

T 4/2

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..... 8/05/2002 .....
ENTRADA NUM. .... 1708 .....

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

<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
Nº Documento <u>613384788</u>
Nº Cópia <u>115466656</u>

MARÍA C. ROMERO PUERTAS  
GRANADA 2002

UNIVERSIDAD DE GRANADA
<b>26 ABR. 2002</b>
COMISION DE DOCTORADO

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

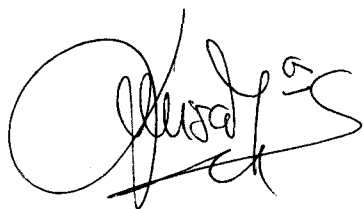
Memoria que presenta la licenciada en Ciencias Biológicas  
María C. Romero Puertas para optar al grado de Doctor.



Fdo. María C. Romero Puertas

Vº Bº

LOS DIRECTORES DEL TRABAJO



Fdo. Dra. Luisa Mª Sandalio González  
Dra. en Ciencias Biológicas  
Científico Titular del CSIC



Fdo. Dr. Luís 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 y Biología Molecular y Celular de Plantas, en la Estación Experimental del Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Granada.

Su elaboración ha sido financiada por una Beca Predoctoral de Formación de Personal Docente e Investigador, de la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se han presentado en los siguientes congresos y reuniones: Optimising Plant Genetic Strategies for Minimising Environmental Contaminants in the Food Chain. Norwich, UK, 21-23 Octubre 1998; Winter Meeting of the Society for Free Radical Research (European Region). Granada, España, 17-19 Diciembre, 1998; V Reunión del Grupo Español de Radicales Libres, Granada, 15-16 Diciembre, 1998; XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VI Hispano-Portuguesa, Sevilla, 19-22 Septiembre, 1999; VI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres y II Latinoamericana, El Puerto de Santa María, Cádiz, 26-28 Junio, 2000; XIV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VII Hispano-Portuguesa, Badajoz, 23-27 Septiembre, 2001; 5<sup>th</sup> Conference on Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants. Niza, Francia, 19-21 Noviembre, 2001.

Y han sido publicados en los siguientes artículos:

Romero-Puertas MC, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, del Río LA. Oxidative protein modification and cadmium toxicity in pea leaves (2002) *Plant Cell Environ* **25**, en prensa

Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río L A. Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes (2002) *PPB* **40**, special issue: Free Radicals and oxidative Stress in Plants, en prensa

McCarthy I, Romero-Puertas MC, Palma JM., Sandalio LM, Corpas FJ, del Río LA. Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants (2001) *Plant Cell Environ* **24**, 1065-1073

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Río LA. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants (2001) *J Exp Bot* **52** (364), 2115-2126

Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA. Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes (1999) *Free Rad Res* **31**, S25-31

Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB, del Río LA. Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms (1999) *Free Rad Res* **31**, S235-241



y en los siguientes capítulos de libro:

del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, McCarthy I, Romero-Puertas MC (2000) Cadmium toxicity in leaf peroxisomes from pea plants: effect on the activated oxygen metabolism and proteolytic activity. En : *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*, pp. 315-328. Kluwer Academic Publishers.

del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, López-Huertas E, Romero-Puertas MC, McCarthy I (2002) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism and stress-related enzyme activities. En: *Plant peroxisomes* . (Baker A, Graham I, eds), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, in press.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA MOLÉCULA DE OXÍGENO	1
1.1.1. Especies de Oxígeno Reactivas (ROS)	1
1.1.1.1. Radical Superóxido ( $O_2^-$ )	3
1.1.1.2. Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )	4
1.1.1.3. Radical Hidroxilo ( $HO^\cdot$ )	4
1.1.1.4. Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ )	4
1.1.2. Especies de Nitrógeno Reactivas	5
1.1.2.1. Óxido Nítrico o Monóxido de Nitrógeno ( $NO^\cdot$ )	5
1.1.3. Producción de ROS en Sistemas Biológicos	5
1.1.3.1. Mitocondrias	6
1.1.3.2. Cloroplastos	6
1.1.3.3. Otros	7
1.1.4. Toxicidad de Especies de Oxígeno Reactivas	8
1.1.5. Papel de ROS y $NO^\cdot$ como Señales Celulares	9
1.1.6. Sistemas Antioxidantes	11
1.1.6.1. Antioxidantes no Enzimáticos	12
1.1.6.2. Antioxidantes Enzimáticos	14
Superóxido dismutasas	14
Catalasa	16
Enzimas del ciclo ascorbato-glutation	17
Otras peroxidasas	18
Glutation-S-transferasas	21
Tiorredoxinas	22
1.2. METABOLISMO DE PEROXISOMAS	22
1.2.1. Funciones Metabólicas Principales	24
1.2.1.1. $\beta$ -Oxidación de Ácidos Grasos	24
1.2.1.2. Ciclo del Glioxilato	25
1.2.1.3. Fotorrespiración	25
1.2.1.4. Metabolismo de Ureidos	26
1.2.2. Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivas y Sistemas Antioxidantes	27
1.2.3. Transición Metabólica Glioxisoma-Peroxisoma	29
1.3. PROBLEMÁTICA DEL CADMIO	31
1.3.1. Fuentes de Contaminación de Cadmio	31
1.3.1.1. Emisiones Atmosféricas	32
1.3.1.2. Depósitos Directos	32

1.3.1.3. Contaminación Accidental	33
1.3.2. Paso del Cadmio a la Cadena Trófica	34
1.3.3. Toxicidad del Cadmio en Plantas	36
1.3.3.1. Alteraciones Estructurales y Ultraestructurales	36
1.3.3.2. Desequilibrios Nutricionales y de Crecimiento	37
1.3.3.3. Desajustes en la Fotosíntesis	38
1.3.3.4. Inhibición de otras Actividades Enzimáticas	39
1.3.3.5. Alteración de Componentes de Membranas	39
1.3.3.6. Relaciones Hídricas y Función Estomática	40
1.3.3.7. Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno	41
1.3.4. Translocación, Almacenaje y Tolerancia al Cadmio	41
1.3.5. Recuperación de Suelos y Agua Contaminados mediante la Utilización de Plantas Acumuladoras	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	49
3.2. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL	50
3.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS MUESTRAS VEGETALES	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	52
3.8. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ORGÁNULOS Y DE LA PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA	53
3.8.1. Integridad de los Peroxisomas	53
3.8.2. Permeabilidad de la Membrana Peroxisomal	53
3.9. DESARROLLOS ELECTROFORÉTICOS	54
3.9.1. En Geles de Poliacrilamida en Condiciones Nativas (EGPA)	54

3.9.2. En Geles de Poliacrilamida con SDS (EGPA-SDS)	54
3.9.3. Tinción de Proteínas en EGPA-SDS	54
3.9.3.1. Tinción con Azul Coomassie	54
3.9.3.2. Tinción con Plata	54
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	56
3.11.1. Superóxido Dismutasa	56
3.11.1.1. Actividad en Solución	56
3.11.1.2. Actividad en Geles de Poliacrilamida	57
3.11.2. Catalasa	57
3.11.2.1. Actividad en Solución	57
3.11.2.2. Actividad en Geles	58
3.11.3. Ascorbato Peroxidasa	59
3.11.4. Monodeshidroascorbato Reductasa	59
3.11.5. Glutation Reductasa	60
3.11.6. Glutation-S-Transferasa	60
3.11.7. Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa	60
3.11.8. 6-Fosfogluconato Deshidrogenasa	61
3.11.9. Isocitrato Deshidrogenasa	61
3.11.10. Glicolato Oxidasa	61
3.11.11. Hidroxipiruvato Reductasa	61
3.11.12. Xantina Oxidasa/Deshidrogenasa	61
3.11.13. Peroxidasa Total	62
3.11.14. Malato Sintasa	62
3.11.15. Isocitrato Liasa	62
3.11.16. Proteasa	63
3.11.16.1. Aminopeptidasas	63
3.11.16.2. Endopeptidasas	63
3.12. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	64
3.13. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	64
3.14. PRODUCCIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDO	65
3.15. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	65

3.16. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA TOTAL	66
3.17. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD	66
3.18. DETERMINACIÓN DE DENSIDAD	66
3.19. DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO	66
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)	68
3.21. DETERMINACIÓN DE GLUTATION REDUCIDO Y OXIDADO	69
3.22. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASÓRBICO	70
3.23. MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA	71
3.23.1. Preparación de las Muestras	71
3.23.1.1. Para Estudios Estructurales	71
3.23.1.2. Para Inmunocitoquímica	71
3.23.2. Detección de Muerte Celular (TUNEL)	71
3.23.3. Detección de Óxido Nítrico (NO <sup>·</sup> )	72
3.23.4. Identificación Citoquímica de Peroxisomas	72
3.23.5. Citoquímica de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	73
3.23.6. Citoquímica de Radicales O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	73
3.23.7. Microanálisis de Rayos-X	73
3.23.8. Microscopio electrónico de barrido	74
3.24. DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Y DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN HOJAS COMPLETAS	74
3.24.1. Producción de Radicales O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	74
3.24.2. Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74
3.24.3. Efecto de Moduladores sobre la Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	74
3.25. ENSAYO DE MUERTE CELULAR EN HOJA COMPLETA	75
3.26. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ADN	75
3.27. EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DEL ARN	77

3.28. DETECCIÓN DE ARNm CON SONDAS DE ADN MARCADO RADIOACTIVAMENTE	78
3.28.1. Sondas de ADN Utilizadas	78
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)	100
4.1.4.4. Glutation Oxidado y Reducido	101
4.1.4.5. Ascorbato Reducido	101
4.1.4.6. Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	102
4.1.4.7. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas	102
4.1.4.8. Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la Formación de Grupos Carbonilo	103
4.1.4.9. Identificación de Proteínas Modificadas Oxidativamente	104
4.1.4.10. Actividad Proteolítica	106
4.2. EFECTO DEL CADMIO EN PEROXISOMAS DE HOJAS DE GUISANTE	109
4.2.1. Población Peroxisomal	109
4.2.2 Metabolismo de Peroxisomas	110
4.2.2.1. Concentración de Proteínas	110
4.2.2.2. Producción de Especies de Oxígeno Reactivo (ROS)	111
4.2.2.3. Xantina Oxidasa (XOD), Glicolato Oxidasa (GOX) e Hidroxipiruvato Reductasa (HPR)	112
4.2.2.4. Mn-SOD y Catalasa	112
4.2.2.5. Enzimas del Ciclo Ascorbato-Glutation	114
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	116
4.2.3.1. Integridad de los Peroxisomas	116
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
<b>4.3. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y MUERTE CELULAR EN HOJAS</b>	<b>122</b>
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
<b>4.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO REACTIVO EN HOJAS</b>	<b>128</b>
4.4.1. Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )	128
4.4.2. Radicales Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	130
4.4.3. Óxido Nítrico ( $NO^{\cdot}$ )	131
<b>4.5. ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES INDUCIDAS POR CADMIO</b>	<b>134</b>
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
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>139</b>
5.1. Efecto del Cadmio sobre el Crecimiento y Metabolismo Oxidativo en Hojas de Extractos de Guisante	139
5.2. Efecto del Cadmio sobre el Metabolismo Oxidativo en Peroxisomas de Hojas de Guisante	152
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>157</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>



# ***INTRODUCCIÓN***



## 1.1. LA MOLÉCULA DE OXÍGENO

El elemento químico que conocemos como oxígeno (O) existe en el aire en forma de molécula diatómica ( $O_2$ , correctamente denominado dioxígeno) 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 diera su nombre actual y estableciera 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, pero están restringidos a entornos en los que la molécula de oxígeno no puede penetrar (Halliwell y Gutteridge, 2000).

### 1.1.1. Especies de Oxígeno Reactivas (ROS)

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 los radicales libres de oxígeno, según se deduce de los trabajos de Rebecca Gerschman y Daniel Gilbert realizados en 1954.

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 por sí solo (Halliwell y Gutteridge, 2000). La molécula de oxígeno es un radical libre, según esta definición, pero no todas las especies de oxígeno reactivas (ROS) lo son. Éstas, incluyen a los productos de su reducción, el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, y a su forma excitada, el oxígeno singlete y son a las que la molécula de oxígeno debe su toxicidad (Fridovich, 1983; Elstner, 1987; Cadenas, 1989; Boveris, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000) (Fig. 1.1).

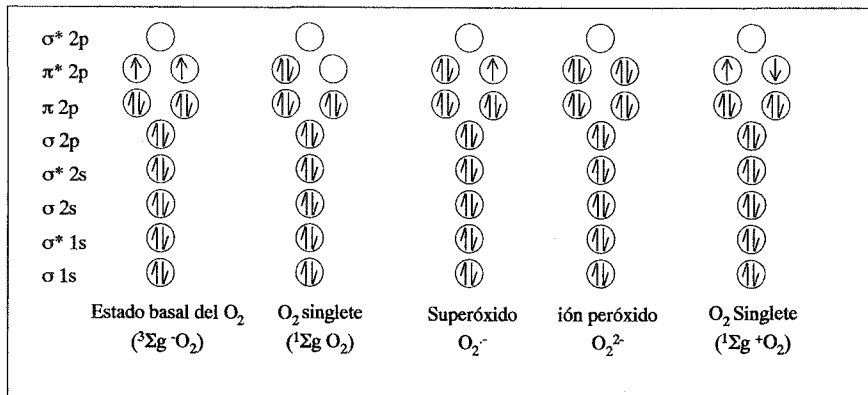


Fig. 1.1 Versión simplificada de la molécula de oxígeno y sus derivados

En la Figura 1.2 se muestra la secuencia de reacciones de transferencia de electrones a la molécula de oxígeno y la formación de especies reactivas y en la Tabla 1.1 se muestran algunas de las especies de oxígeno reactivas más importantes.

