 4.20 Efecto del cadmio en la degradación de proteínas de hojas de guisante. Extractos crudos de plantas control y plantas tratadas con cadmio, se incubaron a 37°C durante 16 h y posteriormente, fueron derivatizadas con DNPH.

A) Tinción con plata de las proteínas (10 μg) en un gel de poliacrilamida-SDS;

B) Detección inmunoquímica de grupos carbonilos.

Líneas 1 y 2, extractos crudos de hojas de guisante de plantas control y plantas tratadas con cadmio, respectivamente, a tiempo 0; líneas 3 y 5, extractos crudos de plantas control y tratadas con cadmio, respectivamente, incubadas 16 h a 37°C , sin derivatizar con DNPH (controles negativos); líneas 4 y 6, extractos crudos de plantas control y tratadas con cadmio, respectivamente, incubadas 16 h a 37°C y derivatizadas con DNPH. En ambos paneles, los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

4.2. EFECTO DEL CADMIO EN PEROXISOMAS DE HOJAS DE GUISANTE

4.2.1. Población Peroxisomal

Para determinar el efecto del cadmio sobre la población de peroxisomas, se procedió a una tinción citoquímica con DAB, específica para la actividad catalasa, y su observación al microscopio electrónico. El recuento de los orgánulos en distintos cortes de hojas control y tratadas con Cd^{2+} 50 μM se muestra en la Tabla 4.11. La población peroxisomal no se vio considerablemente afectada como consecuencia del tratamiento con Cd^{2+} aunque sí existía un incremento significativo de 1,4 veces con respecto al control (Tabla 4.11). Por otro lado, no se observaron cambios en la estructura de los peroxisomas de las plantas tratadas con cadmio con respecto a los controles, ni en la membrana ni en la matriz (Fig. 4.21).

Tabla 4.11. Efecto del cadmio sobre la población de peroxisomas en células del mesófilo de hojas de guisante. Los valores son la media de cuatro secciones diferentes \pm ESM. Los resultados obtenidos mostraban diferencias significativas frente a los controles ($P < 0,0001$)

CdCl_2 (μM)	Peroxisomas por célula
0	$3,07 \pm 0,15$
50	$4,35 \pm 0,33$

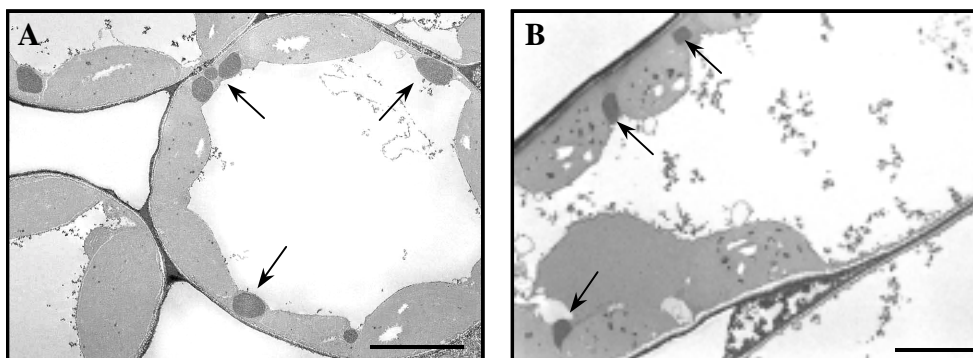


Fig. 4.21 Tinción citoquímica con DAB, específica para la actividad catalasa marcadora de los peroxisomas. A, hojas de plantas control. B, hojas de plantas tratadas con cadmio. Las flechas indican los peroxisomas y la barra corresponde a 5 μm .

4.2.2 Metabolismo de Peroxisomas

Los peroxisomas se purificaron a partir de hojas de guisante procedentes de plantas control y tratadas con cadmio 50 μM , mediante centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa y de Percoll, según se indica en el apartado 7 de Material y Métodos. Las bandas de peroxisomas se situaban a una densidad de equilibrio media de 1,24 g/cm^3 (Fig. 4.22) y se extrajeron de los gradientes mediante perforación y succión con una jeringa. En los orgánulos purificados se llevaron a cabo los estudios que se describen a continuación.

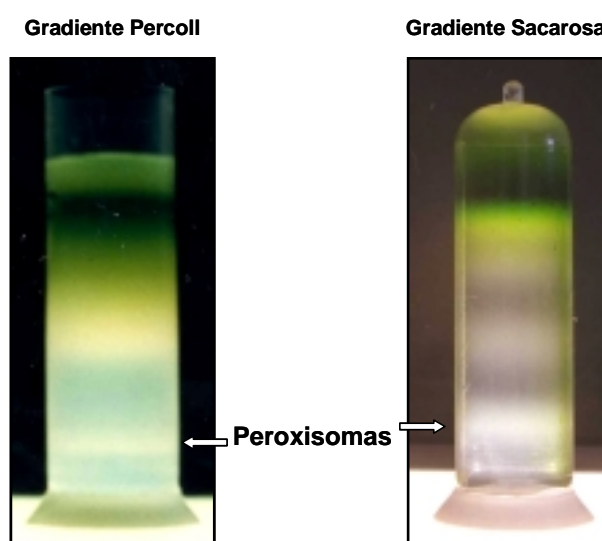


Fig. 4.22 Purificación de peroxisomas de hojas de guisante por centrifugación en gradientes de densidad de Percoll y sacarosa.

4.2.2.1. Concentración de Proteínas

El análisis de la concentración de proteínas de peroxisomas mostró un incremento de 2 veces en matrices peroxisomales de plantas tratadas con Cd^{2+} con respecto a las plantas control (Fig. 4.23 A). Un aumento similar (de 1,5 veces) se obtuvo también en peroxisomas completos (Fig. 4.23 C). Sin embargo, el patrón de proteínas en ambos casos era muy similar tanto en las plantas tratadas como en las control, según se observa en las bandas de proteínas peroxisomales obtenidas por EGPA-SDS al 12% (Fig. 4.23 B y D).

Resultados

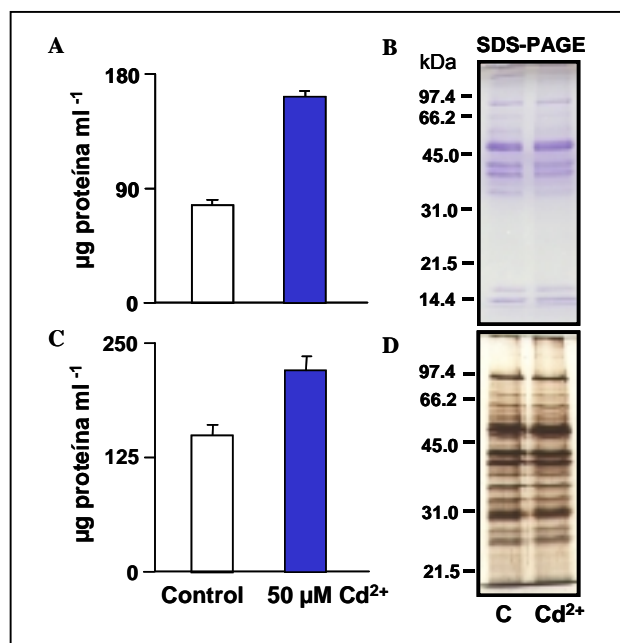


Fig. 4.23 Efecto del cadmio sobre la concentración de proteínas totales de peroxisomas de hojas
 A) Fracción soluble de peroxisomas (matrices).
 C) Peroxisomas completos.
 B) y D) Matrices de peroxisomas (15 µg) y peroxisomas completos (10 µg), separados por EGPA-SDS y revelados con azul de Coomassie y plata, respectivamente. Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda de los gels

4.2.2.2. Producción de Especies de Oxígeno Reactivo (ROS)

Se determinó el contenido de peróxido de hidrógeno en peroxisomas intactos, observándose una concentración de casi el doble en peroxisomas de plantas tratadas con cadmio en comparación con los peroxisomas de las plantas control (Fig. 4.24). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la producción de radicales superóxido (O₂⁻), dependiente de NADH, en las membranas peroxisomales de hojas de plantas control y tratadas con Cd (Fig. 4.24).

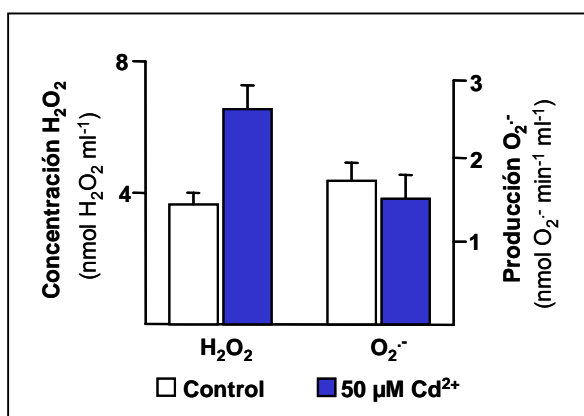


Fig.4.24 Efecto del cadmio en la producción de especies de oxígeno reactivo en peroxisomas de hojas de guisante. La concentración de H₂O₂ se determinó en peroxisomas intactos mientras que la producción de radicales superóxido, dependiente de NADH, se llevó a cabo en membranas de peroxisomas. Cada valor representa la media de cuatro experimentos diferentes ± ESM

4.2.2.3. Xantina Oxidasa (XOD), Glicolato Oxidasa (GOX) e Hidroxipiruvato Reductasa (HPR)

La actividad XOD, responsable de la producción de $O_2^{\cdot -}$ en la matriz peroxisomal experimentó un ligero aumento como consecuencia del tratamiento con Cd, si bien éste no llegó a ser significativo. Sin embargo, sí se advirtió un aumento en el contenido de esta proteína detectado mediante el uso de anticuerpos frente a XOD de rata (Fig. 4.25). También se determinó la actividad de dos enzimas clave de la fotorrespiración, la GOX, enzima generadora de H_2O_2 y la HPR. Se observó un aumento significativo de la actividad GOX con el tratamiento (un 61%) y el contenido de esta proteína también experimentó un incremento, como se observó en la detección inmunoquímica con anticuerpos frente a la GOX de espinaca (Fig. 4.25). Sin embargo, la actividad HPR no mostró cambios significativos en los peroxisomas de las plantas tratadas con cadmio en comparación con los orgánulos de las plantas control (Fig. 4.25).

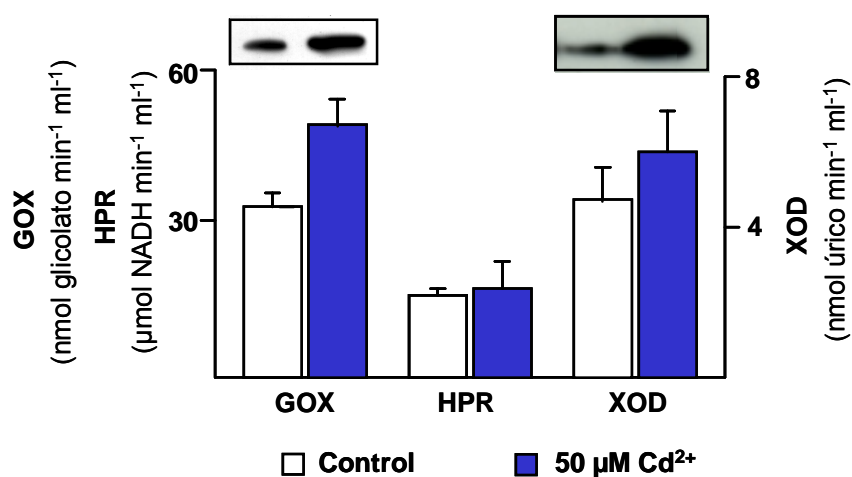


Fig. 4.25 Efecto del cadmio sobre las actividades enzimáticas relacionadas con la producción de especies de oxígeno reactivo. Las medidas se realizaron en matrices de peroxisomas concentradas y cada valor representa la media de cuatro lotes de peroxisomas diferentes \pm ESM. Las bandas se obtuvieron mediante ensayos Western con anticuerpos específicos y en cada tratamiento se utilizó el mismo volumen de muestra.

Resultados

4.2.2.4. Mn-SOD y Catalasa

La actividad Mn-SOD, presente en matrices peroxisomales y encargada de desproporcionar los radicales $O_2^{\cdot -}$, no presentó cambios significativos en los peroxisomas de plantas tratadas con Cd^{2+} en comparación con los controles. Este resultado fue confirmado mediante un estudio de la actividad por espectrofotometría, así como mediante EGPA en condiciones nativas y revelado específico (Fig. 4.26, A y B). Tampoco se observaron cambios en el contenido de proteína determinado por Western con anticuerpos frente a la Mn-SOD de guisante de 27 kDa (Fig. 4.26 A). La actividad catalasa, muy abundante en las matrices peroxisomales, aumentaba ligeramente cuando se medía mediante el método espectrofotométrico (Fig. 4.26 A). Sin embargo, este aumento no iba acompañado por un incremento significativo en el contenido de proteína, como se comprobó en los ensayos Western con el anticuerpo frente a catalasa de calabaza (Fig. 4.26 A).

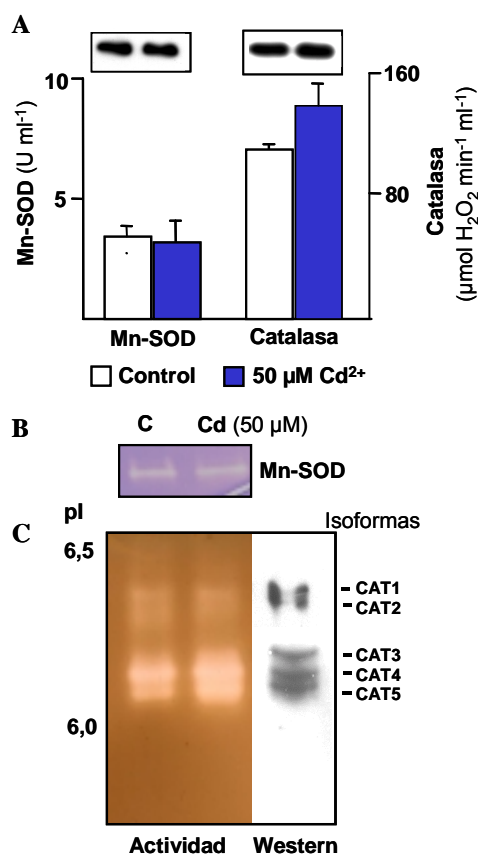


Fig. 4.26 Efecto del cadmio sobre las actividades Mn-SOD y catalasa (CAT) en peroxisomas de hojas de guisante.

A) Western y actividad enzimática total. Cada valor representa la media de cuatro experimentos independientes \pm ESM.

B) Análisis de actividad Mn-SOD en EGPA-nativa y revelado mediante NBT.

C) Actividad de isoformas de CAT individualizadas mediante IEF y reveladas con DAB. La transferencia de Western se llevó a cabo con el anticuerpo frente a la CAT de calabaza.

El análisis de catalasa por isoelectroenfoque (IEF), reveló la presencia de cinco isoformas, designadas como CAT1-5, con puntos isoeléctricos de 6,41, 6,36, 6,16, 6,13 y 6,09, respectivamente (Fig. 4.26 C). Las isoformas más ácidas (CAT3-5), son las que presentan mayor actividad en ambos casos y mostraban un ligero aumento con el tratamiento de Cd^{2+} , mientras que las isoformas más básicas (CAT1-2), disminuían ligeramente con el mismo, sobre todo la CAT2. La existencia de estas cinco isoformas de

catalasa en peroxisomas de hojas de guisante fue confirmada mediante la técnica Western con anticuerpos frente a esta enzima (Fig. 4.26 C). Todas las isoformas, sin embargo, parecen estar formadas por una misma subunidad de 57 kDa ya que por EGPA-SDS y transferencia a una membrana de PVDF, solamente aparece una banda frente al anticuerpo de la CAT con esa masa molecular (Fig. 4.26 A).

4.2.2.5. Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation

Se realizó un estudio en peroxisomas de hojas de guisante de la actividad de las distintas enzimas del ciclo ascorbato-glutation implicado en la eliminación de peróxido de hidrógeno. En peroxisomas de plantas tratadas con Cd^{2+} se observó un incremento significativo en la actividad APX y GR, de casi dos veces en el primer caso y 1,7 veces en el segundo, frente a los peroxisomas de las plantas control. Sin embargo, este incremento no iba acompañado de un aumento significativo en el contenido de proteína GR como se deduce de los resultados la detección con el anticuerpo frente a la misma enzima de guisante (Fig. 4.27). Por el contrario, la actividad MDHAR experimentaba una ligera, aunque significativa, disminución en peroxisomas de plantas tratadas con cadmio frente a los controles (Fig. 4.27).

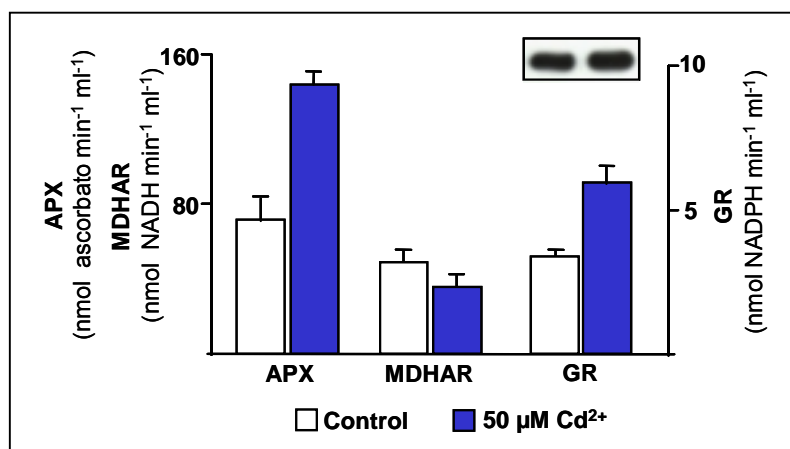


Fig. 4.27 Efecto del cadmio sobre la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, en peroxisomas aislados de hojas de guisante. Cada valor representa la media de cuatro lotes diferentes de peroxisomas \pm ESM. Las bandas corresponden a los ensayos Western con anticuerpos específicos frente a la GR, y en cada tratamiento se utilizó el mismo volumen de muestra.

4.2.2.6. NADP-Deshidrogenasas

En los peroxisomas de hojas también se estudiaron las enzimas implicadas en la ruta de las pentosas fosfato encargadas de regenerar el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation. Se observó un incremento de aproximadamente dos veces en la actividad de la G6PDH y la 6PGDH de la matriz peroxisomal, como consecuencia del tratamiento con cadmio (Fig. 4.28). El aumento de la actividad G6PDH se correspondía además con un incremento en la cantidad de proteína detectada con anticuerpos específicos de *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 4.28). Por otro lado, la actividad de la enzima NADP-ICDH, otra fuente de NADPH, aumentaba en los peroxisomas de plantas tratadas con cadmio frente a los controles, y este comportamiento de la actividad era paralelo a un incremento en la cantidad de proteína, como se comprobó con anticuerpos frente a NADPH-ICDH de guisante (Fig. 4.28).

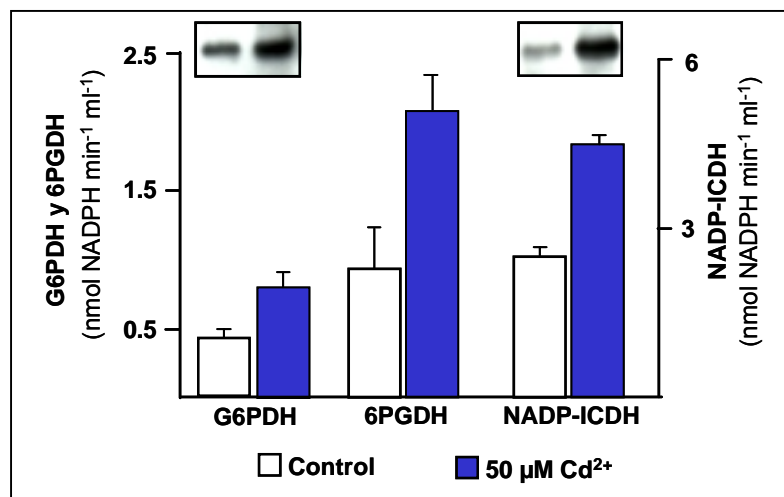
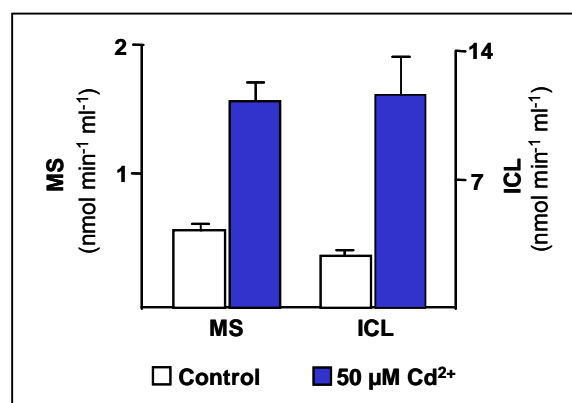


Fig. 4.28 Efecto del cadmio sobre la actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP, en matrices concentradas de peroxisomas de hojas. Cada valor representa la media de cuatro lotes diferentes de peroxisomas \pm MDS. Las bandas corresponden a los ensayos Western con anticuerpos específicos frente a G6PDH y NADP-ICDH y en cada tratamiento se utilizó el mismo volumen de muestra.

4.2.2.7. Enzimas del Ciclo del Glioxilato

En peroxisomas de hojas, la actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato, malato sintasa (MS) e isocitrato liasa (ICL), experimentó un fuerte aumento con el tratamiento con cadmio, del orden de tres y cuatro veces, con relación a los peroxisomas de las plantas control (Fig, 4.29).

Fig. 4.29 Actividad malato sintasa (MS) e isocitrato liasa (ICL) en peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con cadmio. Cada valor representa la media de tres lotes diferentes de peroxisomas \pm ESM



4.2.3. Daños Oxidativos Causados por el Cadmio en Peroxisomas

4.2.3.1. Integridad de los Peroxisomas

Para llevar a cabo estudios de integridad de peroxisomas se procedió al aislamiento de los orgánulos mediante centrifugación en gradientes de densidad de Percoll, que se elimina fácilmente por dilución sin que los orgánulos sufran choque osmótico. La integridad de los orgánulos obtenidos se determinó mediante ensayos de latencia de la actividad hidroxipiruvato reductasa como se muestra en la Tabla 4.12. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre las plantas control y las cultivadas con Cd²⁺, siendo en ambos casos la integridad de los peroxisomas de aproximadamente un 70% (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Integridad de los peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con Cd, determinada por la medida de la latencia de la actividad HPR. Esta se ensayó en un medio isoosmótico (MI) en ausencia o en presencia de Tritón X-100 (0,05%, v/v). Las diferencias entre ambos tratamientos no son significativas

Cd ²⁺ (μM)	Hidroxipiruvato reductasa (μmol NADH ml ⁻¹ min ⁻¹)		Integridad (%)
	MI	MI + Tritón X-100	
0	1,09	3,84	71,6
50	1,86	6,00	69,0

4.2.3.2. Permeabilidad de la Membrana Peroxisomal

Para completar los estudios de integridad de los orgánulos se realizó un estudio de la permeabilidad de la membrana de los peroxisomas obtenidos por centrifugación en gradientes de Percoll. Para ello, los peroxisomas íntegros se incubaron con glicolato oxidasa comercial y se midió la salida de sustrato, el glicolato, de los peroxisomas mediante espectrofotometría a 324 nm, durante 1 h. Las pendientes obtenidas se analizaron mediante el test de Duncan, no apreciándose diferencias significativas entre las mismas en los peroxisomas de plantas control y de las tratadas con Cd²⁺ (Fig. 4.30). El aumento observado de actividad GOX con el tiempo puede deberse a la pérdida de integridad de los orgánulos a lo largo del tiempo de incubación. Alternativamente, se midió la actividad hidroxipiruvato reductasa, utilizando una enzima comercial y como fuente de sustrato los peroxisomas íntegros, obteniéndose los mismos resultados que con la actividad glicolato oxidasa.

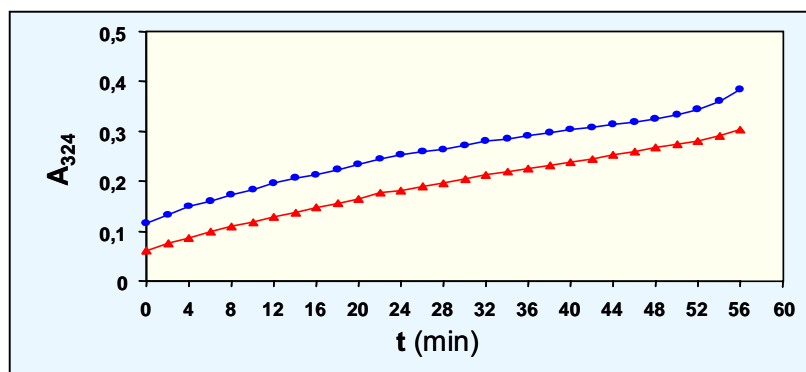


Fig. 4.30 Efecto del tratamiento con Cd sobre la permeabilidad de la membrana peroxisomal. Los peroxisomas intactos purificados mediante centrifugación en gradientes de densidad de Percoll, se incubaron con GOX comercial (0,027 U) y se midió la actividad utilizando como sustrato el glicolato endógeno que atraviesa la membrana peroxisomal. ▲, peroxisomas de plantas control; ●, peroxisomas de plantas tratadas con Cd. La gráfica es representativa de tres experimentos diferentes.

4.2.3.3. Peroxidación Lipídica de las Membranas

Las membranas de los peroxisomas se obtuvieron por choque osmótico de los orgánulos íntegros y posterior centrifugación, como se indica en el apartado 7.1 de Material y Métodos. La tasa de peroxidación lipídica en membranas de peroxisomas, medida como formación de malondialdehído (MDA), no mostró diferencias significativas como consecuencia del tratamiento con Cd²⁺, observándose incluso una ligera disminución de la peroxidación en las membranas de plantas cultivadas con Cd²⁺ en comparación con los controles (Fig. 4.31).

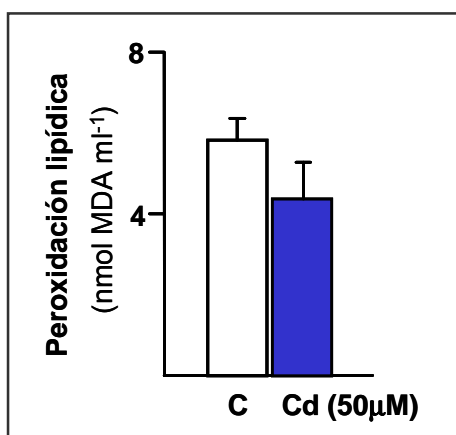


Fig. 4.31 Efecto del cadmio sobre la peroxidación lipídica de las membranas de peroxisomas de hojas. Cada valor representa la media de cuatro experimentos diferentes \pm ESM.

4.2.3.4. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas en Peroxisomas

Los peroxisomas de hojas de guisante control y tratadas con Cd se obtuvieron como se indicó en el apartado correspondiente de Material y Métodos. El contenido de grupos carbonilo en los peroxisomas procedentes de plantas tratadas con Cd²⁺, medido espectrofotométricamente, era algo más de dos veces superior al de los peroxisomas de las plantas control (Fig. 4.32 A), lo que coincide con los datos obtenidos en extractos crudos de hojas. El patrón de proteínas modificadas oxidativamente se determinó por inmunoquímica utilizando el anti-DNPH y comprendía proteínas en el intervalo de 40 a 60 kDa, tanto en los controles como en los tratamientos con cadmio, aunque en este último caso se observó una mayor intensidad, así como la aparición de nuevas bandas entre 25 y 40 kDa (Fig. 4.32 B). Las proteínas más afectadas por el tratamiento eran las de 45 y 55 kDa. La cuantificación global, mediante densitometría, de las bandas que daban reacción con el anti-DNPH mostró un incremento de 2,4 veces en las plantas tratadas con Cd²⁺ respecto a las plantas control, similar al observado en extractos crudos.

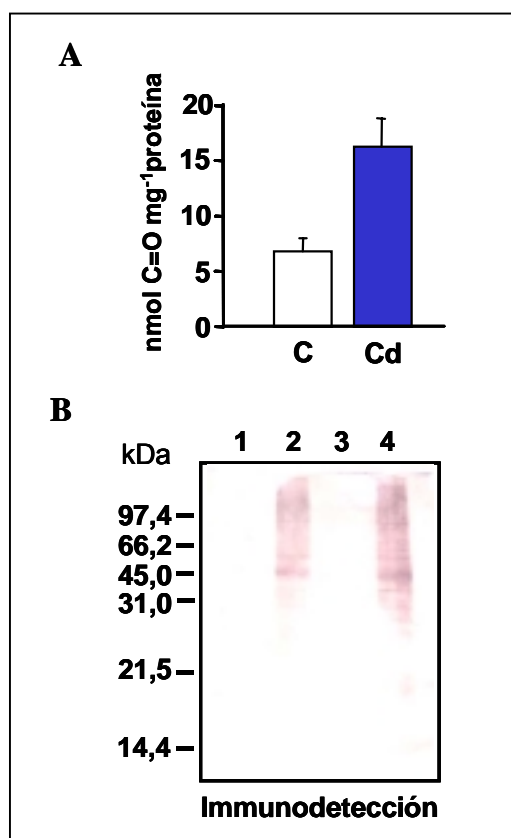


Fig. 4.32 Oxidación de proteínas de peroxisomas en hojas de plantas control y tratadas con Cd²⁺.

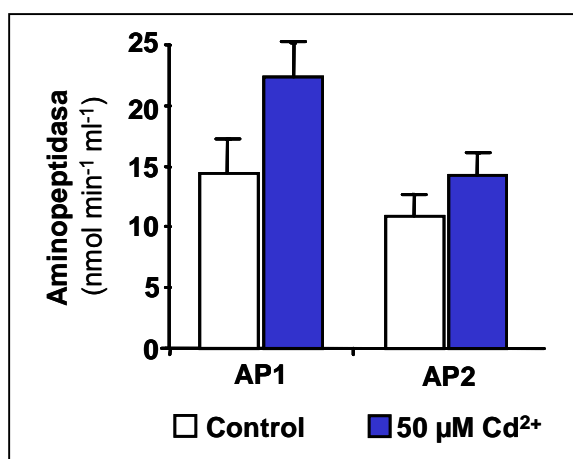
A) Contenido en grupos carbonilos determinado por el método espectrofotométrico. Los resultados son media de tres experimentos diferentes \pm ESM.

B) Detección inmunoquímica de grupos carbonilo. Las líneas 1 y 2 corresponden a peroxisomas de plantas control no derivatizados (control negativo) y derivatizados con DNPH, respectivamente. Las líneas 3 y 4 corresponden a peroxisomas de plantas tratadas con Cd²⁺ no derivatizados (control negativo) y derivatizados con DNPH, respectivamente. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de proteínas (10 μ g). Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

4.2.4. Efecto del Cadmio en la Actividad Proteolítica de los Peroxisomas y Degradación de Proteínas Endógenas

La actividad de las proteasas peroxisomales (exo- y endopeptidasas) se determinó espectrofotométricamente y mediante EGPA, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, según se ha indicado en el apartado 11.16 de Material y Métodos. En geles de poliacrilamida en condiciones nativas se detectaron dos isoenzimas de leucina aminopeptidasa, tanto en las plantas tratadas con cadmio como en las plantas control, y de acuerdo con su movilidad electroforética creciente se designaron como AP1 y AP2. La AP1 era la mayoritaria, representando alrededor del 55-60%, mientras que la AP2 constituía el 40-45% de la actividad AP total en peroxisomas de plantas control y tratadas con cadmio. En base a los resultados obtenidos por el método espectrofotométrico y densitometría se observó un incremento de ambas actividades en las plantas tratadas con Cd del 55 y 31% para la AP1 y la AP2 respectivamente, con respecto a las plantas control (Fig. 4.33).

Fig. 4.33 Actividad aminopeptidasa (AP) en peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con cadmio. Las isoenzimas fueron separadas mediante EGPA-nativa y la actividad de cada una se calculó multiplicando su porcentaje, obtenido por densitometría de los geles teñidos, por la actividad total de las muestras, medida por espectrofotometría.



La actividad endopeptidasa se determinó espectrofotométricamente, midiendo la digestión de la azocaseína. En peroxisomas procedentes de plantas tratadas con cadmio la actividad era dos veces superior a la detectada en peroxisomas de plantas control (Fig. 4.34 A). Además, la actividad endopeptidasa se analizó por EGPA-SDS conteniendo gelatina, y se encontraron al menos cinco isoformas distintas en peroxisomas tanto de las plantas control como de las tratadas con el metal. Las diferentes isoenzimas se designaron como EP1-EP5 según su movilidad electroforética creciente (Fig. 4.34 B). En la Tabla 4.13 se presenta la masa molecular de cada isoenzima, así como su actividad en

Resultados

plantas control y tratadas con cadmio. Excepto la EP5, que apenas se observaba en peroxisomas de plantas tratadas con Cd^{2+} , la actividad de las otras isoenzimas aumentaba con el tratamiento, siendo la EP4 la isoenzima que presentaba más actividad en ambos casos.

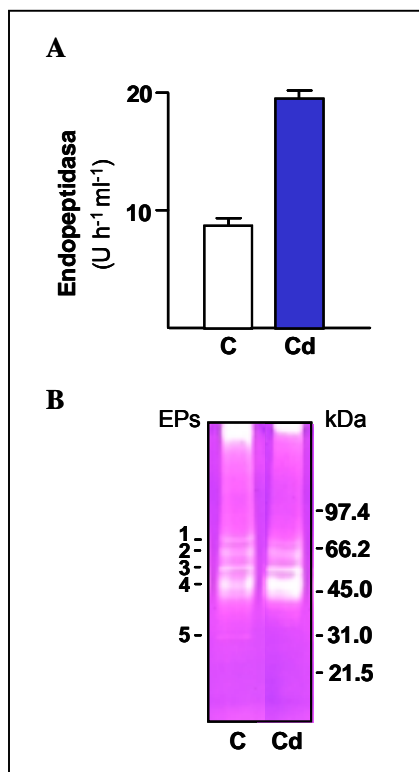


Fig. 4.34 Actividad y patrón isoenzimático de las endopeptidasas (EP) de peroxisomas en plantas control y tratadas con Cd^{2+} 50 μM .