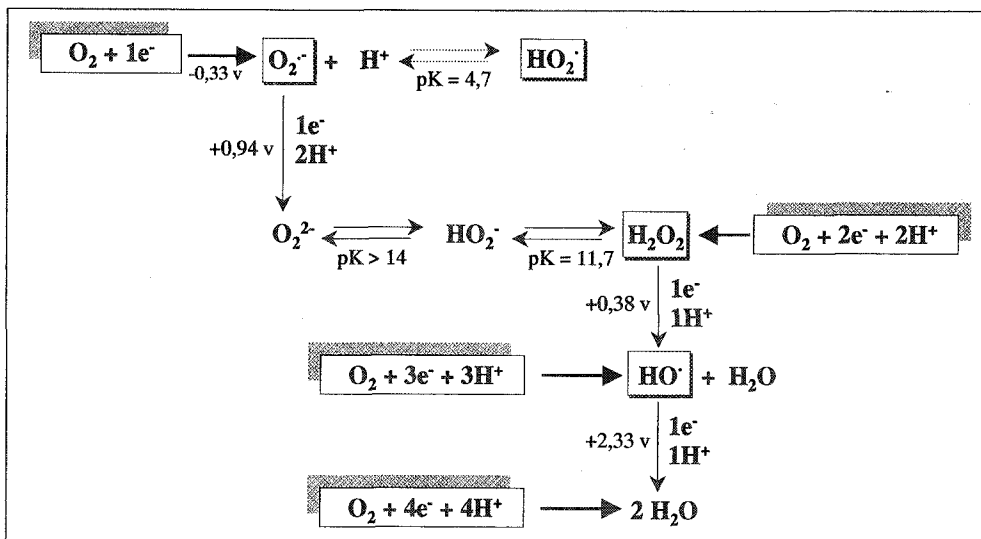


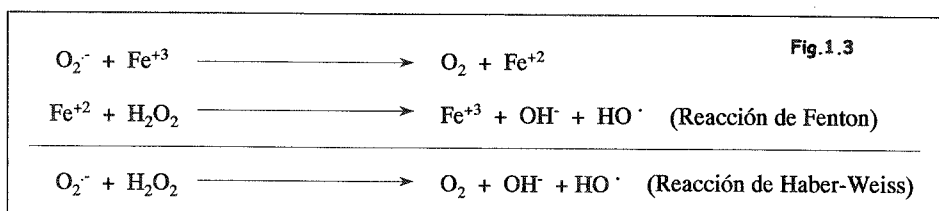
Fig. 1.2 Secuencia de reacciones de transferencia de un electrón a la molécula de oxígeno

Tabla 1.1 Especies de oxígeno reactivas (ROS)

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

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

El  $O_2^{\cdot-}$  tiene una vida media de milisegundos y es el mejor conocido. Su reactividad está limitada dependiendo del medio en el que se encuentre y del pH, a menos que esté protonado como radical perhidroxilo ( $HO_2$ ) 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, pudiendo desaparecer rápidamente en soluciones acuosas por dismutación espontánea (Fridovich, 1986). Además, este radical puede disminuir la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y glutatión peroxidasa (Asada, 1994) e incluso provocar daños, de forma directa sobre determinadas enzimas como 6-fosfogluconato deshidratasa, aconitasa, fumarasa y ribonucleótido reductasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). No obstante gran parte de su toxicidad proviene de la interacción con el  $H_2O_2$  dando lugar, a través de la reacción de Haber-Weiss al  $HO^{\cdot}$ , uno de los oxidantes más potentes que se conocen (Fig.1.3).



En sistemas biológicos el  $O_2^-$  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  $O_2^-$ . También tiene lugar su formación durante la autooxidación de compuestos de importancia biológica, entre ellos, hemoglobinas, ferredoxinas reducidas, flavinas, catecolaminas e hidroquinonas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

#### 1.1.1.2. Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Es el único estable en solución, por lo que puede acumularse de forma apreciable en medios acuosos neutros (Elstner, 1987) y difundir a través de membranas. Se ha encontrado en tejidos vegetales en cantidades del orden de  $2\mu M$  pudiendo incrementarse hasta  $30\mu M$  en infecciones por *Phytophthora megasperma* (Svalheim y Robertsen, 1993) o alrededor de  $0.1-0.6 \mu mol g^{-1}$  de peso fresco (Patterson y col., 1984), con un aumento a bajas temperaturas entre tres y cuatro veces la cantidad basal (Okuda y col., 1991; Kingston-Smith y col., 1999, respectivamente). Es un agente oxidante y reductor no muy fuerte pero a pesar de ello, puede ser citotóxico y se usa como desinfectante a altas concentraciones.

#### 1.1.1.3. Radical Hidroxilo ( $HO\cdot$ )

Está considerado como el agente oxidante más potente (Buettner, 1989). Su vida media es muy corta, del orden de nanosegundos, de tal modo que, nada más producirse, reacciona con sus moléculas vecinas. Se origina en reacciones Fenton, con la intervención de  $H_2O_2$  e iones metálicos (Halliwell y Gutteridge, 1992) (Fig. 1.3), cuando interviene el radical  $O_2^-$ , se denominan reacciones de Haber-Weiss (descrita por estos autores en 1934, Fig.1.3). Es capaz de producir daños importantes en membranas así, tiene la capacidad de iniciar la peroxidación lipídica, además de reaccionar 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).

#### 1.1.1.4. Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ )

Es una especie muy reactiva que para formarse necesita una entrada de energía y se produce en reacciones fotodinámicas en el interior de cloroplastos (Asada y Takahashi, 1987). Al perder la restricción

de spin, la capacidad oxidativa es mucho mayor que la del oxígeno (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).

### 1.1.2. Especies de Nitrógeno Reactivas

#### 1.1.2.1. Óxido Nítrico o Monóxido de Nitrógeno ( $\text{NO}^\cdot$ )

Es un radical libre gaseoso, soluble en agua y en solventes orgánicos que puede difundir rápidamente en y entre las células. En contacto con el aire, puede reaccionar con el oxígeno dando lugar al dióxido de nitrógeno, mucho más reactivo que el  $\text{NO}^\cdot$  (Halliwell y Gutteridge, 2000). La combinación de  $\text{NO}$  con el  $\text{O}_2^\cdot$  da lugar a la formación de peroxinitrito ( $\text{ONNO}^\cdot$ ) que es un potente oxidante de moléculas biológicas, incluyendo los grupos -SH, los lípidos, los aminoácidos y los nucleótidos (Beckman, 1996). El  $\text{NO}^\cdot$  fue caracterizado en un principio como factor de relajación del tono endotelial 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., 2001). 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). En la mayoría de los organismos el  $\text{NO}^\cdot$  es sintetizado por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), que convierten el aminoácido L-arginina en  $\text{NO}^\cdot$  y L-citrulina. Para esta reacción se requiere oxígeno y cuatro cofactores: FAD, FMN, tetrahidropterin y el grupo hemo (como el de los citocromos P450). Hay tres tipos de NOS: neuronal (nNOS) originariamente descubierta en el sistema nervioso, endotelial (eNOS) que se expresa constitutivamente en células endoteliales, ambas necesitan  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina para su acción, y la inducible (iNOS), identificada inicialmente en macrófagos y hepatocitos después de un tratamiento con endotoxinas o ciertas citoquinas, que es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Halliwell y Gutteridge, 2000).

#### 1.1.3. Producción de ROS en Sistemas Biológicos

La producción de oxidantes se encuentra compartimentada en los distintos orgánulos celulares.

### 1.1.3.1. Mitocondrias

Así, en mitocondrias tiene lugar la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el complejo I de la cadena de transporte mitocondrial a nivel de la NADH-deshidrogenasa y en la región de la ubiquinona-citocromos *b* (Flecha y Boveris, 1995) (Fig. 1.4). Una fuente adicional de  $H_2O_2$  la constituiría la SOD mitocondrial. En condiciones normales se estima que un 5% del flujo electrónico en mitocondrias se desvía hacia la formación de  $O_2^-$  (Rich y Bonner, 1993), aunque este porcentaje se incrementa en situaciones de estrés que provoquen aumento de equivalentes de reducción, tales como salinidad (Hernández et al., 1993; Gómez y col., 1999) o sequía (Leprice et al., 1994), entre otros.

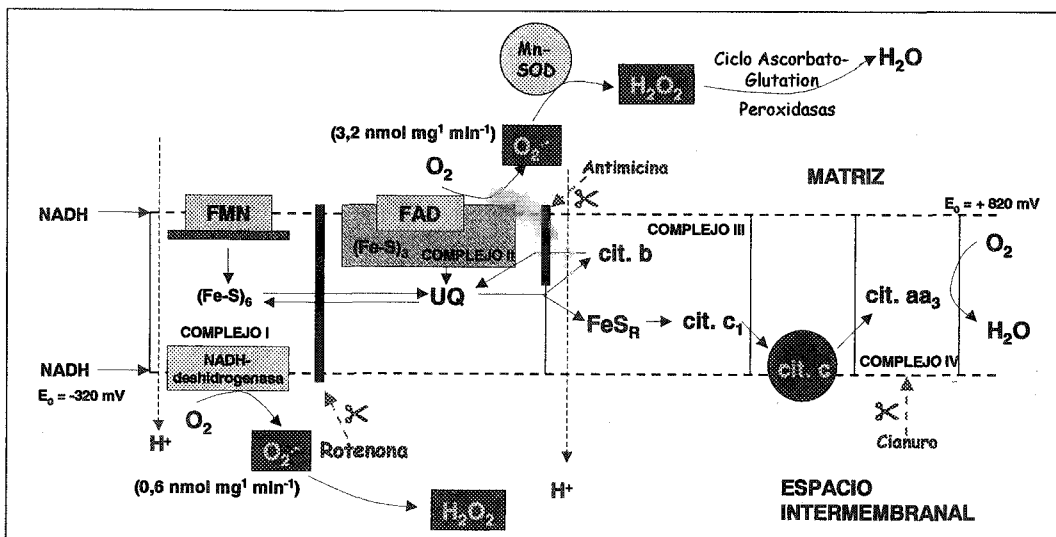


Fig. 1.4 Producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

### 1.1.3.2. Cloroplastos

Los cloroplastos son unos de los orgánulos más expuestos a la acción de los radicales  $O_2^-$  en virtud de la elevada presión parcial de oxígeno existente en su interior. La producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  se encuentra asociada al lado reductor del fotosistema I (FSI) en los centros S-Fe (Asada, 1994) (Fig. 1.5).

Otra vía alternativa de producción de  $O_2^-$  consiste en la autooxidación de la ferredoxina y en la reacción de la NADPH-ferredoxina reductasa (Asada y Takahashi, 1987). También se ha descrito la producción de  $O_2^-$  en el FSII a nivel de la feofitina o proteína QA (Ananyev et al., 1994). 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 en el cloroplasto y este porcentaje puede verse incrementado en situaciones de estrés, como se ha descrito en situaciones de salinidad (Hernández et al., 1995; Gómez y col., 1999), estrés hídrico (Price et al., 1989), estrés térmico (Hodgson y Raison, 1991), herbicidas (Halliwell, 1987) y contaminantes atmosféricos (Eltner, 1988). El  $H_2O_2$  en cloroplastos puede originarse también en la reacción de la Fe-SOD y CuZn-SOD.

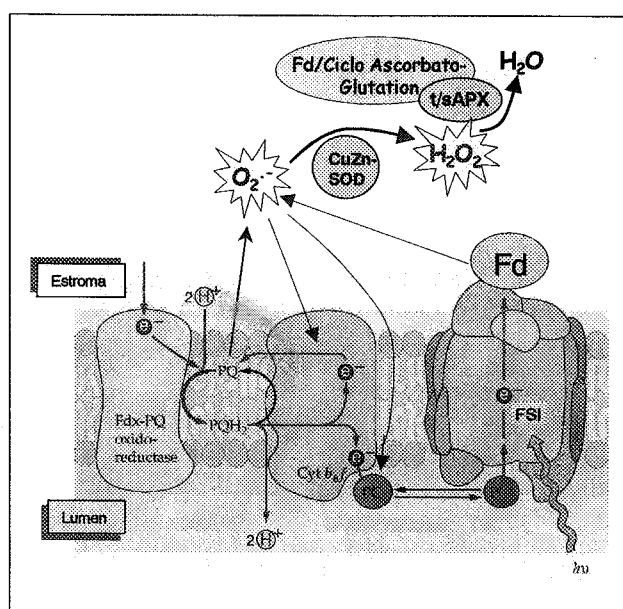


Fig. 1.5 Esquema de la producción y degradación de especies de oxígeno reactivo en cloroplastos. FSI: fotosistema I; PC: plastocianina; PQ: plastoquinona; Fd: ferredoxina; t/sAPX: ascorbato peroxidasa de tilacoides o de estroma

### 1.1.3.3. Otros

En la membrana plasmática de células de raíces se ha descrito la producción de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  asociada a cadenas de transporte electrónico en las que participan actividades NAD(P)H oxidoreductasas dependientes de Fe (Vianello et al., 1990; Macri et al., 1992). Quizás el sistema de producción de ROS asociado a 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  $O_2^-$ . La producción de ROS es 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 reactivas de oxígeno desempeñan un papel importante en el proceso de defensa frente al

patógeno, bien actuando directamente como antifúngicos o antiparásitos, 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).

#### 1.1.4. Toxicidad de Especies de Oxígeno Reactivas

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

1) La inactivación de enzimas por la oxidación de grupos -SH en los 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 post-translacional implicada no sólo en procesos fisiológicos sino también en procesos patológicos (Rodney y col., 1990).

Proteínas dañadas por ROS/RNS son más susceptibles a la degradación proteolítica (Rodney y col., 1990), aumentando así, el reciclaje de aminoácidos en células sometidas a estrés oxidativo. Aunque puede darse el caso de proteínas altamente oxidadas que dan lugar a agregados resistentes al ataque proteolítico, que se acumulan en la célula contribuyendo a la toxicidad (Pacifi y Davies, 1990).

2) Daños a 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). Bien a través de una acción directa sobre las bases y/o azúcares que componen las cadenas de ADN. En este sentido, el radical hidroxilo es el más peligroso en este sentido ya que puede atacar los azúcares y las bases, tanto puricas 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 de ADN (Nunoshiba y col., 1999; Halliwell y Gutteridge, 2000).



3) La peroxidación de lípidos de membrana alterando la funcionalidad de las mismas (Halliwell y Gutteridge, 2000) siendo los ácidos grasos poliinsaturados más susceptibles a este ataque. Los radicales hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) 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 ( $-\text{C}\cdot\text{H}$ ). En condiciones aerobias, lo normal es que este radical carbonilo reaccione con una molécula de oxígeno dando lugar a un radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), éste a su vez es capaz de abstraer 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.

#### 1.1.5. Papel de ROS y $\text{NO}\cdot$ como Señales Celulares

Además de ser citotóxicos, el  $\text{O}_2\cdot^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  tienen también funciones positivas dentro de la célula. Así, se ha descrito que la infección avirulenta de patógenos provoca la activación de una batería de defensas que da lugar a lo que se conoce como respuesta hipersensible que resulta en la restricción de la lesión a una zona claramente delimitada por tejido sano. Por otro lado, está la resistencia sistémica adquirida que resulta del ataque de patógenos virulentos a la planta y que se distribuye por toda ella, que se caracteriza por la inducción de un conjunto de respuestas frente a este ataque. En ambos casos, la respuesta implica la generación de especies de oxígeno reactivas, dando lugar a lo que se conoce como "explosión oxidativa", con la producción masiva de  $\text{O}_2\cdot^-$  y sobre todo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que anteriormente hemos mencionado (Lamb y Dixon, 1997; Bolwell y Wojtaszek, 1997). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  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, también actúa como una molécula señal que contribuye a la inducción de genes protectores en células adyacentes (Desikan y col., 2000). Así, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en la "explosión oxidativa", juega un papel principal en la dirección 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 frente al ozono (Sharma y col., 1996), en respuesta a daños físicos (Orozco-Cárdenas y col., 1999; 2001) o en respuesta a radiaciones ultravioleta (Mackerness y col., 2001). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también está implicado en el cierre estomático de plantas sometidas a estrés hídrico a través del ácido abscísico (Pei y col., 2000).

El NO<sup>•</sup> 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<sup>•</sup>, sino que está determinado por la producción concomitante de otras especies reactivas de oxígeno y la relación entre ellas (NO<sup>•</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO<sup>•</sup>/O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) (Delledonne y col., 2001). Por otro lado, se ha implicado también a la molécula de óxido nítrico en la respuesta ante diferentes estreses en conjunción con las especies reactivas de oxígeno (Delledonne y col., 1998 y 2001; Bolwell, 1999; 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 no está suficientemente claro (Blumwald y col., 1998; Grant y Loake, 2000). La NADPH-oxidasa también se induce por iones Ca<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> pueden estar regulados por GMPc (Durner et al., 1998). El NO<sup>•</sup> a su vez activa la guanilato ciclasa, lo que lleva consigo un incremento de los niveles de GMPc, amplificando de esta forma la señal (Durner et al., 1998; Grant y Loake, 2000). Además de ROS y NO<sup>•</sup>, intervienen otras moléculas señal en el proceso de transducción de señales, entre ellas, el etileno, el jasmónico o el ácido salicílico (SA) existiendo procesos de sinergismo y antagonismo entre ellos y diferentes rutas metabólicas generando una compleja red que de alguna forma coordina la respuesta 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 como la fenilalanina amonioliasa (PAL), las proteínas de resistencia (PRs), las glucanasas y las quitinasas o los genes que codifican para enzimas protectoras como la glutation-S-transferasa, la glutation peroxidasa y las peroxidases. En la Fig. 1.6 se esquematizan los procesos implicados en la transducción de señales en la respuesta de la planta frente a patógenos.



(antioxidantes enzimáticos). Estos sistemas previenen la formación incontrolada de radicales libres y especies de oxígeno reactivo o bien, 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 post-transcripcional (Chaudière y Ferrar-Iliou, 1999).

#### 1.1.6.1. 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:** incluye compuestos como cisteína (N-acetilcisteína), glutatión (GSH), ácido ascórbico, 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 base para la importancia del ascorbato en los sistemas biológicos reside en su capacidad reductora, siendo quizás, el antioxidante más abundante (Smirnov, 2000) y de especial relevancia en plantas, implicado en la eliminación de  $H_2O_2$  con la intervención de la ascorbato peroxidasa (APX) (Foyer, 1993). También puede actuar reduciendo al radical superóxido, dando lugar a  $H_2O_2$  y deshidroascórbico (DHA) (Takahama, 1988), así como secuestrar el oxígeno singlete y ser capaz de reaccionar con los radicales  $HO\cdot$ . En los sistemas biológicos, el ascorbato funciona normalmente como donador de un electrón dando lugar al monodeshidroascorbato (MDHA) y su oxidación completa a DHA es rara por la constricción estructural de la misma (Njus y col., 1990; Villalba y col., 1995). En células vegetales está presente en todos los compartimentos subcelulares, incluyendo el apoplasto, con una concentración media celular de 2-25 mM siendo mayor en el estroma cloroplastídico. En los últimos años se ha evidenciado su implicación además, en la división celular y crecimiento (Noctor y col., 2000; Smirnov, 2000).

El glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil glicina) es un tripéptido tiólico cuya unión  $\gamma$ - parece ser una protección frente a la degradación de 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, bien a través de la actividad GST, así como a la defensa frente a algunos metales pesados, siendo el precursor de las fitoquelatinas (Noctor y Foyer, 1998). Forma parte del ciclo ascorbato-glutation junto con el ascorbato que elimina  $H_2O_2$ . Está implicado también 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), jugando un importante papel en la regulación interórganos de la nutrición azufrada (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 de determinar por su continuo intercambio entre los distintos compartimentos subcelulares, que parece realizarse a través de permeasas de aminoácidos (Noctor y Foyer, 1998). En los últimos años se ha implicado a esta molécula en procesos de transducción de señales, expresión de genes y apoptosis, mediante la glucotiónilación de proteínas (Sies, 1999; Noctor y col., 2000).

**2) Reductores liposolubles:** incluye a la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) que reacciona con los radicales de oxígeno y peróxido o lipóxido formando un radical tocoferilo que, por ser estable, intercepta la cadena de reacciones en cascada producida por los radicales libres. Es el antioxidante más importante en las membranas lipídicas (Diplock, 1983; McCay, 1985; Fryer, 1992; Halliwell y Gutteridge, 2000). Los flavonoides están también incluidos en este grupo 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). Además, se encuentra el  $\beta$ -caroteno que actúa (de forma no estequiométrica) como atrapador físico del oxígeno singlete utilizando su energía para interconvertir la forma *cis* del  $\beta$ -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 tipo Fenton con generación de radicales  $HO\cdot$ . A este grupo pertenecen proteínas como la transferrina y la ceruloplasmina. Esta última, almacena cobre y cataliza la oxidación del

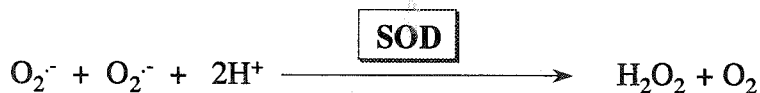
Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> con formación de agua, evitando así la formación de radicales HO<sup>•</sup> (Gutteridge y col., 1980). Otros quelantes de metales son las fitoquelatinas.

#### 1.1.6.2. Antioxidantes Enzimáticos

Su función es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies de oxígeno parcialmente reducidas (O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Winston, 1990).

##### Superóxido dismutasas (EC 1.15.1.1)

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue puesta de manifiesto por primera vez por McCord y Fridovich en 1969, y juegan un papel muy importante como mecanismo de defensa, al llevar a cabo la dismutación o desproporcionamiento de los radicales libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con formación de agua y peróxido de hidrógeno. La SOD aprovecha la capacidad oxidante y reductora del radical superóxido para llevar a cabo esta función, usando un radical superóxido para oxidar otro.



Las SODs son una familia de enzimas que se agrupan según el grupo prostético metálico ligado a la enzima, así encontramos las que contienen cobre y zinc (CuZn-SOD), las que contienen manganeso (Mn-SOD) y finalmente, las que contienen hierro (Fe-SOD). Se han encontrado algunas SODs atípicas que contienen diferentes combinaciones de estos metales 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). Se diferencian unas de otras por su resistencia ante inhibidores: la Fe-SOD es sensible a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5mM) pero resistente a KCN (2mM), la CuZn-SOD es sensible a ambos tratamientos mientras que la Mn-SOD es resistente.

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 u orgánulo en el que se encuentra 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 homología tanto en secuencia aminoacídica como en estructura. Todas las SODs se codifican a través del núcleo y su localización subcelular se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Localización de SODs en plantas superiores y algunas propiedades de las mismas

SOD	SubU kDa/ (Nº SubU)	Localización	Referencias
CuZn-SOD	16,5 (2)	Citoplasma	Sandalio y del Río, 1987 Palma y col., 1998 Kanematsu y Asada (1989a, 1989b)
		Cloroplastos	Hernández y col., 1994 Ogawa y col., 1995
		Peroxisomas	Sandalio y del Río, 1987, 1988 Bueno y del Río, 1992 Sandalio y col., 1997
		Mitocondrias	Duke y Salin, 1985 Sandalio y col., 1987
		Núcleo	Ogawa y col., 1996 Valderrama y col., (en prensa)
		Extracelular	Streller y Wingsle, 1994 Fridovich, 1995 Ogawa y col., 1996
Mn-SOD	27 (4)	Peroxisomas	Del Río y col., 1983 Sandalio y col., 1987, 1988 Del Río y Donalson, 1995
		Mitocondrias	Corpas y col., 1991 Sakamoto y col., 1992 Zhu y Scandalios, 1995
Fe-SOD	20-24 (4)	Citoplasma	Becana y col., 1989
		Cloroplastos	Salin y Bridges, 1980 Bowler y col., 1991
		Peroxisomas	Drouillard y Paulin, 1990
		Mitocondrias	Drouillard y Paulin, 1990

**Catalasa (EC 1.11.1.6)**

Es una enzima hemínica que cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un mecanismo similar al de SOD, una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducida a agua, mientras que la otra es oxidada a O<sub>2</sub> según la reacción:



Esta reacción se encuentra favorecida en condiciones de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevadas (Chance y col., 1979). Sin embargo, la catalasa también es capaz de llevar a cabo ciertas reacciones peroxidásicas en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (AH<sub>2</sub>) (Butt, 1980; 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). 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). Siendo descritas diferentes isoformas para esta actividad (Eising y col., 1990; Havir y col., 1996; Corpas y col., 1999)

La mayoría de las células aerobias contienen actividad catalasa (Chance y col., 1979), y son pocas las que no la presentan, 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 la contienen, aunque algunos como *Propionibacterium shermanii* sí la presentan (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La actividad catalasa se encuentra localizada casi de forma exclusiva en peroxisomas/glioxisomas, llegándose a usar como marcador de estos orgánulos (Huang y col., 1983). Es una enzima por tanto, implicada en procesos metabólicos en los que se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma importante, como son la β-oxidación de ácidos grasos y ciclo del glioxilato con las enzimas implicadas glicolato oxidasa, urato oxidasa y flavoprotein deshidrogenasas, productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang y col., 1983). Son



numerosos los estudios que evidencian a la catalasa como una enzima esencial en el mecanismo de defensa frente a estreses medioambientales (Willekens y col., 1997).