A) Actividad EP de matrices de peroxisomas determinada por el método de la azocaseína. El resultado presentado es media de tres experimentos independientes \pm ESM.

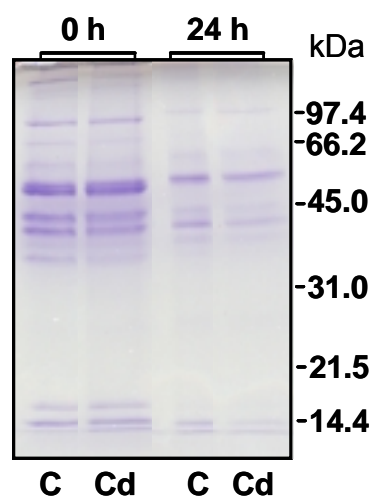
B) Actividad EP de matrices peroxisomales (15 μg) en geles de poliacrilamida-SDS conteniendo gelatina (6-12%). Los marcadores de masa molecular se presentan a la derecha del gel.

Tabla 4.13 Endopeptidasas (EP) de peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con cadmio 50 μM .

Isoenzima	Masa molecular (kDa)	Actividad (mU h ⁻¹ ml ⁻¹)	
		C	Cd
EP1	76	93	181
EP2	64	123	315
EP3	58	104	259
EP4	50	449	932
EP5	34	9	5

La degradación proteolítica por proteasas endógenas se estudió mediante incubación de los peroxisomas a 37°C durante 16 h. Pasado este tiempo se analizó el patrón de polipéptidos de las matrices peroxisomales mediante EGPA-SDS, antes y después de incubar las muestras (Fig. 4.35). Se observó una disminución importante en la intensidad de las bandas de proteínas en ambos casos, aunque no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento con Cd²⁺ y el control.

Fig. 4.35 Degradación de las proteínas peroxisomales por EPs endógenas. Las matrices peroxisomales (15 µg) se incubaron durante 16 h a 37°C y se analizaron mediante EGPA-SDS (12%) y tinción con azul Coomassie. Los marcadores de masa molecular se presentan a la derecha.



4.3. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO Y MUERTE CELULAR EN HOJAS

4.3.1. Producción de Radicales Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

La detección de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en hojas de guisante se llevó a cabo mediante infiltración de las hojas con NBT que es reducido por los radicales $O_2^{\cdot-}$, dando lugar a manchas oscuras debidas a la formación de azul de formazano. Como se observa en la Fig. 4.36 A, en hojas de plantas de guisante tratadas con cadmio se detecta la formación de mayor número de manchas que en plantas control. La producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ tenía lugar fundamentalmente en las zonas situadas entre los haces vasculares (Fig. 4.36 C). Para una mejor observación de las manchas producidas por los radicales superóxido, se procedió a la eliminación de la clorofila de las hojas con etanol hirviendo (Fig. 4.36 B).

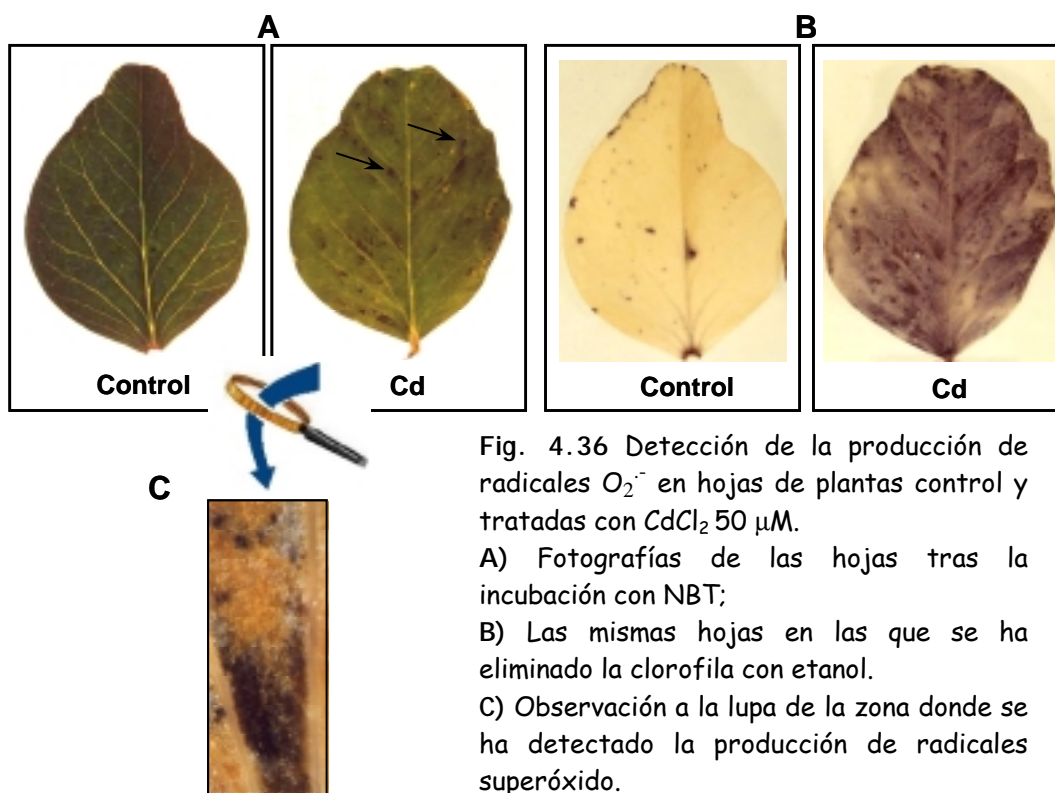


Fig. 4.36 Detección de la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ en hojas de plantas control y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM .

A) Fotografías de las hojas tras la incubación con NBT;

B) Las mismas hojas en las que se ha eliminado la clorofila con etanol.

C) Observación a la lupa de la zona donde se ha detectado la producción de radicales superóxido.

Como control de la reacción se incubaron hojas de plantas tratadas con cadmio con tetrametilpiperidonoxi (TMP) que actúa como secuestrador de radicales superóxido y en este caso se obtuvo una reducción de las manchas producidas por el NBT (Fig. 4.37). El uso de diferentes inductores/inhibidores de la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$, tal y como se indica en el apartado 24.1 de Material y Métodos, dio lugar a diferentes respuestas en la formación de precipitados (Fig. 4.37). Así, la cantaridina y el ODQ (1H[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona), inhibidores de proteína quinasas y GMPc, respectivamente, anulaban la generación de $O_2^{\cdot-}$, y el cloruro de lantano, un inhibidor de los canales de calcio, la reducía. La incubación con nitroprusiato sódico, un generador de NO , estimulaba la

producción de $O_2^{\cdot-}$, mientras que el PTIO (2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido), un secuestrador de NO , anulaba los precipitados debidos al $O_2^{\cdot-}$. La incubación con 8-Br-cGMP, estimulaba la generación de radicales $O_2^{\cdot-}$, al igual que el ácido salicílico (Fig. 4.37).

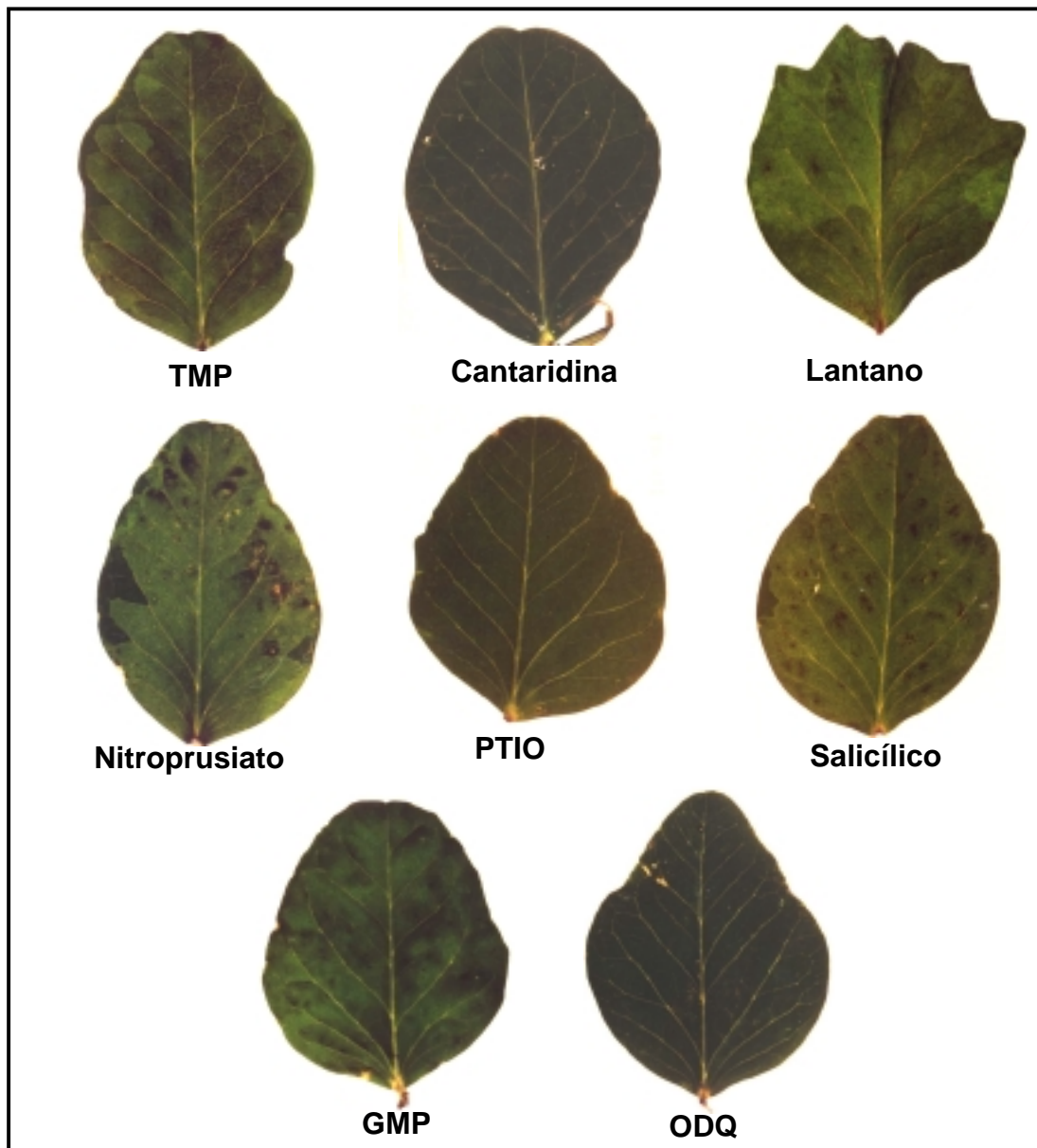


Fig.4.37 Efecto de diferentes inductores/inhibidores sobre la producción de radicales superóxido en hojas completas de plantas tratadas con cadmio. Los radicales superóxido se visualizaron en las hojas por infiltración con NBT, que origina manchas oscuras debidas a la formación de azul de formazano. TMP 1mM, (secuestrador de radicales $O_2^{\cdot-}$), cantaridina 5 μ M (inhibidor de protein quinazas), $LaCl_3$ 1mM (bloqueante de canales de calcio), nitroprusiato sódico 0,5 mM (donador de NO), PTIO 150 μ M, (secuestrador de NO), ácido salicílico 1mM, 8-Br-cGMP 100 μ M (donador de GMP cíclico) y ODQ 200 μ M, (inhibidor de GMP cíclico)

4.3.2. Producción de H₂O₂

La producción de H₂O₂ se determinó mediante infiltración de las hojas con DAB. Al igual que en el caso de los radicales O₂^{•-}, también se encontró una mayor acumulación de H₂O₂ en hojas completas de plantas tratadas con Cd²⁺ en comparación con las plantas control (Fig 4.38 A). Para una mejor observación de las manchas provocadas por la producción de H₂O₂, se procedió a la eliminación de la clorofila de las hojas con etanol hirviendo (Fig 4.38 B). Como control de la reacción, las hojas de plantas tratadas con cadmio se incubaron en presencia de ascorbato 10 mM y N-acetil-cisteína (NAC) 20 mM que actúan como secuestradores de H₂O₂. En estas condiciones se observó una disminución sustancial de las manchas de oxidación del DAB lo que demuestra la especificidad del método de detección de H₂O₂ utilizado (Fig. 4.39).

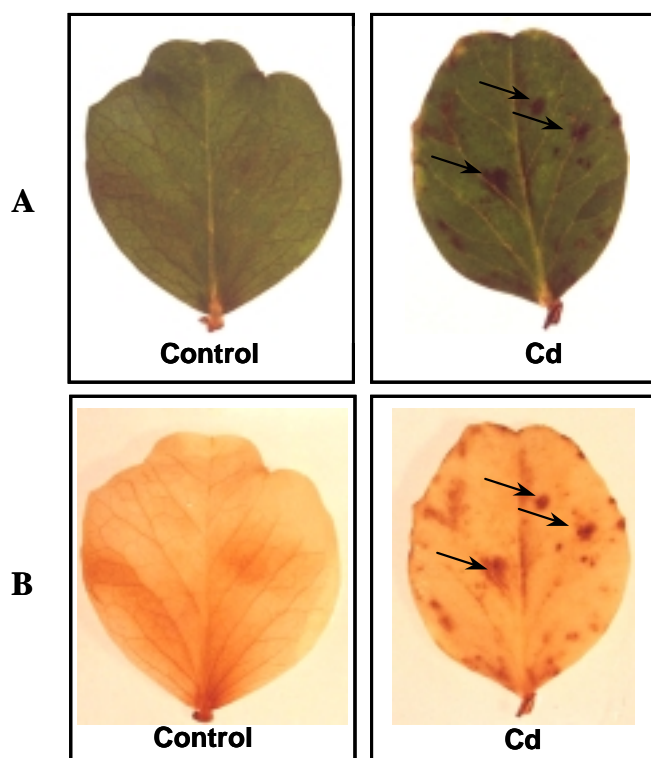


Fig. 4.38 Detección de la producción de H₂O₂ en hojas de plantas de guisante control e tratadas con CdCl₂ 50 μM.

A) Hojas completas fotografiadas después de la incubación con DAB. B) Las mismas hojas en las que se ha eliminado la clorofila con etanol. La producción de H₂O₂ se indica con una flecha.

El uso de diferentes inductores/inhibidores de la producción de H₂O₂, tal y como se indica en el apartado 24.2 de Material y Métodos, dio lugar a diferentes respuestas en la obtención de precipitados. Así, la cantaridina, el cloruro de lantano, el PTIO y el ODQ reducían la producción de H₂O₂, mientras que el nitroprusiato promovía la formación de precipitados similares a los observados con NBT. El GMP y el ácido salicílico también inducían la formación de precipitados de DAB (Fig. 4.39).

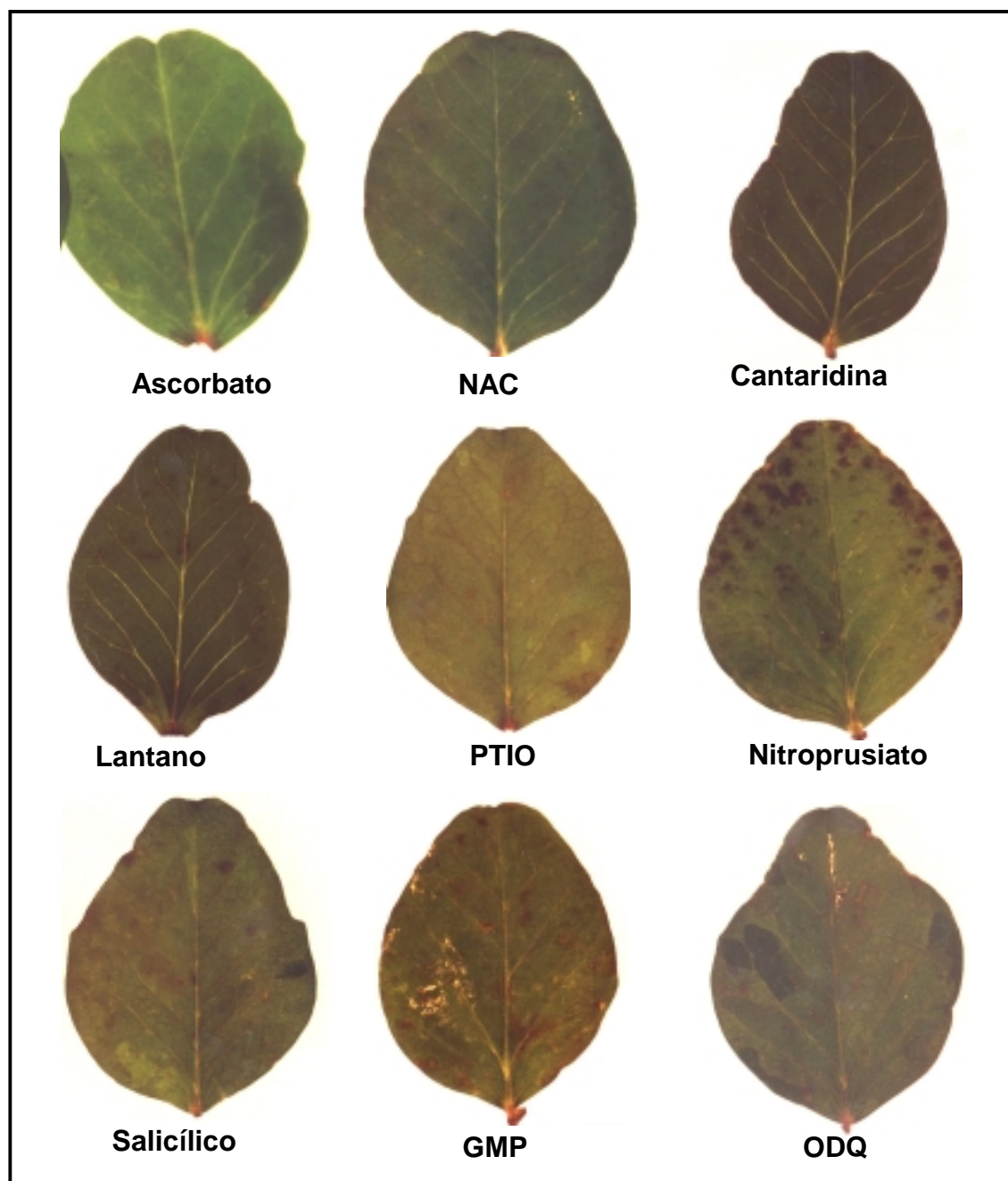


Fig. 4.39 Efecto de diferentes inductores/inhibidores en la producción de H_2O_2 en hojas completas de plantas tratadas con cadmio. El H_2O_2 se visualizó en las hojas por infiltración con DAB, que origina manchas oscuras, debidas a su oxidación por el agua oxigenada. ácido ascórbico 1mM; NAC 20 mM, N-acetil-cisteína (secuestrador de H_2O_2), cantaridina $5\mu M$ (inhibidor de protein quinasas), $LaCl_3$ 1mM (bloqueante de canales de calcio), nitroprusiato sódico 0,5 mM (donador de NO), PTIO $150\mu M$, 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolinona-3-oxido (secuestrador de $NO\cdot$), ácido salicílico 1mM, 8-Br-cGMP $100\mu M$ (donador de GMP cíclico) y ODQ $200\mu M$, 1H(1,2,4-oxadiazol[4,3- α]quinoxalin-1-ona (inhibidor de GMP cíclico).

Resultados

4.3.3. Ensayos de Muerte Celular

Como marcador de muerte celular en hoja se utilizó un colorante impermeable, "Evans blue", que sólo penetra en aquellas células que tienen dañada la membrana. Para esto, se infiltraron peciolo de hojas de guisante según se indicó en el apartado 3.25 de Material y Métodos. Tras la infiltración del colorante, se procedió a la decoloración de las hojas con etanol hirviendo, y de esta forma se observó una mayor penetración del colorante en las hojas de las plantas tratadas con cadmio en comparación con las controles (Fig. 4.40), lo que es indicativo de un mayor daño en las membranas celulares de las hojas expuestas al metal. La cuantificación de la absorción del colorante, por medida de la absorbancia a 600 nm, mostró que las plantas tratadas con cadmio absorben el colorante unas 4 veces más que las plantas control (Fig. 4.40).

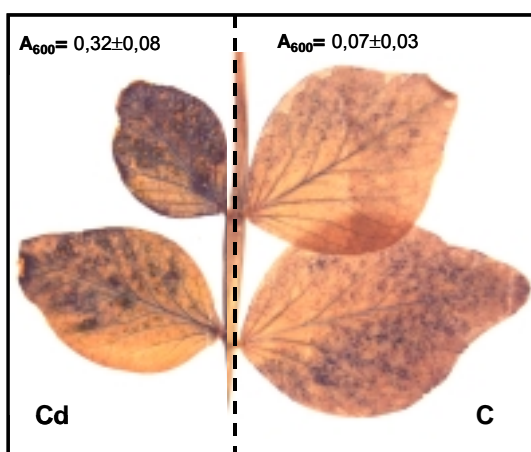


Fig. 4.40 Infiltración de hojas de guisante con "Evans Blue", marcador de muerte celular. C, hojas de plantas control. Cd, hojas de plantas tratadas con cadmio. La cuantificación de la absorción del colorante se determinó mediante extracción con SDS a 50°C y medida de la absorbancia a 600 nm. Cada valor representa una media de tres réplicas \pm ESM y las diferencias son significativas según el test de Duncan ($P < 0,001$).

4.3.4. Medidas de Conductividad

Como marcador adicional de muerte celular se determinó la pérdida de electrolitos mediante cambios de la conductividad en discos foliares de hojas incubados durante 3 h en agua ultrapura (milli-Q), utilizándose hojas de plantas control y tratadas con cadmio. Paralelamente, se determinó el efecto de distintos moduladores (inductores/inhibidores) de procesos de señalización sobre la conductividad de las hojas tratadas con Cd^{2+} . Para ello, se incubaron las hojas durante 18 h en invernadero con los distintos inhibidores/inductores. Como se observa en la Fig. 4.41, el tratamiento con Cd producía un incremento de la conductividad que revertía con la adición de GMPc y con un secuestrador de radicales O_2^- , el TMP. La incubación con ácido salicílico y el nitroprusiato sódico, un donador de NO , producía aumentos de la conductividad de un 37 y un 57%, respectivamente, frente a las hojas control. El resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas con respecto a las hojas tratadas con Cd^{2+} e incubadas en agua (Fig. 4.41).

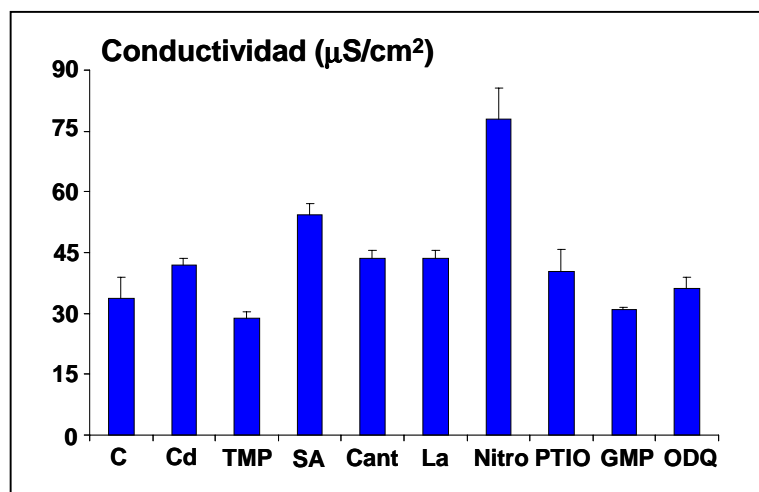


Fig. 4.41 Efecto del Cd y de diferentes moduladores sobre la conductividad de discos foliares de hojas de plantas tratadas con Cd. TMP 1mM, (atrapador de radicales $O_2^{\cdot-}$); SA 1mM, ácido salicílico; Cant 5 μ M, cantaridina (inhibidor de protein quinasas); La 1mM (bloqueante de canales de calcio); Nitro 0,5 mM, nitroprusiato de sodio (donador de NO); PTIO 150 μ M, (secuestrador de NO \cdot); 8-Br-cGMP 100 μ M (donador de GMP cíclico); y ODQ 200 μ M, (inhibidor de GMP cíclico). Cada valor representa una media de tres réplicas y las barras de error representan el error estándar de la media (ESM) según el test de Duncan.

4.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO REACTIVO EN HOJAS

4.4.1. Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)

En cortes de hoja de plantas de guisante control y tratadas con Cd²⁺ 50 µM se estudió la acumulación de H₂O₂ mediante la formación de precipitados de perhidróxido de cerio, densos a los electrones, para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). La observación al ME mostró la formación de precipitados de Ce en cuatro tipos diferentes de células (Figs. 4.42 y 4.43): 1) En células de transferencia, en la membrana plasmática, asociadas a los vasos del floema (Fig. 4.42 B); 2) En células de la vaina, en el tonoplasto (fig. 4.42 D); 3) En células epidérmicas, en la membrana plasmática (Fig. 4.42 F); y 4) En células del mesófilo, en la membrana plasmática (Fig. 4.43 B). En las células del mesófilo, también se observan precipitados en la membrana externa de la mitocondria (Fig. 4.43 C). En cortes de hoja incubados con aminotriazol, un inhibidor de catalasa, se observó además la formación de precipitados alrededor de la membrana de peroxisomas, en las zonas de contacto con cloroplastos y vacuola (Fig. 4.43 D). En los cortes de hojas procedentes de plantas control (Fig. 4.42 A, C y E; Fig. 4.43 A), sólo se observaron pequeños precipitados asociados a las células de transferencia de tejidos vasculares (Fig. 4.42 A). Para comprobar la especificidad de la reacción, se incubaron los cortes con catalasa, que descompone el H₂O₂, no observándose precipitados en este caso. También se realizó un control en ausencia de cerio, en el que tampoco se observaron precipitados. Para determinar la fuente de la producción de H₂O₂ en las plantas tratadas con cadmio, se preincubaron las muestras con un inhibidor de peroxidasas (Na₃N), y un inhibidor de NADPH oxidasas (DPI), y los resultados mostraron que sólo con el DPI se inhibía la formación de precipitados de Ce lo que implicaría a una NADPH-oxidasa en la producción de H₂O₂ (Tabla 4.14).

Tratamiento	Acumulación de H ₂ O ₂
DPI (10 µM)	-
Na ₃ N (1 mM)	+
Catalasa (1 µM)	-
Aminotriazol (1 mM)	+

Tabla 4.14 Efecto de distintos inhibidores sobre la acumulación de H₂O₂ en hojas de plantas de guisante cultivadas con Cd. Los cortes fueron incubados con diferentes inhibidores preparados en tampón HEPES 0,1 M (pH 7,2) durante 30 min, antes de la tinción con CeCl₃. Los resultados (+) y (-) expresan presencia o ausencia, respectivamente de precipitados de Ce dependientes de H₂O₂. Los resultados presentados se han obtenido en cuatro experimentos diferentes.

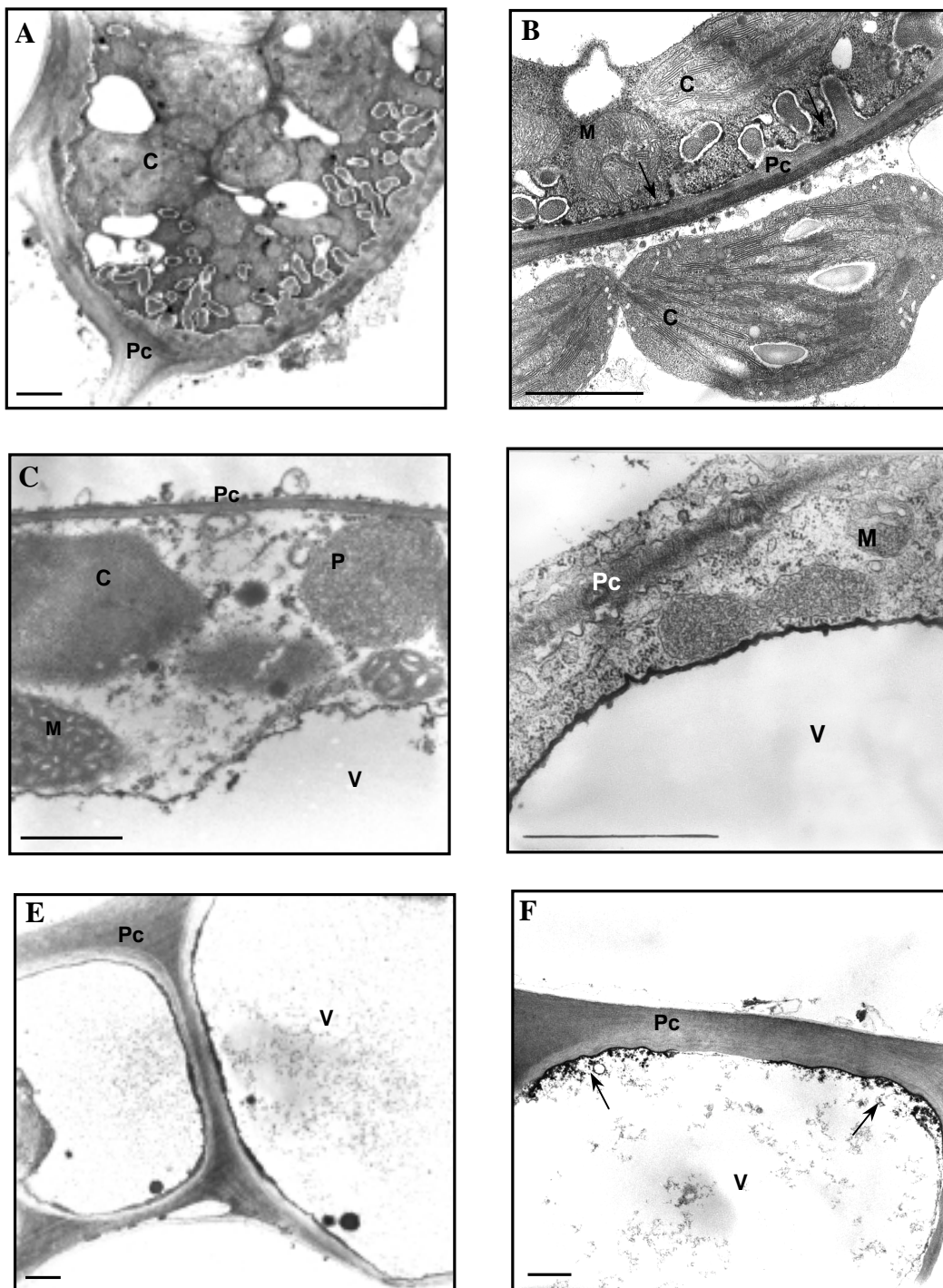


Fig. 4.42 Localización de H_2O_2 en hojas de guisante mediante citoquímica con $CeCl_3$ y microscopía electrónica de transmisión. A, C y E corresponden a cortes de hojas de plantas control, mientras que B, D y F corresponden a cortes de hojas de plantas tratadas con cadmio. A y B, células de transferencia en tejido vascular; C y D, células de la vaina; E y F, células epidérmicas. Las flechas señalan los precipitados de cerio. La barra indica 1 μm . C: cloroplasto; M: mitocondria; Pc: pared celular; P: peroxisoma; V: vacuola.

Resultados

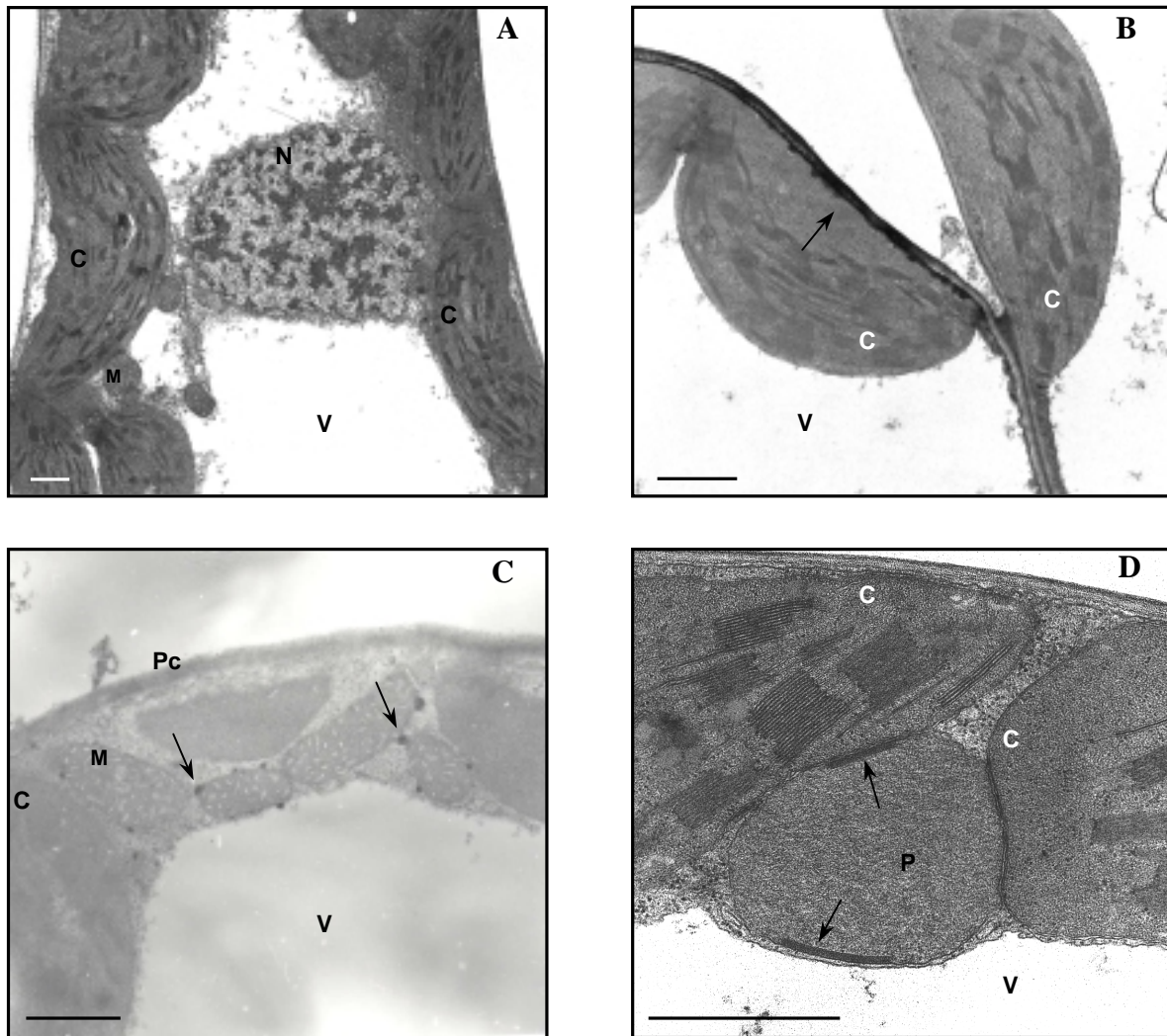


Fig. 4.43 Localización de acumulación de H_2O_2 en células del mesófilo de hojas de guisante mediante citoquímica con $CeCl_3$ y microscopía electrónica de transmisión. A, cortes de hojas de guisante control; B, C y D, cortes de hojas de guisante tratados con cadmio. Las flechas señalan precipitados de cerio. C: cloroplasto; M: mitocondria; N: núcleo; Pc: pared celular; P: peroxisoma; V: vacuola. La barra indica 1 μm .