### Enzimas del ciclo ascorbato-glutation

También denominado ciclo de Foyer-Halliwell-Asada, es un mecanismo eficiente en las células vegetales para la eliminación de  $H_2O_2$ , especialmente en aquellos compartimentos donde se produzca y no exista catalasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). Es un ciclo en el que participan cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) que resulta en la eliminación de  $H_2O_2$  a partir de ascorbato (Asc) y que implica la utilización de glutatión reducido (GSH) y de poder reductor (NADPH) (Foyer y Halliwell, 1976; Asada, 1984) (Fig. 1.7).

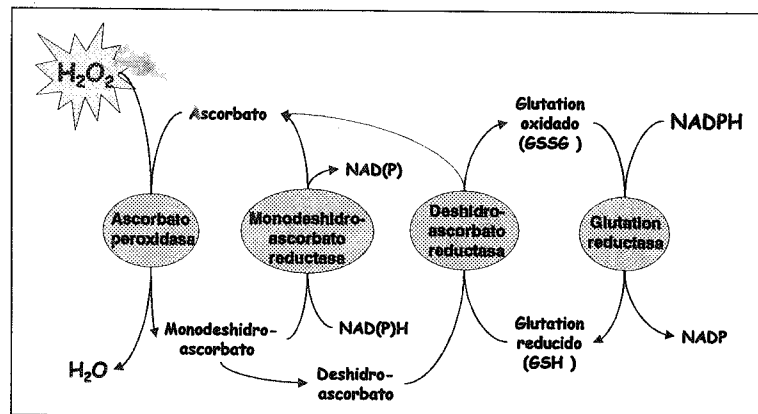


Fig. 1.7 Ciclo ascorbato-glutation

Este ciclo se ha localizado en cloroplastos, citosol y mitocondrias de nódulos de raíz (Foyer y col., 1997; Jiménez y col., 1997), así como en peroxisomas de hojas de guisante (Jiménez y col., 1997). Existe un alto grado de complejidad en términos de compartimentación a nivel subcelular de los componentes de este ciclo, tamaño de sus familias de genes y regulación de la expresión de los mismos. Esta complejidad, asociada al papel del glutatión en procesos de señalización en respuesta a distintos tipos de estrés sugiere que el ciclo ascorbato-glutation es sólo una parte de la función dentro de la célula para las enzimas que lo forman (Mullineaux y Creissen, 1998).

### 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 de peróxido de hidrógeno 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 citosol, mitocondrias y peroxisomas (Chen y Asada, 1989; Miyake y Asada, 1992; Foyer y col., 1997; Jiménez y col., 1997; López-Huertas y col., 1998). 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 para la APX citosólica en guisante y *Arabidopsis*, sin embargo un barrido sobre la base de datos de *Arabidopsis*, se resolvió en 4 clases de APXs (que incluyen a 62 cDNAs con homología al centro activo de APX): APX1, APX3 y los que codifican para 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) (Mullineaux y Creissen, 1998).

### Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR; EC 1.6.5.4)

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

Se han clonado los cDNAs de la MDHAR en tres especies vegetales diferentes, pepino, tomate y guisante, que codifican para un péptido similar de unos 47 kDa que se supone es la forma citosólica de la MDHAR para la que parece existir una sólo copia del gen. Sin embargo, la detección de otras isoformas en otras especies y en compartimentos subcelulares diferentes sugiere la existencia de otros genes (Mullineaux y Creissen, 1998).

### 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, 1984; Villalba y col., 1995). Es una enzima poco caracterizada debido a su baja estabilidad (Foyer y Halliwell, 1977; Trumper y 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, se ha purificado casi a homogeneidad en hojas de espinaca (Foyer y Halliwell, 1977; Hossain y Asada, 1984) y se sabe que es un monómero de unos 23 kDa. También se ha purificado parcialmente en tallos de guisante (Jablonski, 1981), en tubérculos de patata (Dipierro y Borranccino, 1997), y en una monocotiledónea como es 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 dimerica con FAD en el centro activo de cada subunidad. Parece ser que el NADPH reduce el FAD, que pasa 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). Se encontró en plantas por primera vez hace unos 50 años y desde entonces se ha identificado en numerosas especies vegetales y tejidos (Rennenberg, 1982) siendo purificada en un gran número de plantas superiores (Mullineaux y col., 1994). Es una enzima importante en la protección de la planta frente a diferentes estreses como herbicidas, contaminantes, bajas temperaturas, alta intensidad lumínica y estrés hídrico (Rennenberg, 1982; Smith y col., 1989; Foyer y col., 1991; Osswald y col., 1992; Mullineaux y col., 1994; Navari-Izzo e Izzo, 1994).

Se clonó por primera vez a partir de hojas de guisante en 1992 por Creissen y col. El ADNc codificaba para 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 raíz de soja y hojas de tabaco, presuntamente plastídicas también (Aono y col., 1995; Mullineaux y Creissen, ¿?). Por otro lado, se ha clonado un gen que codifica para la GR sin péptido señal y que todo hace indicar que puede ser citosólica (GOR2). Sin embargo, estos genes no explican la cantidad de isoformas encontradas en determinadas especies vegetales, y parece lógico pensar que debería existir una familia multigénica igual que para APX, y que quizás se expresan sólo en condiciones definidas de estrés (Mullineaux y Creissen, 1998)

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 pertenecientes 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 primera se ha localizado en citosol, cloroplastos y peroxisomas (Herbert y col., 1979; Schnarrenberger y col., 1973; Corpas y col., 1998). 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<sup>+</sup> a la primera enzima, proporcionado por la misma GR, que al actuar oxida el NADPH y disminuye la relación NADPH/NADP<sup>+</sup> (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 que es la NADP<sup>+</sup>-ferredoxina reductasa del fotosistema I.

#### Otras peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7, donador H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreductasas) constituyen un grupo de enzimas cuya función primaria es oxidar sustratos a expensas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontrándose en plantas, mamíferos, hongos y organismos procariontes (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 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 glutatión peroxidasa (GPX) (Lauchli, 1993; Stadman, 1990). La GPX es una seleno-proteína no hemínica que cataliza la siguiente reacción (Flohé y Günzler, 1985):



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)

#### Glutation-S-transferasas (GST; EC 2.5.1.18)

Catalizan la reacción de compuestos de bajo peso molecular como tiol y glutatión con una gran variedad de sustratos tanto hidrofóbicos, como electrofílicos y normalmente, citotóxicos, formando tioésteres denominados conjugados-S (Marrs, 1996). Las GSTs se identificaron por primera vez por su capacidad de desintoxicar 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 ante estrés, incluyendo el producido por ataque de patógenos, estrés oxidativo, y toxicidad por metales pesados. Además, en plantas 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, dependiendo de la especificidad de su sustrato y otras características. Al menos, seis familias de genes codifican para las GST lo que da una idea de su alta complejidad (Halliwell y Gutteridge, 2000).

### Tiorredoxinas

Son polipéptidos de pequeña masa molecular (alrededor de 12 kDa), encontrados tanto en procariotas como en eucariotas. Contienen dos grupos -SH adyacentes, en su 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 tiorredoxin reductasa, enzima que contiene un FAD y utiliza NADPH en su reacción, mostrando similitud con la glutatión reductasa.

Las tiorredoxinas juegan un papel clave en el metabolismo de plantas y de animales, ya que intervienen en numerosos procesos: se sabe que puede reaccionar directamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aunque su función metabólica se desconoce), regulan actividades de las enzimas del ciclo de Calvin en el cloroplasto (fosforibulosa quinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa), regulan enzimas implicadas en la glucólisis (glucosa-6-fosfo deshidrogenasa), en la síntesis de ATP (factor de acoplamiento CF1), en la asimilación del carbono de plantas C<sub>3</sub> (NADP-malato deshidrogenasa), participa en la exportación de equivalentes de reducción al citosol en plantas C<sub>3</sub> e intervienen en la reparación de daños a residuos de metionina en proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2000).

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

## 1.2. METABOLISMO DE PEROXISOMAS

Fue Rhodin en 1954 quien por primera vez describió los peroxisomas estudiando los túbulos renales de ratón a microscopía electrónica, denominándolos entonces como "microcuerpos". Dos años después, Rouiller y Benhard identificaron unos orgánulos de similar morfología pero con una estructura cristalina en su matriz. Pero no fue hasta principios de los años 60 cuando se llevó a cabo una caracterización bioquímica de los peroxisomas y su reconocimiento como orgánulos celulares distintos,

gracias a unos trabajos de de Duve y col. en tejidos de mamíferos, en los que separaron los orgánulos mediante técnicas de centrifugación diferencial y gradientes de densidad. Por su alto contenido en  $H_2O_2$ , de Duve (1965) los "bautizó" con el nombre de peroxisomas, que los define fisiológicamente. Además, se demostró la presencia de diferentes actividades enzimáticas: urato oxidasa, catalasa,  $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa y D-aminoácido oxidasa. Fue en 1967 cuando se definen estos orgánulos por primera vez en tejidos vegetales, cuando Breidenbach y Beevers aislaron mediante gradientes de densidad de sacarosa, unos orgánulos de gran densidad que contenían las enzimas del ciclo del ácido glioxílico y catalasa, similares al microscopio electrónico a los "microcuerpos", denominándolos en este caso, glioxisomas. Actualmente, estos orgánulos se han encontrado en la gran mayoría de células eucariotas (Kindl y Lazarow, 1982).

Los peroxisomas poseen un diámetro entre 0,1 y 1,7  $\mu m$  y están constituidos por una membrana simple que rodea una matriz granular o fibrilar que en ocasiones presentan inclusiones amorfas o cuerpos cristalinos (Tolbert y Essner 1981; 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 (Olsen y Harada, 1995). Desde un punto de vista fisiológico y bioquímico, se pueden definir como orgánulos subcelulares ubicuos con catalasa y flavín oxidasas productoras de  $H_2O_2$  como constituyentes enzimáticos básicos (del Río y col., 1998). Los peroxisomas presentan una gran versatilidad y en los últimos años se ha ido demostrando su implicación en un amplio número de procesos metabólicos celulares tanto en animales (van den Bosch y col., 1992; Fahimi y Baumgart, 1999) como en vegetales (Tolbert y Essner, 1981; Huang y col., 1983; del Río y col., 1998).

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): Glioxisomas, presentes en semillas oleaginosas y en los que se encuentran las enzimas necesarias para llevar a cabo la  $\beta$ -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, 1981; Tolbert y Essner, 1981; Beevers, 1982). Peroxisomas de hojas, presentes en los tejidos fotosintéticos, llevando a cabo las reacciones más importantes de la fotorrespiración (Tolbert, 1981). Estos peroxisomas se hallan en estrecho contacto con mitocondrias y cloroplastos con los que coopera para

realizar la fotorrespiración (Huang y col., 1983). Peroxisomas de nódulos de raíz, presentes en los nódulos de ciertas leguminosas, están implicados en la síntesis de alantoína (Schubert, 1986). 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, 1981; Huang y col., 1983).

### 1.2.1. Funciones Metabólicas Principales

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:

#### 1.2.1.1 $\beta$ -Oxidación de Ácidos Grasos

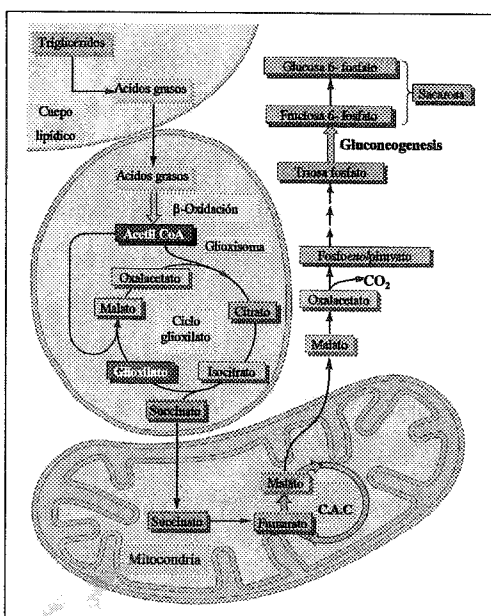


Fig. 1.8 Esquema del ciclo del glioxilato y  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Buchanan y col., 2000

Esta ruta 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, y el producto final de la  $\beta$ -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. 1.8). 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 (Reumann,



2000; Buchanan y col., 2000). En peroxisomas de hojas y 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).

#### 1.2.1.2. Ciclo del Glioxilato

En plantas, este ciclo es exclusivo de tejidos de reserva (Hang y col., 1983) y se encuentra en estrecha relación con la  $\beta$ -oxidación, actuando ambos para suministrar glúcidos a la plántula durante su desarrollo. En la figura 1.8 se muestra un esquema del proceso.

#### 1.2.1.3. 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  $\text{CO}_2$  por ciclo. Este proceso está compartimentado en cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Fig. 1.9), y su velocidad viene determinada por la intensidad luminosa, la temperatura y la relación  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (Tolbert, 1980; Huang y col., 1983; Buchanan y col., 2000).