4.4.2. Radicales Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

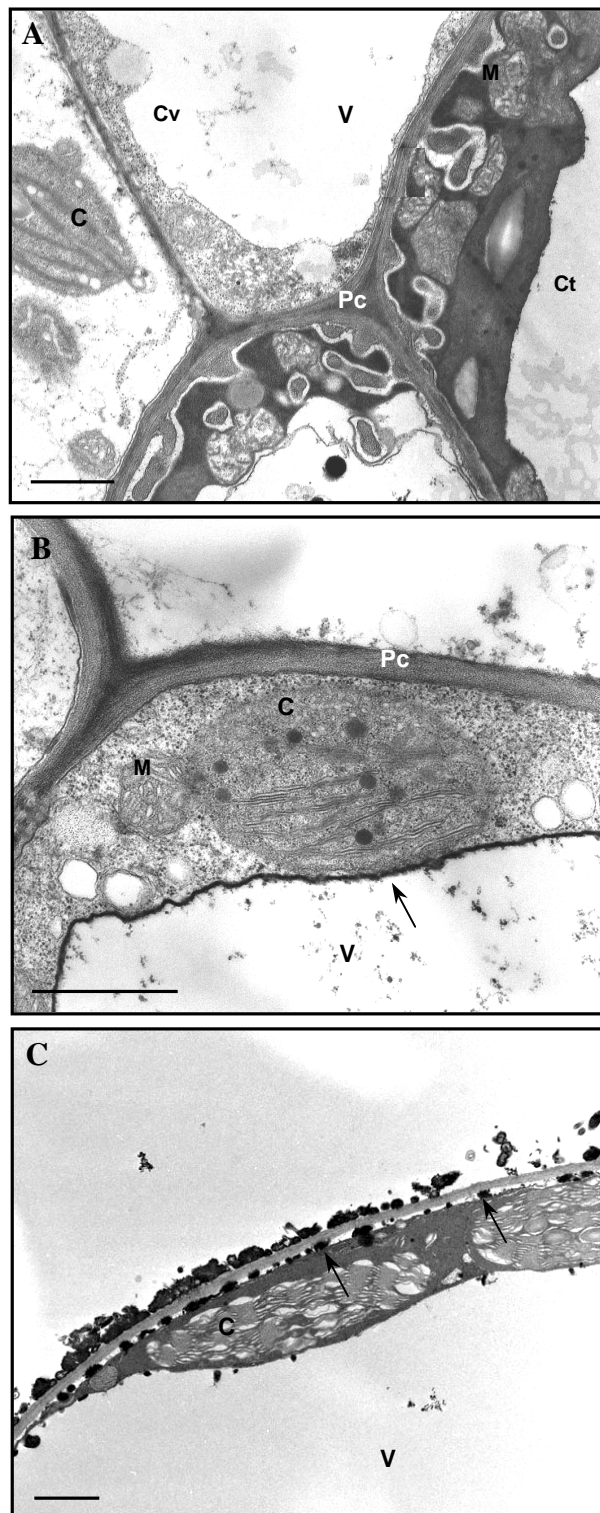
Se ha estudiado la producción de radicales superóxido en cortes de hojas de guisante control y tratadas con cadmio, mediante citoquímica con Mn y DAB, lo que da lugar a la formación de precipitados densos a los electrones y visibles al microscopio electrónico. En cortes de hojas tratadas con Cd^{2+} se observó la formación de precipitados principalmente en el tonoplasto de las células de la vaina cercanas al tejido vascular (Fig. 4.44 B) mientras que en hojas de plantas control no se apreciaron estos precipitados (Fig. 4.44 A). La incubación del tejido con dietilditiocarbamato 1 mM, un inhibidor de la CuZn-SOD, demostró además la formación de precipitados en la membrana plasmática de las células del mesófilo,

asociados a células muy dañadas por el tratamiento (Fig. 4.44 C). La especificidad de la reacción se comprobó preincubando el tejido con CuZn-SOD o bien no incluyendo el Mn y/o DAB en la solución de incubación, lo que daba lugar a la ausencia de precipitados.

Fig. 4.44 Localización de O_2^- en hojas de guisante mediante citoquímica con Mn/DAB y microscopía electrónica de transmisión.

A) hojas de guisante control mostrando células de transferencia y células de la vaina. B y C) células de la vaina y del mesófilo, respectivamente, de cortes de hojas de guisante tratadas con cadmio. Las flechas muestran precipitados de Mn/DAB.

C: cloroplasto; M: mitocondria; Pc: pared celular; V: vacuola; Ct: célula de transferencia; Cv: célula de la vaina. La barra indica 1 μ m.



Resultados

4.4.3. Óxido Nítrico (NO[•])

La detección de NO[•] se realizó mediante reacción con diacetato de diaminofluoresceína (DAF2-DA) y observación de la fluorescencia al microscopio láser confocal a una longitud de onda de 495-515 nm, como se indica en el apartado 3.23.3 de Material y Métodos. Como se muestra en la Fig. 4.45, en plantas control la detección de NO[•] se localizaba fundamentalmente en los haces vasculares, así como en la epidermis (Fig. 4.45 A). Mediante el uso de L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), se comprobó que la producción de NO[•] observada era dependiente de esta enzima (Fig. 4.45 C).

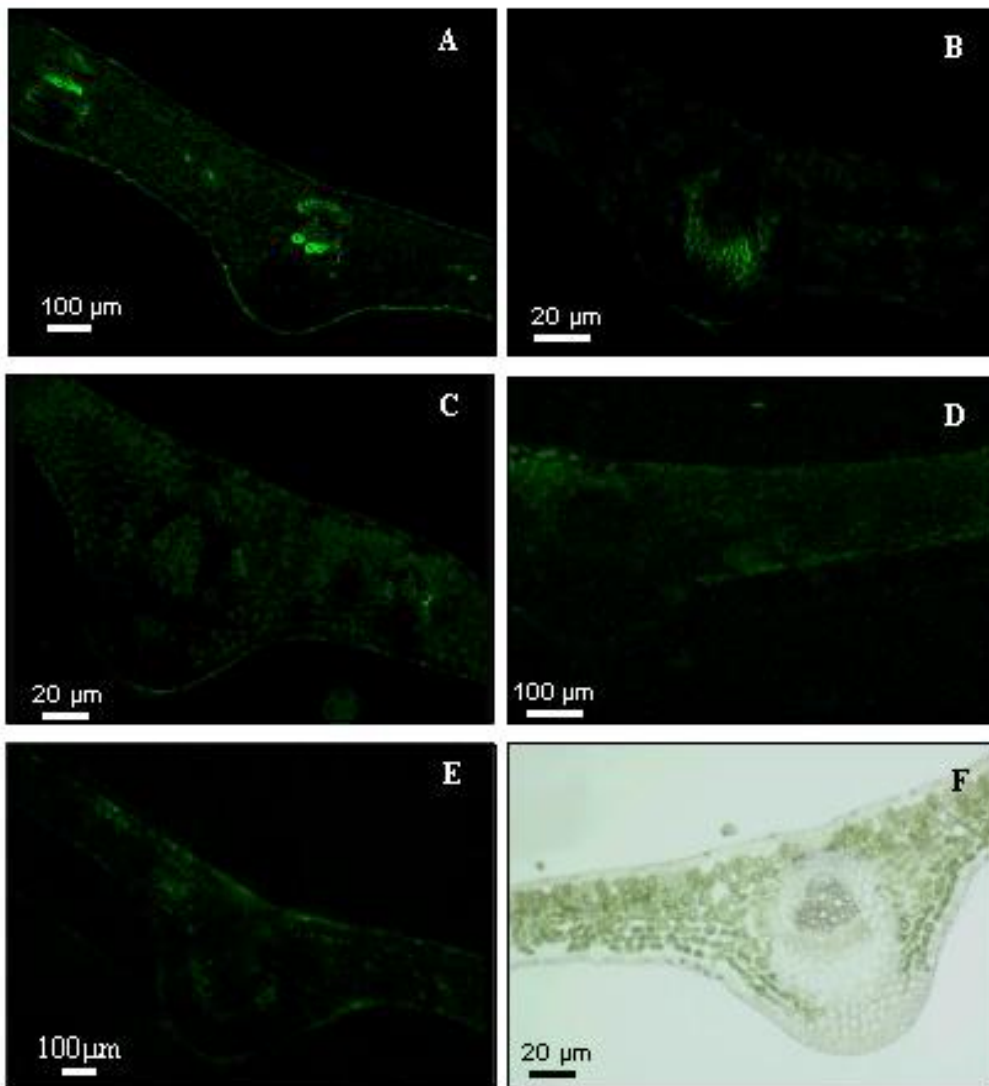


Fig. 4.45 Detección de óxido nítrico en hojas de guisante. Se prepararon cortes de hojas de guisante que se incubaron con DAF2-DA y observaron al microscopio láser confocal a 495-515 nm. A: hoja control; B: hoja procedente de plantas tratadas con Cd²⁺; C: hoja control incubada con L-NAME (inhibidor de la NOS); D: hoja control incubada con Tris-ClH sin DAF2-DA; E: hoja senescente; F: tinción con NBT y observación de la estructura foliar al microscopio óptico.

Como control negativo, se observaron cortes incubados en tampón sin DAF2-DA (Fig. 4.45 D). En la Fig. 4.45 F se presenta un corte, teñido con NBT y observado al microscopio óptico, donde se aprecia la estructura de la hoja. En las plantas tratadas con Cd^{2+} se observó una reducción de la formación de NO^{\cdot} (Fig. 4.45 B) y esta reducción era mayor en hojas senescentes (Fig. 4.45 E).

Superponiendo las distintas observaciones realizadas al microscopio láser confocal se obtuvo una imagen tridimensional del corte en el que se observa también una producción importante de NO^{\cdot} en las células guarda de los estomas (Fig 4.46).

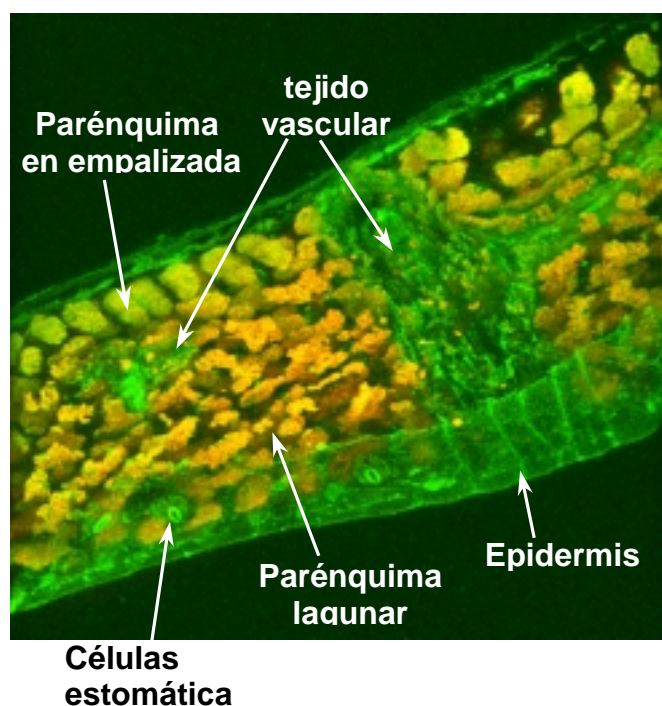


Fig. 4.46 Imagen tridimensional de la producción de óxido nítrico en hojas de guisante. Los cortes de hojas se incubaron con DAF2-DA y se observaron al microscopio láser confocal, superponiéndose las distintas imágenes obtenidas. El NO^{\cdot} se detectó por su fluorescencia verde, y estaba localizado fundamentalmente en la epidermis, haces vasculares y estomas. El color naranja representa autofluorescencia.

4.5. ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES INDUCIDAS POR CADMIO

4.5.1. Ensayos de Apoptosis

Uno de los marcadores bioquímicos de la apoptosis es la degradación del ADN genómico por endonucleasas internas, con formación de fragmentos mono- y oligonucleosómicos. Estos fragmentos cuando se someten a electroforesis se distribuyen en forma de escalera constituida por múltiples subunidades de aproximadamente 180 pares de bases. Con el fin de detectar posibles procesos de apoptosis inducidos por Cd^{2+} , se obtuvo ADN total de hojas de guisante y se analizó, mediante EGPA en condiciones nativas y posterior tinción con plata, para estudiar el nivel de degradación del mismo causado por el tratamiento con Cd^{2+} . Sin embargo, no se observó un aumento considerable de la degradación del ADN en plantas tratadas con cadmio con respecto a los controles (Fig. 4.47).

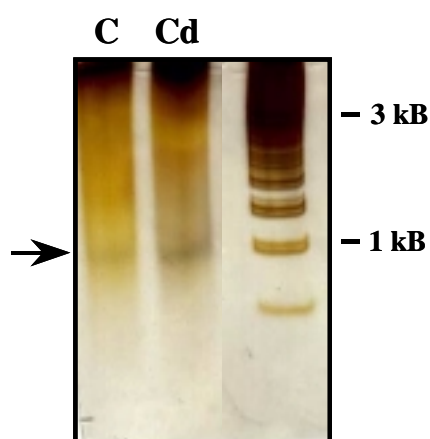


Fig. 4.47 Efecto del cadmio sobre la fragmentación del ADN total de hojas de guisante. Los marcadores moleculares se sitúan a la derecha. La flecha indica posible fragmentación del ADN. El ADN se analizó por EGPA-nativa al 7,5% y se reveló con plata.

Al no ser los resultados obtenidos lo suficientemente claros para concluir o descartar la fragmentación del ADN como consecuencia del tratamiento, se abordó el estudio de la fragmentación del ADN genómico mediante la técnica TUNEL con observación al microscopio de fluorescencia. Para ello se utilizaron cortes semifinos de hojas control y tratadas con Cd^{2+} preparados en resina LRW, tal y como se describe en el apartado 3.23.2 de Material y Métodos. Como se observa en la Fig. 4.48, no se encontraron diferencias significativas entre los cortes procedentes de las hojas control y las tratadas con Cd^{2+} . En ambos casos, no se observó la reacción positiva de núcleos apoptóticos caracterizada por la aparición de fluorescencia de color verde-amarillo intenso.

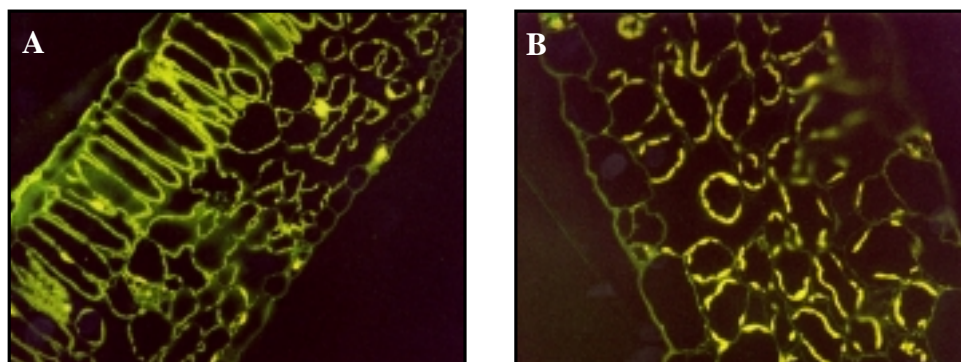
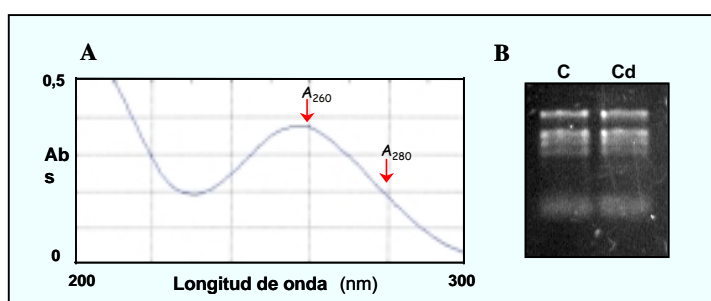


Fig. 4.48 Técnica TUNEL para la detección de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia en cortes de hojas de plantas control (A) y tratadas con Cd^{2+} (B)

4.5.2. Efecto del Cadmio sobre la Expresión de Enzimas Antioxidantes

El ARN total de hojas de guisante se obtuvo como se indicó en el apartado 3.27 Material y Métodos. Las preparaciones de ARN se cuantificaron por espectrofotometría y su integridad se analizó en geles de agarosa-TBE al 0,8% (p/v) (Fig. 4.49).

Fig.4.49 Cuantificación e integridad del ARN de hojas de guisante. A) Para determinar la pureza del ARN se midió la absorbancia entre 200-300 nm y se cuantificó a partir de la DO_{260} . B) La integridad del ARN (150 ng) se comprobó en geles de agarosa-TBE al 0,8% (p/v)



Para determinar la expresión de enzimas antioxidantes, se partió de 15 μg de ARN total obtenido de hojas de plantas control y tratadas con cadmio 50 μM , que se analizó en geles de agarosa-MOPS al 1,2% (p/v) en presencia de formaldehído al 1,8% (v/v). El ARN se transfirió a membranas de nylon en las condiciones especificadas en el apartado 3.27 de Material y Métodos y las membranas se hibridaron con distintas sondas específicas marcadas con ^{32}P . Después de la exposición de las películas autorradiográficas entre 2 y 15 días, a -80°C , se observó una inducción de la expresión de las enzimas CuZn-SOD y CAT, por efecto del tratamiento con cadmio, mientras que disminuía la expresión de la GR.

Resultados

Sin embargo, no se observaron diferencias claras en los niveles de transcritos de la Mn-SOD, APX y MDHAR como consecuencia del tratamiento con el metal (Fig. 4.50).

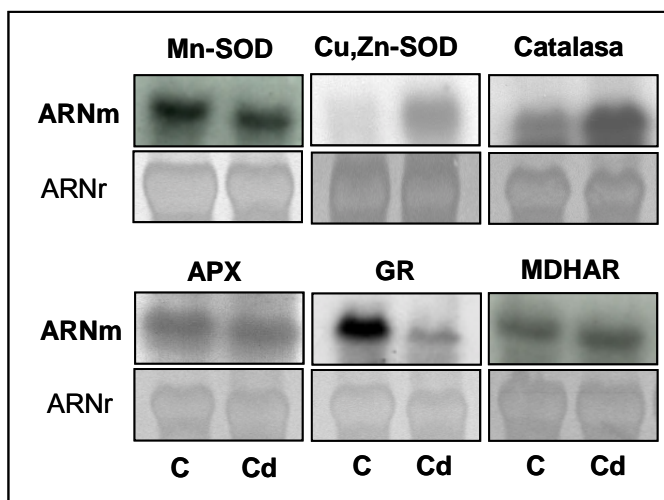


Fig. 4.50 Análisis mediante la técnica de Northern de los niveles de ARNm de distintas enzimas antioxidantes en hojas de plantas control y tratadas con cadmio. El ARNr se utilizó como control de igualdad de carga.

4.5.3. Efecto de Moduladores de Procesos de Señalización Celular sobre la Expresión de Sistemas Antioxidantes

Se partió de 15 μg de ARN total obtenido a partir de hojas de plantas cultivadas con cadmio 50 μM que habían sido previamente incubadas a través de los peciolo durante 18 horas en distintas soluciones acuosas, excepto en nitroprusiato de sodio que se incubó 3 h. Las hojas de plantas tratadas con cadmio se incubaron en: agua, cantaridina 5 μM (inhibidor de protein quinasas), LaCl_3 1 mM (bloqueante de canales de calcio), nitroprusiato sódico 0,5 mM (donador de NO^\cdot), PTIO 150 μM , 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolinona-3-óxido (secuestrador de NO^\cdot), ODQ 200 μM , 1H-[1,2,4]-oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-ona (inhibidor de GMP cíclico), TMP 1 mM, tetrametilpiperidonooxi (secuestrador de radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$), 8-Br-cGMP 100 μM (donador de GMP cíclico), ácido salicílico 1 mM, y ácido ascórbico 1 mM.

El ARN se transfirió a una membrana de nylon en las condiciones indicadas en el apartado 3.27 de Material y Métodos y las membranas se hibridaron con las sondas correspondientes a la GR, CAT, MDHAR, Mn-SOD, APX y CuZn-SOD.

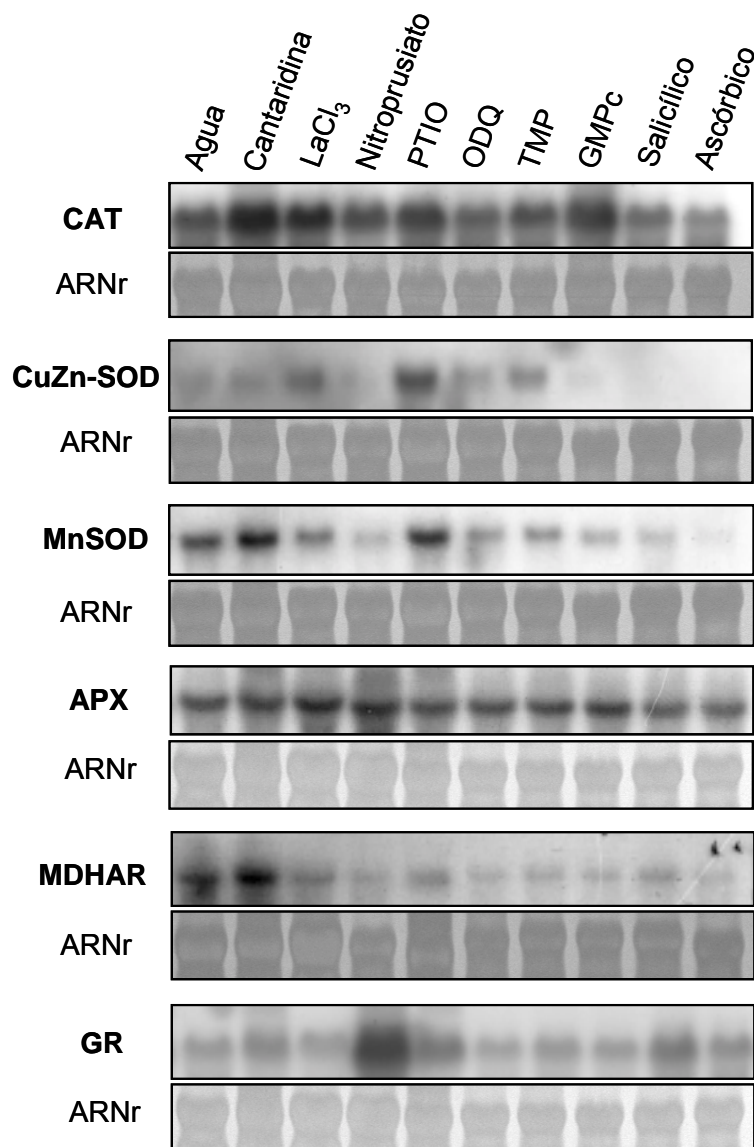


Fig. 4.51 Efecto de diferentes inductores/inhibidores sobre la expresión de actividades antioxidantes en hojas de plantas de guisante tratadas con cadmio. Las hojas se incubaron con los compuestos siguientes: agua (control), cantaridina 5 μ M (inhibidor de protein quinasas), LaCl₃ 1mM (bloqueante de canales de calcio), nitroprusiato sódico 0,5 mM (donador de NO \cdot), PTIO 150 μ M (secuestrador de NO \cdot), ODQ 200 μ M (inhibidor de GMP cíclico), TMP 1mM (secuestrador de radicales O₂ \cdot^-), 8-Br-cGMP 100 μ M (donador de GMP cíclico), ácido salicílico 1mM y ácido ascórbico 1mM.

Resultados

Como se puede observar en la Fig. 4.51, los transcritos de la CAT aumentaban por incubación con la cantaridina, el LaCl_3 , el PTIO y el GMPc. La incubación con ácido ascórbico, sin embargo, producía una reducción considerable de los transcritos de CAT. La expresión de la CuZn-SOD aumentaba por efecto del LaCl_3 , el PTIO y el TMP, mientras que era fuertemente reprimida por el ácido ascórbico, el ácido salicílico y el GMP. A su vez, los ARNm de la Mn-SOD se incrementaban por la cantaridina y el PTIO y era reprimida por el nitroprusiato sódico y por el ácido ascórbico y, en menor medida, por el ácido salicílico, el GMP, el TMP y el ODQ. La expresión de la APX apenas se modificaba con las distintas incubaciones. Los transcritos de MDHAR eran fuertemente reprimidos por todos los compuestos utilizados, salvo el PTIO con el que prácticamente no varía y la cantaridina que los inducía, ligeramente. Por último, la expresión de la GR era fuertemente inducida por el nitroprusiato y en menor grado, por la cantaridina, el PTIO y el ácido salicílico, mientras que el resto de los compuestos no tenía ningún efecto.

DISCUSIÓN

El propósito del trabajo que se presenta en esta Memoria Doctoral ha sido evaluar el efecto del tratamiento con Cd sobre el crecimiento y estado fisiológico de plantas de guisante y profundizar en los mecanismos implicados en la toxicidad de este metal. Para ello, se ha abordado el estudio utilizando distintas aproximaciones: fisiológicas, bioquímicas, citológicas y moleculares, haciendo especial hincapié en los cambios inducidos por el Cd en el metabolismo de especies de oxígeno reactivo y sus posibles implicaciones en el metabolismo celular.

Reducción del Crecimiento y Alteraciones Nutricionales en Plantas de Guisante

En primer lugar se ha analizado el efecto de distintas concentraciones de CdCl₂ (0-50 µM) sobre el crecimiento de la planta y distintos parámetros fisiológicos con el fin de seleccionar una concentración del metal adecuada para realizar estudios posteriores. Como resultado de ello, se ha comprobado que el cadmio provoca una reducción significativa en el crecimiento de las plantas de guisante, expresado como peso fresco y como peso seco, dependiente de la concentración del metal en el medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los descritos en la misma especie vegetal por Hernández y col. (1998) y Dixit y col. (2001). Este efecto era más acusado en hojas, mientras que en raíces solo se ha detectado una reducción significativa del crecimiento con la mayor concentración de cadmio (50 µM), siendo las raíces laterales las más afectadas. Resultados similares han sido observados en raíces de maíz (Khan y col., 1984).

El tratamiento con Cd producía además un pardecimiento de las raíces de guisante que podría ser debido a la formación de complejos S-Cd tal como se ha descrito en *Arabidopsis* (Howden y col., 1995), o bien a la formación de fenoles. Así, en raíces de pino tiene lugar un incremento del contenido de fenoles solubles en respuesta al tratamiento con cadmio (Schützendübel y col., 2001). En glándulas de la epidermis de hojas de lirio de agua también tiene lugar acúmulo de fenoles en respuesta al estrés por cadmio (Lavid y col., 2001). Los polifenoles podrían participar en la desintoxicación de metales pesados, bien actuando como secuestradores de los mismos o indirectamente, actuando como antioxidantes contribuyendo a la eliminación de H₂O₂ con la intervención de peroxidasas (Schützendübel y col., 2001; Lavid y col., 2001). Posiblemente, la menor sensibilidad de las raíces al cadmio se deba a su capacidad para acumularlo de forma inactiva, quizás por su unión a fitoquelatinas, como se ha observado en otras especies vegetales (Zenk, 1996; Vögeli-Lange y Wagner, 1996; Schäfer y col., 1998) o porque se facilite el transporte del metal hacia la parte aérea de la planta (Barceló y col., 1988). Con respecto a las hojas, no se han observado síntomas de toxicidad, salvo la reducción del tamaño y del peso, mientras que en otras especies vegetales la presencia de Cd induce la aparición de síntomas de clorosis, pardeamiento de los

Discusión

márgenes de las hojas o curvatura de las mismas (Ouzounidou y col., 1997; Skórzynska-Polit y Baszynski, 1997; Baryla y col., 2001).

La reducción del crecimiento dependiente de Cd podría deberse a una inhibición de la división celular tal como han descrito Baryla y col. (2001), aunque este es un proceso complejo en el que intervienen múltiples factores. Así, la deficiencia de Ca inducida por Cd también podría determinar una reducción del crecimiento dado que este elemento es necesario tanto para el desarrollo de la pared celular, como para la estabilidad de la membrana plasmática (Greger y Bertell, 1992). Además de alteraciones en el contenido de Ca, una reducción del contenido de GSH, como el observado en hojas de guisante en respuesta al Cd, también podría influir negativamente sobre el inicio y mantenimiento de la división celular, tal como se ha observado en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en γ -glutamil cisteína sintetasa (Vernoux y col., 2000). Otro factor limitante del crecimiento es la reducción de la tasa fotosintética, que llega a ser hasta 6 veces inferior respecto al control en plantas cultivadas con CdCl₂ 50 μ M. En esta inhibición de la tasa fotosintética está posiblemente implicada la disminución en el contenido de clorofila que es dependiente de la concentración de Cd. De hecho, en otras especies vegetales se ha demostrado que el cadmio provoca una reducción en el contenido de clorofila, bien por degradación de la misma, o bien por la reducción de su biosíntesis, provocando la disminución de la tasa fotosintética de las plantas (Somashekaraiah y col., 1992; Bazzaz y col., 1992; Lakshaman y Surinder, 1999; Di Cagno y col., 1999). Otro hecho que explicaría la disminución de la tasa fotosintética sería la reducción del contenido de Fe y Mg observados. Ambos elementos son necesarios para un correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, asimilación del CO₂ y síntesis de clorofila (Ouzounidou y col., 1997). El Ca también es necesario para el mantenimiento del flujo de electrones en el fotosistema II (FSII), y la deficiencia de Ca inducida por Cd podría así afectar al FSII, como se ha descrito en trigo (Ouzounidou y col., 1997). El transporte electrónico en el FSII es inhibido por el Cd en plantas de *Beta vulgaris* (Greger y Ögren, 1991), mientras que no se ve afectado en plantas de *Brassica juncea* (Haag-Kerwer y col., 1999). En plantas de guisante, Lakshaman y Surinder (1999), también han descrito reducción de la fotosíntesis neta por el Cd junto con la inhibición de las actividades Rubisco, gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa. La inhibición de estas actividades del ciclo de Calvin también podría estar relacionada con la disminución de la productividad de las plantas (de Filippis y Ziegler, 1993; Siedlecka y col., 1997; Skórzynska-Polit y Baszynski, 1997; Lakshaman y Surinder, 1999). La reducción del número y tamaño de los cloroplastos por efecto del Cd, observada en este trabajo también debe contribuir a la reducción de la fotosíntesis neta y productividad.

Las alteraciones en el intercambio gaseoso a través de los estomas pueden limitar la fotosíntesis neta, y por lo tanto, la productividad vegetal. En este sentido, el análisis mediante microscopía de barrido de la superficie abaxial de las hojas de guisante, muestra un mayor número de estomas cerrados en respuesta al Cd, lo que llevaría consigo una disminución del CO₂ disponible para la fotosíntesis. El cierre de los estomas iba acompañado de una reducción de la tasa de transpiración dependiente de la concentración de Cd en la solución nutritiva. El efecto del Cd sobre la transpiración es complejo y aparentemente va a depender de la concentración del metal, la especie vegetal, y el periodo de tratamiento. Así, el Cd produce una reducción de la transpiración en *Picea abies* (Schlegel y col., 1987), *Veronica anagalis* y *Ranunculus aquatilis* (Saygideger, 2000), mientras que el efecto opuesto ha sido observado en *Beta vulgaris* (Greger y Johansson, 1992) y *Helianthus annuus* (di Cagno y col., 1999) y no se han observado cambios en diferentes ecotipos de *Silene* (Chardonens y col., 1998). Alteraciones en la apertura de los estomas en respuesta al Cd han sido descritas en distintas especies vegetales (Barceló y col., 1988; Greger y Johansson, 1992), así como una reducción de la densidad de los estomas (Baryla y col., 2001). El cierre de los estomas podría estar relacionado con un efecto directo del Cd sobre el contenido y el flujo de iones (fundamentalmente K⁺ y Ca²⁺) y movimiento del agua en las células guarda que, a su vez, está implicado en el proceso de cierre/apertura de los estomas (Poschenrieder y col., 1989). De esta forma, la deficiencia de Ca observada en las plantas de guisante tratadas con cadmio podría afectar a la función estomática.

El cadmio también provoca una disminución en la eficiencia en el uso del agua, y este efecto podría deberse a una inhibición de la absorción y translocación de la misma como se ha descrito en otras especies vegetales (Barceló y col., 1988), como consecuencia de la reducción del tamaño y número de los vasos, así como de alteraciones en el balance hormonal (Poschenrieder y Barceló, 1999).

El análisis del contenido de Cd en distintos tejidos demuestra que las plantas de guisante acumulan cadmio fundamentalmente en la raíz existiendo una relación lineal entre la concentración de cadmio en el medio y su acumulación en la raíz con CdCl₂ 0-30 μM, alcanzándose una meseta con CdCl₂ 30-50 μM. Esta capacidad para acumular Cd en las raíces está de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores en la misma especie vegetal (Leita y col., 1993; Lozano-Rodríguez y col., 1997), en maíz (Lozano-Rodríguez y col., 1997), en judía (Leita y col., 1993), en mostaza (Salt y col., 1995a), o en *Arabidopsis* (Larsson y col., 2002), entre otros. En trigo (Hart y col. 1998), *Lupinus* (Costa y Morel, 1993) y *Arabidopsis* (Larsson y col., 2002) se ha descrito una fase lineal y otra saturable en la asimilación del Cd por la raíz. La entrada del metal en las células de la raíz parece llevarse a cabo de un modo bifásico: a través de transportadores saturables y por difusión a través de canales de membrana (Cohen y col., 1998; Nies, 1995; Hart y col., 1998; Larsson y col., 2002). Una vez en la raíz, el cadmio puede asociarse a

Discusión

grupos carboxilo o sulfhidrilo componentes de la pared celular o formar complejos con fitoquelatinas para ser almacenado en la vacuola (Cohen y col., 1998).

Lozano-Rodríguez y col., (1997) han observado que en plantas de guisante el cadmio se acumula principalmente en la fracción soluble de las células de la raíz, siendo este un comportamiento característico de aproximadamente el 50% de las leguminosas (Lozano-Rodríguez y col., 1997). La translocación del Cd de la raíz al tallo parece estar controlada por la transpiración ya que en plantas de *Brassica juncea* el ABA reduce drásticamente la acumulación del Cd en la hojas (Salt y col., 1995a). Respecto a la localización subcelular de los acúmulos de Cd en hojas y raíces de guisante, los intentos realizados mediante aproximaciones de microanálisis con rayos-X utilizando un microscopio electrónico de alta resolución (HRTEM), han sido infructuosos incluso utilizando distintos métodos de inmovilización del Cd. En las condiciones experimentales utilizadas no se detectó acúmulo específico de Cd debido probablemente a que el metal se encuentra en forma soluble y no formando complejos tal como han observado Lozano-Rodríguez y col. (1997) en la misma especie vegetal, y posiblemente la concentración del Cd en la muestra se encuentra por debajo de los límites de detección de la técnica. No obstante, en plantas tratadas con Cd, mediante el uso de piroantimoniato como inmovilizador de cationes, se ha observado un mayor acúmulo de precipitados de antimonio fundamentalmente en la vacuola y en la proximidad de la pared celular tanto en raíces como en hojas, lo que refleja un mayor acúmulo de cationes dependiente de Cd^{2+} en ambos tejidos, si bien no podemos especificar el tipo de catión. Se han descrito resultados similares mediante el uso de piroantimoniato en raíces de plantas de maíz cultivadas en presencia de Al (Vázquez y col., 1999). La localización subcelular del Cd está sujeta a varios factores, entre ellos la especie vegetal, la concentración de Cd utilizada y el tiempo de tratamiento, e incluso el método empleado para la inmovilización y detección del metal. En plantas de maíz el cadmio se localiza fundamentalmente en la pared celular de células epidérmicas, córtex y elementos del xilema (Khan y col., 1984) mientras que Rauser y Ackerley (1987) han observado en raíces de maíz y *Agrostis* gránulos densos a los electrones en el citoplasma, núcleo y vacuola. En la vacuola del alga *Dunaliella* también se ha descrito Cd asociado a azufre (Heuillet y col., 1986). En el hiperacumulador *Thlaspi caerulescens* se han descrito acúmulos de Cd fundamentalmente en el apoplasto y en la vacuola de las células de la raíz asociados a calcio y a hierro (Vázquez y col., 1992). También se ha localizado Cd en las células de la vaina de *Azolla* (Sela y col., 1998) y en la pared celular de células epidérmicas de *Hordeum vulgare* (Brune y col., 1994) y *Silene vulgaris* (Chardonnes y col., 1998). En *Arabidopsis halleri*, considerada como un hiperacumulador de cadmio, el metal se acumula en la pared celular de la rizodermis asociada a fosfatos, y en la base de los tricomas de las hojas (Küpper y col., 2000). El acúmulo de cadmio en tricomas también ha sido descrito en plantas de *Brassica juncea* (Salt y col., 1995a) y tabaco (Choi y col., 2001), y

en lirio de agua tiene lugar el acúmulo de Cd en las glándulas de la epidermis, tanto en el rizoma como en la hoja (Lavid y col., 2001).

El estado nutricional de la planta se ve alterado por la presencia del cadmio, disminuyendo el contenido total en las hojas de Zn y Mn y, en menor medida, de Fe y Cu, mientras que en las raíces sólo resulta afectada la entrada de Mn por la mayor concentración de Cd. Estos resultados sugieren que el cadmio interfiere fundamentalmente en la incorporación del Mn a la raíz y en la translocación de micronutrientes desde la raíz a las hojas. La alteración de este transporte puede deberse a distintos factores, entre ellos, la inhibición de los transportadores implicados en la entrada de micronutrientes al xilema y en el desplazamiento hacia la parte aérea de la planta, a cambios morfológicos del tejido conductor, o a problemas en la absorción desde la hoja (Barceló y col., 1988). La disminución de la incorporación del Mn dependiente del Cd parece ser un hecho general en otras especies vegetales (Yang y col., 1996; Hernández y col., 1998; Salt y col., 1995a). En *Brassica juncea* el Cd produce una reducción del contenido en Mn tanto en raíces como en tallos, mientras que el contenido de Cu sólo se reduce en el tallo hasta un 50% (Salt y col., 1995a), y se han descrito resultados similares en *Betula pendula*, aunque en hojas también tenía lugar una reducción de la concentración de Fe, Mn y Cu (Gussarson y col., 1996). Sin embargo, se desconocen las razones de la reducción en la incorporación de Mn dependiente de Cd. La disminución del contenido de Zn en hojas podría responder a una inhibición competitiva por el Cd, ya que ambos tienen propiedades químicas similares, aunque en estudios llevados a cabo en distintas especies vegetales se ha observado cierta contradicción al respecto (Grant y col., 1998; Cakmak y col., 2000; Harris y col., 2001).

En cuanto al resto de micronutrientes, el comportamiento varía según la planta, la concentración de cadmio suministrada, las condiciones experimentales, y el tiempo de exposición. Por ejemplo, el contenido en Fe disminuye por efecto del Cd en remolacha, maíz y abedul (Greger y Lindberg, 1987; Siedlecka y Baszinski, 1993 y Gussarson y col., 1996) mientras que aumenta en plantas de judía y tomate (Chaoui y col., 1997 y Moral y col., 1994). En general, son varios los factores que pueden determinar el transporte de metales en condiciones de estrés por cadmio: cambios en la actividad H⁺-ATPasa de membrana, cambios en la selectividad de transportadores como el IRT1, o modificaciones de la actividad enzimática de la reductasa férrica. La actividad H⁺-ATPasa en raíces de girasol y trigo se reduce en presencia de cadmio, y ello se asocia a modificaciones en los componentes de la membrana (Fodor y col., 1995). No obstante, la inducción de la actividad H⁺-ATPasa de plantas de guisante en situaciones de deficiencia de Fe no se ha relacionado con un incremento de la acumulación de Cd en la raíz (Cohen y col., 1998). En cuanto a los transportadores, el IRT1 es un transportador de Fe que además puede transportar Zn, Mn y Cd, y su selectividad puede variar dependiendo del pH de la solución nutritiva

Discusión

(Korshunova y col., 1999). En plantas de guisante en situaciones de deficiencia de Fe tiene lugar la inducción de la expresión del *IRT1* y ello lleva consigo un incremento del contenido de otros cationes como el Cd y el Zn (Cohen y col., 1998). Además, en plantas de *Arabidopsis* se ha observado que un exceso de Cd produce la inhibición de la incorporación de Fe y Zn a través del *IRT1* (Korshunova y col., 1999). En el trabajo que se presenta en esta Memoria Doctoral, el aporte de Fe se realizó en forma de EDTA-Fe(III), que debe ser reducido a Fe(II) por la reductasa férrica, de forma que cualquier modificación en su actividad dependiente de Cd puede limitar la disponibilidad del Fe.

En general, la concentración de macronutrientes en las hojas se encuentra reducida de forma severa por efecto del Cd, mientras que en las raíces sólo se afectaba en los tratamientos con CdCl₂ 40 y 50 µM. Se han obtenido resultados similares en abedul (Gussarson y col., 1996) y remolacha (Greger y Lindberg, 1987). Es bien conocido que el contenido de cationes polivalentes puede verse afectado por la presencia de cadmio a través de procesos de competencia por los sitios de unión o por los transportadores (Gussarson y col., 1996). En plantas de *Arabidopsis* y tabaco se ha demostrado que los transportadores de la membrana vacuolar CAX2, transportan Ca, Cd y Mn y se inducen en situaciones de desequilibrio nutricional (Hirschi y col., 2000). Así mismo, la entrada de K puede verse afectada por la modificación, dependiente de Cd, de la actividad ATPasa responsable del transporte activo de este elemento y por la actividad de la reductasa férrica (Gussarson y col., 1996). La incorporación de cationes puede resultar alterada por modificaciones dependientes del Cd de la actividad de la reductasa férrica asociada a la membrana plasmática de raíces (Welch y col., 1993).

Inducción de Estrés Oxidativo en Plantas de Guisante

En hojas de plantas cultivadas con cadmio se encontró un incremento de la concentración de malondialdehído, un marcador de la peroxidación lipídica y, a su vez, considerado como un indicador de estrés oxidativo. Este incremento de malondialdehído dependía de la concentración del Cd en la solución nutritiva. Un efecto similar se ha observado en distintas especies vegetales como *Holcus lanatus* (Hendry y col., 1992), *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992; Shaw, 1995; Chaoui y col., 1996), *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), *Pisum sativum* (Lozano-Rodríguez y col., 1997; Dixit y col., 2001), y *Pinus silvestris* (Schützendübel y col., 2001). La infiltración de hojas de guisante con CdCl₂ 100 µM producía igualmente un incremento de la peroxidación lipídica dependiente del tiempo de incubación y este proceso iba asociado a la pérdida de pigmentos de las hojas (Dalurzo y col., 1997). La peroxidación de las membranas biológicas puede afectar severamente a la funcionalidad e integridad de las mismas, y puede producir daños celulares irreversibles. La peroxidación lipídica puede iniciarse por especies de oxígeno reactivo tales como O₂⁻, [•]OH y ¹O₂ o por acción de la lipoxigenasa (Halliwell y Gutteridge, 2000).

El tratamiento con Cd induce la actividad lipoxigenasa en plantas de *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992), y *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), lo que lleva consigo la peroxidación lipídica y la producción de radicales alcoxilo y peroxilo que son muy reactivos y pueden dañar a las membranas o a cualquier otra macromolécula (Halliwell and Gutteridge, 2000). Si bien el cadmio no es un metal como el Cu o el Fe, que participan en reacciones tipo Fenton generando especies de oxígeno reactivo de forma directa, sí puede inducir estrés oxidativo de forma indirecta, alterando el metabolismo de los cloroplastos, modificando la actividad de enzimas por unión con grupos SH, entre ellas enzimas relacionados con la defensa antioxidante, o bien modificando la composición de las membranas biológicas y potenciando daños oxidativos. Así, se han descrito cambios en la composición de las membranas lipídicas, dependientes del Cd, en raíces de plantas de guisante (Hernández y Cooke, 1997) y en plántulas de tomate (Ouariti y col., 1997) que afectan fundamentalmente al contenido de fosfolípidos y de ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, ya se ha indicado que el cadmio puede afectar al metabolismo de los cloroplastos en distintos puntos lo que puede provocar el desvío de los electrones de las cadenas de transporte electrónico del FSI y FSII, dando lugar a la formación de radicales libres (Foyer y col., 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante citocímica de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ no parecen dar mucha relevancia a los cloroplastos como fuente de ROS en situaciones de estrés por Cd. La disminución de GSH inducida por Cd, debido a la formación de PCs, podría contribuir al estrés oxidativo al descender la capacidad antioxidante de la célula (Gallego y col., 1996; Dixit y col., 2001).

Otra diana de los radicales libres son las proteínas, que pueden resultar afectadas por las especies de oxígeno reactivo, bien por la oxidación directa de sus aminoácidos, o por reacciones secundarias con aldehídos resultantes de la peroxidación lipídica (Levine y col., 1990). Ambas reacciones pueden dar lugar a grupos carbonilo dentro de las proteínas, cuya presencia es un índice de estrés oxidativo. El deterioro oxidativo también ha sido considerado como un marcador de senescencia en hojas (del Río y col., 1998). En este trabajo hemos observado que el cadmio provoca un incremento en el contenido de grupos carbonilo en extractos de hojas de guisante, si bien sólo es significativo en los tratamientos de $CdCl_2$ 40 y 50 μM . Con el fin de identificar el patrón de proteínas oxidadas, se realizó un estudio en extractos de hojas de plantas de guisante control y tratadas con $CdCl_2$ 50 μM , mediante detección inmunocímica con un anticuerpo frente a la dinitrofenilhidrazona (DNPH). Como resultado de ello, se han detectado una serie de bandas de proteínas oxidadas, con pesos moleculares comprendidos entre 24 y 120 kDa. En cloroplastos aislados de hojas de trigo bajo condiciones de estrés hídrico, se han identificado proteínas oxidadas con pesos moleculares similares a los descritos en este trabajo, especialmente las proteínas de 68, 54 y 41 kDa (Tambussi y col., 2000). La proteína oxidada de 55 kDa corresponde a la subunidad mayor de la Rubisco, una enzima clave en la fijación fotosintética del carbono.

Discusión

Los fragmentos más pequeños reconocidos por el anticuerpo frente a la Rubisco corresponden a la subunidad menor, el de 16 kDa, y el resto, con pesos moleculares de 48, 34, y 24 kDa son fragmentos producto de la degradación de la subunidad mayor. Se han observado fragmentos de degradación de la Rubisco similares en cebada (Desimone y col., 1996), trigo (Ishida y col., 1997) y maíz (Kingston-Smith y Foyer, 2000) sometidos a estrés oxidativo inducido por distintos agentes abióticos. La Rubisco es una proteína muy abundante sujeta a una continua degradación (Esquivel y col., 1998) lo que explicaría la presencia de fragmentos de degradación incluso en plantas control. La inhibición de la actividad de la Rubisco ha sido descrita como una de las primeras respuestas de la planta frente al cadmio (Siedlecka y col., 1997), y también se ha relacionado con procesos de senescencia (Landry y Pell, 1993).

Para la identificación del resto de las proteínas oxidadas, se procedió a la inmunoprecipitación de los extractos derivatizados con el anticuerpo frente a DNPH, para su posterior identificación mediante EGPA-SDS y transferencia a membranas de PVDF, utilizando distintos anticuerpos. De esta forma se ha comprobado que la FBPasa, otra enzima clave en la fijación del carbono, no parece verse afectada por el tratamiento con cadmio ya que la cantidad de proteína no varía en plantas tratadas con respecto a las control y su anticuerpo no reconoce ninguna de las proteínas inmunoprecipitadas con anti-DNPH. Sin embargo, la CAT, GR y Mn-SOD con masas moleculares de 53, 57 y 27 kDa, respectivamente, fueron reconocidas entre las proteínas oxidadas en plantas tratadas con cadmio. Por el contrario, la CuZn-SOD no se encontraba entre las proteínas oxidadas por efecto del Cd. La diferencia observada en la susceptibilidad de las distintas isoenzimas de SOD a modificaciones oxidativas podría deberse a diferencias en su estructura primaria y tridimensional. De hecho, en trabajos anteriores hemos constatado la mayor susceptibilidad de la Mn-SOD, en comparación con la CuZn-SOD, frente a la oxidación durante el proceso de purificación de ambas enzimas, requiriendo la Mn-SOD la incorporación de DTT en los tampones de extracción para prevenir su inactivación (Palma y col., 1998). Por lo que respecta a la CAT, es una enzima que se encuentra oxidada tanto en extractos de hojas control como de hojas tratadas con cadmio, lo que puede ser indicativo de una alta tasa de recambio de la proteína. De hecho, la CAT es una proteína muy sensible a la fotoinhibición y su actividad se ve afectada frente a distintas situaciones de estrés (Streb y col., 1993; Schäfer y Feirabend, 2000).

Para demostrar la implicación de las especies de oxígeno reactivo en la modificación oxidativa de proteínas, llevamos a cabo una incubación de extractos crudos de hojas de guisante con concentraciones crecientes de H₂O₂ y los resultados obtenidos, tanto en concentración de grupos carbonilo como en el patrón de proteínas oxidadas son similares a los obtenidos en extractos crudos de plantas cultivadas con cadmio. Estos resultados avalan la idea de que el estrés oxidativo generado por el cadmio, y en concreto por el H₂O₂, puede ser responsable de la oxidación de las proteínas *in vivo*. La medida de la

concentración de H₂O₂ en hojas de plantas control y tratadas con CdCl₂ 50 μM respalda este resultado, detectándose una concentración de H₂O₂ 6 veces mayor en plantas tratadas que en plantas control. Recientemente Dixit y col. (2001) han observado un incremento de la concentración de H₂O₂ en plantas de guisante cultivadas con Cd 40 μM durante 7 días, aunque este aumento es muy inferior al observado en esta Memoria. La diferencia podría deberse a la duración del tratamiento, que en nuestro caso fue mas prolongado (14 días). La acumulación de H₂O₂ por efecto del tratamiento con Cd también se ha demostrado en raíces de pino mediante tinción histoquímica (Schützendübel y col., 2001).

Es bien conocido que las proteínas modificadas oxidativamente son sustratos preferentes para la degradación proteolítica, y este hecho está asociado a un incremento de la tasa de recambio de las proteínas (Pacifici y Davies, 1990). Es por ello que la degradación de proteínas y la actividad proteolítica han sido propuestas como índices de estrés oxidativo. Por esta razón, en este trabajo se ha determinado el efecto del Cd sobre la actividad proteolítica de extractos crudos de hojas de guisante. Sin embargo, no se han observado cambios significativos en la actividad endoproteasa total, aunque el análisis de la actividad mediante EGPA mostraba un ligero incremento de las isoenzimas EP2 y EP3. Pero este incremento no parece ser suficiente como para degradar todas las proteínas oxidadas, lo que puede dar lugar a un acúmulo de las mismas hasta concentraciones potencialmente tóxicas promoviendo así daños celulares (Stadtman y Oliver, 1991). De igual forma Landry y Pell (1993) no han observado cambios en la actividad proteasa de hojas de *Populus* sometidas a condiciones pro-oxidantes de ozono, y en semillas de maíz crecidas a bajas temperaturas tampoco se han detectado cambios en la actividad proteolítica aunque sí se producía una acumulación de proteínas oxidadas (Prasad, 1996).

La generación de especies de oxígeno reactivo puede verse incrementada también por una disminución de la respuesta antioxidante de la planta, que engloba tanto a los antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, GR o peroxidasas) como a los no enzimáticos (GSH, ASC). De los antioxidantes no enzimáticos, el GSH es uno de los mas importantes y una de las principales fuentes de tioles no proteicos en células vegetales. El GSH desempeña un papel importante en la protección de la planta frente a distintas situaciones de estrés, especialmente el estrés oxidativo. Así, el GSH puede secuestrar especies de oxígeno reactivo directamente o bien participar junto con el ASC en el ciclo ascorbato-glutation encargado de la descomposición del H₂O₂ en distintos compartimentos celulares (Halliwell y Gutteridge, 2000; Jiménez y col.,1997). La reducción de la cantidad de GSH y de ascorbato en respuesta al Cd, observada en esta Memoria Doctoral podría indicar una reducción de la capacidad del ciclo ascorbato-glutation para descomponer el peróxido de hidrógeno, lo que explicaría en cierto modo el aumento del contenido de H₂O₂ observado en plantas crecidas con CdCl₂. En plantas de pino expuestas a CdCl₂ 50

Discusión

μM , el contenido de ascorbato total de la raíz se reduce en exposiciones largas mientras que el efecto opuesto tiene lugar a tiempos cortos de exposición (Schützendübel y col., 2001).

El GSH también participa en la desintoxicación de compuestos orgánicos mediante conjugación con los mismos en una reacción catalizada por la glutation-S-transferasa (Marrs, 1996). Por otro lado, el GSH desempeña un papel muy importante en la protección frente a metales, fundamentalmente Cd y Cu, a través de la formación de PCs catalizada por la PC sintetasa (Cobbett, 2000). La síntesis de PCs se induce por la presencia de metales en el medio (Cobbett, 2000) y ello va acompañado de una reducción del contenido de GSH (Meuwly y Rauser, 1992; Xiang y Oliver, 1998; Noctor y col., 1998), si bien el análisis de expresión de los genes implicados en la síntesis de GSH (*gsh1* y *gsh2*) demuestra un incremento de la transcripción de los mismos inducida por cadmio (Xiang y Oliver, 1998; Zhu y col., 1999). El papel del GSH en la tolerancia a metales pesados y en la síntesis de PCs ha sido bien ilustrado en mutantes de *Arabidopsis* sensibles al Cd como consecuencia de su deficiencia en la síntesis de GSH (Howden y col., 1995).

En esta Memoria se ha observado en hojas de plantas de guisante cultivadas en presencia de Cd una reducción del 50% en el contenido de glutation total (oxidado más reducido) con respecto a las plantas control, siendo el GSH el que experimenta una mayor reducción. El contenido de tioles totales aumentaba ligeramente pero el mayor incremento era el correspondiente a los tioles no proteicos. Esta discrepancia en los resultados podría deberse a la contribución de otros tioles no proteicos como la cisteína y la γ -glutamilcisteína. En raíces de pino se ha descrito un incremento del contenido de ambos tioles dependiente de la concentración de cadmio en el medio. No obstante, este incremento no parece estar relacionado con los mecanismos de defensa frente al cadmio, sino más bien ser el resultado de un aumento de la asimilación de sulfatos dependiente del Cd (Schützendübel y col., 2001). Una situación similar ha sido descrita en plantas de *Brassica juncea* expuestas al cadmio (Lee y Leusteck, 1999). Sin embargo, Domínguez-Solís y col. (2001) han descrito que el aumento de la síntesis de cisteína en plantas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés por cadmio está directamente implicado en los mecanismos de protección de la planta. Así, plantas transformadas que sobreexpresan el gen *Atcys-3A* que codifica la O-acetilserina(tiol) liasa, desarrollan tolerancia a concentraciones de Cd 250 μM (Domínguez-Solís y col., 2001).

La reducción del contenido de GSH observada en esta Memoria no parece estar asociada a la síntesis de PCs, ya que el análisis de proteínas en extractos crudos de hojas mediante EGPA y con distintas concentraciones de acrilamida, no mostró la inducción, dependiente del Cd, de proteínas de bajo peso molecular tipo fitoquelatinas. Sin embargo, no podemos descartar que tenga lugar su formación y que no sean detectadas por los métodos clásicos de separación de proteínas por EGPA. Por el contrario,

Leita y col. (1993), han demostrado mediante técnicas de HPLC, la inducción por Cd de PCs en hojas de guisante y judía, con masas moleculares de 9,2 y 5,3 kDa, respectivamente. La inducción de fitoquelatinas en hojas también ha sido descrita en plantas de tabaco (Vögeli-Lange y Wagner, 1996).

Además de su papel como antioxidante y precursor de PCs, el GSH puede actuar como un sensor del estado redox de la célula, desempeñando un papel muy importante en la integración de los procesos celulares con el crecimiento y el desarrollo en condiciones de estrés (May y col., 1998). Así, se ha demostrado que existe una correlación entre la cantidad de glutatión y el grado de adaptación de la planta a situaciones extremas de estrés por temperatura, xenobióticos, sequía, metales pesados o ataque por patógenos, y la inducción de su biosíntesis parece ser un hecho intrínseco a la respuesta de la planta al estrés (May y col., 1998).

El cadmio provoca una disminución, dependiente de la concentración del metal en la solución nutritiva, de las principales actividades responsables de la eliminación del H₂O₂, la catalasa y las peroxidasas, contribuyendo de esta forma al acúmulo de H₂O₂ observado en hojas tratadas con Cd. La reducción de la actividad CAT por Cd también ha sido descrita en otras especies como *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992; Chaoui y col., 1997), *Phaseolus aureus* (Shaw, 1995), *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), *Secale cereale* (Streb y col., 1993), *Lemna minor* (Mohan y Hosseti, 1997), *Amaranthus lividus* (Bhattacharjee, 1998), *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001) y *Capsicum annuum* (León y col., 2002), mientras que el efecto opuesto ha sido descrito en *Raphanus sativus* (Vitòria y col., 2001) y *Chloris barbata* (Patra y col., 1994). Estas discrepancias responden a varios factores, y principalmente dependen de la sensibilidad o tolerancia al cadmio de la especie vegetal, del tejido estudiado, de la concentración del metal utilizada, del método de aplicación, y del periodo de tratamiento utilizados. De esta forma, en plantas de guisante Dixit y col. (2001) han observado que concentraciones de Cd 40 µM producen un incremento de la actividad CAT en hojas a las 24 h de tratamiento, y este aumento se reduce a medida que se incrementa el tiempo de tratamiento. Por el contrario, la infiltración de hojas de guisante con Cd 100 µM producía una fuerte reducción de la actividad catalasa a las 24 h respecto a las hojas control, y un incremento de la misma a los 2 y 6 días de incubación (Dalurzo y col., 1997). La posibilidad de inactivación directa por unión del Cd a grupos SH de la catalasa ha sido descartada, dado que la incubación de la enzima comercial con Cd 100 µM, durante 72 h, no producía cambios de la actividad determinada mediante EGPA (datos no presentados en esta Memoria). El Cd podría inactivar la enzima indirectamente a través de un incremento de pro-oxidantes como el O₂^{·-} o el GSSG, lo que explicaría la presencia de grupos carbonilos en la proteína. Además de a una inactivación propiamente dicha, la reducción de la actividad CAT también se debe a una reducción de la cantidad de proteína, según se ha observado mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo específico frente a la

Discusión

catalasa. Esta disminución tanto de la actividad como de la proteína, podría estar asociada a procesos de degradación proteolítica ya que, como se ha indicado anteriormente, la catalasa se oxida por efecto del Cd, lo que la hace más susceptible a la degradación. La catalasa es una enzima muy sensible a la fotoinactivación como ha demostrado en hojas de centeno bajo diferentes situaciones de estrés, incluidas concentraciones tóxicas de Cd, y muestra una tasa de recambio elevada que puede inclinarse hacia una mayor degradación en determinadas circunstancias (Streb y col., 1993; Feierabend y col., 1999). Este proceso se encuentra favorecido por el incremento de la actividad proteolítica detectado en peroxisomas, donde se localiza esta actividad. Distefano y col. (1999) han demostrado que la CAT es una proteína diana de proteasas peroxisomales en procesos de senescencia foliar. El análisis de la expresión mediante Northern de los transcritos de esta proteína demuestra, sin embargo, un ligero incremento dependiente del Cd del ARNm, lo que sugiere cambios en la eficiencia de la traducción o cambios postraduccionales dependientes del Cd, tal y como se ha propuesto para la síntesis de CAT en plantas de arroz (Feierabend y col., 2001). Discrepancias entre el ARNm y la cantidad de proteína CAT también han sido observadas en hojas de maíz expuestas a ozono (Ruzsa y col., 1999) y en plantas de cebada tratadas con ácido giberélico (Fath y col., 2001). El aumento de los transcritos de CAT podría ser inducido por el aumento de la concentración de H_2O_2 observado en extractos crudos de hojas cultivadas con Cd, dado que la infiltración de hojas de guisante con ascórbico (secuestrador de H_2O_2), reduce los transcritos de CAT. Se ha demostrado que el H_2O_2 participa como molécula señal en la inducción de *cat1* en respuesta a ABA y a daños mecánicos en plantas de maíz (Guan y Scandalios, 2000a). Por el contrario, la regulación de la expresión de CAT no era dependiente de NO^{\cdot} , ya que ni el nitroprusiato (un donador de NO^{\cdot}), ni el PTIO (un secuestrador de NO^{\cdot}), afectaban los transcritos. El $O_2^{\cdot-}$ tampoco está implicado en la regulación de la síntesis de CAT dado que el TMP (un secuestrador de $O_2^{\cdot-}$), no tiene efecto alguno sobre la expresión de la enzima. Sin embargo, los transcritos de CAT responden positivamente a la cantaridina y al GMPc, lo que sugiere la participación de procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas y de la adenilato ciclasa, respectivamente.

El análisis de la actividad guayacol peroxidasa, utilizado como medida de la actividad total de peroxidasa, muestra una disminución de esta actividad dependiente de cadmio. Esta reducción de la actividad podría deberse a una inhibición directa de la enzima por el metal, tal como se ha descrito en plantas de trigo (Converso y col., 2000). Sin embargo, el suministro de Cd (100 μ M) mediante infiltración directa de las hojas producía el efecto opuesto en la misma especie vegetal (Dalurzo y col., 1997), lo que podría cuestionar un efecto inhibitorio directo del Cd sobre la enzima. La inducción cualitativa y cuantitativa de actividad peroxidasa es un hecho extendido en procesos de toxicidad por el Cd y otros metales pesados (Van Assche y Clijsters, 1990; Patra y col., 1994; Chaoui y col., 1997; Lavid y col., 2001;

Schützendübel y col., 2001; León y col., 2002) y ha sido relacionado con la generación de estrés oxidativo, dependiente de metales, y con procesos de lignificación de la pared celular asociados a mecanismos de adaptación a condiciones de estrés (Chaoui y col., 1997; Schützendübel y col., 2001).

El ciclo ascorbato-glutation constituye uno de los principales sistemas de eliminación del H₂O₂ en distintos compartimentos celulares y está compuesto básicamente por la APX, la GR, la MDHAR, la DHAR, el GSH y el ASC. El funcionamiento de este ciclo podría afectarse por la presencia de Cd en el medio de cultivo, ya que como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de GSH y ascorbato se encuentran disminuidos respecto a las plantas control. En cuanto a las actividades enzimáticas, la GR se incrementa ligeramente en actividad y contenido de proteína en presencia de CdCl₂ 10 y 50 µM. Estos resultados contrastan con la presencia de grupos carbonilo en la proteína, lo que es un índice de modificación oxidativa de la misma. Sin embargo, estas alteraciones pueden no afectar al centro activo de la proteína, lo que explicaría la ausencia de cambios de la actividad enzimática. No obstante, el análisis de expresión mostró una reducción dependiente del Cd en el ARNm de la GR. Estas discrepancias entre la cantidad de proteína, actividad, y el ARNm podrían ser debidas a una mayor inestabilidad de los ARNm, o bien a que la sonda utilizada (*Gor2*) para los ensayos de Northern reconozca mayoritariamente alguna de las isoformas de GR, mientras que los datos de proteína y actividad corresponden a la suma de las distintas isoformas presentes en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y citosol. Por otro lado, la regulación de GR era independiente de H₂O₂ dado que la incubación con ácido ascórbico prácticamente no altera los transcritos, pero sí responde al NO[•] ya que la incubación con nitroprusiato incrementa considerablemente los ARNm. El SA también podría intervenir en la regulación de la expresión de la GR, a juzgar por el incremento observado en los transcritos de hojas incubadas con este compuesto. Por el contrario, la expresión de la GR era independiente de cambios en el flujo de iones Ca²⁺, procesos de fosforilación de proteínas y adenilato ciclasa, lo que sugiere que la regulación de GR se encuentra a un más arriba en la cascada de reacciones de transducción de señales y posiblemente su regulación responda fundamentalmente al estado redox de la célula o, más concretamente, a la relación GSH/GSSG. Xiang y Oliver (1998) han observado que la GR no se activa por H₂O₂ pero sí por ácido jasmónico. En plantas de pimiento expuestas al Cd, se ha observado un incremento de la actividad GR en variedades tolerantes al metal, mientras que las variedades sensibles mostraban una actividad similar con respecto a las plantas control (León y col., 2002). Se han descrito incrementos de la actividad GR por efecto del Cd en *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), *Raphanus sativus* (Vitòria y col., 2001) y *Phaseolus vulgaris* (Chaoui y col., 1997), mientras que en el hiperacumulador *Alyssum* concentraciones elevadas de Cd producían una reducción de la actividad, si bien esta respuesta variaba dependiendo de la concentración del metal y de la especie estudiada (Schickler y Caspi, 1999). Schützendübel y col. (2001) han demostrado

Discusión

que en plantas de *Pinus sylvestris* la sensibilidad de la actividad GR al Cd también varía dependiendo del periodo de tratamiento.

Respecto a la actividad APX, el tratamiento con Cd producía un ligero incremento de la actividad, si bien las diferencias no eran significativas, lo que explicaría la ausencia de cambios en los transcritos de APX por efecto del tratamiento. Los datos existentes en la literatura discrepan respecto al efecto del Cd sobre la actividad de esta enzima. Así un incremento de actividad APX ha sido descrito en *Phaseolus vulgaris* (Chaoui y col., 1997), y *Pisum sativum* (Dixit y col., 2001), mientras que el efecto opuesto se ha descrito en *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), y fluctuaciones de la actividad se han detectado en función del periodo de tratamiento en raíces de *Pinus sylvestris* (Schützendübel y col., 2001). En cambio, en *Alyssum* la actividad no se afectaba por el tratamiento con Cd (Schickler y Caspi, 1999). En cuanto a la regulación de la APX, los resultados obtenidos en esta Memoria sugieren que la APX es una enzima constitutiva que se expresa independientemente de señales ambientales, por lo que las modificaciones que pueda experimentar su actividad podrían deberse fundamentalmente a modificaciones postraduccionales. Así, la expresión de APX era independiente de H₂O₂, dado que la incubación con ácido ascórbico no modificaba el ARNm. En plantas de *Arabidopsis* la activación de la APX tampoco es dependiente de H₂O₂ (Orendi y col., 2001). El uso de distintos efectores de la transducción de señales sugiere además que la expresión de la APX en respuesta al estrés por Cd no es dependiente de flujos de Ca²⁺, NO[•] o SA, pero sí responde ligeramente a fostatasas y GMPc. La activación de la APX citosólica en plantas de *Arabidopsis* en respuesta a ozono también era insensible al SA (Rao y Davis, 1999) así como en plantas de tabaco inoculadas con el virus del mosaico del tabaco (Mittler y col., 1999). Los resultados obtenidos en esta Memoria sobre la APX contrastan con la literatura existente en distintas situaciones de estrés, donde los transcritos de APXs varía en condiciones de exceso de luz, daños mecánicos, infección por patógenos, paraquat, etc. (Shigeoka y col., 2002). Sin embargo, también es cierto que los ARNm de las distintas isoenzimas de APX responden de una forma diferencial a los diferentes factores de estrés. La APX citosólica se induce en respuesta a alta intensidad luminosa y paraquat pero no frente a sequía o salinidad, mientras que la peroxisomal y la cloroplastídica no cambian en respuesta a ninguno de estos tratamientos (Shigeoka y col., 2002). Sobre la base de estos datos, la ausencia de cambios en los transcritos de APX en respuesta al Cd podría responder a cambios diferenciales en la expresión de las distintas isoformas, aunque de una forma global se mantenga constante.