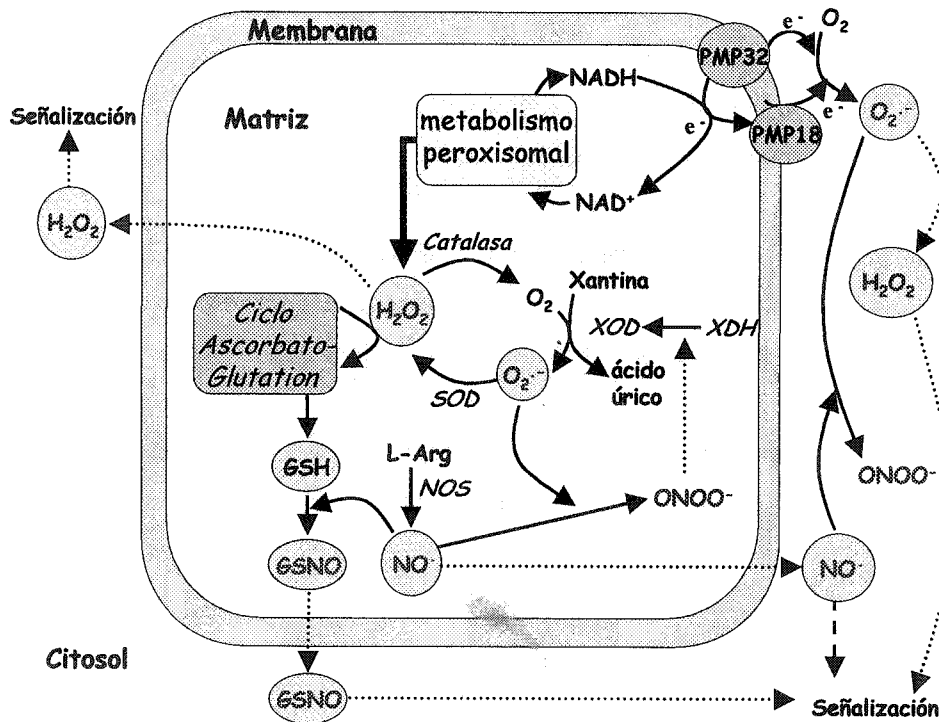
El papel fisiológico de la fotorrespiración se desconoce, aunque este ciclo refleja la evolución de la RUBISCO desde su origen en un ambiente anaerobio (Buchanan y col., 2000). Se ha propuesto que es un mecanismo de defensa de plantas  $\text{C}_3$  frente a los daños fotooxidativos que podrían producirse por una producción excesiva de radicales libres de oxígeno, manteniendo en el cloroplasto siempre niveles mínimos de  $\text{CO}_2$ , ya que al disminuir su disponibilidad también disminuye la del NADP para aceptar electrones del fotosistema I, iniciándose de esta manera la reducción del oxígeno con la generación concomitante de especies de oxígeno reactivas (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).



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 peroxisomas de nódulos de 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 a nivel de hoja (Corpas, 1992). Así mismo, la presencia de xantina, ácido úrico y alantoína, productos de la reacción de la urato oxidasa, detectados en peroxisomas de hojas de guisante (Corpas y col., 1997) implica un papel en el catabolismo de xantina producida como resultado de la renovación de nucleótidos, ARN y ADN (del Río y col., 1998).

### 1.2.2. Especies de Oxígeno y Nitrógeno Reactivas 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 han ido determinando la producción de especies de oxígeno reactivas y las enzimas antioxidantes presentes en los mismos, encargadas de eliminar o regular la presencia de estas moléculas. Ya se ha visto que a partir del metabolismo peroxisomal se genera  $H_2O_2$  que se encargan de retirar la actividad catalasa (Huang y col., 1983; del Río y col., 1992) y las enzimas del ciclo ascorbato-glutation presentes en peroxisomas de hojas de guisante (Jiménez y col., 1997), así como los metabolitos implicados en el mismo, ascorbato y glutatión (tanto en su forma oxidada como reducida) (Fig. 1.10). Así mismo, 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), además de la actividad isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Corpas y col., 1998), anteriormente encontrada por Tolbert en peroxisomas de hojas de espinaca (1981) y por Donalson en glioxisomas de ricino (1982) (Fig. 1.10).



Corpas et al. TIPS 6: 145-150 (2001)

Fig. 1.10 Esquema de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivas y sistemas antioxidantes en peroxisomas de hojas de guisante.

Por otro lado, se ha demostrado la formación de 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., 1988; 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, 1999; del Río y col. 1998) (Fig. 1.10). Esta 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., 2002). La encargada de dismutar los radicales superóxido es la actividad SOD también encontrada en peroxisomas (Fig. 1.10), la presencia de esta actividad en los orgánulos fue demostrada por primera vez en tejidos vegetales (del Río y col., 1983;

Sandalio y col., 1987; Corpas y col., 1998), desde entonces, la presencia de SODs en peroxisomas aislados se ha demostrado al menos, en ocho especies diferentes de plantas y se ha extendido a células animales y humanos (del Río y col., 2001). Recientemente, se ha mostrado la existencia de actividad oxido nítrico sintasa (NOS) (Corpas y col., 2001) en peroxisomas de hojas de guisante, lo que implicaría también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) en el metabolismo peroxisomal (Fig. 1.10).

La presencia de actividad endo- y exo-proteolítica en peroxisomas vegetales se demostró por primera vez en hojas de guisante (Corpas y col., 1993b), encontrando una Leucina-aminopeptidasa (Leu-AP) en la fracción soluble del peroxisoma, caracterizada como una serín-proteasa con un peso molecular de 56,8 kDa y un *pI* de 5,3. A ésta habría que añadir otra Leu-AP encontrada en el mismo tejido (McCarthy y col., 2001). También se ha encontrado en peroxisomas de hojas de guisante la presencia de actividad endoproteasa que se ve incrementada en procesos de senescencia (Distefano y col., 1997). Se han llegado a diferenciar hasta 7 endoproteasas mediante análisis con geles de poliacrilamida con SDS en hojas senescentes (Distefano y col., 1997) todas ellas, neutras y las serín-proteasas representan el 70% de la actividad EP total. La actividad proteolítica en peroxisomas puede estar relacionada con la degradación de proteínas existente durante el cambio de glioxisoma a peroxisoma y viceversa, así como en proteólisis parciales del extremo N-amino terminal de determinadas proteínas con el péptido señal hacia el peroxisoma, y muy posiblemente, en la conversión de XDH en XOD que se realiza de forma irreversible (Palma y col., 2002).

### 1.2.3. Transición Metabólica Glioxisoma-Peroxisoma

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).

### 1.3. PROBLEMÁTICA DEL CADMIO

El cadmio (Cd) fue descubierto en 1817 por el químico y farmacéutico Friedrich Strohmeyer formando parte de la smithsonita ( $\text{ZnCO}_3$ ) (Andersson and Petterson, 1981). Es un elemento de color blanco plateado, brillante y de elevada densidad ( $8,65 \text{ g cm}^{-3}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) lo que hace que se incluya dentro del grupo de los metales pesados (Cabot y col., 1988). 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 capas. Es bastante electronegativo lo que le da un carácter reductor. Algunos complejos del  $\text{Cd}^{2+}$  presentan propiedades parecidas a los correspondientes cationes de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (este último por su parecido radio iónico). 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., 1988; Wagner, 1993). Es por ello que el Cd es 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 introduce en 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 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  $0,098 \text{ } \mu\text{g/g}$ , mientras que en la corteza oceánica se estima en  $0,13 \text{ } \mu\text{g/g}$  (Cabot y col., 1988), en la zona costera de California se encuentra una de las más altas concentraciones de Cd de forma natural, formada por rocas sedimentarias con  $60\text{-}340 \text{ mg kg}^{-1}$  (Alloway, 1995).

#### 1.3.1. 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.

### 1.3.1.1. Emisiones Atmosféricas

Son las transportadas por el aire y que 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 se ha observado un aumento de las deposiciones de Cd desde la atmósfera al suelo en las últimas décadas (Johnston and 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 ser de relativo gran tamaño 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 se obtiene generalmente, como subproducto del Zn o como metal acompañante del Pb, del Cu y de otros metales (McLaughlin and Singh, 1999). El Zn y el Cd son elementos antagónicos lo que va a influir en el comportamiento fisiológico de los cultivos y toxicológico de los propios elementos. Algunas de las mayores concentraciones de Cd que se ha encontrado en el aire han sido alrededor de fundiciones de metales (OECD, 1994) en Bélgica y Alemania ( $60 \text{ ng m}^{-3}$  y  $29 \text{ ng m}^{-3}$ , respectivamente). Se ha estimado que sólo Europa es responsable de la emisión de 1658 T de cadmio a la atmósfera, en 1979 (Pacyna, 1987).

El cadmio es usado en procesos industriales como son: protección del hierro frente a la corrosión, acero y otros metales, 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 de residuos sólidos municipales también aumenta de modo significativo el contenido de este metal en la atmósfera (McLaughlin and Singh, 1999).

### 1.3.1.2. 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 introduzca en 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 contribuyente a los depósitos directos son los **fangos residuales** que resultan del tratamiento de aguas residuales antes de su introducción en ríos o mares. Éste suele sufrir tratamiento para su posterior utilización en tierra o para su eliminación por incineración o depositándolo en el 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 3410 mg kg<sup>-1</sup>. Dado su alto contenido en N y P, aparte de 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 and Steinnes, 1999).

#### 1.3.1.3. 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).

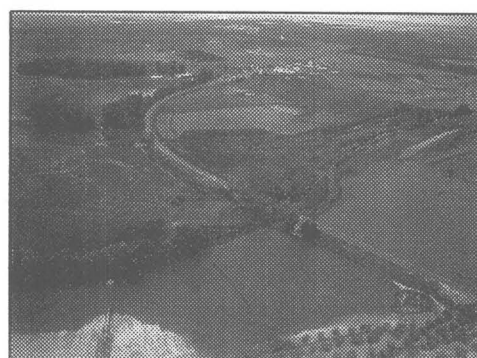


Fig. 1.11 Vertido de Aznalcóllar en 1998.

Como consecuencia de ello resultaron degradados todos los hábitats que conformaban el cauce y sus riberas. Las pérdidas agrícolas se situaron 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). 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.

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 ocurrido en Rumanía, el vertido de Baia Mare, que a través del afluente Tisza, llevó unos cien mil  $\text{m}^3$  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.

### 1.3.2. Paso del Cadmio a la Cadena Trófica

Las plantas tienden a tomar y translocar el cadmio del suelo pasando a la cadena trófica (Aery y Tiagi, 1988), al contrario que ocurre con el plomo, por ejemplo (Chumbley y Unwin, 1982). En los estudios llevados a cabo hasta ahora, en general, la ingesta de cadmio en la dieta es menor a 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, exposición y 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 Haung, 1999). Por tanto, hay que tener en cuenta tanto factores no bióticos: pH (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), contenido de arcillas del suelo, presencia de carbonatos y óxidos de hierro y manganeso, potencial redox, tipo y contenido de materia orgánica y ligandos, contenido de agua y finalmente, las prácticas de manejo del suelo (Alloway y col., 1990); como factores bióticos: especie de planta de la que se trate (en cultivos hortícolas son las plantas de hoja ancha las que tienden a acumular más cadmio, Alloway y col., 1990; Rahlenbeck y col., 1999), actividad de la raíz: 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 protéicos, absorción de macro y micronutrientes (Salt y col. 1995; Gries y Wagner, 1998; Cabot y col., 1988b; Shu-I Tu y col., 1998) y microorganismos asociados, que influyen en la entrada de cadmio a las plantas.

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 en modo bifásico (Fujimoto and Uchida, 1979; Salt and 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 para hierro (Cohen y col., 1998). También se ha observado que cuando se expresa la proteína *IRT1*, transportadora de hierro en *A. thaliana*, en levaduras, 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 para 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), y 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 and 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 and Silver, 1989).

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 se ha visto que libera la raíz en caso de deficiencia en hierro (Welch, 1995) e introducirse por regiones de la membrana plasmática de las células de la raíz específicas para estos compuestos, sin embargo, esta idea no está corroborada (Shenker y Crowley, 1997).

### 1.3.3. Toxicidad del Cadmio en Plantas

#### 1.3.3.1. Alteraciones Estructurales y Ultraestructurales

Ya hemos visto que la entrada del cadmio se produce fundamentalmente por la raíz, pero parte de este metal se va a translocar por lo general, 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; Cagno y col., 1999; Dixit y col., 2001). En monocotiledóneas como *Allium sativum* en la que 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., 2000). Aunque existen excepciones como son dos plantas acuáticas estudiadas por Saygideger en las que la acumulación en hojas es mayor que la de tallos (Saygideger y col., 2000).