La actividad GST también puede desempeñar un papel importante en procesos de desintoxicación de metales y el incremento de actividad observado en esta Memoria Doctoral podría contribuir a la generación de estrés oxidativo a través del consumo de GSH. Resultados similares han sido obtenidos en raíces y hojas de plantas de guisante (Dixit y col., 2001) y en tallos y raíces de trigo y guisante (Votila y

col., 1994). En cuanto a la regulación de la GST, el incremento observado de actividad podría responder a una inducción de la transcripción en respuesta a un incremento de la concentración de H_2O_2 , tal como se ha descrito en plantas de maíz (Polidoros y Scandalios, 1999).

La SOD es una enzima clave en la protección de las células frente al estrés oxidativo, llevando a cabo la eliminación de los radicales $O_2^{\cdot-}$. El análisis de la actividad SOD total en los extractos crudos mostró interferencias de algún componente de los extractos con la reducción del citocromo *c*, utilizado como molécula detectora, ya que en ausencia del sistema de generación de radicales $O_2^{\cdot-}$ (Xantina + XOD), se registraban altas tasas de reducción del citocromo *c*, que aumentaban con la concentración del Cd en el medio de cultivo. Estas interferencias podrían deberse a la presencia de fenoles que pueden interferir con el método del citocromo *c*, lo que explicaría el oscurecimiento observado en los extractos de plantas crecidas con $CdCl_2$ 40 y 50 μM . No obstante, el análisis de la actividad SOD mediante EGPA, mostró una reducción de la actividad de todas las isoenzimas de SOD presentes en hojas de guisante, siendo la CuZn-SOD, especialmente la isoforma citosólica, la más sensible al cadmio, seguida de la CuZn-SOD y la Fe-SOD cloroplastídicas, mientras que la isoforma más resistente era la Mn-SOD, localizada en mitocondrias y peroxisomas. La oxidación de la Mn-SOD determinada paralelamente por el contenido en carbonilos, podría explicar la disminución de la actividad observada durante el tratamiento con cadmio, ya que tanto el contenido de proteínas como los transcritos de la Mn-SOD prácticamente no se modificaban por el tratamiento con el metal. La reducción de la actividad Fe-SOD podría deberse a una inactivación por el H_2O_2 , ya que esta enzima, junto con la Cu,Zn-SOD, es sensible al H_2O_2 . Sin embargo, no podemos descartar modificaciones traduccionales o postraduccionales dependientes del Cd en la síntesis de la Fe-SOD.

La disminución de la actividad CuZn-SOD no era debida a procesos de oxidación o a interacciones del metal con grupos SH de la proteína, ya que la CuZn-SOD no contenía grupos carbonilo y era insensible a la incubación con Cd incluso durante 72 h. La disminución de la actividad CuZn-SOD estaba asociada a una reducción del contenido de proteína determinado por Western, siendo esta reducción especialmente dramática para la CuZn-SOD citosólica. Sin embargo, el análisis Northern mostraba un incremento de los transcritos de la CuZn-SOD por efecto del Cd. Estos resultados sugieren que el Cd puede producir modificaciones postraduccionales que afectan a la síntesis de CuZn-SOD, y de hecho, una reducción del contenido de Cu y Zn en hojas, inducido por el Cd podría afectar a la síntesis de la enzima (del Río y col., 1991). Otra explicación sería el incremento de la tasa de recambio de la CuZn-SOD dependiente del cadmio. Discrepancias similares entre los transcritos y la actividad de la proteína han sido descritas en plantas de tabaco expuestas al NaCl (Savouré y col., 1999).

Discusión

En cuanto a la regulación de la expresión de SODs, parece ser dependiente del H_2O_2 ya que la incubación con ácido ascórbico reprime completamente la acumulación de los transcritos correspondientes a Mn- y CuZn-SODs. Por el contrario, el $NO\cdot$ es un represor de la expresión de las SODs, ya que el nitroprusiato inhibe la acumulación de ARNm mientras que el PTIO (secuestrador de NO) la induce. La regulación de la expresión de ambos tipos de SODs parece ser dependiente de procesos de desfosforilación de proteínas, ya que la cantaridina induce ligeramente la expresión y, por el contrario, el GMPc y el SA reducen la acumulación de transcritos. La disminución de la actividad SOD por cadmio se ha descrito también en *Phaseolus vulgaris* (Somashékaraiah y col., 1992) y *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), así como en levaduras (Romandini y col., 1992). Por el contrario, se ha observado un incremento de la actividad SOD en *Lemna*, aunque la concentración de Cd utilizada era baja (Srivastave y Tel-Or, 1991), y en *Raphanus sativus* (Vitória y col., 2001), *Capsicum annuum* (León y col., 2002) y hojas de *Pisum sativum* (Dixit y col., 2001), aunque en este último caso el tiempo de tratamiento era inferior al utilizado en esta Memoria.

En cuanto a la actividad isoenzimática, en plantas de *Raphanus* el incremento de la actividad SOD era debido a un incremento de las dos isoformas presentes (Mn-SOD y CuZn-SOD) (Vitória y col., 2001), mientras que en *Capsicum* el cadmio producía un incremento de la Fe-SOD y de la Mn-SOD y una reducción de las dos CuZn-SODs (León y col., 2002). Las discrepancias existentes en distintas especies vegetales en cuanto a la respuesta de la actividad SOD y sus isoformas frente al Cd puede deberse a diferencias en la tolerancia al metal, al tiempo de tratamiento y a la concentración de cadmio utilizada en los trabajos. Así, plantas de *Capsicum annuum* se consideran tolerantes al Cd ya que soportan concentraciones elevadas de Cd sin mostrar síntomas de toxicidad (León y col., 2002), mientras que las plantas de guisante, como se ha mostrado en esta Memoria, son sensibles al Cd. Por otro lado, la respuesta diferencial de las isoenzimas de SOD frente al Cd puede deberse a su distribución en distintos compartimentos celulares y por ello, podrían utilizarse como indicadores de estrés oxidativo en los distintos orgánulos celulares.

Los resultados obtenidos en extractos crudos de hojas de plantas de guisante sometidas a diferentes concentraciones de $CdCl_2$ sugieren la inducción de estrés oxidativo, ya que se produce un aumento de la peroxidación lipídica, de la oxidación de proteínas, y de la concentración de H_2O_2 , y una disminución de la relación GSH/GSSG y del contenido de ácido ascórbico. Y esta situación puede acentuarse como consecuencia de la reducción de antioxidantes enzimáticos como la catalasa, peroxidasas y SODs, obteniéndose los efectos más acusados con una concentración de $CdCl_2$ de $50\ \mu M$. Si bien a esta concentración se mantenía la viabilidad de las plantas. A la vista de estos resultados se seleccionó esta concentración de $CdCl_2$ de $50\ \mu M$ para llevar a cabo el resto de los estudios.

Alteraciones en el Metabolismo Oxidativo de Peroxisomas de Hojas de Guisante

A la vista de los resultados obtenidos en hojas, y teniendo en cuenta la carencia de estudios subcelulares sobre la toxicidad del Cd, se ha abordado el estudio del efecto del CdCl₂ 50 µM sobre el metabolismo de los peroxisomas. Estos orgánulos tienen un metabolismo eminentemente oxidativo y constituyen uno de los lugares de producción de ROS en la célula, y están implicados en numerosas e importantes funciones celulares, tales como la fotorrespiración, la β-oxidación de ácidos grasos y el ciclo del glioxílico entre otras (del Río y col., 2002a). Otra característica de estos orgánulos es su plasticidad metabólica, ya que sus componentes enzimáticos pueden variar dependiendo del organismo, célula, tejido, e incluso de las condiciones ambientales (Van den Bosch y col., 1992; del Río y col., 2002a). Estas características, unido a la batería de antioxidantes presentes en estos orgánulos, les asigna un papel importante para el estudio de los mecanismos de toxicidad y tolerancia de las células frente a distintas situaciones de estrés.

El análisis mediante microscopía electrónica de las hojas de guisante muestra un ligero aumento del número de peroxisomas, inducido por el tratamiento con Cd, sin que se observaran modificaciones aparentes en su estructura. En la levadura *Candida albicans* se ha descrito un incremento de hasta seis veces en la población de peroxisomas por efecto del Cd y este hecho ha sido relacionado con la toxicidad del Cd en este organismo, a través de la generación de estrés oxidativo, como resultado del incremento de H₂O₂ producido en estos orgánulos y de la reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes (Chen y col., 1995). Una situación similar ha sido descrita en peroxisomas de hojas de guisante como consecuencia del tratamiento de las plantas con un xenobiótico (Palma y col., 1991). Si bien el aumento del número de peroxisomas causado por el Cd en hojas de guisante no es tan acusado como en *Candida albicans*, podría contribuir de alguna forma a la toxicidad del metal.

El cadmio induce además un incremento de dos veces en la producción de H₂O₂ en peroxisomas respecto a los peroxisomas de las plantas control. Este incremento se debe en parte al aumento de la actividad GOX, encargada de la conversión de glicolato en glioxilato y que constituye la primera enzima de la fotorrespiración en peroxisomas. El análisis mediante Western demuestra además que este aumento de actividad se debe a un mayor contenido de proteína GOX. La fotorrespiración suministra CO₂ que puede ser utilizado por el cloroplasto para la realización de la fotosíntesis, especialmente en condiciones en las que el intercambio de gases se encuentra disminuido por el cierre estomático, como hemos comprobado que tiene lugar en hojas de guisante como consecuencia de la toxicidad del Cd. Se ha sugerido que una de las funciones de la fotorrespiración podría ser la prevención de daños oxidativos que podrían resultar de una producción excesiva de radicales libres en el cloroplasto en condiciones limitantes de CO₂. De esta

Discusión

forma, el aumento observado en la actividad GOX podría indicar un incremento en la fotorrespiración a fin de evitar daños oxidativos en el cloroplasto, aunque ello llevaría consigo una mayor producción de H_2O_2 que podría causar estrés oxidativo si no va acompañado de un aumento simultáneo de los sistemas antioxidantes de defensa. Sin embargo, la actividad HPR, otra enzima peroxisomal implicada en la fotorrespiración, que cataliza la reducción dependiente de NADPH del hidroxipiruvato a glicerato, no experimentaba cambios con el tratamiento. Esto parece indicar que el proceso global de la fotorrespiración no está afectado por el tratamiento con Cd, aunque sí puede existir alguna regulación en la actividad GOX. Es posible que en condiciones de toxicidad causada por el Cd, la GOX pueda incrementarse a fin de proporcionar más glioxilato para la malato sintasa, lo que contribuiría a intensificar el ciclo del glioxilato, un proceso que es sabido tiene lugar en tejidos senescentes (de Bellis y col., 1990; Landolt y Matilde, 1990; Nishimura y col., 1996; del Río y col., 1998) y que como se verá a continuación, también se incrementa por Cd.

A diferencia del H_2O_2 , la producción de radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) determinada en membranas de peroxisomas no se modificaba significativamente por el tratamiento con Cd, aunque se apreciaba un ligero incremento. De igual forma, la actividad XOD principal sistema generador de $O_2^{\cdot-}$ en la matriz peroxisomal, se incrementaba ligeramente por el tratamiento, aunque no de forma significativa. La actividad Mn-SOD, responsable de la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ en matrices de peroxisomas tampoco se afectaba por el tratamiento. Estos resultados sugieren que la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ en peroxisomas de hojas no está implicada en el mecanismo de la toxicidad del cadmio.

La tasa de peroxidación lipídica en las membranas peroxisomales no se mostraba significativamente afectada por el tratamiento con Cd, debido probablemente al incremento de la actividad APX, localizada en la membrana peroxisomal. La función de esta enzima es eliminar el H_2O_2 que se escapa de la acción de la CAT, principal enzima encargada de descomponer este metabolito en la matriz de peroxisomas. También se ha observado un incremento en la actividad GR, que unido al de la APX sugiere una inducción del ciclo ascorbato-glutation presente en peroxisomas y que podría ser importante en la protección de las células frente a la toxicidad del Cd. Aunque la actividad APX total en extractos crudos de hojas de guisante no experimentaba cambios significativos, la actividad de las isoformas presentes en los distintos orgánulos puede variar por el tratamiento. Así la actividad peroxisomal experimenta un incremento en respuesta a los cambios desencadenados por el Cd y, probablemente, este incremento fuera contrarrestado por la reducción de otra isoenzima para mantener la actividad total equilibrada. En este sentido, se ha observado una reducción de la actividad de la isoenzima mitocondrial que podría compensar el incremento de la peroxisomal (datos no presentados). A diferencia de la GR y la APX, el cadmio no produce alteraciones significativas ni en la actividad y ni en los ARNm de la MDHAR, lo

que sugiere que en estas condiciones la reducción del monodeshidroascorbato a ascorbato en peroxisomas se realiza principalmente vía DHAR. El análisis de distintos efectores sobre la expresión de la MDHAR demuestra que es dependiente de un gran número de señales, entre ellas H_2O_2 , O_2^- , NO^- , canales de Ca^{2+} , proteínas fosfatasa, adenilato ciclasa y ácido salicílico. Es poco lo que se conoce de la regulación de la MDHAR en situaciones de estrés pero se ha descrito la inducción de transcritos en senescencia y frente a daños mecánicos, posiblemente en respuesta a una reducción del ascorbato celular (Creissen y Mullineaux, 2002)

El NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation en peroxisomas es suministrado por las enzimas del ciclo de las pentosas fosfato (G6PDH y 6PGDH), y por la NADP-ICDH. El tratamiento con Cd producía un incremento de dos veces en las actividades G6PDH y 6PGDH de la matriz peroxisomal y, en el caso de la G6PDH, este aumento se debía a un incremento del contenido de proteína. Estos resultados corroboran el aumento observado en la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation APX y GR y su papel relevante en los mecanismos de defensa de la planta frente a la toxicidad del Cd. Una respuesta similar se ha observado en extractos de *Silene italica* expuestas a Ni y Cd (Mattioni y col., 1997). Otra fuente de NADPH en peroxisomas es la NADP-ICDH (Corpas y col., 1999) cuya actividad experimentaba igualmente un incremento como consecuencia del tratamiento con Cd. El papel de la actividad NADP-ICDH en peroxisomas todavía no ha sido determinado con claridad, pero esta enzima parece estar implicada en los mecanismos de reducción del $NADP^+$, lo que contribuiría a mantener una relación NADPH/NADP alta para favorecer el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation, así como otras rutas metabólicas. En un estudio llevado a cabo con distintas variedades de *Capsicum annum* que difieren en su sensibilidad frente al Cd, se ha correlacionado positivamente la tolerancia al Cd con una mayor capacidad de las plantas para regenerar el NADPH a través de las enzimas del ciclo de las pentosas fosfato, la NADP-ICDH y la enzima málico (León y col., 2002). Según estos autores, el incremento de estas deshidrogenasas podría conferir ventajas a la planta en aquellas situaciones en las que la fotosíntesis está fuertemente inhibida y, por tanto, el suministro de NADPH y ATP está muy limitado.

En cuanto a la actividad catalasa, el análisis de los peroxisomas por IEF ha permitido distinguir 5 isoformas diferentes de CAT, que varían en su punto isoeléctrico pero comparten una única subunidad con una masa molecular de 57 kDa. La existencia de varias isoformas de catalasa en hojas de guisante no es única, también se ha descrito en ricino (Ota y col., 1992), tabaco (Havir y McHale, 1989), pino (Mullen y Gifford, 1993), maíz (Scandalios, 1994), algodón (Ni y Trelease, 1991), *Arabidopsis* (Frugoli y col., 1996) y girasol (Eising y col., 1990). Resultados preliminares de Southern, que no han sido presentados en esta

Discusión

Memoria, nos hacen suponer que la CAT peroxisomal de guisante está codificada por un único gen, por lo que la presencia de múltiples

isoformas podría explicarse por modificaciones postraduccionales, o por la existencia de diferentes estados de oxidación de la proteína como se ha descrito en *Neurospora crassa* (Lledías y col., 1998). En cualquier caso, las isoformas más ácidas parecen ser las que más se modifican por la toxicidad del Cd.

El peróxido de hidrógeno es bien conocido como oxidante, y teniendo en cuenta que su producción en peroxisomas se encuentra incrementada por efecto del tratamiento con Cd, parece lógico pensar que en estas condiciones pueden tener lugar procesos de oxidación de proteínas en estos orgánulos. Es por ello, que se ha estudiado en peroxisomas de hojas de guisante el efecto del cadmio sobre el contenido de grupos carbonilo, como marcador de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos sugieren que el Cd produce daños oxidativos en las proteínas de los peroxisomas. Sin embargo, este hecho no parece afectar a la funcionalidad de la membrana peroxisomal, ya que no se altera ni la integridad de los orgánulos ni la permeabilidad de la membrana. Estos resultados concuerdan con la ausencia de daños por peroxidación lipídica y de alteraciones en la estructura de estos orgánulos. El hecho de que no se produzcan daños en las membranas de los peroxisomas puede deberse al aumento de la actividad APX localizada en las mismas y que ha sido mencionado anteriormente. No obstante, la ausencia de daños en las membranas contrasta con la formación de grupos carbonilo, lo que hace suponer que la mayoría de las proteínas oxidadas pueden estar asociadas a la matriz peroxisomal. Entre ellas podrían estar incluidas la CAT y la GR, identificadas con anterioridad como algunas de las proteínas oxidadas en extractos crudos. En mitocondrias de cultivos celulares de condrocitos de conejo, se ha descrito que la senescencia produce un incremento de las especies de oxígeno reactivo así como del contenido de grupos carbonilo, mientras que no tienen lugar cambios en la estructura ni en la funcionalidad de la membrana mitocondrial (Pfeuty y Gueride, 2000).

Las proteínas oxidadas en los peroxisomas pueden ser eliminadas de forma eficiente por la acción de las proteasas presentes en estos orgánulos, previniendo de esta forma daños oxidativos o por agregación de proteínas (Distefano y col., 1997). El análisis de actividad endoproteasa (EP) en peroxisomas de plantas expuestas a Cd muestra un patrón similar al descrito en peroxisomas de hojas senescentes (Distefano y col., 1997). De las isoenzimas presentes, EP1 y EP2 han sido descritas previamente como serín-proteasas, mientras que la EP5 es una metalo-proteasa, y las EP3 y EP4 no han sido caracterizadas hasta la fecha (Distefano y col., 1997). El incremento observado en la actividad proteolítica de los peroxisomas, además de contribuir a la disminución de las proteínas oxidadas, podría estar relacionado con los cambios metabólicos que pueden tener lugar en estos orgánulos como consecuencia del tratamiento con Cd. Así, se ha observado una inducción dependiente del Cd de las

enzimas del ciclo del glioxilato, MS e ICL. Estas enzimas están presentes fundamentalmente en los glioxisomas, un tipo de peroxisomas presentes en cotiledones de semillas oleaginosas que convierten las reservas lipídicas en azúcares, que después son utilizados en la germinación y crecimiento de la planta (Huang y col., 1983). En el ciclo del glioxilato, la actividad MS genera malato en presencia de glioxilato y acetil-CoA, mientras que la ICL descompone el isocitrato en succinato y glioxilato. Este ciclo se induce en peroxisomas de hojas senescentes, donde se produce una transición metabólica de los peroxisomas de hojas a glioxisomas (de Bellis y col., 1990; Landolt y Matilde, 1990; Nishimura y col., 1996; del Río y col., 1998). Esta transición metabólica requiere una degradación de las proteínas preexistentes, lo que podría explicar la inducción de actividad proteolítica responsable de este cambio metabólico.

Otro efecto del Cd a tener en cuenta es el incremento de la concentración de proteínas en peroxisomas de hojas de plantas tratadas. Este aumento podría explicarse por el ligero incremento observado en el número de peroxisomas y por una mayor síntesis de las proteínas ya presentes en el orgánulo, ya que no se han detectado nuevos polipéptidos mediante EGPA en peroxisomas de plantas tratadas con Cd. Esto está de acuerdo con la síntesis de nuevos peroxisomas que, en la mayoría de las células eucariotas tiene lugar por incorporación postraduccional de nuevas proteínas tanto de la matriz como de la membrana, a los peroxisomas ya existentes, los cuales se dividen posteriormente para dar lugar a los peroxisomas hijos (Lazarow y Fujiki, 1985; Titorenko y Rachubinski, 1998; Baker y Graham, 2002). El hecho de que el incremento de proteínas peroxisomales causado por el Cd sea utilizado para la proliferación de orgánulos ya ha sido descrito en otros trabajos (Chen y col., 1995). En procesos de senescencia también se ha visto que se induce la proliferación de peroxisomas en hojas de guisante (Pastori y del Río, 1994) y en pétalos de clavel (Droillard y Paulin, 1990), así como en plantas expuesta a ozono (Morré y col., 1990) y en tratamientos con los xenobióticos isoproturón (de Felipe y col., 1988) y clofibrato (Palma y col., 1991).

En la Fig. 5.1 se muestra un esquema compendiando todas las modificaciones producidas por el cadmio en el metabolismo de los peroxisomas, que se acaban de comentar.

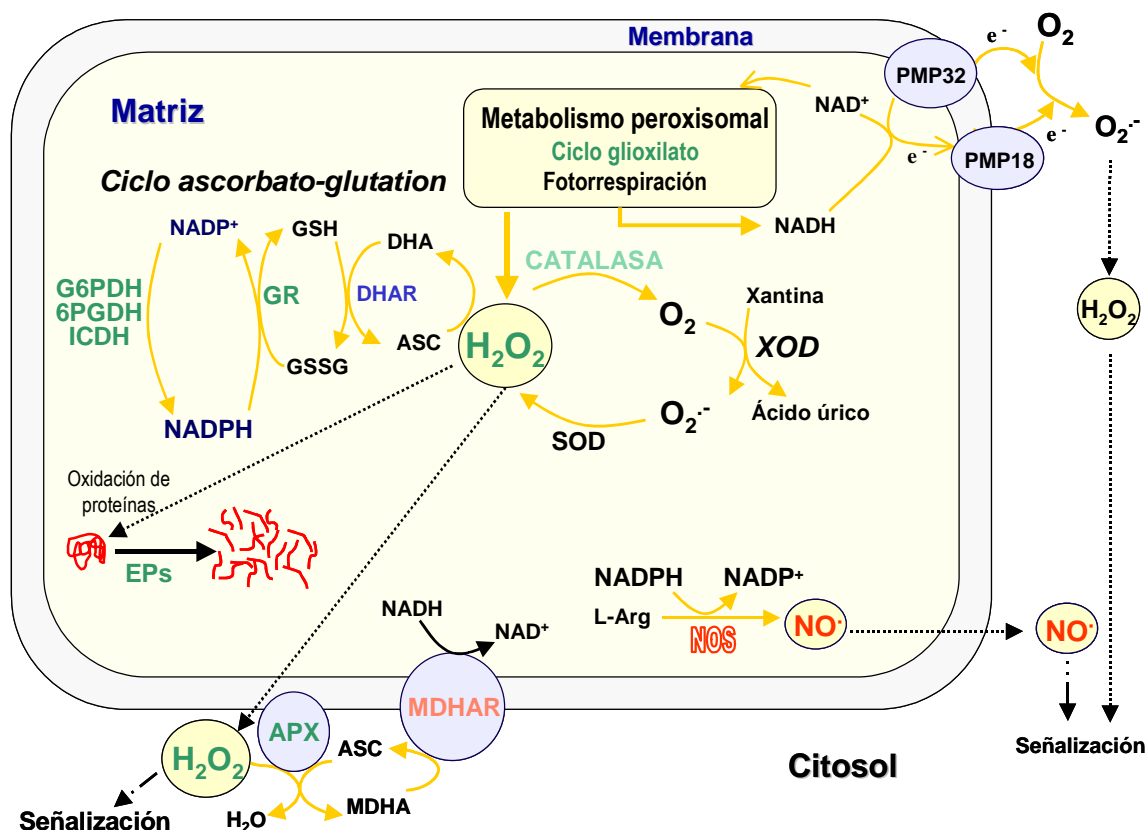


Fig. 5.1 Esquema que ilustra las modificaciones producidas por el cadmio en el metabolismo peroxisomal (modificado de Corpas y col., 2001). Las enzimas que aumentan su actividad se presentan en color verde, las que la disminuyen, en color rojo y, las que no varían su actividad en color negro. APX: ascorbato peroxidasa; DHAR: deshidroascorbato peroxidasa; GR: glutatión reductasa; G6PDH: glucosa, 6 fosfo deshidrogenasa; 6PGDH: 6 fosfo gluconato deshidrogenasa; ICDH: isocitrato deshidrogenasa; MDHAR: monodeshidroascorbato deshidrogenasa; NOS: óxido nítrico sintasa; PMP18 y 32: polipéptidos de membrana peroxisomal de 18 y 32 kDa; SOD: superóxido dismutasa; XOD: xantina oxidasa

Modificaciones en la Estructura y Ultraestructura de las Hojas

El análisis de secciones de hoja por microscopía óptica muestra alteraciones de la estructura en plantas cultivadas en presencia de CdCl₂ 50 μM, caracterizadas por un aumento del tamaño de las células del parénquima, en especial del parénquima en empalizada, fundamentalmente debido a un incremento del tamaño de la vacuola, así como a una reducción del número y tamaño de los cloroplastos. Se han observado resultados similares en plantas de *Brassica napus* cultivadas en suelos contaminados con

cadmio (Baryla y col., 2001). El análisis al microscopio electrónico de cortes de hojas muestra además alteraciones de la estructura de los cloroplastos, tales como desorganización de tilacoides, incremento del número y tamaño de plastoglobulos y aumento de los gránulos de almidón. Cambios similares han sido descritos en distintas especies vegetales en respuesta al tratamiento con Cd (Barceló y col., 1988; Ouzounidou y col., 1997; Ouariti y col., 1997; Jemal y col., 2000). El aumento del contenido en almidón, por efecto del cadmio, ha sido descrito en plantas de *Lupinus* y podría explicarse sobre la base de una reducción de la fijación de CO₂ (Costa y Spitz, 1997). En plantas de *Brassica napus* la reducción del número de cloroplastos por célula ha sido relacionada con interferencias del cadmio en la división de los cloroplastos (Baryla y col., 2001). Los cambios observados en la estructura de los cloroplastos en respuesta al cadmio son similares a los descritos en tejidos senescentes, de hecho, estos orgánulos son unos de los primeros en experimentar procesos catabólicos durante la senescencia (Smart, 1994). La formación de plastoglobulos está unida a la degradación de tilacoides que acompaña a la senescencia (Buchanan-Wollaston, 1997; del Río y col., 1998; Inada y col., 1998). A diferencia de los cloroplastos, la estructura de las mitocondrias y de los peroxisomas no parece verse afectada por el tratamiento con Cd, y tan solo se ha observado un ligero incremento en el número de peroxisomas por célula, como se ha mencionado anteriormente. Otro efecto del tratamiento con Cd que también se produce durante la senescencia, es la formación de invaginaciones del tonoplasto que acompaña al crecimiento de la vacuola, y la formación de bandas de mielina como resultado de procesos de degradación de membranas (Thimann, 1983; Thomsom y Platt-Aloia, 1987; Inada y col., 1998; Quirino y col., 2000). Estos daños estructurales observados al microscopio, especialmente en membranas biológicas, podrían deberse en parte a los daños oxidativos que hemos mencionado anteriormente, como resultado de alteraciones en el metabolismo de especies de oxígeno reactivo.

El tratamiento con Cd producía también cambios en la condensación de la cromatina nuclear, respecto a las plantas control. En plantas de *Allium*, el Cd produce cambios en la estructura nuclear que afectan fundamentalmente al nucleolo, y según Marcano y col. (2002) estos cambios ultraestructurales sugieren que el metal puede provocar un bloqueo en la biosíntesis o maduración del ARN ribosómico lo que conduce a la inhibición de la transcripción de algunos ARN, la segregación nucleolar y la condensación de la cromatina (Marcano y col., 2002).

Senescencia y Muerte Celular en Hojas de Guisante

Los cambios bioquímicos observados en esta Memoria Doctoral en plantas de guisante, así como las alteraciones en la ultraestructura y metabolismo de peroxisomas, indican la inducción de senescencia como uno de los mecanismos de la toxicidad del cadmio. Sin embargo, también hay otros síntomas característicos de un proceso de senescencia que no se han observado en el tratamiento con Cd, como son la reducción del contenido de proteínas y una fuerte inducción de actividad proteolítica (Thimann, 1983; Buchanan-Wollaston, 1997), lo que sugiere que la respuesta frente al Cd puede ser específica, aunque comparta procesos similares con la senescencia. La senescencia es una secuencia de procesos degradativos que conducen a la remobilización de nutrientes y a la muerte de la hoja. Es un proceso regulado que implica inhibición de la fotosíntesis, degradación de proteínas, peroxidación lipídica y degradación de clorofila (Smart 1994,). La senescencia foliar, como otros procesos, está regulado por la expresión diferencial de genes, entre ellos el *rbcS* que codifica la subunidad menor de la Rubisco, que se reduce en senescencia (Bate y col., 1991), mientras que otros genes se activan, entre ellos los genes que codifican proteasas, y reguladores de proteasas, lipasas, metalotioneínas, enzimas del ciclo del glioxílico, proteínas relacionadas con la patogénesis, glutation-S-transferasa, etc (Buchanan-Wollaston, 1997). Aunque la senescencia foliar depende de la edad de la planta y fase reproductiva, algunos factores externos tales como deficiencias nutricionales, ataque por patógenos, sequía, ozono, etc pueden inducir una senescencia prematura lo que indica que existen múltiples vías de señalización que conducen a la inducción de la misma (Smart, 1994, Miller y col., 1999). En el caso del cadmio, la inducción de senescencia es un proceso complejo en el que intervienen múltiples factores, entre ellos alteraciones nutricionales que pueden afectar, a su vez, a importantes procesos metabólicos, y también a procesos oxidativos derivados de cambios en el metabolismo del oxígeno reactivo como se ha mencionado con anterioridad. Según Rascio y col. (1993) el Cd puede también inducir senescencia mediante estimulación de la biosíntesis del etileno. En la Tabla 5.1 se resumen los distintos procesos característicos de la senescencia inducida por cadmio en plantas de guisante, descritos en esta Memoria Doctoral.

Tabla 5.1 Características de la senescencia inducida por cadmio en hojas de plantas de guisante

Alteración de la actividad fotosintética	Reducción del contenido en clorofila
Alteración de la ultraestructura celular	Desorganización de los grana Incremento de los plastoglobulos Aparición de bandas de mielina Vesiculación del citosol Condensación de núcleos
Procesos oxidativos	Aumento de la producción de H ₂ O ₂ Peroxidación lipídica de membranas Oxidación de proteínas
Reducción de la capacidad antioxidante celular	Disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (CAT, Peroxidasas, SOD) Disminución de antioxidantes no enzimáticos (GSH/ASC)
Alteraciones en el metabolismo de peroxisomas	Inducción de la población peroxisomal Inducción del ciclo del glioxilato Inducción de proteasas peroxisomales

Como marcador de muerte celular se ha utilizado la tinción con “Evans Blue” que es un colorante impermeable a las membranas biológicas y que, por lo tanto, sólo penetra en células que presentan graves daños en su pared y membrana plasmática. El análisis de hojas de guisante utilizando este colorante muestra una mayor capacidad de retención del colorante por parte de las hojas de plantas expuestas al Cd lo que demuestra un mayor índice de muerte celular dependiente del Cd. Adicionalmente, se utilizó como marcador de muerte celular la pérdida de electrolitos mediante análisis de cambios de conductividad de discos foliares, obteniéndose resultados similares, si bien las diferencias entre plantas control y expuestas al Cd no fueron tan patentes como con el “Evans Blue”. El incremento de la conductividad en las plantas expuestas al Cd era revertido por la adición de secuestradores de O₂⁻, lo que demuestra que estas especies de oxígeno reactivo pueden estar implicadas en este proceso. Por el

Discusión

contrario, la adición de ácido salicílico y nitroprusiato, un donador de NO[•], producía un incremento considerable de la conductividad foliar, lo que sugiere la participación del H₂O₂ y del NO[•] en la muerte celular. El papel del NO[•] en la activación de la muerte celular en la respuesta hipersensible ha sido recientemente demostrado en cultivos celulares (Delledonne y col., 1998). El tratamiento de suspensiones celulares de soja con nitroprusiato potencia la inducción de la muerte celular siendo su efecto más acusado cuando hay un incremento de la concentración endógena y exógena de H₂O₂ (Delledonne y col., 1998). Este efecto del NO[•] podría deberse en parte a su acción sobre la APX y la CAT, produciendo la inactivación de ambas enzimas y, por tanto, aumentando la concentración del H₂O₂ (Clark y col., 2000).

La tinción con “Evans Blue” y el aumento de la conductividad han sido considerados por algunos autores como marcadores de muerte celular programada o apoptosis (Delledonne y col., 2001). Sin embargo, el análisis de fragmentos de ADN de hojas de guisante expuestas a Cd, no mostró la formación de fragmentos en escalera de ADN, característico de los procesos apoptóticos, lo que nos permite concluir que el Cd en las condiciones experimentales utilizadas no induce procesos de apoptosis propiamente dichos. Este resultado ha sido corroborado mediante el análisis de la formación de fragmentos de ADN al microscopio de fluorescencia (técnica TUNEL), donde no se observaron núcleos apoptóticos ni en plantas control ni en las expuestas al Cd. La ausencia de algunas de las alteraciones morfológicas características de las células apoptóticas, tales como formación de precipitados densos en el citosol, apoyan la ausencia de apoptosis en las condiciones experimentales utilizadas en esta Memoria. En cultivos de células de tabaco se ha descrito recientemente que el Cd provoca apoptosis, caracterizada por la fragmentación de la cromatina nuclear, a concentraciones de Cd de 50-100 mM. Sin embargo, concentraciones inferiores también producían muerte celular pero sin que se observara degradación de ADN (Fojtová y Kovarik, 2000). Por tanto son posibles dos mecanismos de muerte celular en función de la concentración de Cd, uno de ellos respondería a procesos de necrosis, a bajas concentraciones de Cd e inducido por estrés oxidativo, mientras que la apoptosis tendría lugar a concentraciones muy elevadas de Cd (Fojtová y Kovarik, 2000). Estos resultados sugieren que en las condiciones experimentales utilizadas en esta Memoria Doctoral el Cd podría provocar muerte por necrosis y que, en condiciones fisiológicas, el metal podría inducir apoptosis requiriendo para ello concentraciones muy superiores a las empleadas en este trabajo, y que difícilmente pueden darse en la naturaleza.

Producción Celular de ROS y NO[•]

Una vez demostrado que el Cd induce estrés oxidativo en hojas, resulta de gran utilidad determinar la localización precisa de la producción de ROS y NO[•] con objeto de conocer los mecanismos implicados en este proceso. Actualmente, apenas existen datos en la literatura respecto a la producción a subcelular de ROS y NO[•] en situaciones de estrés por metales pesados. La producción diferencial de ROS y NO[•] en distintas células y orgánulos celulares podría activar la expresión específica de genes implicados en la respuesta de los distintos orgánulos al estrés por Cd, lo que puede constituir un mecanismo muy fino de regulación celular e incluso sistémico. Mediante técnicas citoquímicas utilizando CeCl₃ se ha demostrado que el Cd induce la acumulación de H₂O₂ en el tejido vascular, células epidérmicas y células del parénquima lagunar. La especificidad de estos precipitados se ha confirmado mediante el uso de catalasa, que descompone el H₂O₂, y por tanto se utiliza como control negativo. Los precipitados de Ce observados en las células de transferencia del tejido vascular están probablemente asociados a procesos de lignificación que son muy activos en este tejido (Olson y Varner, 1993), lo que explicaría su presencia incluso en hojas control, si bien el precipitado de H₂O₂ observado en hojas procedentes de plantas tratadas con Cd era mayor que en las hojas control. Este resultado está de acuerdo con una activación de la lignificación de la pared celular en respuesta a la toxicidad por metales que ha sido descrita por varios autores (Schützendübel y col., 2001; Delisle y col., 2001).

En las células de la vaina, próximas a las células de transferencia, el tratamiento con Cd induce la producción de H₂O₂ y O₂^{•-} en el tonoplasto. La colocalización de ambas ROS sugiere la posibilidad de que el H₂O₂ detectado proceda de la dismutación espontánea del O₂^{•-}. La producción de O₂^{•-} descrita en este trabajo constituye la primera referencia de la localización subcelular de esta especie de oxígeno reactivo en plantas. Por lo que respecta a las células de la vaina, son células aclorofílicas y tienen algunas diferencias estructurales con las células del mesófilo. Así, los cloroplastos no poseen grana, son más pequeños que los de las células del mesófilo y no se encuentran en estrecha asociación con peroxisomas o mitocondrias. La producción de ROS en este tipo de células podría deberse a una disminución de la capacidad antioxidante de las mismas, como se ha descrito en plantas de maíz (Kingston-Smith y Foyer, 2000). Sin embargo, en plantas C₃, como el guisante, no hay datos sobre una posible distribución diferencial de la capacidad antioxidante en las células del mesófilo y de la vaina. En hojas de maíz (planta C₄) se ha observado una mayor susceptibilidad de las células de la vaina al estrés oxidativo por factores abióticos frente a las células del mesófilo debido a una deficiencia de NADPH en estas células que es necesario para la reducción del ascorbato oxidado (Kingston-Smith y Foyer, 2000).

Discusión

También se ha observado producción de H_2O_2 en las células de la epidermis, concretamente en la cara citosólica de la membrana plasmática. Estas células podrían ser más susceptibles a los daños provocados por Cd ya que el metal podría acumularse en la epidermis favorecido por la fuerza de la transpiración (Chardonnens y col., 1998), y a su vez, una alta concentración de Cd podría provocar daños en el metabolismo de las mismas afectando al balance catiónico, la relación GSH/GSSG y a las defensas antioxidantes, promoviendo un estrés oxidativo. En raíces de plantas de trigo tratadas con Al se ha demostrado que las células epidérmicas de la raíz muestran un mayor índice de muerte celular y este proceso está asociado a un aumento de la concentración del H_2O_2 dependiente de la oxalato oxidasa (Delisle y col., 2001).

Respecto a las células del mesófilo, el acúmulo de ROS dependiente de Cd tiene lugar fundamentalmente en la membrana plasmática y recuerda a la “explosión oxidativa” descrita en respuesta a patógenos (Bestwick y col., 1997, 1998). En estas células también tiene lugar la formación de H_2O_2 en la membrana mitocondrial, concretamente en la cara externa de la misma y podría estar asociada a una NADH-oxidoreductasa descrita en la membrana mitocondrial e independiente de la cadena de transporte electrónico, que utiliza NADH citosólico y libera $O_2^{\cdot-}$ al espacio extramitocondrial (Nohl, 1994). Sin embargo, no podemos descartar que la producción de ROS sea el resultado de alteraciones de la cadena de transporte electrónico mitocondrial inducidas por el Cd. La producción de H_2O_2 observada en peroxisomas está de acuerdo con los resultados obtenidos en peroxisomas purificados y podría ser el resultado del incremento de la actividad GOX descrito con anterioridad, aunque no se pueden descartar otras fuentes de H_2O_2 como la acil CoA oxidasa. Es de destacar la posición de los precipitados de cerio en la proximidad de la membrana peroxisomal en estrecho contacto con cloroplastos y tonoplasto. Esta observación sugiere una distribución funcional de proteínas en el orgánulo, y también la posibilidad de que el de H_2O_2 producido en peroxisomas actúe como molécula señal participando en la comunicación entre orgánulos y en la transducción de señales que conducen a la activación de genes implicados en la respuesta celular al estrés por Cd. Recientemente, Corpas y col. (2001) han propuesto un papel para los peroxisomas como fuente celular de ROS y NO^{\cdot} que actuarían como segundos mensajeros en los mecanismos de transducción de señales y en la comunicación entre distintos orgánulos (Corpas y col., 2001).

A diferencia de mitocondrias y peroxisomas, en los cloroplastos de las células del mesófilo no se ha detectado la formación de ROS. Este hecho es sorprendente si tenemos en cuenta que los cloroplastos son una de las principales fuentes de ROS en condiciones de estrés (Foyer y col., 1994) y, como se ha mostrado con anterioridad la fotosíntesis es muy sensible al Cd. Resultados similares se han obtenido en hojas de abedul expuestas a ozono, donde se ha encontrado, mediante la utilización de Ce, producción de

H₂O₂ en la membrana plasmática, pared celular, peroxisomas y mitocondrias pero no en cloroplastos (Pellinen y col., 1999). La ausencia de precipitados dependientes de H₂O₂ o de O₂^{•-} en cloroplastos podría ser debida a la capacidad de estos orgánulos para eliminar especies de oxígeno reactivo gracias a un eficiente sistema de antioxidantes (Foyer y col., 1994).

Respecto a la fuente de producción de H₂O₂ y O₂^{•-}, los resultados obtenidos utilizando inhibidores de NADPH oxidasa (DPI) y de peroxidasa (azida) sugieren que se trata de una NADPH-oxidasa similar a la descrita en respuesta a patógenos en algunas plantas, ya que la formación de precipitados de Ce desaparece en presencia de DPI. Tanto las NADPH-oxidasas como las peroxidasas han sido implicadas en la producción de H₂O₂ en procesos de infección por patógenos (Alan y Fluhr, 1997; Bolwell y col., 1999b), y en la exposición a ozono (Pellinen y col., 1999). Pero a pesar del parecido con la respuesta a patógenos, la producción de ROS inducida por Cd difiere en algunos aspectos de la “explosión oxidativa” descrita en el primer caso. Así, en la respuesta hipersensible y frente al ozono, la acumulación de H₂O₂ tiene lugar fundamentalmente en la pared celular o en la cara externa de la membrana plasmática, a diferencia del tratamiento con Cd donde el precipitado se localiza principalmente en la cara interna de la membrana plasmática. Por otro lado, en la respuesta hipersensible se incrementa la actividad de la SOD extracelular y de las peroxidasas (Pellinen y col., 1999), mientras que en plantas tratadas con Cd se ha observado una reducción de ambas actividades, especialmente de la SOD. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos diferentes de regulación en la producción de ROS inducida por Cd y por factores bióticos, e incluso el papel de las ROS podría ser diferente en ambas situaciones. Además, en la respuesta hipersensible la producción de ROS y NO[•] está implicada en la inducción de apoptosis (Low y Merida, 1996; Delledonne y col., 2001), mientras que, como se ha mostrado en esta Memoria, el Cd no induce procesos de apoptosis.

La generación de ROS en las membranas inducida por Cd puede ser el resultado de daños producidos por el crecimiento de la planta con el metal durante un largo periodo de tiempo, como se ha discutido anteriormente. Podría estar motivada, en parte, por la deficiencia de Zn que lleva consigo la toxicidad de Cd, ya que según Pinton y col. (1994), este elemento es esencial en la regulación de la actividad NADPH-oxidasa, tanto en células vegetales como animales y su deficiencia podría promover la formación de O₂^{•-}. Este hecho se encuentra además favorecido por el descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes, como se ha indicado anteriormente. Por otra parte, Piqueras y col (1999) han estudiado la producción de H₂O₂ inducida por Cd en suspensiones celulares de tabaco, y estos autores han sugerido que los daños estructurales producidos por el Cd en las membranas podrían activar las NADPH-oxidasas originando una producción masiva de H₂O₂ (Piqueras y col., 1999).

Discusión

Respecto a la producción de NO^\cdot , el análisis de cortes transversales de hojas mediante microscopía de fluorescencia demuestra que el NO^\cdot se produce fundamentalmente en los haces vasculares, especialmente en las células de la vaina y en la epidermis y que su producción es dependiente de la actividad NOS. Por otro lado, la producción de NO^\cdot en hojas de plantas tratadas con Cd se reducía con respecto a las plantas control. Leshem y col. (1998) han demostrado la existencia de una relación inversa entre la producción de NO^\cdot y de etileno en procesos de maduración y senescencia, por lo que podemos concluir que la menor producción de NO^\cdot en plantas tratadas con Cd podría deberse a una aceleración de la senescencia de las hojas inducida por el Cd. Estos resultados corroborarían los obtenidos anteriormente en esta Memoria y apoyan la hipótesis de Leshem y col. (1998) del papel del NO^\cdot en la senescencia.

La localización de la producción de NO^\cdot en los haces vasculares y, en especial, en las células de la vaina constituye la primera evidencia de la presencia de la enzima NOS en este tipo de tejido, si bien la detección de NO^\cdot en células epidérmicas y, más concretamente, en estomas, ya ha sido demostrada previamente (Foissner y col., 2000; Neill y col., 2002). La producción de NO^\cdot , H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en haces vasculares y células de la vaina sugiere un papel importante para estas células en procesos de señalización en plantas en situaciones de estrés, que hasta la fecha había pasado desapercibido. De igual forma, Fryer y col (2002) en situaciones de exceso de luz, han observado una acumulación de H_2O_2 , preferentemente en tejido vascular. Estas células podrían funcionar como centros emisores de señales que podrían ejercer su función en distintos lugares de la hoja, lo que implica un sistema complejo de regulación sistémica en el que tendría una gran relevancia la relación de ROS y NO^\cdot , debido a procesos de antagonismo y sinergismo entre ambos (Delledonne y col., 2001). Por otro lado, recientemente se ha demostrado la localización de NOS en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas y col., 1999), lo que sugiere una nueva función para estos orgánulos en la emisión de señales celulares, como se ha comentado anteriormente. La localización reciente de calmodulina, necesaria para el funcionamiento de la NOS en peroxisomas aislados de cotiledones de calabaza (Yang y Poovaiah, 2002) pone de manifiesto la importancia de estos orgánulos celulares en los mecanismos de transducción de señales.

A la vista de estos resultados y de la regulación de los sistemas antioxidantes por Cd, podemos suponer que la producción de ROS inducida por Cd puede ser un ejemplo de la doble función de estas especies de oxígeno reactivo en la respuesta al estrés en plantas (Dat y col., 2000), de forma que altas concentraciones de ROS pueden ser tóxicas y provocar daños oxidativos, mientras que bajas concentraciones de ROS pueden ser útiles en procesos de señalización. Sobre la base de estas consideraciones, la producción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la membrana plasmática y tonoplasto podría ser una consecuencia de la fitotoxicidad del Cd, mientras que la pequeña acumulación en peroxisomas y

mitocondrias sugiere una función para estas especies de oxígeno reactivo como moléculas señal en la inducción de genes relacionados con la defensa de la planta frente a la toxicidad del Cd. Los cambios observados en los antioxidantes en respuesta al Cd podrían estar relacionados con la cascada de señales implicadas en la respuesta de la planta al estrés, lo que permitiría la liberación de ROS para que actuaran como moléculas señal.

Aunque los procesos de señalización en plantas y la posible interconexión entre diferentes señales en respuesta al estrés están siendo actualmente muy estudiadas y se conoce la secuencia de estas reacciones, hay mucha menos información acerca de la regulación de la producción de ROS en estas situaciones, especialmente en estrés por metales. Es por ello, que en esta Memoria Doctoral se ha abordado el estudio de distintos moduladores de la transducción de señales sobre la producción de ROS inducida por Cd. Para ello, se han realizado tinciones histoquímicas de hojas completas utilizando NBT (para el $O_2^{\cdot-}$) y DAB (para el H_2O_2). Los resultados obtenidos permiten concluir que la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 es dependiente de procesos de fosforilación, de flujo de Ca^{2+} y de GMPc. Estos resultados son similares a los obtenidos en la respuesta hipersensible frente a patógenos y estrés por temperatura o daños mecánicos (Low y Merida, 1996; Lamb y Dixon, 1997; Knight y Knight, 2001). La adición de NO^{\cdot} exógeno y SA induce la formación de ambas especies de oxígeno reactivo, lo que sugiere que estos compuestos pueden participar en la regulación de la producción de ROS en situaciones de estrés. Además, en células de tabaco se ha demostrado que el SA induce la generación extracelular de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de una peroxidasa, participando en este proceso canales de Ca^{2+} (Kawano y col., 1998). La activación por SA de la transcripción de genes relacionados con la respuesta a patógenos, parece ser que tiene lugar a través del aumento de la concentración de H_2O_2 (Chen y col., 1993). Sin embargo, los resultados de expresión de antioxidantes obtenidos en esta Memoria no apoyan esta hipótesis, dado que la expresión de SOD y MDHAR, que se inhibe en ausencia de H_2O_2 , se encuentra igualmente disminuida en presencia de SA. En la Fig. 5.2 se muestra un esquema de la secuencia de reacciones que pueden tener lugar en la transducción de señales en respuesta al estrés por Cd. De este esquema podemos concluir que las SODs y la MDHAR se encuentran reguladas de una forma coordinada y responden de una forma similar al H_2O_2 , NO^{\cdot} y SA lo que sugiere que el punto en común en la regulación de estas enzimas es el H_2O_2 . Este esquema es similar al mostrado en el capítulo de Introducción para ilustrar la transducción de señales en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos, sin embargo, existen algunas diferencias. Ésto sugiere que distintos factores pueden inducir estrés oxidativo utilizando diferentes caminos de señalización, que finalmente convergen en una misma respuesta. Ello explicaría que el estrés por metales induzca la expresión de las proteínas de defensa frente a patógenos PR10 y PR2, de glucanasas, fenilalanina amonioliasa, además de algunos antioxidantes (Dat y col., 2000). El desarrollo de

CONCLUSIONES

1. En plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) cultivadas en medios hidropónicos, niveles de cadmio de 20-50 μM reducen considerablemente el crecimiento de la planta, principalmente debido a la inhibición de la fotosíntesis y de la transpiración, a alteraciones en la distribución de nutrientes, y a la producción de daños estructurales. Igualmente, este metal induce estrés oxidativo en las hojas, afectando a las defensas antioxidantes, a proteínas implicadas en la fotosíntesis, y provocando daños en las membranas biológicas. Su efecto sobre las distintas enzimas antioxidantes parece responder a modificaciones transcripcionales, en el caso de la glutatión reductasa, y a modificaciones traduccionales o postraduccionales, en el caso de la catalasa, la CuZn-SOD y la Mn-SOD.
2. El cadmio induce ligeramente la proliferación de la población de peroxisomas en hojas de guisante, y en estos orgánulos produce un incremento en el contenido de peróxido de hidrógeno y en las actividades enzimáticas responsables de su eliminación. Asimismo, este metal pesado también provoca la transición metabólica de peroxisomas a glioxisomas y en este proceso podrían participar algunas proteasas peroxisomales que se inducen por cadmio. Sobre la base de estos resultados, y de los de actividad proteolítica y ultraestructura, se puede concluir que el cadmio causa síntomas de senescencia en hojas de guisante.
3. El cadmio provoca en hojas de guisante una respuesta similar a la descrita en infecciones por patógenos en plantas, caracterizada por un incremento en la producción subcelular de especies de oxígeno reactivo (ROS) y por una cascada de reacciones en las que intervienen proteínas quinasas/fosfatasa, canales de Ca^{2+} , GMPc, la NADPH-oxidasa, y el óxido nítrico. Las especies de oxígeno reactivo generadas, además de actuar como productos tóxicos responsables de diversos daños oxidativos a macromoléculas, también podrían tener una función como moléculas señal, y los peroxisomas y las mitocondrias podrían desempeñar un papel importante como fuente de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, a diferencia de la respuesta hipersensible en infecciones por patógenos, el cadmio no induce muerte celular programada o apoptosis en hojas de guisante.

BIBLIOGRAFIA

- AEBI H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121-126
- AERY NC, TIAGI YD (1988) Accumulation of cadmium by plants of Zawar mines, *Rajasthan*, India. *Acta Biol Hung* **39 (1)**: 87-98
- ALFENITO MR, SOUERE, GOODMAN CD, BUELL R, MOL J, KOES R, WALBOT V (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-Transferases. *Plant Cell* **10**: 1135-1149
- ALLAN AC, FLUHR R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**: 1559-1572
- ALLOWAY BJ, JACKSON AP, MORGAN H (1990) The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *Sci Total Environ* **91**: 223-236
- ALLOWAY BJ (1995) *Heavy metals in soils*. Blackie Academic & Professional, 368p. New York
- ALLOWAY BJ, STEINNES E (1999) Antropogenic additions of cadmium to soils. Capítulo 5. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- ALSCHER RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathion in plants. *Physiol Plant* **77**: 457-464
- AMES BN, CATHEART R, SCHWIERS E, HOCHSTEIN P (1981) Uric acid provides an antioxidant defenses in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**: 6858-6862
- ANDERSON A, PETTERSON O (1981) *Cadmium* in swedish winter wheat: regional differences and their origin. *Swed J Agric Res* **11**: 49-66
- ANNANYEV G, REUGER G, WACKER V, KLIMOV V (1994) The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of photosystem II. The possible involvement of cytochrome *b*₅₅₉. *Photosyn Res* **41**: 327-338
- AONO M, SAJI H, FUJIYAMA K, SUGITA M, KONDO N, TANAKA K (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **107**: 645-648
- ARCHER EK, TING BL (1996) A virescent plastid mutation in tobacco decreases peroxisome enzyme activities in seedlings. *J Plant Physiol* **149**: 520-526
- ARNON DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- AROUMA OI, HALLIWELL B, HOEY BM, BUTLER J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Rad Biol Med* **6**: 593-597

Bibliografía

- ASADA K (1984) Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzimol* **105**: 422-429
- ASADA K, TAKAHASHI M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: *Photoinhibition*. (Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ, ed), pp 227-287. Elsevier, Amsterdam.
- ASADA K (1992) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide- scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241
- ASADA K (1994) Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (Foyer CH, Mullineaux PM eds), pp 77-104. CRC Press, Boca Raton
- BAETHEGEN WE, ALLEY MN (1989) A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. *Commun Soil Sci Plant Anal* **20**: 961-969
- BAKER AJM, WALKER PL (1989) Physiological responses of plants to heavy metals and quantification of tolerance and toxicity. *Chem Spec Bioav* **1**: 7-17
- BAKER AJM, GRAHAM I (2002) *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (Baker A, Graham I, eds), pp 221-258. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- BARCELÓ J, VÁZQUEZ MD, POSCHENRIEDER Ch. (1988) Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol* **108**: 37-49
- BARCELÓ J, POSCHENRIEDER Ch (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutr* **13 (1)**: 1-37
- BARIAUD A, BURY M, MESTRE JC (1985) Mechanism of Cd²⁺ resistance in *Euglena gracilis*. *Physiol Plant* **63**: 382-386
- BARKLEY KB, GREGORY EM (1990) Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic *Actinomyces*. *Arch Biochem Biophys* **280**: 192-200
- BARTLING D, RADZIO R, STEINER U, WEILER W (1993) A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* **216**: 579-586
- BARYLA A, CARRIER P, FRANCK F, COULOMB C, SAHUT C, HAVAUX M (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**: 696-709
- BATE NJ, ROTHSTEIN SJ, THOMPSON JE (1991) Expression of nuclear and chloroplast photosynthesis-specific genes during leaf senescence. *J Exp Bot* **42**: 801-811
- BATTACHARJEE S (1998) Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol Plant* **40**: 131-135

- BAZZAZ FA, ROLFE GL, CARLSON RW (1992) Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower *Physiol Plant* **32**: 373-377
- BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287
- BECANA R, PARIS FJ, SANDALIO LM, del RÍO LA (1989) Isozymes of SOD in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L. and *Vigna unguiculata* L. walp. *Plant Physiol* **90**: 1286-1292
- BECKMAN JS, KOPPENOL W (1996) NO[•], O₂⁻ and ONOO⁻: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424
- BEEVERS H (1982) Glyoxysomes in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **386**: 243-253
- BESTWICK CS, BROWN IR, BENNETT MHR, MANSFIELD JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Plant Cell* **9**: 209-221
- de BELLIS L, PICCIARELLI P, PISTELLI L, ALPI A (1990) Localization of glyoxylate-cycle enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. *Planta* **180**: 435-439
- BESTWICK CS, BROWN IR, MANSFIELD JW (1998) Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* **118**: 1067-1078
- BLUMWALD E, AHARON GS, LAM BC-H (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **3**:342-346
- BOLWELL GP, WOJTASZEK P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* **51**: 347-366
- BOLWELL GP (1999a) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294
- BOLWELL GP, BLEE KA, BUTT VS, DAVIES DR, GARDNER SL, GERRISH C, MINIBAYEBA F, ROWNTREE EG, WOJTASZEK P (1999b) Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Rad Res* **31**: S137-145
- BORS W, HELLER W, MICHEL C, SARAN M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **106**: 343-355
- BOVERIS A (1998) Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Oxygen, nitric oxide and therapeutic perspectives*. International Symposium, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires **58**: 350-356
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Bibliografía

BREIDENBACH RW, BEEVERS H (1967) Association of glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particles from castor bean endosperm. *Biophys Biochem Res Comm* **27**: 462-469

BROOKS RR, LEE J, REEVES RD, JAFFRE T (1977) Detection nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of index plants. *J Geochem Explor* **7**: 49-57

BRUNE A, URBACH W, DIETZ K-J (1994) Differential toxicity of heavy metals in partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: A comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. *New Phytol* **129**: 403-409

BUCHANAN BB, GRUISSEM W, JONES RL (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 15501 Monona Drive, Rockville, MD 20855-2768 USA

BUCHANAN-WOLLASTON V (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* **48**: 181-199

BUEGE JA, AUST SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302-310

BUENO P, del RÍO LA (1992) Purification and properties of glyoxysomal cuprozinc superoxide dismutase from watermelon cotyledons (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Physiol* **98**: 331-336

BUENO P, VARELA J, GIMÉNEZ-GALLEGO G, del RÍO LA (1995) Peroxisomal copper,zinc superoxide dismutase: characterization of the isoenzyme from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Plant Physiol* **108**: 1151-1160

BUETTNER GR (1989) Spin trapping of hydroxyl radical. En: *Handbook of Methods for oxygen radical research* (RA Greenwald ed) pp 151-155. CRC Pres, Boca Raton

BUNKELMANN R, TRELEASE RN (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* **110**: 589-598

BUTT (1980) Metabolism and Respiration. En: *The Biochemistry of Plants* (David D, Davies ed), Vol. 2, capítulo 3. Academic Press

CABOT C, POSCHENRIEDER Ch BARCELÓ J (1988a) Cadmio I. Presencia natural y antropogénica del Cd en el medio ambiente. *Cir Far* **298**: 91-108

CABOT C, POSCHENRIEDER Ch BARCELÓ J (1988b) Cadmio II. El Cd en los seres vivos. *Cir Far* **300**: 233-252

CADENAS E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem* **58**: 79-110

di CAGNO R, GUIDI L, STEFANI A, SOLDATINI GF (1999) Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. *New Phytol* **144**: 65-71

CAKMAK I, WELCH RM, HART J, NORVELL WA, OZTÜRK L, KOCHIAN LV (2000) Uptake and kinetics in intact soybean plants *Plant Physiology* **73**: 844-848

CARDRY LG, PELL EJ (1993) Modification of rubisco and altered proteolytic activity in O₃-stressed hybrid poplar (*Populus maximowizii* x *trichocarpa*). *Plant Physiol* **101**: 1355-1362

- CASTILLO FJ, GREPPIN H (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environ Exp Bot* **28**: 231-238
- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A (1979) Hydroperoxide metabolism in mamalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-535
- CHAOUÏ A, MAZHOUDI S, GHORBAL MH, EL FERJANI E (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci* **127**: 139-147
- CHARDONNENS AN, BOOKUM WM, KUIJPER LD, VERKLEIJ JA, ERNST WH (1998) Distribution of cadmium in leaves of cadmium sensitive acotypes of *Silene vulgaris*. *Physiol Plantar* **104**: 75-80
- CHAUDIÈRE J, FERRARI-ILIOU R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Toxicol* **37**: 949-962
- CHEN G-X, ASADA K (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* **30**: 987-998
- CHEN T, LI W, SCHULZ PJ, FURST A, CHIEN PK (1995) Induction of peroxisome proliferation and increase of catalase activity in yeast, *Candida albicans*, by cadmium. *Biol Trace Elem Res* **50**: 125-133
- CHOI Y-E, HARADA E, WADA M, TSUBOI H, MORITA Y, KUSANO T, SANO H (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containig cadmium and calcium through trichomes. *Planta* **213**: 45-50
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987) *N Anal Biochem* **162**: 156
- CHOU PT, KHAN AU (1983) L-Ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 932-937
- CHRISTENSEN TH, HAUNG PM (1999) Solid phase cadmium and the reactions of aqueous cadmium with soil surfaces. Capítulo 4. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- CHUMBLEY CG, UNWIN RJ (1982) Cadmium and lead content of vegetable crops grown on land with a history sewage sludge application. *Environ Pollut* **4**: 231-237
- CHURCH GM, GILBERT W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1991-1995.
- CIIAF (1969) Métodos de referencia para la determinación de elementos minerales en vegetales I: Nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, calcio y magnesio. *Anal Edaf Agrobiol* **28**: 409-430
- CIIAF (1973) Méthodes de référence pour le détermination des éléments minéraux dans les vegetaux. Détermination des éléments Ca, Fe, Mg, Cu, Mn et Zn par absorption atomique. *Oleagineux* **28**: 87-92

Bibliografía

CIRIOLO MR, CIVITAREALE P, CARRI MT, DEMARTINO A, GALIAZZO F, ROTILIO G (1994) Purification and characterization of Ag,Zn-superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae* exposed to silver. *J Biol Chem* **269**: 25783-25787

CLARE DA, DUONG MN, DARR D, ARCHIBALD F, FRIDOVICH I (1984) Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal Biochem* **140**: 532-537.

CLARK D, DURNER J, NAVARVE DA, KLESSIG DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1380-1384

CLEMENS S, KIM EJ, NEUMANN D, SCHROEDER J (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* **18** (12): 3325-3333

COBBETT CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* **123**: 825-832

COHEN CK, FOX TC, GARVIN DF, KOCHIAN LV (1998) The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol* **116**: 1063-1072

CONVERSO DA, FERNÁNDEZ MC, TOMARO ML (2000) Cadmium inhibition of a structural wheat peroxidase. *J Enz Inhib* **15**: 171-183

COOMBS J, HALL DO, LONG SP, SCURLOCK JMO (1985) *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon Press, pp 62-93. Oxford.

CORPAS FJ, GÓMEZ M, del RÍO LA (1989) Actividad xantina oxidorreductasa (formas O y D) en peroxisomas de *Vigna unguiculata* L. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica (Alicante): Abst. 22-5

CORPAS FJ (1992) Metabolismo del oxígeno activado y de los ureidos en peroxisomas de hojas de *Pisum sativum* L. en condiciones de salinidad. Tesis Doctoral. Universidad de Granada

CORPAS FJ, GÓMEZ M, HERNÁNDEZ JA, del RÍO LA (1993a) Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *J Plant Physiol* **141**: 160-165

CORPAS FJ, PALMA JM, del RÍO LA (1993b) Evidence for the presence of proteolytic activity in peroxisomes. *Eur J Cell Biol* **61**: 81-85

CORPAS FJ, de la COLINA C, SÁNCHEZ-RASERO F, del RÍO LA (1997) A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines. *J Plant Physiol* **151**: 246-250

CORPAS FJ, BARROSO JB, SANDALIO LM, DISTEFANO S, PALMA JM, LUPIÁÑEZ JA, del RÍO LA (1998a) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochem J* **330**: 777-784

- CORPAS FJ, SANDALIO LM, del RÍO LA, TRELEASE RN (1998b) Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledons of oilseed plants. *New Phytol* **138**: 307-314
- CORPAS FJ, PALMA JM, SANDALIO LM, LÓPEZ-HUERTAS E, ROMERO-PUERTAS MC, BARROSO JB, del RÍO LA. (1999) Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: Identification of five different isoforms. *Free Rad Res* **31**: S235-241
- CORPAS FJ, SANDALIO LM, BROWN MJ, del RÍO LA, TRELEASE RN. (2000) Identification of porin-like polypeptide(s) in the boundary membrane of oilseed glyoxysomes. *Plant Cell Physiol* **41**: 1218-1228
- CORPAS FJ, BARROSO JB, del RÍO LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *TRENDS Plant Sci* **6** (4): 145-150
- COSTA G, MORELL JL (1993) Cadmium uptake by (*Lupinus albus* L.): cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. *J Plant Nutr* **16**: 1921-1929
- COSTA G, SPITZ E (1997) Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free aminoacids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci* **128**: 131-140
- CREISSEN G, EDWARDS EA, ENARD C, WELLBURN A, MULLINEAUX PM (1992) Molecular characterization of glutathione reductase cDNAs from pea (*Pisum sativum* L.) *Plant J* **2**: 129-131
- CREISSEN G, EDWARDS EA, MULLINEAUX PM (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. En: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants* (Foyer CH, Mullineaux PM, eds), pp 343-364. CRC press, Inc
- CREISSEN G, FIRMIN J, FRYER M, KULAR K, LEYLAND N, REYNOLDS H, PASTORI G, WELLBURN F, BAKER N, WELLBURN A, MULLINEAUX PM (1999) Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplast of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* **11**: 1277-1291
- CREISSEN G, MULLINEAUX PM (2002) The Molecular Biology of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Higher Plants. En: *Oxidative Stress in Plants* (Inzé D, Van Montagu M, eds), pp 247-269. Taylor and Francis, London
- CROOK J, BASTIAN RK (1992) *Guidelines for water reuse*. US EPA. Washington D. C. USA
- CRYSTAL RG, BAST A (1991) Proceedings of a Symposium. Oxidants and antioxidants: pathophysiologic determinants and therapeutic agents. *American J Med* **91**
- CUMMINS I, COLE DJ, EDWARDS R (1997) Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. *Pest Biochem Physiol* **59**: 35-49
- DALURZO HC, SANDALIO LM, GÓMEZ M, DEL RÍO LA (1997) Cadmium infiltration of detached pea leaves: Effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton* **37s** (3): 59-64

Bibliografía

- DAT JF, VANDENABEELE S, VRANOVA E, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN BREUSEGEM F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779-795
- DAVIS BJ (1964) Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. *Annals New York Acad Sci* **121**: 407-427
- DELISLE G, CHAMPOUX M, HOUDE M (2001) Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiol* **42**: 324-333
- DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci (early ed)* **Abril 10**
- DEMPLE B, HALBROOK J (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **304**: 466-468
- DESIKAN R, NEILL SJ, HANCOCK JT (2000) Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Rad Biol Med* **28 (5)**: 773-778
- DESIMORNE M, HEMKE A, WAGNER E (1996) Oxidative stress induces partial degradation of large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated chloroplasts of barley. *Plant Physiol* **111**: 789-796
- DIPIERRO S, BORRANCCINO G (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochem* **30**: 427-429
- DIPLOCK AT (1983) The role of vitamin E in biological membranes. En: *CIBA Foundation Symposium 101: Biology of vitamin E*, (Porter R, Whelan J, eds), pp 45-55. London, Pitman
- DISTEFANO S, PALMA JM, GÓMEZ M, del RÍO LA (1997) Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochem J* **327**: 399-405
- DISTEFANO S, PALMA JM, MCCARTHY I, del RÍO LA (1999) Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta* **209**: 308-313
- DIXIT V, PANDEY V, SHYAM R (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv Azad) *J Exp Bot* **52 (358)**: 1101-1109
- DOMÍNGUEZ-SOLÍS JR, GUTIÉRREZ-ALCALÁ G, ROMERO LC, GOTOR C (2001) The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J Biol Chem* **276**: 9297-9302
- DONALSON RP (1982) Nicotinamide cofactors (NAD and NADP) in glyoxysomes, mitochondria, and plastids isolated from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys* **215**: 274-279