Los cambios a nivel de tejido y célula son resultado de la interacción bien directa o indirecta del metal con componentes estructurales. La principal entrada del metal se produce a través de la raíz, es por tanto de esperar que los primeros efectos del mismo sea 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, daños estructurales generalizados en la misma. Así, se produce una reducción en la multiplicación celular, una disminución del número de cloroplastos y un ensachamiento 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 un aumento de plastoglobuli, lo que indica una liberación de lípidos desde la membrana tilacoidal y desorganización de la estructura interna (Barceló y col. 1988; Ouzounidou y col., 1997; Baryla y col., 2001). Desde un punto de vista estructural, los cloroplastos parecen ser el

orgánulo diana de la toxicidad del cadmio aunque también se han observado cambios en otros orgánulos como mitocondrias y retículo endoplasmático en cultivos celulares (Neumann y col., 1994)

### 1.3.3.2. 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 1.3 el efecto varía según las condiciones experimentales (concentración de cadmio, periodo de tratamiento, etc.), del tipo de tejido y del nutriente considerado, además de la susceptibilidad de la especie estudiada.

Tabla 1.3 Algunos ejemplos de desequilibrios nutricionales causados por el cadmio

Nutriente	Efecto del Cd	Especie	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 cél. 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 raíz y tallos	<i>Azolla filiculoides</i>	Sela y col., 1988
	Disminuye en tallo 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

En términos generales, la concentración de macronutrientes disminuye en presencia de cadmio, tanto en raíces como en parte aérea (Greger y Lindberg, 1987; Welch y col., 1993; Gussarson y col., 1996). Algo similar ocurre con el contenido de micronutrientes, como se resume en la Tabla 1.3. 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<sup>+</sup>-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).

#### 1.3.3.3. Desajustes en la Fotosíntesis

La actividad fotosintética siempre se ve, en general, afectada por el Cd, aunque los efectos del metal dependen del tiempo de acción, concentración del mismo y especie 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 sobre 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, ribulosa-1,5-bifosfato, ácido fosfoglicérico y fosfato de dihidroxiacetato, así como de ATP, quizás por un menor consumo de éstos, así como una inhibición de la actividad RUBISCO (Siedlecka y col., 1997). Además, se ha observado que el cadmio provoca inhibición de otras enzimas, como son la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, la NADP-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, la fructosa-1,6-bifosfatasa y la NADP-malato deshidrogenasa (Chugh 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; Chugh 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 CO<sub>2</sub> 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 el efecto sobre la biosíntesis y daños causados en los pigmentos necesarios para llevar a cabo la fotosíntesis. 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., 1995), pero de modo más generalizado, se observa esta pérdida en toda la planta, así como en la

relación clorofila *a/b* (Sheoran y col., 1990; Gallego y col., 1996; Chug y col., 1997; 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 y col., 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 (Kupper y col., 1996).

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

#### 1.3.3.4. 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 sulfidril de las mismas, entre ellas: 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<sup>+</sup>-ATPasa (Fodor y col., 1995; Gries y Wagner, 1998).

#### 1.3.3.5. 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 total, tanto en hojas como en raíces. Así, disminuye el contenido de glicolípidos y el contenido de fosfolípidos y lípidos neutros, esto último puede 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 la arquitectura de las membranas tilacoidales (Jemal y col., 2000). Además, se ha encontrado un aumento en la actividad lipooxigenasa, cuyos productos son radicales, que pueden ocasionar daños en los lípidos de la

membrana. En general, en hojas se reduce el grado de insaturación, lo que sugiere una alteración en la desaturación de ácidos grasos acelerando así la peroxidación lipídica. En raíces parece existir una mayor estabilidad en las membranas en este sentido (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 a membranas y a la ultraestructura causada por el cadmio. 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).

#### 1.3.3.6. Relaciones Hídricas y Función Estomática

El daño provocado por el metal sobre la función de las membranas, sobre el equilibrio iónico y sobre las actividades enzimáticas, van a provocar 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 observa como consecuencia de la toxicidad del metal es la inhibición de la expansión celular (Barceló y col., 1988; Poschenrieder y col., 1989; Saygideger, 2000), así como una disminución en 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 este aspecto. Sin embargo, este puede no ser el único motivo para que disminuya la entrada de agua, sino también 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 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; Saygieder, 2000), así como por la obstrucción de los mismos debido a la presencia de complejos de cadmio (Salt y col., 1995) 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 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)

#### 1.3.3.7. Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno

Parece ser que el grado de daño celular en plantas crecidas con concentraciones tóxicas de cadmio, está relacionado con la formación de especies de oxígeno reactivas y con la eficiencia y capacidad antioxidante, así como de los mecanismos reparadores de la planta. Se ha descrito que los metales pesados estimulan la producción de radicales libres y especies de oxígeno reactivas (ROS; Foyer y col., 1997), bien de forma directa interfiriendo en la transferencia de electrones, bien de forma indirecta al inhibir determinadas reacciones metabólicas (Halliwell and Gutteridge, 1984). Así, se ha observado un incremento de la peroxidación lipídica en dos clones de *Holcus-lanatus* uno sensible y otro tolerante a cadmio (Hendry y col., 1992), así como en hojas de girasol, en hojas de judía y en hojas de guisante (Gallego y col., 1996; Chaoui y col., 1997 y Dixit y col., 2001, respectivamente). 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 hay que tener en cuenta además, 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 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 ven activadas (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.

#### 1.3.4. Translocación, Almacenaje y Tolerancia al Cadmio

Son varios los mecanismos que se han propuesto para la desintoxicación de los iones de metales pesados, potencialmente tóxicos, en plantas. Debido a sus efectos negativos para la planta, su concentración intracelular debe mantenerse a bajos niveles, 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 que tiene lugar 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). 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 Umehayashi, 1993; Rauser y Neuwly, 1995; Vögeli-Lange y Wagner, 1996). En la Fig. 1.13 se muestra un modelo en el que se proponen varios mecanismos de control de entrada, salida y acumulación de Cd (modificado de Wagner, 1993; Rauser, 1995; Zenk, 1996; Cobbett 2000).

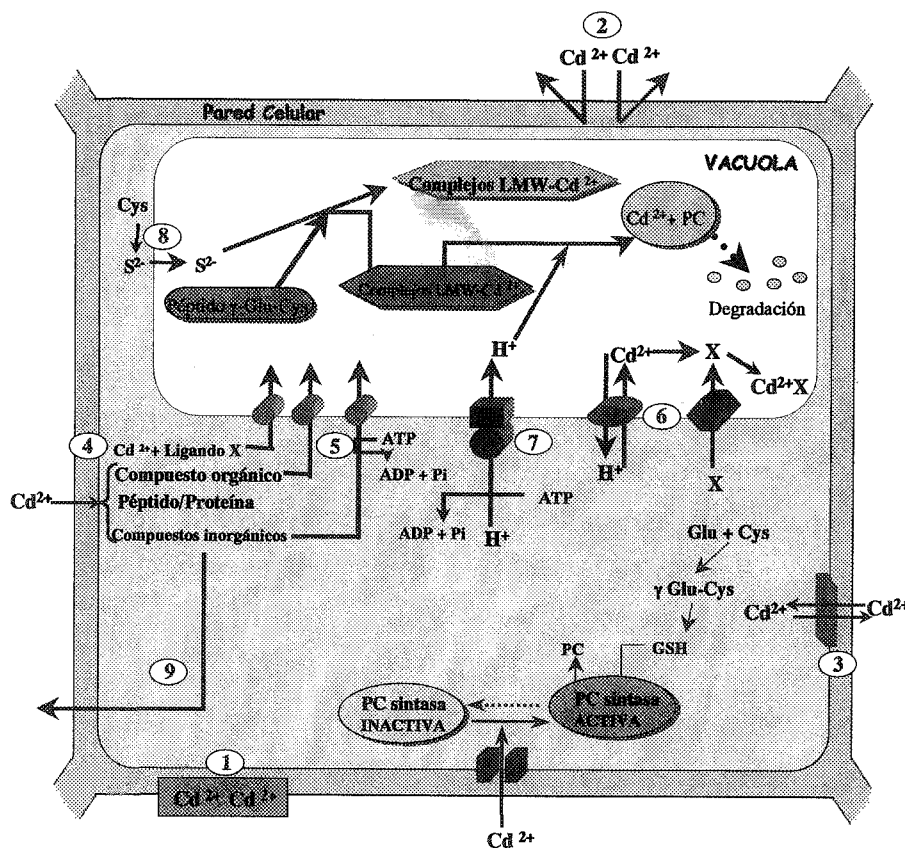


Fig. 1.12 Modelo que describe los mecanismos de entrada, exclusión y acumulación de cadmio en células vegetales. 1. Unión a fitoquelatinas (PCs); 2. limitación del flujo de cadmio a través de la membrana plasmática; 3. salida activa de cadmio presente en bacterias; 4. acumulación y secuestro de cadmio con diferentes complejos; 5. entrada activa a la vacuola tipo cassette, unido a ATP; 6. antiporte  $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ ; 7. ATPasa vacuolar generando un gradiente de protones; 8. mecanismo hipotético de entrada con  $\text{S}^{2-}$  a través del plasmalema; 9. Transporte de los complejos-Cd fuera de la célula.

Las PCs son moléculas ricas en cisteína que poseen grupos tiol 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 GSH con el que están relacionadas estructuralmente (Rauser, 1995; Cobbett, 2000). En raíces de *Brassica juncea* expuestas a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  de cadmio se ha observado un incremento en la expresión de  $\gamma$ -glutamilcisteína 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. La sobreexpresión de una  $\gamma$ -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 su origen está en la participación en procesos de homeostasis de metales en la planta y se han encontrado tanto en mono- como en dicotiledóneas, así como en algas pardas, verdes y rojas (Rauser, 1995). También se han descrito en levaduras, como *Candida glabrata*, en la que coexisten con metalotioneínas (Zenk, 1996). Son numerosos los trabajos en los que se relacionan de forma positiva la inducción de PCs y compuestos tiólicos en presencia de cadmio (Leita y col., 1992; Obata y Umebayashi, 1993; Rauser y Neuwly, 1995; Vögeli-Lange y Wagner, 1996), aunque existen otros metales capaces de inducirlos, como Cu y 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, 1990).

Mediante técnicas de microanálisis de rayos-X se han observado gránulos de acúmulos de cadmio densos a los electrones en el citoplasma, vacuola y núcleo en 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, 1990). 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 suecica*, capaz de acumular grandes cantidades de cadmio, se ha descrito que el metal se acumula en vesículas osmiofílicas que además contiene concentraciones elevadas de N y S (Nassiri y col., 1997). La localización subcelular del cadmio resulta difícil en aquellos casos 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 para desintoxicar utilizado por algunas plantas es la acumulación del metal en los tricomas de la superficie foliar, como ocurre en *Brassica juncea* (Salt y col., 1995), 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 (Küper y col., 2000), además de localizarse en la vacuola de las células del mesófilo. 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 (Choi y col., 2001). En plantas de lirio de agua se ha descrito 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 peciolo 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 de su crecimiento (supervivencia de semillas, biomasa, crecimiento de raíces y tallos, crecimiento del tubo polínico, ect.; 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 almacenaje 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 plantas que acumulaban más de 1 mg Ni por g de peso fresco en sus tallos, pertenecientes 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 cotolerancia, sin embargo, sí hay descritos casos como los de *Thlaspi caerulescens* y *Arabidopsis halleri* que son hiperacumuladores de Cd y Zn (Vázquez y col., 1992; Küper y col., 2000, respectivamente) o *Chloris barbata* que presenta cotolerancia al mercurio, cadmio y zinc (Patra y col., 1994).

### 1.3.5. Recuperación de Suelos y Agua 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 hemos visto, la contaminación de suelos y agua 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, 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., 1995).

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

- a) **fitoextracción** en el que la planta acumuladora se usa para transportar y concentrar metales desde el suelo hacia las partes de la misma que se puedan cosechar (raíces o tallos, fundamentalmente). En este caso, la planta ideal debe tolerar y acumular grandes cantidades del metal, debe presentar un crecimiento rápido y la capacidad de producir una biomasa grande en el campo.
- b) **rizofiltración** en el 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 muestran baja eficiencia en la translocación hacia los tallos.
- c) **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 para 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., 1995).

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 desde un punto de vista biológico, 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 hasta el 60% de su peso seco como metales pesados, 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., 1995).

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, ect.) para aumentar la disponibilidad de los metales para la planta. En definitiva, una mejor comprensión de los procesos bioquímicos relacionados con la entrada, transporte y acumulación, así como de la resistencia dará lugar a mejoras en la recuperación de suelo y agua contaminados mediante el uso de plantas, usando modernas aproximaciones genéticas (Mejáre y Bülow, 2001). Estas técnicas están pensadas para concentrar metales en los tejidos vegetales minimizando la cantidad de elementos peligrosos en suelos y agua, que habrán de ser depositados en lugares de residuos peligrosos y con la idea futura de eliminar estos metales del tejido vegetal (Salt y col., 1995; Meagher, 2000). Esta mejora en la capacidad para adquirir minerales y almacenarlos puede ser utilizado también en agricultura y mejora de la salud humana a través de una nutrición mineral equilibrada (Guerinot y Salt, 2001).