- DONALSON RP (1986) Transfer of reducing equivalents (electrons) through the peroxysomal membrane during β -oxidation glyoxylate cycle, and the conversion of triglyceride to hexose. En: *Models in Plant Biochemistry* (Newman DW ed), CRC Press
- DOUCE R, HELDT H-W (2000) Photorespiration. En: *Photosynthesis: physiology and metabolism* (Leegood RC, Sharkey TD, von Cammerer S, eds) pp 115-136. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland
- DROTAR A, PHELPS P, FALL R (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci* **42**: 35-40
- DROILLARD M, PAULIN A (1990) Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol* **94**: 1187-1192
- DUKE MV, SALIN ML (1985) Purification and characterization of an iron-containing SOD from a eukariote, *Ginkgo biloba*. *Arch Biochem Biophys* **243**: 305-314
- DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Aca Sci USA* **95**: 10328-10333
- de DUVE C, BEAUFAY, JACQUES P, RAHMAN-LI Y, SELLINGER OZ, WATTIAUX R, de CONNIC S (1960) Intracellular localization of catalase and some oxidases in rat liver. *Biocim Biophys Acta* **40**: 186-187
- de DUVE C (1965) Function of microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol* **27**: 25
- de DUVE C, BAUDHUIN P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rew* **46**: 323-357
- EDWARDS EA, RAWSTHONE S, MULLINEAUX PM (1990) Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284
- EDWARDS R (1996) Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*Pisum sativum*). *Physiol Planta* **98**: 594-604
- EISING R, TRELEASE RN, NI W (1990) Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Arch Biochem Biophys* **278 (1)**: 258-264
- ELSTNER EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. En: *The Biochemistry of Plants* (Davis, DD, ed), pp 253-315. Academic Press, San Diego.
- ESHDAT Y, HOLLAND D, FALTIN Z, BEN-HAYYIM G (1997) Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* **100**: 234-240
- ESQUÍVEL MG, FERREIRA RB, TEIXEIRA AR (1998) Protein degradation in C3 and C4 plants with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase and glycolate oxydase. *J Exp Bot* **49**: 807-816

Bibliografía

- FAHIMI HD, BAUMGART E (1999) Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes: A review. *J Histochem Cytochem* **47 (10)**: 1219-1232
- FANG TK, DONALSON RP, VIGIL EL (1987) Electron transport in purified glyoxysomes membranes from castor bean endosperm. *Planta* **172**: 1-13
- FARRIS MW, REED DJ (1987) High-performance liquid chromatograph of thiols and disulfides: dinitrophenol derivates. *Methods Enzymol* **143**: 101-109
- FATH A, BETHKE PC, JONES RL (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol* **126**: 156-166
- FEIERABEND I, SCHMIDT M, DEHNE S (2001) The posttranscriptional control of catalase synthesis during its light-induced turnover involves reversible changes of the translation efficiency of its mRNA in mature rye leaves. En: *Fifth Conference on "Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants"*. Niza
- de FELIPE MR, LUCAS MM, POZUELO JM (1988) Cytochemical study of catalase and peroxidase in the mesophyll of *Lolium rigidum* plants treated with isoproturon. *J Plant Physiol* **132**: 67-73
- FERGUSON JE (1990) *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental impact and Health effects*. Pergamon Press, Oxford.
- de FILIPPIS LF, ZIEGLER H (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J Plant Physiol* **142**: 167-172
- FLOHÉ L, GÜNZLER WA (1985) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **105**: 114-121
- FODOR A, SZABÓ-NAGY A, ERDEI L (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiol* **147**: 87-92
- FOISSNER I, WENDEHENNE D, LANGEBARTELS C, DURNER J (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced intracellular oxidative burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817-824
- FOJTOVÁ M, KOVARÍK A (2000) Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant Cell Environ* **23**: 531-537
- FOYER CH, HALLIWELL B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25
- FOYER CH, HALLIWELL B (1977) Purification and properties of dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Phytochem* **16**: 1347-1350
- FOYER CH, LELANDAIS M, GALAP C, KUNERT KJ (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* **97**: 863-872

- FOYER CH (1993) Ascorbic acid. En: *Antioxidants in higher plants* (Alscher RG, Hess JI, eds), pp 31-58. CRC press.
- FOYER CH, LELANDAIS M, KUNERT KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696-717
- FOYER CH, LÓPEZ-DELGADO H, DAT JF, SCOTT IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254
- FREW JE, JONES P, SCHOLES G (1983) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solutions. *Anal Chim Acta* **155**: 139-150.
- FRIDOVICH I (1983) Superoxide radical. An endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol* **23**: 239-257
- FRIDOVICH I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **247**: 1-11
- FRUGOLI JA, ZHONG HH, NUCCIO ML, McCOURT P, McPEEK MA, THOMAS TL, McCLUNG CR (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiol* **112**: 327-336
- FRYER MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ* **15**: 381-392
- FUJIMOTO T, UCHIDA Y (1979) Cadmium absorption by rice plants *Oryza sativa* L. Mode of the absorption. *Soil Sci Plant Nutr* **25**: 407-416
- FUJITA M, HANADA Y, TOMITA H, TAKAO N, TANIGUCHI N (1998) Preliminary studies on organ specificities of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-inducible glutathione S-transferases and new glutathione s-transferases preferential to developing organs in pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.). *Tech Bull Fac Agr Kagawa Univ* **50 (2)**: 105-113
- GALLEGO SM, BENAVIDES MP, TOMARO ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* **121**: 151-159
- GARCÍA-OLMEDO F, RODRÍGUEZ-PALENZUELA P, MOLINA A, ALAMILLO JM, LÓPEZ-SOLANILLA E, BERROCAL-LOBO M, POZA-CARRIÓN C (2001) Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence. *FEBS Lett* **498**: 219-222
- GERHARDT B (1987) Higher plant peroxisomes and fatty acids degradation. En: *Peroxisomes in Biology and Medicine* (Fahimi HD, Sies H eds), pp 141-151. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- GERSCHMAN R, GILBERT DL, NYE SW, DWYER P, FENN WV (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: Mechanism in common. *Science* **119**: 623-626
- GOLDBERG DM, ELLIS G (1983) Isocitrate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (HU Bergmeyer ed), pp 183-190. Academic Press, New York

Bibliografía

- GÓMEZ JM, HERNÁNDEZ JA, JIMÉNEZ A, del RÍO LA, SEVILLA F (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplast and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Rad Res* **31**: S11-S18
- GONZÁLEZ E, BRUSH MD, MAESHIMA M (1987) The alkaline lipase of the glyoxysomal membrane is a glycoprotein. En: *Peroxisomes in Biology and Medicine* (Fahimi HD, Sies H eds), pp 141-151. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- GONZÁLEZ FLECHA B, BOVERIS A (1995) Mitochondrial sites of hydrogen peroxide production in reperfused rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta* **1243**: 361-366
- GRAEVE K, VON SCHAEWEN A, SCHEIBE R (1994) Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* **5** (3): 353-361
- GRANT CA, BUCKLEY WT, BAILEY LD, SELLS F (1998) Cadmium accumulation in crops. *Canad J Plant Sci* **78**: 1-17
- GRANT JJ, LOAKE GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21-29
- GREGER M, LINDBERG S (1987) Effects of Cd and EDTA on young sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant* **83**: 129-135
- GREGER M, ÖGREN E (1991) Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant* **83**: 129-135
- GREGER M, JOHANSSON M (1992) Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol Plant* **86**: 465-473
- GRIES GE, WAGNER GJ (1998) Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta* **204**: 390-396
- GUAN LM, SCANDALIOS JG (2000a) Catalase transcript accumulation in response to dehydration and osmotic stress in leaves of maize viviparous mutants. *Redox Rep* **5**: 377-383
- GUSSARSON M ASP H, ADALSTEINSSON S, JENSÉN P (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO). *J Exp Bot* **47**: 211-215
- GUTTERIDGE JMC, RICHMOUND R, HALLIWELL B (1980) Oxygen free radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein ceruloplasmin. *FEBS Lett* **112**: 269-272
- HAAG-KERWER A, SCHÄFER HJ, HEISS S, WALTER C, RAUSH T (1999) Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J Exp Bot* **50** (341): 1827-1835
- HABIG WH, PABST MJ, JAKOBY WB (1974) Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **22**: 7130-7139

HALBROCK K, GRISEBACH H (1979) Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu Rev Plant Physiol* **30**: 105-130

HALLIWELL B, GUTTERIDGE MC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**: 1-14

HALLIWELL B (1987) Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. *Chem Phys Lipids* **44**: 327-340

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (1992) Biologically relevant metal ion dependent $\cdot\text{OH}$. *FEBSS Lett* **307**: 108

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London

HARADA E, CHOI Y-E, TSUCHISAKA A, OBATA H, SANO H (2001) Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J Plant Physiol* **158**: 655-661

HARRIS NS, TAYLOR GJ (2001) Remobilization of cadmium in maturing shoots of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *J Exp Bot* **52**: 1473-1481

HART JJ, WELCH RM, NORVELL WA, SULLIVAN LA, KOCHIAN LV (1998) Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol* **116**: 1413-1420

HASSAN HM (1989) Microbial superoxide dismutases. En: *Advances in genetic* (Scandalios JG ed), pp 65-97. Academic Press, San Diego

HATTON PJ, CUMMINS I, PRICE LJ, COLE DJ, EDWARDS R (1998) Glutathione transferases and herbicide detoxification in suspension-cultured cells of giant foxtail (*Setaria faberi*). *Pest Sci* **53**: 209-216

HATTON PJ, CUMMINS I, COLE DJ, EDWARDS R (1999) Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Physiol Plant* **105**: 9-16

HAVIR EA, McITALE NA (1989) Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiol* **91**: 812-815.

HAVIR EA, BRISSON LF, ZELITCH I (1996) Distribution of catalase isoforms in *Nicotiana tabacum*. *Phytochem* **41 (3)**: 699-702

HAYASHI T, SAWA K, KAWASAKI M, ARISAWA M, SHIMIZU M, MORITA M (1988) Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Nat Products* **51 (2)**: 345-348

HELMKE PA (1999) En: *Cadmium in Soils and Plants*, Capítulo 3. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

Bibliografía

HENDRY GAF, BAKER AJM, EWART CF (1992) Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus* L. *Acta Bot Neerl* **41(3)**: 271-281

HERBERT M, BURKHARD C, SCHNARRENBERGER C (1979) A survey for isoenzymes of glucosephosphate isomerase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in C₃-, C₄-, and CAM-plants and green algae. *Planta* **145**: 95-104

HERNÁNDEZ JA, CORPAS FJ, GÓMEZ M, del RÍO LA, SEVILLA F (1993) Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol Plant* **89**: 103-110

HERNÁNDEZ JA, del RÍO LA, SEVILLA F (1994) Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplast from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytol* **126**: 37-44

HERNÁNDEZ JA, OLMOS E, CORPAS FJ, SEVILLA F, del RÍO LA (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Sci* **105**: 151-167

HERNÁNDEZ LE, CARPENA-RUIZ R, GÁRATE A (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr* **19**: 1581-1598

HERNÁNDEZ LE, COOKE DT (1997) Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **48**: 1375-1381

HERNÁNDEZ LE, LOZANO-RODRÍGUEZ E, GÁRATE A, CARPENA-RUIZ R (1998) Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Sci* **132**: 139-151

HEUILLET E, MOREAU A, HALPERN S, JEANNE N, PUISEUX-DAO S (1986) Cadmium binding to a thiol-molecule of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: electron probe microanalysis. *Biol Cell* **58**: 79-86

HEWITT EJ (1966) Sand and water culture Methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication No. 22 (revised 2nd Edition), 237-315. *Commonwealth Agricultural Bureau*. Farnham Royal. Bucks. England

HOCK B, BEEVERS H (1966) Development and decline of the glyoxylate-cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Effect of dactinomycin and cycloheximide. *Z Pflanzenphysiol* **55**: 405-414

HODGSON RAJ, RAISON JK (1991) Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in relation to photoinhibition induced by chilling in moderate light. *Planta* **185**: 215-219

HONG YN, SCHOPFER P (1981) Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during peroxisome development in the cotyledons of mustard (*Sinapsis alba* L.) seedlings. *Planta* **152**: 325-335

HOSSAIN MA, ASADA K (1984a) Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide : Its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiol* **25**: 1285-1295

- HOSSAIN MA, ASADA K (1984b) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant Cell Physiol* **25** (1): 85-92
- HOWDEN R, ANDERSEN CR, GOLDSBROUGH PB, COBBETT C (1995) A cadmium-sensitive, glutathione-deficiente mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**: 1067-1073
- HUANG AHC, TRELEASE RN, MOORE TSJr (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-358260-1
- INADA N, SAKAI A, KUROIWA H, KUROIWA T (1998) Three-dimensional analysis of the senescence program in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles. Investigations by fluorescence and electron microscopy. *Planta* **206**: 585-597
- ISHIDA H, NISHIMORI Y, SUGISAWA M, MAKINO A, MAE T (1997) The large subunit of ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase is fragmented into 37 KDa and 16 Kda polypeptides by active oxygen in the lysates of chloroplasts from primary leaves of wheat. *Plant Cell Physiol* **38**: 471-479
- ISHIKAWA T, SAKAI K, TAKEDA T, SHIGEOKA S (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*). *Plant Sci* **120**: 11-18
- ISIN SH, BURKE JJ, ALLEN RD (1990) Sequence divergence of pea Cu/Zn superoxide dismutase II cDNAs. *Plant Mol Biol* **15** (5): 789-791.
- ISIN SH, ALLEN RD (1991) Isolation and characterization of a pea catalase cDNA. *Plant Mol Biol* **17** (6): 1263-1265
- JABLONSKI PP, ANDERSON JW (1981) Light dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplast. *Plant Physiol* **67**: 1239-1244
- JEMAL F, ZARROUK M, GHORBAL MH (2000) Effect of cadmium on lipid composition of pepper. *Biochem Soc Trans* **28** (6): 907-910
- JENSEN A, BRO-RASMUSSEN F (1992) Environmental cadmium in Europe. *Rev Environ Cont Toxicol* **125**: 101-181
- JIANG LW, BUNKELMANN J, TOWILL L, KLEFF S, TRELEASE RN (1994) Identification of peroxisome membrane proteins (PMPs) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons and influence of light on the PMP developmental pattern. *Plant Physiol* **106**: 293-302.
- JIANG W, LIU D, HOU W (2001) Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.) *Biores Techn* **76**: 9-13
- JIMÉNEZ A, HERNÁNDEZ JA, del RÍO LA, SEVILLA F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* **114**: 275-284
- JOHNSTON AE, JONES KC (1992) En: *Phosphate Fertilizers and the Environment*. (JJ Schultz ed), pp 255-269. Spec Pub IFDC-SP-18, Int. Fert. Develop. CTR. Muscle Shoals, A.L.

Bibliografía

KANEMATSU S, ASADA K (1989a) CuZn-superoxide dismutases from the fern *Equisetum arvense* and the green alga *Spirogyra sp.*: Occurrence of chloroplast and cytosol types of enzyme. *Plant Cell Physiol* **30**: 717-727

KANEMATSU S, ASADA K (1989b) CuZn-superoxide dismutase in rice: Occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol* **30**: 381-391

KAPPUS H, SIES H (1981) Toxic drug effects associated with oxygen metabolism redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**: 1233-1241

KATO Y, URANO J, MAKI Y, USHIMARU T (1997) Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol* **38** (2): 173-178

KAWANO T, SAHASHI N, TAKAHASHI K, VOZUMI N, MUTO S (1998) Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: The earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol* **39**: 721-730

KEISTER DL, SAN PIETRO A (1963) The photoreduction of cytochrome *c* by chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **103**: 45-53.

KELVIN J, DAVIES A (1986) Intracellular proteolytic system may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *J Free Rad Biol Med* **2**: 155-173

KERR MV, GROVES D (1975) Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochem* **14**: 359-362

KHAN DH, DUCKETT JG, FRANKLAND B, KIRHAM JB (1984) An X-ray microanalytical of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *J Plant Physiol* **115**: 19-28

KIM E-J y col (1998) Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sod N* gene encoding Ni-containing SOD from *Streptomyces coelicolor* Müller. *Molec Microbiol* **27**: 187

KINDL H, LAZAROW PB (1982) *Peroxisomes and glioxisomes*. The New York Academy of Sciences, 386. New York, NY. ISBN 0-89766-162-1.

KINGSTON-SMITH AH, HARBINSON J, FOYER CH (1999) Acclimation of photosynthesis, H₂O₂ content and antioxidant in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant Cell Environ* **22**: 1071-1083

KINGSTON-SMITH AH, FOYER CH (2000) Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *J Exp Bot* **51**: 123-130

KNIGHT H, KNIGHT MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* **6**: 262-267

KNOWLES RG, MONCADA S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249-258

- KOBAYASHI J (1978) Pollution by cadmium and the itai-itai disease in Japan. En: *Toxicity of Heavy Metals in the Environment*. (Oehme FW ed), pp 199-260. Marcel Dekker Inc, New York
- KOCHIAN LV, LUCAS WJ (1998) Potassium transport in roots. *Adv Bot Res* **15**: 93-178
- KORSHUNOVA YO, EIDE D, CLARK WG, GUERINOT ML, PAKRASI HB (1999) The *IRT1* protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol Biol* **40**: 37-44
- KRINSKI NI, DENEKE SM (1982) Interaction of oxygen and oxy-radical with carotenoids. *JNCI* **69**: 205-210
- KROTZ RM, EVANGELOU BP, WAGNER GJ (1989) Relationships between Cadmium, Zinc, Cd-peptide and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol* **91**: 780-787
- KRUPA Z (1988) Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. *Physiol Plant* **73**: 518-524
- KUNAU W-H (1998) Peroxisome biogenesis: from yeast to man. *Curr Opin Microbiol* **1**: 232-237
- KUNCE CM, TRELEASE RN (1986) Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol* **81**: 1134-1139
- KÜPPER H, KÜPPER F, SPILLER M (1996) Environmental relevance of heavy-metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* **47**: 259-266
- KÜPPER H, LOMBI E, ZHAO F-J, McGRATH SP (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* **212**: 75-84
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LAKSHAMAN KC, SURINDER KS (1999) Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol Biochem* **37**: 297-303
- LAMB C, DIXON RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- LANDOLT R, MATILDE P (1990) Glyoxysome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Sci* **72**: 159-163
- LARSSON EH, ASP H, BORNMAN JF (2002) Influence of prior Cd²⁺ exposure on the uptake of Cd²⁺ and other elements in the phytochelatin-deficient mutant, cad 1-3, of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **53**: 447-453
- LAUCHLI A (1993) Selenium plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Bot Acta* **106**: 455-468

Bibliografía

LAVID N, BARKAY Z, TEL-OR E (2001) Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* **212**: 313-322

LAZAROV P, FUHIKI Y (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev Cell Biol* **1**: 489-530

LEE S, LEUSTECK T (1999) The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci* **141**: 201-207

LEITA L, BACA-GARCÍA MT, MAGGIONI A (1992) Cadmium uptake by *Pisum sativum*: accumulation and defense mechanism. *Agrochimica* **36 (3)**: 253-259

LEITA L, de NOBILI M, MONDINI C, BACA-GARCÍA MT (1993) Response of leguminosae to cadmium exposure. *J Plant Nutr* **16**: 2001-2012

LEÓN AM, PALMA JM, GÓMEZ M, CHATERJI D, ROMERO-PUERTAS MC, MATEOS RM, CORPAS FJ, SANDALIO LM, del RÍO LA (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol Biochem* **40 (10)**, en prensa

de LEONARDIS S, de LORENZO G, BORRACINO G, DIPIERRO S (1995) A specific ascorbate free radical reductase isozyme participates in the regeneration of ascorbate for scavenging toxic oxygen species in potato tuber mitochondria. *Plant Physiol* **109**: 847-851

LEPRINCE O, ATHERTON MN, DELTOUR R, HENDRY GAF (1994) The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. *Plant Physiol* **104**: 1333-1339

LESHEM YY, WILSS RBH, KU VVV (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO[•])-as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* **36**: 825-833

LESHEM YY (2000) *Nitric oxide in plants: occurrence, function and use*. Kluwer Academic Press. Dordrecht, The Netherlands

LEVINE A, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ A-G, AHN B-W, SHALTIEL S, STADTMAN R (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **186**: 464-478

LEVINE RL, WILLIAMS JA, STADTMAN ER, SHACTER E (1991) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**: 346-363

LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593

LLEDÍAS F, RANGEL P, HANSBERG W (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273 (24)**: 10630-10637

LÓPEZ-HUERTAS E, SANDALIO LM, del RÍO LA (1995) Integral membranes polypeptides of pea leaf peroxisomes: Characterization and response to plant stress. *Plant Physiol Biochem* **33**: 295-302

- LÓPEZ-HUERTAS E, SANDALIO LM, GÓMEZ M, del RÍO LA (1997) Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18-kDa integral membrane polypeptide. *Free Rad Res* **26**: 497-506
- LÓPEZ-HUERTAS E, CORPAS FJ, SANDALIO LM, del RÍO LA (1999a) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* **337**: 531-536.
- LÓPEZ-HUERTAS E, BAKER A (1999b) Peroxisome biogenesis. En: *Transport of molecules across microbial membranes*. Cambridge UK, pp 204-238. Cambridge University Press
- LOW PS, MERIDA JR (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal. *Physiol Planta* **96**: 533-542
- LOZANO-RODRÍGUEZ E, HERNÁNDEZ LE, BONAY P, CARPENA-RUIZ RO (1997) Distribution of Cd in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J Exp Bot* **48**: 123-128
- LUCOTTE G, BANEYX F (1993) *Introduction to Molecular Cloning Techniques*. VCH Publishers, Inc. New York
- LUDLOW MM, MUCHOW RC (1990) A critical evaluation of trials for improving crops yield in water-limited environmental. *AdvAgron* **43**: 107-153
- MACKERNESS SA-H, JOHN CF, JORDAN B, THOMAS B (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* **489**: 237-242
- MACRI F, BRAIDOT E, PETRUSSA E, ZANCANI M, VIANELLO A (1992) Ferric ion and oxygen reduction at the surface of protoplast and cells of *Acer pseudoplatanus*. **105**: 97-103
- MARCANO L, CARRUYO I, del CAMPO A, MONTIEL X (2002) Effects of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L.: An ultrastructural study. *Environ Res Sect A* **88**: 30-35
- MARRS KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 127-158
- MARRS KA, WALBOT V (1997) Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol* **113**: 93-102
- MASTERS C, CRANE D (1995) *The peroxisome: a vital organelle*. Cambridge, Cambridge University Press
- MATTONI C, GABBRIELLI R, VANGRONSVELD J, CLIJSTERS H (1997) Nickel and cadmium toxicity and enzymatic activity in Ni-tolerant and non-tolerant populations of *Silene italica* Pers. *J Plant Physiol* **150**: 173-177
- MAY MJ, VERNOUX T, LEAVER C, VAN MONTAGNI M, INZÉ D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* **49**: 649-667

Bibliografía

McCARTHY I, ROMERO-PUERTAS MC, PALMA JM, SANDALIO LM, CORPAS FJ, GÓMEZ M, del RÍO LA (2001) Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants. *Plant Cell Environ* **24**: 1065-1073

McCAY PB (1985) Vitamin E: interaction with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* **5**: 323-340

McCORD JM (1979) Superoxide dismutases: occurrence, structure, function and evolution. En: *Isozymes. Current Topics in Biological and Medical Research* (Rattazzi MC, Sandalios JG, Whitt GS, eds), pp 1-21. Alan R. Liss, Inc., New York

McCORD JM, FRIDOVICH I (1969) Superoxide dismutase: and enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**: 6049-6055

McLAUGHLIN MJ, SINGH BR (1999) Cadmium in soils and plants. Capítulo 1. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands

MEAGHER RB (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 153-162

MEISTER A, ANDERSON JW (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-760

MEJÁRE M, BÜLOW L (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and fitoremediation of heavy metals. *TRENDS Biotech* **19** (2): 67-73

MEUWLY P, RAUSER WE (1992) Alteration of thiol pools in roots and shoots of maize seedlings exposed to cadmium: adaptation and development cost. *Plant Physiol* **99**: 8-15

MINETTI M, FORTE T, SORIANI M, QUARESIMA U, MENDITTO A, FERRARI M (1992) Iron-induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation. *FEBS Lett* **352**: 159-162

MITRA RS, GRAY RH, CHIN B, BERNSTEIN IA (1975) Molecular mechanism of accommodation in *E. coli* of toxic levels of Cd²⁺. *J Bacteriol* **121**: 1180-1188

MITTLER R, ZILINSKAS BA (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* **97**: 962-968

MITTER R, LAM E, SHULAER V, COHEN M (1999) Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol* **39**: 1025-1035

MIYAKE C, ASADA K (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplast and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radical in thylakoids. *Plant Cell Physiol* **33**: 541-553

MOHAN BS, HOSETTI BB (1997) Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environ Pollut* **98**: 233-238

MØLLER (1998) *Plant physiol* **116**: 1029-1036

- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rew* **43**: 109-142
- MORAL R, GÓMEZ I, NAVARRO-PEDREÑO J, MATAIX J (1994) Effects of cadmium on nutrient distribution, yield and growth of tomato grown in soil-less culture. *J Plant Nutr* **17**: 953-962
- MORELL S, FOLLMANN H, DE TULLIO M, HÄBERLEIN I (1997) Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett* **414**: 567-570
- MORIMURA Y, OHYA T, IKAWA T (1996) Presence of ascorbate-peroxidizing enzymes in roots of *Brassica campestris* L. cv Komatsuna. *Plant Sci* **117**: 55-63
- MORIWAKI Y, YAMAMOTO T, YAMAGUCHI K, TAKAHASHI, HIGASHINO K (1996) Immunohistochemical localization of aldehyde and xanthine oxidase in rat tissues using polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol* **105**: 71-79
- MORRÉ DJ, SELLDEN G, OJANPERAE K, SANDELIUS AS, EGGER A, MORRÉ DM, CHALKO CM, CHALKO RA (1990) Peroxisome proliferation in Norway spruce induced by ozone. *Protoplasma* **155**: 58-65
- MORTVEDT JJ (1996) Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilisers. *Fert Res* **43**: 55-61
- MULLEN RT, GIFFORD DJ (1993) Purification and characterization of catalase from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) megagametophytes. *Plant Physiol* **103**: 477-483
- MULLINEAUX PM, CREISSEN GP, BROADBENT P, REYNOLDS H, KULAR B, WELLBURN A (1994) Elucidation of the role of glutathione reductase using transgenic plants. *Biochem Soc Trans* **22**: 931-936
- MUREAU RA, LIV KDF, HUANG AHC (1980) Spherosomes in castor bean endosperm. Membrane components, formation and degradation. *Plant Physiol* **65**: 1176-1180
- MURTHY SS, ZILINSKAS BA (1994) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *J. Biol. Chem* **269**: 31129-31133.
- NASSIRI Y, WERY J, MAMSOT JC, GINSBURGER-VOGEL T (1997) Cadmium bioaccumulation in *Tetraselmis suecica*: an electron energy loss spectroscopy (EELS) study. *Arch Environ Contam Toxicol* **33**: 156-161
- NAVARI-IZZO F, IZZO R (1994) Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. *Plant Sci* **96**: 31-40
- NAVARI-IZZO F, RASCIO N (1999) Plant response to water deficit conditions. En: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M Pessarakli Marcel Dekker eds), pp 231-270. New York
- NAVARI-IZZO F, QUARTACCI MF (2001) Phytoremediation of metals: Tolerance mechanisms against oxidative stress. *Minerva Biotech* **13**: 73-83

Bibliografía

- NEDELKOSKA TV, DORAN PM (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotech Bioeng* **67 (5)**: 607-615
- NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HANCOCK JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**: 13-16
- NEUMANN D, LICHTENBERGER O, GÜNTER D, TSCHIERSCH K, NOVER L (1994) Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* **194**: 360-367
- NI W, TRELEASE RN (1991) Two genes encode the two subunits of cottonseed catalase. *Arch Biochem Biophys* **289**: 237-243
- NIES DH (1995) The cobalt, zinc and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **117**: 2707-2712
- NIES DH, SILVER S (1989) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol* **171**: 896-900
- NISHIMURA M, HAYASHI M, KATO A, YAMAGUCHI M, MANO S (1996) Functional transformation of microbodies in higher plant cells. *Cell Struct Funct* **21**: 387-393
- NJUS D, KELLEY M, HARNADEK GJ, JALUKAR V (1990) *Oxidation-reduction reactions in secretory vesicles in oxidoreduction at the plasma membrane: relation to growth and transport* (FL Crane, DJ Morré, HE Lów, eds), Vol. I, pp 85-99. CRC press, Boca Ratón
- NMHPPE (1991) Netherlands Ministry of Housing, *Physical Plannig and Environment*. Leidschendam, Netherlands
- NOCTOR G, FOYER CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279
- NOCTOR G, VELJOVIC-JOVANOVIC S, FOYER CH (2000) Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Phil Trans R Soc Lond* **355**: 1465-1475
- NUNOSHIBA T, OBATA F, BOSS AC, OIKAWA S, MORI T, KAWANISHI S, YAMAMOTO K (1999) Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274 (49)**: 34832-34837
- OBATA H, UMEBAYASHI M (1993) Production of SH compounds in higer plants of different tolerance to Cd. *Plant and Soil* **155/156**: 533-536
- OECD (1994) *Risk Reduction Monograph No.5 Cadmium*. Environment Directorate OECD, Paris
- OGAWA K, KANEMATSU S, TABAKE K, ASADA K (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplast: detection by immunogold labeling after rapid freezing and substitution Method. *Plant Cell Physiol* **36**: 565-573
- OGAWA K, KANEMATSU S, ASADA K (1996) Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" Cu,Zn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant Cell Physiol* **37 (6)**: 790-799

- OKUDA T, MATSUDA Y, YAMANAKA A, SAGISAKA S (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol* **97**: 1265-1267
- OLSEN LJ, HARADA JJ (1995) Peroxisomes and their assembly in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 123-146
- OLSEN LJ (1998) The surprising complexity of peroxisome biogenesis. *Plant Mol Biol* **38**: 163-189
- OLSON PD, VARNER JE (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* **4**: 887-892
- O'NEIL RA, SCOTT TK (1987) Rapid effects of IAA on cell surface proteins from intact carrot suspension culture cells. *Plant Physiol* **84**: 443-446
- ORENDI G, ZIMMERMANN P, BAAR C, ZENTGRAF V (2001) Loss of stress-induced expression of catalases during leaf senescence in arabidopsis thalian is restricted to oxidative stress. *Plant Sci* **161**: 301-314
- OROZCO-CÁRDENAS ML, RYAN CA (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plants leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 6553-6557
- OROZCO-CÁRDENAS ML, NARVÁEZ-VÁSQUEZ J, RYAN CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and Methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179-191
- OSWALD WF, KRAUS R, HIPPELI S, BENZ B, VOLPERT R, ELSTNER EF (1992) Comparison of the enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* L. Karst.). *J Plant Physiol* **139**: 742-748
- OTA Y, ARIO T, HAYASHI K, NAKAGAWA T, HATTORI T, MAESHIMA M, ASAHI T (1992) Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. *Plant Cell Physiol* **33**: 225-232
- OUARITI O, BOUSSAMA N, ZARROUK M, CHERIF A, GHORBAL MH (1997) Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochem* **45 (7)**: 1343-1350
- OUZOUNIDOU G, MOUSTAKAS M, ELEFThERIOU EP (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Arch Environ Contam Toxicol* **32**: 154-160
- PACIFICI RE, SALO DC, DAVIES KJA (1989) Macroxyproteinase (m.O.P.): A 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Rad Biol Med* **7**: 521-536
- PACIFICI RE, DAVIES KJA (1990) Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods Enzimol* **186 B**: 485-502

Bibliografía

PACKER L, GLAZER AN (1990) Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants. *Methods enzymol* **186**: Academic Press, San Diego, CA

PACYNA JM (1987) Atmospheric emissions of arsenic, cadmium, lead and mercury from high temperature processes in power generation and industry. En: *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. (TC Hutchinson, KM Meema, eds). John Wiley and Sons, Chichester

PALMA JM, GARRIDO M, RODRIGUEZ-GARCÍA MI, del RÍO LA (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **287**: 68-74

PALMA JM, PASTORI G, BUENO P, DISTEFANO S, del RÍO LA (1997) Purification and properties of cytosolic copper,zinc superoxide dismutase from watermelon (*Cytrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Rad Res* **26**: 83-91

PALMA JM, LÓPEZ-HUERTAS E, CORPAS FJ, SANDALIO LM, GÓMEZ M, del RÍO LA (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: Purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiol Plant* **104**: 720-726

PALMA JM, SANDALIO LM, CORPAS FJ, ROMERO-PUERTAS MC, McCARTHY I, del RÍO LA (2002) Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem*, en prensa.

PARKER MW, SCHININA ME, BOSSA F, BANNISTER JV (1984) Chemical aspects of the structure, function and evolution of superoxide dismutases. *Inorg Chim Acta* **91**: 307-317

PASTORI GM, del RÍO LA (1994) An activated-oxygen-mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of pea leaves. *Planta* **193**: 385-391

PATRA J, LENKA M, PANDA B (1994) Tolerance and co-tolerance of the grass *Chloris barbata* Sw. to mercury, cadmium and zinc. *New Phytol* **128**: 165-171

PATTERSON BD, MACRAE EA, FERGUSON IB (1984) Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem* **139**: 487-492

PEDROSO MC, DURZAN DJ (2000) Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves. *Annals Bot* **86**: 983-994

PEI Z-M, MURATA Y, BENNING G, THOMINE S, KLÜSENER B, ALLEN GJ, GRILL E, SCHROEDER JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731-734

PELLINEN R, PALVA T, KANGASJÄRVI J (1999) Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* **20**: 349-356

PENCE NS, LARSEN PB, EBBS SD, LETHAM DL, LASAT MM, GARVIN DF, EIDE D, KOCHIAN LV (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci* **97** (9): 4956-4960

- PFEUTY A, GUERIDE M (2000) Peroxide accumulation without major mitochondrial alteration in replicative senescence. *FEBS Lett* **468**: 43-47
- PINTON R, CAKMAK I, MARSCHNER H (1994) Zinc deficiency enhanced NAD(P)H-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. *J Exp Bot* **45**: 45-50
- PIQUERAS A, OLMOS E, MARTÍNEZ-SOLANO JR, HELLÍN E (1999) Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: Time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Rad Res* **31 (suppl)**: S33-38
- POLIDOROS AN, SCANDALIOS JG (1999) Role of hydrogen and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* **106**: 112-120
- POSCHENRIEDER Ch, GUNSÉ B, BARCELÓ J (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol* **90**: 1365-1371
- POSCHENRIEDER Ch, BARCELÓ J (1999) Water relations in heavy metal stressed plants. En: *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems* (Prasad MNV, Hagemeyer J, eds). Springer-Verlag, pp 207-230. Heidelberg
- PRASSAD TK (1996) Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant J* **10**: 1071-1026
- PRICE A, HENDRY GAF (1989) Stress and the role of activated oxygen scavengers and the protective enzymes in plants subjected to drought, pp 493-494. *Biochemical Society Transactions*, 629th Meeting, London
- QUESSADA MP, MACHEIX JJ (1984) Caractérisation d'une peroxidase impliqué spécifiquement dans la lignification, en relation avec l'incompatibilité au greffage chez l'abricotier. *Physiol Véget* **22**: 533-540
- QUIRINO BF, NOH YS, HIMELBLAN E, AMASINO RM (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* **5**: 278-282
- RABIE RK, ARIMA Y, KUMAZAWA K (1980) Uptake and distribution of combined nitrogen and its incorporation into seeds of nodulates soybean plants as revealed by 15-N studies. *Soil Sci Plant Nutr* **26**: 427-436
- RAHLENBECK SI, BURBERG A, ZIMMERMANN RD (1999) Lead and cadmium in Ethiopian vegetables. *Bull Environ Contam Toxicol* **62**: 30-33
- RAJAGOPALAN KV (1985) Purification of bovine milk xanthine oxidase. En: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (RA Greenwald ed), pp 21-23. CRC Press, Boca Ratón, FL
- RAO MV, DAVIS KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J* **17**: 603-614

Bibliografía

RASCIO N, DALLA VECCHIA D, FERRETI M, MERLO L, GHISI R (1993) Some effects of cadmium on maize plants. *Ach Environ Contam Toxicol* **25**: 244-249

RAUSER WE (1995) Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiol* **109**: 1141-1149

RAUSER WE, ACKERLEY CA (1987) Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. *Can. J. Bot* **65**: 643-646

RAUSER WE, MEUWLY P (1995) Retention of cadmium in roots of maize seedlings. *Plant Physiol* **109**: 195-202

RENNENBERG H (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Reviews. Phytochem* **21 (12)**: 2771-2781

RENNENBERG H, BRUNOLD C (1994) Significance in glutathione metabolism in plants under stress. En: *Progress in Botany* (Benke HD, Luttge V, Esser K, Kadereit JW, Ringe M, eds), 55, pp 142-156

REUMANN S (2000) The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol Chem* **381**: 639-648

RHODIN J (1954) *Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney*. Doctoral Thesis. Karolinska Institut. Aktiebolaget Godvil, Stockholm.

RICH PR, BONNER WDJr (1978) The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **188**: 206-213

del RÍO LA, GÓMEZ M, LEAL A, LÓPEZ GORGÉ A (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**:409-15

del RÍO LA, LYON DS, OLAH I, GLICK B, SALIN ML (1983) Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplast from a higher plant. *Planta* **158**: 216-224

del RÍO LA, SANDALIO LM, YÁÑEZ J, GÓMEZ M (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. *J Inorg Biochem* **24**: 25-34

del RÍO LA, FERNÁNDEZ VM, RUPÉREZ FL, SANDALIO LM, PALMA JM (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiol* **89**: 728-731

del RÍO LA, SEVILLA F, SANDALIO LM, PALMA JM (1991) Nutritional effect and expression of SODs: Induction and gene expression; diagnostics; prospective protection against oxygen toxicity. *Free Rad Res Commun* **12-13**: 819-827

del RÍO LA, SANDALIO LM, PALMA JM, BUENO P, CORPAS FJ (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Rad Biol Med* **13**: 557-580

del RÍO LA, DONALDSON RP (1995) Production of superoxide radicals in glyoxysomal membranes of castor bean endosperm. *J Plant Physiol* **146**: 283-287

del RÍO LA, SANDALIO LM, ALTOMARE DA, ZILINSKAS BA (1996) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase of pea leaves: changes induced by leaf senescence. Libro de resúmenes: *VIII Biennial International Society for Free Radical Research*. Barcelona

del RÍO LA, GÓMEZ-ORTEGA M, LEAL A, LÓPEZ-GORGÉ J (1997) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**: 409-415

del RÍO LA, SANDALIO LM, CORPAS FJ, LÓPEZ-HUERTAS E, PALMA JM, PASTORI GM (1998) Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Physiol Plant* **104**: 673-680

del RÍO LA, SANDALIO LM, PALMA JM, CORPAS FJ, LÓPEZ-HUERTAS E, ROMERO-PUERTAS MC, McCARTHY I (2002a) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism, and stress-related enzyme activities. En: *Plant Peroxisomes, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. (Baker A, Graham I, eds), pp 221-258. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands

del RÍO LA, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GÓMEZ M, BARROSO JB (2002b) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**:1255-1272

ROMANDINI P, TALLANDINI L, BELTRAMINI M, SALVATO B, MANZANO M, BERTOLDI M, ROCOO GP (1992) Effects of copper and cadmium on growth, superoxide dismutase and catalase activities in different yeast strains. *Comp Biochem Physiol* **103C**: 255-262

ROMERO-PUERTAS MC, SANDALIO LM, PALMA JM, GÓMEZ M, del RÍO LA (2002) Cadmium causes the modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* **25**: 677-686

ROMERO-PUERTAS MC, McCARTHY I, SANDALIO LM, PALMA JM, CORPAS FJ, GÓMEZ M, del RÍO LA (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Rad Res* **31**: S235-241

ROSELL DF, WHITE EH (1978) *Methods Enzymol* **57**: 409

ROUILLER C, BERNHARD W (1956) Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J Biophys Biochem Cytol* **2 (supp)**: 355-359

RUÍZ-LOZANO JM, COLLADOS C, BAREA JM, AZCÓN R (2001) Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *J Exp Bot* **52 (364)**: 2241-2241

RUZSA SM, MYLONA P, SCANDALIOS JG (1999) Differential response of antioxidant genes in maize leaves exposed to ozone. *Redox Rep* **4**: 95-103

SAKAMOTO A, OHSUGA H, TANAKA K (1992) Nucleotide sequence of two cDNA clones encoding different Cu/Zn-superoxide dismutases expressed in developing rice seed (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **19**: 323-327

Bibliografía

SALIN ML, BRIDGES SM (1980) Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Arch Biochem Biophys* **201**: 369-374

SALT DE, WAGNER GJ (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *J Biol Chem* **268**: 12297-12302

SALT DE, PRINCE RC, PICKERING IJ, RASKIN I (1995a) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol* **109**: 1427-1433

SALT DE, BLAYLOCK M, KUMAR NP, DUSHENKOV V, ENSLEY BD, CHET I, RASKIN I (1995b) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotech* **13 May**: 468-474

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS TM (1989) En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Edn 2. Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

SÁNCHEZ-MARTÍN MJ, SÁNCHEZ-CAMAZANO M, LORENZO LF (2000) Cadmium and Lead contents in suburban and urban soils from two medium-sized cities of Spain: Influence of traffic intensity. *Bull Environ Contam Toxicol* **64**: 250-257

SANDALIO LM, PALMA JM del RÍO LA (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci* **51**: 1-8

SANDALIO LM, del RÍO LA (1988a) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxisomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol* **88**: 1215-1218

SANDALIO LM, FERNÁNDEZ VM, RUPÉREZ FL, del RÍO LA (1988b) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* **87**: 1-4

SANDALIO LM, LÓPEZ-HUERTAS E, BUENO P, del RÍO LA (1997) Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Rad Res* **26**:187-194

SANDALIO LM, DALURZO HC, GÓMEZ M, ROMERO-PUERTAS MC, DEL RÍO LA (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* **52**: 2115-2126

SAVOURÉ A, THORIN D, DAVEY M, HUA X-J, MAURO S, VAN MONTAGNI M, INZÉ D (1999) NaCl and CuSO_4 treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Cell Environ* **22**: 387-396

SAYGIDEGER S (2000) Sorption of cadmium and their effects on growth, protein contents, and photosynthetic pigment composition of *Veronica anagallis-aquatica* L. and *Ranunculus aquatilis* L. *Bull Environ Contam Toxicol* **65**: 459-464

SCANDALIOS JG (1994) Regulation and properties of plant catalases. En: Cause of photooxidative stress and ameliovation of defense systems in plants (EDs. C.H.Foyer y P.M Mullineaux) CRC Press, Boca Ratón, FL. pp. 275-315

- SCHÄFER HJ, HAAG-KERWER A, RAUSCH T (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol Biol* **37**: 87-97
- SCHÄFER L, FEIERABEND J (2000) Photoinactivation and protection of glycolate oxidase *in vitro* and in leaves. *Z Naturforsch* **55c**: 361-372
- SCHICKLER H, CASPI H (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol Plant* **105**: 39-44
- SCHLEGEL H, GODBOLD DL, HÜTTERMANN A (1987) Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO₂ uptake and water relations of spruce (*Picea abies*) seedlings. *Physiol Plant* **69**: 265-270
- SCHNARRENBERGER C, OESER A, TOLBERT NE (1973) Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch Biochem Biophys* **154**: 438-448
- SCHNEIDER EA, WIGHTMAN F (1974) Metabolism of auxin in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol* **25**: 487-513
- SCHRAUDNER M, MOEDER W, WIESE C, VAN CAMP W, INZÉ D, LANGEBARTELS C, SANDERMANN HJR (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J* **16** (2): 235-245
- SCHUBERT KR (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Ann Rev Plant Physiol* **37**: 539-574
- SCHÜTZENDÜBEL A, SCHWANZ P, TERCHMANN T, GROSSK, LANGENFELD-HEYGER R, GODBOLD DL, POLLE A (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol* **127**: 887-898
- SCHWITZGUÉBEL JP, SIEGENTHALER PA (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiology* **75**: 670-674
- SELA M, TEL-OR E, FRITZ E, HÜTTERMANN A (1988) Localization and toxic effects of cadmium, copper and uranium in *Azolla*. *Plant Physiol* **88**: 30-36
- SEVANI A, KIM E (1985) *J Free Radical Biol Med* **1**: 263-271
- SHARMA Y, LEÓN J, RASKIN I, DAVIS KR (1996) Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5099-5104
- SHAW BP (1995) Effect of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedling of *Phaseolus aureus*. *Biol Plants* **37**: 587-596

Bibliografía

SHENKER M, CROWLEY DE (1997) Phytosiderophores do not influence cadmium uptake by wheat plants. En: *Fourth International Conference on the Biochemistry of Trace Elements*, June 23-26. (Berkeley, CA, Eds, IK Iskandar, SE Hardy, AC Chang , GM Pierzynski), pp 205-206

SHEORAN IS, SINGAL HR, SINGH R (1990) Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Photosynth Res* **23**: 345-351

SHERLOCK JC (1984) Cadmium in foods and the diet. *Experientia* **40**: 152-155

SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, MIYAGAWA Y, TAKEDA T, YABUTA Y, YOSHIMURA K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* **53**: 1305-1319

SIEDLECKA A, BASZINSKY T (1993) Inhibition of electron flow around photosystem I in chloroplast of Cd-treated maize plants is due to Cd-induced iron deficiency. *Physiol Plant* **87**: 199-202

SIEDLECKA A, KRUPA Z, SAMUELSSON G, ÖQUIST G, GARDESTRÖM P (1997) Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. *Plant Physiol Biochem* **35**: 951-957

SIES H (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad Biol Med* **27 (9, 10)**: 916-921

SIMON M, ORTÍZ I, GARCÍA I, FERNÁNDEZ E, FERNÁNDEZ J, DORRONSORO C, AGUILAR J (1999) Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite min (Aznalcóllar, Spain). *Sci Total Environ* **242**: 105-115

SKÓRZYŃSKA-POLIT E, BASZYŃSKI T (1997) Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Sci* **128**: 11-21

SMALL GM, IMANAKA T, SHIO H, LAZAROW PB (1987) Efficient association of *in vitro* translation products with purified stable *Candida tropicalis* peroxisomes. *Mol Cel Biol* **7**: 1848-1855

SMART C (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytol* **126**: 419-448

SMIRNOFF N (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 229-235

SMITH IK, VIERHELLER TL, THORNE CA (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol Plant* **77**: 449-456

SOMASHEKARAI AH BV, PADMAJA K, PRASAD ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* **85**: 85-89

SRIVASTAVE A, TEL-OR E (1991) Effect of some environmental pollutants on the superoxide dismutase activity in *Lemna*. *Free Rad Res Comm* **12-13**: 601-607

- STADTMAN ER, OLIVER CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* **266**: 2005-2008
- STADTMAN ER (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **28**: 1220-1224
- STADTMAN TC (1990) Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem* **59**: 111-127
- STEINBECK MJ, KHAN AU, APPEL JR, WH, KARNOVSKY MJ (1993) The DAB-Mn⁺⁺ cytochemical Method revisited: validation of specificity for superoxide. *J Histochem Cytochem* **41(11)**: 1659-1667
- STEINER AA (1961) A universal Method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. *Plant Soil* **15**: 134-154
- STEVENS R, CREISSEN G, MULLINEAUX PM (1997) Cloning and characterization of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol Biol* **35**: 641-654.
- STREB P, MICHAEL-KNAUF A, FEIERABEND J (1993) Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiol Plant* **88**: 590-598
- STRELLER S, WINGSLE G (1994) *Pinus silvestris* L. needles contain extracellular Cu,Zn superoxide dismutase. *Planta* **192**: 195-201
- SVALHEIM O, ROBERTSEN B (1993) Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. *Physiol Plant* **88**: 675-681
- TABAK HF, BRAAKMAN I, DISTEL B (1999) Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol* **9**: 447-453
- TAKAHAMA U (1988) Oxidation of flavonoids by hydrogen peroxide in epidermal and guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* **29**: 433-438
- TAMBUSSI EA, BARTOLI CG, BELTRANO J, GUIAMET JJ, ARAUS JL (2000) Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* **108**: 398-404
- TANAKA K, TAKEUCHI E, KUBO A, SASAKI T, HARAGUCHI K, KAWAMURA Y (1991) Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Arch Biochem Biophys* **286**: 371-375
- THIMANN KV (1983) Senescence in Plants. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- THOMSON WW, PLATT-ALOIA KA (1987) Ultrastructure and senescence in plants. En: Plant senescence: its biochemistry and physiology (Eds W.W.W. Thomson, EA Nothnagel, RC Huffaker) pp. 20-30. The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

Bibliografía

THORPE, GHG, KRICKA LJ, MOSELEY SB, WHITEHEAD TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in the luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* **31**: 1335.

TITORENKO VI, RACHUBINS RA (1998) The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci* **23**: 231-233

TOLBERT NE (1980) Photorespiration. En: *The Biochemistry of Plants*. (Davis DD, ed), Vol 2, pp. 487-523. Academic Press, London

TOLBERT NE (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxisomes. *Annu Rev Biochem* **50**: 133-157

TOLBERT NE, ESSNER E (1981) Microbodies: Peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol* **91**: 271s-283s

TOLBERT NE, GEE R, HUSIC DH, DIETRICH S (1987) Peroxisomal glycolate metabolism and the C₂ oxidative photosynthesis carbon cycle. En: *Peroxisomes in Biology and Medicine*. (Fahimi HD, Sies H, eds), pp. 213-322. Berlin: Springer-Verlag.

TRUMPER S, FOLLMANN H, HABERLEIN Y (1994) A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplast homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Lett* **352**: 159-162

TSUCHIYA K (1978) Cadmium studies in Japan. A Review. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York. 376p

TUPPY H, WIESBANER U, WINTERSBERGER E (1962) Amino säure-p-nitroanilide als substrate für aminopeptidasen und andere proteolytische fermente. *Z Physiol Chem* **379**: 278.

TYNECKA Z, GOS Z, ZAJAC J (1981) Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **147**: 313-319

VALDERRAMA R, CORPAS FJ, CARRERAS A, SANDALIO LM, del RÍO LA, BARROSO JB (2002) Characterisation of NADPH-producing systems and antioxidative enzymes in leaves of olive cultured *in vitro*. *Plant Physiol Biochem*, enviado a publicar

VAN ASSCHE F, CLIJSTERS HMM (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* **13**: 195-206

VAN DEN BOSCH H, SCHUTGENS RBH, TAGER JM, WANDERS JA (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* **61**: 157-197

VÁZQUEZ MD, POSCHENRIEDER Ch, BARCELÓ J (1989) Pulvinus structure and leaf abscission in cadmium treated bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Can J Bot* **67**: 2756-2764

VÁZQUEZ MD, BARCELÓ J, POSCHENRIEDER Ch, MÁDICO T, HATTON P, BAKER AJM, COPE GH (1992) Localization of zinc and cadmium in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals. *J Plant Physiol* **140**: 350-355

- VÁZQUEZ MD, POSCHENRIEDER Ch, CORRALS I, BARCELÓ J (1999) Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol* **119**: 435-444
- VERNOUX T, WILSON RC, SEELEY KA, REICHEL D, MUROY S, BROWN S, MAUGHAM SC, COBBETT CS, VAN MONTAGNI M, INZÉ D, MAY M, SUNG ZR (2000) The root meristemless cadmium sensitive 2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* **12**: 97-109
- VIANELLO A, ZANCANI M, MACRI F (1990) Hydrogen peroxide formation and iron ion oxidation linked to NADH oxidation in radish plasmalemma vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1023**: 19-24
- VIANELLO A, MACRI F (1992) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. *J Bioenerg Biomem* **23**: 409-423
- VICENTINI F, MATILDE P (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisomes in senescent leaves. *J Plant Physiol* **142**: 50-56
- VIGIL EL (1983) Microbodies. En: *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. (Hall JL, Moore AL, eds), pp 211-236. Academic Press, London
- VILLALBA JM, CÓRDOBA F, NAVAS P (1995) Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. En: *Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology 4*, (Haris JR, eds), pp 57-81. Plenum press, New York
- VITÓRIA AP, LEA PJ, AZEVEDO RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* **57**: 701-710
- VÖGELI-LANGE R, WAGNER GJ (1996) Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in Tobacco leaves. *Plant Physiol* **92**: 1086-1093
- VOTILA M, AIOUB AA, GULLNER G, KÓMÍVES T, BRUNOLD C (1994) Induction of glutathione transferase activity in wheat and pea seedlings by cadmium. *Acta Biol Hung* **45 (1)**: 11-16
- WAGNER GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* **51**: 173-217
- WELCH RM, NORWELL WA, SCHAEFER SC, SHAFF JE, KOCHIAN LV (1993) Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) by Fe and Cu status: does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulation of cation uptake?. *Planta* **190**: 555-561
- WELCH RM (1995) Micronutrient nutrition of plants. *Crit Rev Plant Sci* **14**: 49-82
- WELCH RM, NORWELL WA (1999) Mechanism of cadmium uptake, translocation and deposition in plants. Chapter 6. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands

Bibliografía

WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J (2001) Nitric oxide: a comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177-183.

WILLEKENS H, VILLAROEL R, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN CAMP W (1994) Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Lett* **352**:79-83

WILLEKENS H, CHAMNONGPOL S, DAVEY M, SCHRAUDNER M, LANGEBARTELS C, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN CAMP W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stresses defence in C₃ plants. *EMBO J* **16**: 4806-4816

WINGSLE G, KARPINSKI S (1995) Differential redox regulation by glutathione reductase and Cu,Zn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* **198**: 151-157

WINSTON GW (1990) Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. En: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatization Mechanism*, pp 57-86. Wiley-Liss, Inc

WOLF B (1982) A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrient status. *Comm Soil Sci Plant Anal* **13**: 1035-1059

WONG-VEGA L, BURKE JJ, ALLEN RD (1991) Isolation and sequence of a cDNA that encodes pea manganese superoxide dismutase. *Plant Mol Biol* **17**: 1271-1274

WOODBURY W, SPENCER AK, STAHMANN MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* **443**: 301-305

WOOLHOUSE HW (1983) Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. En: *Encyclopeida of Plant Physiology (New Series)*. (OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler, eds), vol 12c, pp 245-300. Springer-Verlag, Berlin

XIANG C, OLIVER DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1539-1550

YAMAZAKI RK, TOLBERT N (1970) Enzymatic characterization of leaf peroxisomes. *J Biol Chem* **245**: 5137-5144

YAN L-J, ORR WC, SOHAL RS (1998) Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing and microsequencing. *Anal Biochem* **263**: 67-71

YANG X, BALIGAR VC, MARTENS DC, CLARK RB (1996) Cadmium effects on the influx and transport of mineral nutrients in plant species. *J Plant Nutr* **19**: 643-656

YANG T, POOVAIAH BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 4097-4102

ZELITCH I, HAVIR EA, MCGONIGLE B, MCHALE NA, NELSON T (1991) Leaf catalase mRNA and catalase-protein levels in a high-catalase tobacco mutant with O₂-resistant photosynthesis. *Plant Physiol* **97**: 1529-1559.

ZENK MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**: 21-30

ZHU D, SCANDALIOS JG (1995) The maize mitochondrial Mn-SOD encoded by multiple genes are localized in the mitochondrial matrix of transformed yeast cells. *Free Rad Biol Med* **18**: 179-183

ZHU YL, PILON-SMITS EAH, TARUN AS, WEBER SU, JOUANIN L, TERRY N (1999) Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* **121**: 1169-1177

ANEXOS

Tabla	Título	página
Tabla 1.1	Algunos ejemplos de desequilibrios nutricionales causados por el cadmio.....	11
Tabla 1.2	Especies de oxígeno reactivo (ROS).....	19
Tabla 1.3	Distribución subcelular de SODs en plantas superiores.....	32
Tabla 1.4	Polipéptidos de membranas peroxisomales implicados en la generación de radicales O_2^- en peroxisomas de hojas de guisante.....	45
Tabla 3.1	Sondas que se marcaron con ^{32}P	79
Tabla 4.1	Efecto del cadmio sobre el crecimiento de plantas de guisante.....	83
Tabla 4.2	Efecto del tratamiento con cadmio sobre la fotosíntesis neta, la eficiencia en el uso del agua y transpiración de plantas de guisante.....	85
Tabla 4.3	Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de metales en hojas y en raíces de plantas de guisante.....	86
Tabla 4.4	Contenido de Cd en frutos y vainas de plantas de guisante.....	87
Tabla 4.5	Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de macronutrientes en hojas y en raíces de plantas de guisante.....	88
Tabla 4.6	Efecto del tratamiento con cadmio sobre el tamaño de las células y el número de cloroplastos de hojas de guisante.....	89
Tabla 4.7	Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de grupos tiol en extractos de hojas de guisante.....	99
Tabla 4.8	Contenido en glutatión en extractos de hojas de guisante.....	100
Tabla 4.9	Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de ascorbato reducido en extractos crudos de hojas de guisante.....	101
Tabla 4.10	Efecto del cadmio sobre el contenido de H_2O_2 en extractos crudos de hojas de guisante.....	108

Tablas

<u>Tabla</u>	<u>Título</u>	<u>página</u>
Tabla 4.11	Efecto del cadmio sobre la población de peroxisomas.....	108
Tabla 4.12	Integridad de los peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con cadmio	112
Tabla 4.13	Endopeptidasas (EP) de peroxisomas de hojas de guisante	120
Tabla 4.14	Efecto de distintos inhibidores sobre la acumulación de H ₂ O ₂ en hojas	128
Tabla 5.1	Características de la senescencia inducida por cadmio en hojas de guisante	163

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>página</u>
Fig. 1.1	Vertido de Aznalcóllar en 1998	3
Fig. 1.2	Modelo que describe los mecanismos de entrada, exclusión y acumulación de cadmio en células vegetales	7
Fig. 1.3	Configuración electrónica de la molécula de oxígeno y sus formas activadas.....	18
Fig. 1.4	Secuencia de reacciones de transferencia de electrones a la molécula de O ₂ ...	18
Fig. 1.5	Reacción química de Haber-Weiss catalizada por metales	19
Fig. 1.6	Bioquímica del NO [•] en sistemas biológicos	22
Fig. 1.7	Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial	23
Fig. 1.8	Esquema de la producción y degradación de ROS en cloroplastos.....	24
Fig. 1.9	Peroxidación lipídica en membranas	26
Fig. 1.10	Esquema de las rutas de transducción de señales en la respuesta de defensa de la planta.....	28
Fig. 1.11	Ciclo ascorbato-glutation o de Foyer-Halliwell-Asada	34
Fig. 1.12	Esquema de la β-oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato.....	41
Fig. 1.13	Esquema de la fotorrespiración.....	42
Fig. 1.14	Esquema de la producción de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo	44
Fig. 3.1	Obtención de peroxisomas	52
Fig. 3.2	Extracción del ADN de hojas.....	76
Fig. 3.3	Obtención de ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias	80
Fig. 3.4	Extracción y purificación de ADN de los geles de agarosa	81
Fig. 3.5	Técnica de Northern-blot	82

Figuras

Figura	Título	página
Fig. 4.1	Efecto del cadmio sobre el crecimiento de plantas de guisante	84
Fig. 4.2	Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila de las hojas de guisante.....	85
Fig. 4.3	Efecto del tratamiento con cadmio en la estructura de las hojas de guisante ..	90
Fig. 4.4	Efecto del tratamiento con cadmio en la ultraestructura de hojas de guisante	91
Fig. 4.5	Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de la superficie abaxial de hojas de guisante	92
Fig. 4.6	Micrografías electrónicas de raíces y hojas de guisante y análisis microanalítico.....	93
Fig. 4.7	Efecto del tratamiento con Cd^{2+} sobre el contenido de proteínas en hojas de guisante	94
Fig. 4.8	Efecto del tratamiento con cadmio sobre la tasa de peroxidación lipídica y el contenido de grupos carbonilo.....	95
Fig. 4.9	Efecto del tratamiento con cadmio sobre enzimas antioxidantes en extractos crudos de hojas de guisante.....	95
Fig. 4.10	Efecto del cadmio sobre la actividad catalasa en extractos de hojas de guisante	96
Fig. 4.11	Tasa de reducción del citocromo c en extractos crudos de hojas de guisante ..	97
Fig. 4.12	Efecto del Cd^{2+} sobre las isoenzimas de actividad SOD de hojas de guisante...	97
Fig. 4.13	Efecto del Cd^{2+} sobre la actividad SOD de extractos crudos de hojas de guisante y sobre la CuZn-SOD	98
Fig. 4.14	Efecto del tratamiento con cadmio sobre las actividades APX y GST en extractos crudos de hojas de guisante	98
Fig. 4.15	Modificación oxidativa de proteínas en extractos crudos de hojas.....	102

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>página</u>
Fig. 4.16	Oxidación de proteínas en extractos crudos de hojas de guisante incubados con H_2O_2	103
Fig. 4.17	Identificación de proteínas oxidadas en extractos de hojas de guisante.....	104
Fig. 4.18	Inmunodetección de Rubisco	105
Fig. 4.19	Actividad proteolítica de extractos crudos de hojas de guisante.....	106
Fig. 4.20	Efecto del cadmio en la degradación de proteínas de extractos crudos de hojas.....	107
Fig. 4.21	Tinción citoquímica con DAB, específica para la actividad catalasa marcadora de los peroxisomas.....	108
Fig. 4.22	Gradientes de densidad de Percoll y sacarosa.....	109
Fig. 4.23	Efecto del cadmio sobre la concentración de proteínas totales de peroxisomas de hojas.....	110
Fig. 4.24	Efecto del cadmio en la producción de especies de oxígeno reactivo en peroxisomas	110
Fig. 4.25	Efecto del cadmio sobre las actividades enzimáticas relacionadas con la producción de especies de oxígeno reactivo.....	111
Fig. 4.26	Efecto del cadmio sobre las actividades Mn-SOD y catalasa (CAT) en peroxisomas	112
Fig. 4.27	Efecto del cadmio sobre la actividad de las enzimas del ciclo ascorbato-glutation en peroxisomas	113
Fig. 4.28	Efecto del cadmio sobre la actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP en matrices concentradas de peroxisomas	114
Fig. 4.29	Actividad malato sintasa (MS) e isocitrato liasa (ICL) en peroxisomas.....	115
Fig. 4.30	Efecto del tratamiento con Cd sobre la permeabilidad de la membrana peroxisomal	117

Figuras

Figura	Título	página
Fig. 4.31	Efecto del cadmio sobre la peroxidación lipídica de las membranas de peroxisomas	117
Fig. 4.32	Oxidación de proteínas de peroxisomas.....	118
Fig. 4.33	Actividad aminopeptidasa (AP) en peroxisomas.....	119
Fig. 4.34	Actividad y patrón isoenzimático de las endopeptidasas de peroxisomas.....	120
Fig. 4.35	Degradación de las proteínas peroxisomales por EPs endógenas	121
Fig. 4.36	Detección de la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$ en hojas.....	122
Fig. 4.37	Efecto de diferentes inductores/inhibidores en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en hojas	123
Fig. 4.38	Detección de la producción de H_2O_2 en hojas	124
Fig. 4.39	Efecto de diferentes inductores/inhibidores en la producción de H_2O_2 en hojas	125
Fig. 4.40	Infiltración de hojas de guisante con "Evans Blue", marcador de muerte celular.....	126
Fig. 4.41	Efecto del Cd y de diferentes moduladores sobre la conductividad de discos foliares.....	127
Fig. 4.42	Localización de H_2O_2 en hojas de guisante.....	129
Fig. 4.43	Localización de acumulación de H_2O_2 en células del mesófilo	130
Fig. 4.44	Localización de $O_2^{\cdot-}$ en hojas de guisante.....	131
Fig. 4.45	Detección de óxido nítrico en hojas de guisante.....	132
Fig. 4.46	Imagen tridimensional de la producción de óxido nítrico en hojas.....	133
Fig. 4.47	Efecto del cadmio sobre la fragmentación del ADN.....	134
Fig. 4.48	Técnica TUNEL para la detección de núcleos apoptóticos	135

<u>Figura</u>	<u>Título</u>	<u>página</u>
Fig. 4.49	Cuantificación e integridad del ARN de hojas de guisante.....	135
Fig. 4.50	Análisis mediante la técnica de Northern de los niveles de ARNm de distintas enzimas antioxidantes.....	136
Fig. 4.51	Efecto de diferentes inductores/inhibidores sobre la expresión de actividades antioxidantes.....	132
Fig. 5.1	Modificaciones producidas por el cadmio en el metabolismo peroxisomal	160
Fig. 5.2	Posible respuesta celular frente al cadmio	170

ABA: ácido abcísico
ADN: ácido desoxirribonucleico
AP (Leu-): (Leucina) aminopeptidasa
APX: ascorbato peroxidasa
ARN: ácido ribonucleico
ASB: albúmina de suero bovino
ASC: ascorbato
ATP: trifosfato de adenosina
BCIP: fosfato 5-bromo-4-cloro-3indolil
BPDS: ácido batofenantrolindisulfónico
Caps: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CAT: catalasa
CDNB: cloro-2,4-dinitrobenceno
pCMS: ácido *p*-cloromercurifenilsulfónico
DAB: 3,3'-diaminobencidina
DAF2-DA: diacetato de diaminofluoresceína
DEPC: dietil piro carbonato
DETAPAC: ácido dietilentriaminopentaacético
DHA: deshidroascórbico
DHAR: deshidroascorbato reductasa
DMSO: dimetil sulfóxido
DNP: dinitrofenil
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina
DPI: difeniliodonio
DTNB: ácido 5-5' -ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT: 1,4-ditiotreitól
EDTA-Na₂: sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
EGPA: electroforesis en gel de poliacrilamida
EM: enzima málico
EP: endoproteasa
FAD: flavín adenín dinucleótido
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FBPasa: fructosa bisfosfatasa
Feo: feofitina
Fd: ferredoxina
FDNB: fluoro-dinitro-benceno
FMN: flavín mononucleótido
FSI/II: fotosistema I/II
GMPc: monofosfato de guanosina

Abreviaturas

GOX: glicolato oxidasa
GPX: glutation peroxidasa
GR: glutation reductasa
GSH/GSSG: glutation reducido (γ -glutamil-cisteinil glicina)/oxidado
GST: glutation-S-transferasa
G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Hepes: ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HPLC: cromatografía líquida de alta presión
HPR: hidroxipiruvato reductasa
HR: respuesta hipersensible
HVA: ácido homovanilínico
IAA: ácido indoacético
ICDH: isocitrato deshidrogenasa
ICL: isocitrato liasa
IEF: isoelectroenfoque
IRGA: analizador de gases en el infrarrojo
LB: medio de Luria-Bertani
L-NAME: N-nitro L- arginina metil éster
MDA: malondialdehido
MDHA: monodeshidroascorbato
MDHAR: monodeshidroascorbato reductasa
Mes: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
Mops: ácido 3-morfolino propano sulfónico
MP: membrana plasmática
MS: malato sintasa
NAC: N-acetil-cisteína
NAD(P)/NAD(P)H: 2-fosfonucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/reducido
NBT: azul de nitrotetrazolio
NEM: N-etilmaleimida
NOS: óxido nítrico sintasa
ODQ: 1H[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona
PAL: fenilalanina amonioliasa
PAR: radiación disponible para fotosíntesis
PC: plastocianina
PCs: fitoquelatinas
PCR: reacción en cadena de la ADN polimerasa
6PGDH: 6-fosfo gluconato deshidrogenasa
pI: punto isoeléctrico
PMPs: proteínas integrales de membranas de peroxisomas

PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo
PQ: plastoquinona
PRs: proteínas de resistencia
Psa A-F: polipéptidos del FSI
PTIO: 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
PVC: cloruro de polivinilo
RNS: especies de nitrógeno reactivo
ROS: especies de oxígeno reactivo
Rubisco: ribulosa-1,5-bisfosfatasa carboxilasa oxigenasa
SA: ácido salicílico
SAR: respuesta sistémica adquirida
SDS: lauril sulfato sódico
SIPK: quinasa inducida por SA
SOD (CuZn-/ Fe-/ Mn-): (cuprozinc/ ferro/ manganeso) superóxido dismutasa
TBE/TE: tampón tris de baja concentración salina
TBS: tampón tris salino
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TMP: tetrametil piperidinooxi
Tris: tris-hidroximetilaminometano
UV: luz ultravioleta
WIPK: quinasa inducida por herida
XDH: xantina deshidrogenasa
XOD: xantina oxidasa