***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

La bioquímica del oxígeno activado en células vegetales en situaciones 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. En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio hemos demostrado que en condiciones de estrés nutricional por altas concentraciones de  $\text{ClNa}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ , tiene lugar la generación de un estrés oxidativo caracterizado por un aumento de especies reactivas de oxígeno y daños oxidativos a macromoléculas en distintos orgánulos celulares. En estas situaciones los sistemas antioxidantes encargados de la protección frente a estas formas reactivas del oxígeno podrían a su vez desempeñar un papel importante en los mecanismos de protección frente a iones y metales nocivos. Paralelamente, hemos caracterizado diferentes sistemas generadores de radicales superóxido en peroxisomas, así como la distribución subcelular de los sistemas antioxidantes más relevantes. Como fruto de ello, actualmente se sabe que los peroxisomas desempeñan un papel muy importante en el metabolismo de especies de oxígeno reactivas y disponen de una amplia batería de antioxidantes, entre ellos, SOD, los componentes del ciclo ascorbato-glutation, las enzimas de las pentosas fosfato y la isocitrato deshidrogenasa. Recientemente, se ha demostrado que los peroxisomas contienen actividad óxido nítrico sintasa, lo que confiere a estos orgánulos un importante papel como emisores de señales celulares implicadas en multitud de procesos metabólicos.

En los últimos años se habían acumulado evidencias de que la toxicidad del Cd podría deberse en parte a la generación de estrés oxidativo, sin embargo, los trabajos existentes se reducían a medidas de indicadores de daños oxidativos o cambios en los niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los aspectos más estudiados de la toxicidad del Cd han sido aquellos relacionados con alteraciones nutricionales y fisiológicas, mecanismos de transporte del metal y producción de fitoquelatinas como mecanismo protector. Sin embargo, son escasos los estudios bioquímicos y moleculares relacionados con el metabolismo de especies de oxígeno reactivo.

Dado que el Cd puede llegar a ser un contaminante muy peligroso por los motivos mencionados en la Introducción, y dada la escasez de estudios en los campos bioquímico y molecular, y su utilidad potencial en el desarrollo de estrategias de fitoremediación, en este trabajo hemos decidido abordar el estudio de los mecanismos implicados en la toxicidad del Cd relacionados con el metabolismo del oxígeno activado y la respuesta de la planta frente a estas situaciones de estrés. Para ello, se ha abordado el estudio desde distintas campos o disciplinas, incluyendo estudios fisiológicos, bioquímicos, celulares y moleculares con objeto de integrar el mayor número de



información posible que nos permita conocer la respuesta de la planta a distintos niveles de organización. Con tal motivo se han establecido los siguientes objetivos:

1. Estudio del efecto de distintas concentraciones de Cd sobre el crecimiento y estado fisiológico de la planta con objeto de determinar las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo estudios en mayor profundidad.
2. Estudio del efecto del Cd sobre sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, así como marcadores de daños oxidativos a macromoléculas. Se identificarán algunas de las proteínas susceptibles de oxidación en situaciones de estrés por Cd.
3. Para profundizar en los mecanismos de toxicidad del Cd, se llevarán a cabo estudios a nivel subcelular en peroxisomas purificados. En los orgánulos purificados se determinarán los cambios bioquímicos y metabólicos que tienen lugar en respuesta al Cd, incluyendo enzimas marcadoras de distintas rutas metabólicas, sistemas de defensa frente a estrés oxidativo, identificación de proteínas oxidadas y procesos de degradación proteolítica dependientes del Cd.
4. Análisis de la estructura y ultraestructura de la hoja mediante microscopía óptica y electrónica. Se estudiará la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  y NO a nivel subcelular en respuesta al estrés por Cd mediante técnicas citoquímicas y observación al microscopio electrónico y confocal con objeto de conocer 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 Cd.
5. Finalmente se analizarán los cambios inducidos por Cd en la expresión de los sistemas antioxidantes enzimáticos de defensa frente especies reactivas de oxígeno. Con ello se pretende conocer como se modula la respuesta celular frente al estrés por Cd y sus posibles implicaciones en la confección de estrategias de fitoremediación.



***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% 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  $\text{CaSO}_4$  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  $30 \text{ mg ion l}^{-1}$ , siguiendo la técnica propuesta por Steiner (1961). Las concentraciones de nutrientes utilizadas fueron: macronutrientes, expresados en mM:  $\text{NO}_3^-$ , 12;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 4,0;  $\text{SO}_4^{2-}$ , 1,5;  $\text{K}^+$ , 5,0;  $\text{Ca}^{2+}$ , 4,5;  $\text{Mg}^{2+}$ , 1,5; y los siguientes micronutrientes, expresados en  $\mu\text{M}$ : 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  $\text{CdCl}_2$ : 0 (control), 10, 20, 30, 40 y  $50 \mu\text{M}$ , que corresponden a los diferentes tratamientos aplicados, y se mantuvieron en estas condiciones durante otros 14 días.

### **3.2. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL**

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 (Bethgen 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 CO<sub>2</sub> fueron realizadas al final del tiempo de cultivo, mediante un IRGA, con flujo de aire en un sistema de circuito abierto, utilizando un ADC tipo LCA-3, 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

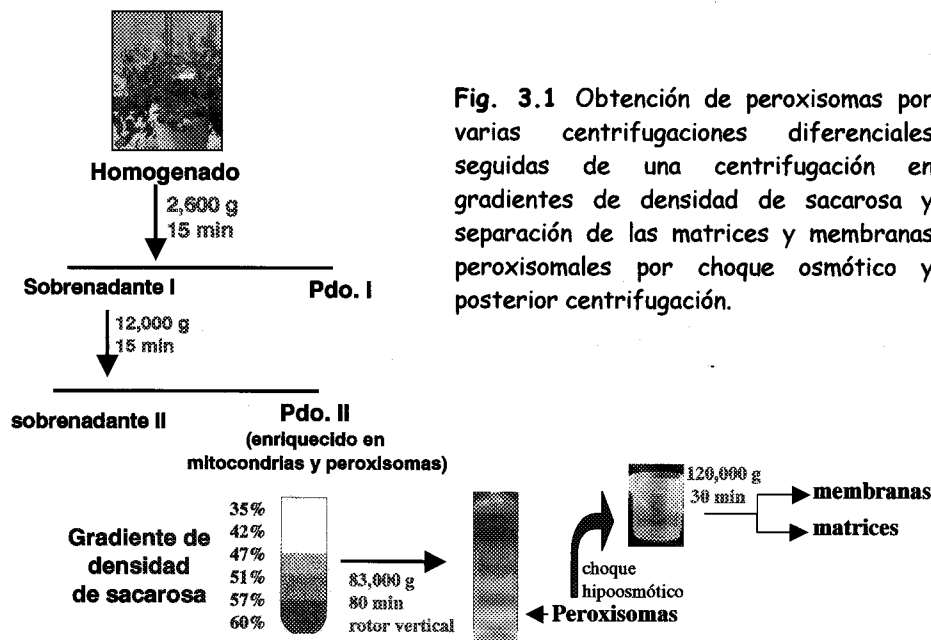
Todas las operaciones se efectuaron a 4°C. Las hojas de guisante se lavaron y homogeneizaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, 1,4-ditiotreitol (DTT) 2 mM, Tritón X-100 al 0,2% (v/v) y PMSF 1 mM utilizando una relación peso/volumen de 1:4. El PMSF se omitió en extractos destinados 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-Na<sub>2</sub> 1 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 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 15 minutos para eliminar la mayor parte de los cloroplastos. 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 a 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/v). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa del 66% (p/v) preparada en EDTA-Na<sub>2</sub> 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 ultracentrifuga Beckman usando un rotor vertical VTi50. Finalizada la centrifugación, los

peroxisomas se situaban en la parte inferior 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-Na<sub>2</sub> 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 60 Ti. 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-Na<sub>2</sub> 1 mM, ASB al 0,2% (p/v) y cisteína 4 mM (relación p/v = 1/4). El homogenado se sometió a dos centrifugaciones diferenciales a 2.600 g y 12.000 g y el precipitado, 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-Na<sub>2</sub> 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 60 Ti 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.

### 3.8. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ORGÁNULOS 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 Tritón X-100 (Sandallo 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<sup>2+</sup>, 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. En 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.

#### 3.9.2. En Geles de Poliacrilamida con SDS (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%. 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).

#### 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).

##### 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 cm<sup>2</sup> durante 2 horas, según Corpas y col. (1998).

#### 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 (Bunkelman y Trelease, 1996). Se basa en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti IgG en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formándose un intermediario que se estabiliza mediante la emisión de luz (Thorpe et al., 1985). Esta emisión de luz se potencia con la presencia de 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol (Rosell et al., 1978). Este método es de 10 a 100 veces más sensible que el método de la fosfatasa alcalina.

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, las membranas se incubaron con metanol 100% 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 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  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (v/v) y 200  $\mu$ l 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" (Amershan), con ayuda de un "cassette" para autoradiografía (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, UK), anticuerpo frente a la Cu,Zn-SOD de sandía (Bueno y col., 1995), anticuerpo frente a la Mn-SOD mitocondrial de guisante (del Río y col., 1996), anticuerpo frente a la FBPassa de guisante (cedido por la Dra. R. Hermoso, de la *Estación Experimental del Zaidín*, CSIC, Granada), anticuerpo frente a la dinitrofenilhidrazona (Sigma), y anticuerpo frente a la xantina oxidasa de rata (XOD) cedido por el Dr. Moriwaki (Moriwaki y col., 1996).

### 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<sub>2</sub><sup>-</sup> generados por el sistema enzimático xantina/XOD. La reacción se llevó a cabo 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 3ml de una mezcla de reacción que contenía citocromo *c* 1,35 x 10<sup>-5</sup> M, xantina 9,67 x 10<sup>-5</sup> M en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM y 25-100  $\mu$ 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 (4-15  $\mu$ l) a la mezcla de reacción hasta obtener una tasa de reducción del citocromo *c* entre 0,024 y 0,026 unidades. 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  $\text{CN}^-$   $10^{-5}$  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:

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

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

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

#### 3.11.1.2. Actividad en Geles de Poliacrilamida

Las distintas isoenzimas de superóxido dismutasa fueron individualizadas mediante EGPA nativa en geles al 10%. La actividad enzimática se localizó mediante un método fotoquímico basado en la reducción del NBT por los radicales libres  $\text{O}_2^-$  generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametilendiamina (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.

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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La determinación se efectuó a 25°C en una mezcla de reacción que contenía  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 Tritón X-100 al 0,2% (v/v). La actividad enzimática, expresada en  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ prot (o } \times \text{ ml}^{-1})$ , se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de  $39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (del Río y col., 1977).

### 3.11.2.2. Actividad en Geles

#### Electroforesis nativa

La actividad catalasa se analizó mediante EGPA al 6%, 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  $[\text{Fe}(\text{CN})_6] \text{K}_3$  con el  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ . 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,003% (v/v) durante 10 min. Tras varios lavados con agua destilada, los geles se incubaron en una solución de  $\text{Cl}_3\text{Fe}$  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 anfólitos de pH 5-7 al 5% (v/v) de Pharmacia Biotech. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 5%, conteniendo un 10% (v/v) de glicerol y un 2% de anfólitos (p/v) de intervalo de pH 5-7, y de 1,5 mm de grosor. Para prevenir inactivaciones por la solución del cátodo, sobre las muestras se colocó una solución de glicerol al 7% (v/v) y anfólitos 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  $4^\circ\text{C}$ , 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  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y se incubaron en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,0, conteniendo peroxidasa de rábano (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 45 minutos en oscuridad. Posteriormente, se añadió a la solución anterior  $\text{H}_2\text{O}_2$  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) de 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. Los puntos

isoelectrónicos de las diferentes isoformas de catalasa detectadas se determinaron usando marcadores de pl 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 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. La mezcla de reacción contenía tampón HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6, ascorbato 0,2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad enzimática, expresada en nmoles de ácido ascórbico oxidado x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> (Hossain y Asada 1984). Se utilizaron tres controles, uno sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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-ClH 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.

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.

Como sistema generador del radical monodeshidroascorbato, se empleó una mezcla de ácido ascórbico 1 mM y 0,5 unidades de ascórbico oxidasa, necesario para conseguir un descenso de absorbancia a 265 nm comprendido entre 0,01 y 0,02 unidades por minuto. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADH oxidado x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (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 Cl<sub>2</sub> 3 mM, y glutacion 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 glutacion oxidado. La actividad enzimática expresada en nmoles de NADPH oxidado x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el NADH de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Jiménez y col., 1997).

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

La reacción catalizada por la glutacion-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 glutacion reducido (GSH) y el cloro-2,4-dinitrobenzono (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 (µmol x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>) se definía como la cantidad de enzima necesaria para producir 1µmol de producto conjugado por minuto. La actividad enzimática expresada en nmoles x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup>, se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y de un coeficiente de extinción molar para el producto conjugado de 9,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (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<sup>+</sup> a 340nm según Corpas y col. (1998). 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 Mg Cl<sub>2</sub> 2 mM y NADP<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/min 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 6PGDH, sustituyendo el sustrato por el 6-fosfogluconato (6PG) 5 mM (Corpas y col., 1998). Una miliunidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP<sup>+</sup>/min 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 NADPH 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<sub>2</sub> 2 mM y NADP<sup>+</sup> 0,8 mM, iniciándose la reacción con la adición de 2R,3S-isocitrato. Una miliunidad de actividad (nmol NADPH/min) se definía como la cantidad de enzima necesaria para reducir un nmol de NADP<sup>+</sup>/min a 25°C.

### 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 de 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 de  $1,7 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (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  $\mu\text{l}$  de muestra e hidroxipiruvato 2 mM. La actividad enzimática en  $\mu\text{moles NADH} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ , 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; EC 1.1.3.22)

Se determinó según describe Rajagopalan (1985), midiendo a 293 nm la aparición de ácido úrico a una temperatura de 25°C durante 10 minutos. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v), KCN 0,1 mM, xantina 50  $\mu\text{M}$  y la muestra (50-150  $\mu\text{l}$ ).

Previamente el tampón es burbujeado con nitrógeno para eliminar el oxígeno. La reacción se inició añadiendo  $\text{NAD}^+$  0,5 mM y se realizaron controles de muestra en ausencia del sustrato.

La actividad enzimática en 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).

### 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 peroxidases. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1,1 ml, contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 6,1, guayacol- $\text{H}_2$  6,25 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,025 mM y la muestra convenientemente diluida. La reacción se inició por adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la actividad se expresó en unidades  $\times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ .

### 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,  $\text{Mg Cl}_2$  4 mM, DTNB 0,1 mM, glioxilato-Na 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  $\times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar de  $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (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 de glioxilatofenilhidrazona 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,  $\text{Mg Cl}_2$  4,5 mM, fenilhidracina 10 mM y la muestra. La actividad se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Archer y Ting (1996). Una unidad de isocitrato liasa se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{mol}$  de glioxilatofenilhidrazona por minuto a 25°C.



### 3.11.16. Proteasa

#### 3.11.16.1. Aminopeptidasas

##### Actividad en solución

Se determinó espectrofotométricamente utilizando L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato según Corpas y col. (1993). 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  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Tuppy *et al.*, 1962).

##### Actividad en geles

La actividad aminopeptidasa también se determinó en desarrollos electroforéticos 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- $\beta$ -naftilamida 0,5 mM en tampón Tris-ClH 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 *et al.*, 1993). 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 *et al.* (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-ClH 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.

### 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 Tritón 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-ClH 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 (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). Para el ensayo se añadieron 200  $\mu$ l 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 ClH 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  $\mu$ M).

### 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  $2 \times 10^{-9}$  M y  $H_2O_2$   $2,5 \times 10^{-6}$  M, a la cual se le adicionaban 200  $\mu$ l 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,625-10  $\mu\text{M}$ ).

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 CIH 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 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  $\mu\text{l}$  de muestra. La reacción comenzaba con la adición de peroxidasa de rábano 40 mM. La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se determinó 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  $\mu\text{M}$ ).

### 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. (1999). 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, Tritón X-100 al 0,05% (v/v), ferricitocromo c 25  $\mu\text{M}$ , y las membranas de peroxisomas. El tampón se borboteó previamente con aire. La reacción se inició adicionando NADH 100  $\mu\text{M}$  y la reducción del ferricitocromo se registró a 550 nm frente a un blanco con idéntica composición pero conteniendo Cu,Zn-SOD 2  $\mu\text{M}$ . 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 azul Coomassie de Bio-Rad. 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

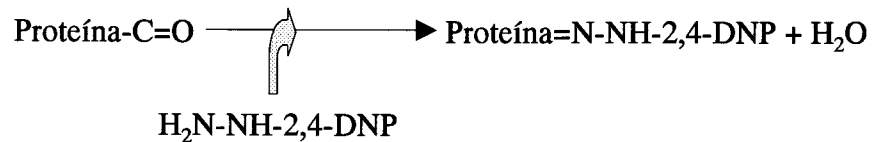
La determinación de la densidad de las soluciones de sacarosa se efectuó a partir de medidas de refractometría, a temperatura ambiente, utilizando un refractómetro Atago mod. 500 con capacidad para medir concentraciones en el intervalo 0-90% de sacarosa (p/p).

### 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  $H_2O_2$  (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, Tritón 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 2000 g durante 10 min. Posteriormente, los homogenados se incubaron durante 1 h con DNPH 10 mM preparada en CIH 2 M. Los blancos se incubaron con CIH 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Levine y col., 1991).

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 CIH 2 M durante 1 hora. Como controles se utilizaron blancos incubados en CIH 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., 1998) 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 µl de NaOH 0,1 N, luego se añadieron 40 µl de tampón de muestra para geles de SDS, 4,25 µl de CIH 0,1 N y finalmente, 1 µl 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-CIH 50 mM, pH 7,5, con EDTA 1mM y Tritón 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  $\mu$ 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-ClH 0,4 M, pH 8,9, y 50  $\mu$ 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  $\mu$ g/ $\mu$ 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 S-carboximetil derivados. Posteriormente se realizaba una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger con la consiguiente formación de 2,4-dinitrofenil derivados 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/H<sub>2</sub>O) se utilizaba para eluir rápidamente el exceso de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno, los DNP derivados de aminoácidos 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 H<sub>2</sub>O ultrapura Mili-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  $\gamma$ -glutamil-glutamato ( $\gamma$ -Glu-Glu) como patrón interno, la derivatización se llevó a cabo mezclando: 250  $\mu$ l del extracto ácido descongelado, 50  $\mu$ l de  $\gamma$ -Glu-Glu 0,2 mM preparado en ácido perclórico 0,3% (v/v) y 25  $\mu$ 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  $\mu$ l del sobrenadante que se mezclaron con 200  $\mu$ l de fluorodinitrobenceno

(preparado al 1% 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior cuantificación por HPLC. Para ello, las muestras se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  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 este artefacto, una alícuota de la muestra se extraía rutinariamente 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 20  $\mu\text{l}$  de inyección de la muestra derivatizada, la fase móvil A (70% metanol/ $\text{H}_2\text{O}$ ) 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 ASÓRBICO

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  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  al 2% en agua, a un pH 2,8. Antes de ser analizadas, las muestras eran pasadas a través de columnas Sepack  $\text{C}_{18}$  (Waters) y filtradas por un filtro de 0,5  $\mu\text{m}$  (Millex  $\text{GV}_3$ , Millipore). Posteriormente se inyectaron en una columna Apex octadecil de 5  $\mu\text{m}$  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 estándar 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. Para Estudios Estructurales

Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> 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<sub>4</sub> 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 uranilo para su observación en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

##### 3.23.1.2. Para Inmunocitoquímica

Los cortes de hoja (1 mm<sup>2</sup>) 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 (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-ClH 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' terminal 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<sup>·</sup>)

Se incubaron cortes de hojas, de 25 mm<sup>2</sup>, en una solución de 10 μM de diacetato de diaminofluoresceína (DAF2-DA) de Calbiochem, preparada en tampón Tris-ClH 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<sup>·</sup>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forma un precipitado con el OsO<sub>4</sub> 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-ClH 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 $H_2O_2$

Se utilizó el método descrito por Bestwick y col. (1997). Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente  $1\text{ mm}^2$  y se incubaron en una solución de  $CeCl_3$  5mM en tampón MOPS 50mM, pH 7,2, durante 1 h y se siguió el mismo protocolo de preparación de muestras en resina Spurr descrito en el apartado 23.1.1. Como controles negativos, previamente a la incubación con  $CeCl_3$ , se incubaron cortes de hojas con catalasa de hígado bovino (25  $\mu\text{g/ml}$ ), y también se utilizaron cortes incubados en tampón y en ausencia de  $CeCl_3$ . Para determinar el efecto de inhibidores sobre la formación de precipitados de  $H_2O_2$ , las muestras se incubaron previamente con los mismos durante 30 min. Los inhibidores utilizados fueron azida sódica 1 mM y difeniliodonio (DPI) 10  $\mu\text{M}$ . 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 $O_2^{\cdot-}$

Las hojas de guisante se cortaron en piezas de aproximadamente  $1\text{ mm}^2$  y se incubaron en una solución de diaminobencidina (DAB) 2,5 mM y  $MnCl_2$  0,5 mM en tampón HEPES 0,1 M, pH 7,2, con azida sódica 1mM durante 30 min (Steinbeck *et al.*, 1993). Como controles de la reacción se llevaron a cabo incubaciones en ausencia de Mn, en presencia y en ausencia de DAB, y en presencia de Cu,Zn-SOD 10  $\mu\text{M}$  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 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  $\text{OsO}_4$  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% 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 $\text{O}_2^-$ Y DE $\text{H}_2\text{O}_2$ EN HOJAS COMPLETAS

### 3.24.1. Producción de Radicales $\text{O}_2^-$

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 a 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  $\text{O}_2^-$  (Schraudner et al., 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 $\text{H}_2\text{O}_2$

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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como control de la reacción, las hojas antes y durante la infiltración con DAB, se incubaron en presencia de ascorbato 10 mM que actúa eliminando el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.24.3. Efecto de Moduladores sobre la Producción de $\text{H}_2\text{O}_2$ y $\text{O}_2^-$

Para determinar el efecto de distintos inhibidores y activadores sobre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ , las hojas de guisante se incubaron a través de los peciolo durante 3-18 horas, en distintas soluciones acuosas conteniendo los siguientes compuestos: cantaridina  $5\mu\text{M}$  (inhibidor de protein quinasas),  $\text{LaCl}_3$

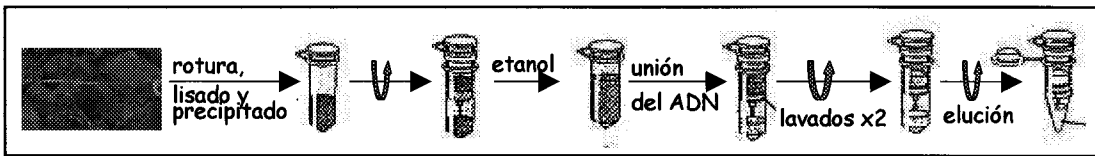
1mM (bloqueante de canales de calcio), ácido salicílico 1mM, N-acetil-cisteína 20mM (secuestrador de  $H_2O_2$ ), nitroprusiato de sodio 0,5 mM (donador de NO), 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) 150  $\mu$ M (secuestrador de NO), 8-Br-cGMP 100  $\mu$ M (donador de GMP cíclico), 1H[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) 200  $\mu$ 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. ENSAYO DE MUERTE CELULAR EN HOJA COMPLETA

Como marcador de muerte celular en hoja se utilizó un colorante impermeable, "Evans blue", que sólo penetra en las células que tienen dañada la membrana. Para esto, se infiltraron peciolo de hojas de guisante con 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 microcentrífuga con filtro obteniéndose un lisado con el ADN. Éste, se transfirió a un tubo de microcentrífuga 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-ClH 0,1 M, pH 8,0, con EDTA 1 mM).



**Fig. 3.2** Extracción de ADN de hojas según el protocolo de Quiagen (DNAeasy Plant Mini Kit). El ADN se eluyó con  $H_2O$ .

La cuantificación del ADN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad de densidad óptica a esta longitud de onda es equivalente a 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de cadena doble. Para ello se diluyó el ADN con agua estéril y se midió su absorbancia 260 nm. Para comprobar la posible contaminación de 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 está entre 1,7 y 1,9.

La separación de fragmentos de ADN por 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 desnaturizantes (como se indica en el apartado 9.1) eran preparados en tampón TBE (Tris base 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% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol y 0,001% 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 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.

Para la transferencia de las muestras de ADN a un soporte sólido, después de la electroforesis, el gel de agarosa se incubó 30 minutos en una solución de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M en agitación (para desnaturizar el ADN), se enjuagó con agua ultrapura y se incubó en Tris-ClH 1 M, pH 8,0, y NaCl 1,5 M en agitación durante otros 30 minutos para neutralizar el pH del gel. 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 20x (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M a pH 7,0). Sobre el gel se colocó la membrana de nylon, del mismo tamaño, y sobre ella 6 papeles de filtro (Whatman 3 MM) cortados al 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. Posteriormente, se recogió la membrana, se enjuagó con SSC 2x y se dejó secar al aire, tras lo cual se fijó el ADN a la membrana con un tratamiento de luz ultravioleta a  $0,12 \text{ J/cm}^2$  (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 *et al.*, 1989).

### 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  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) se homogeneizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Inmediatamente se pesaron y se les añadió la solución de TRIzol (1 ml por cada 0,1 g de tejido) y se incubaron a  $15-30^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. A continuación se añadió cloroformo (0,2 ml por cada ml de TRIzol) agitando vigorosamente durante 15 segundos y se dejó durante 2-3 minutos a  $15-30 \text{ }^\circ\text{C}$ , para después centrifugar a 12.000 g durante 15 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . 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 para precipitar el ARN, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Así, se obtuvo un precipitado de ARN que se lavó con etanol al 75 % (al menos 1 ml por ml de TRIzol utilizado) y posteriormente se volvió a precipitar centrifugando a 7.500 g durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Finalmente, se dejó secar el precipitado al aire durante unos minutos y se resuspendió el ARN en agua tratada previamente con dietilpircarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v) para inactivar posibles RNAsas ( $20-40 \mu\text{l}$  por cada 0,1 g 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  $40 \mu\text{g/ml}$  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 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 *et al.* (1989). Las muestras de ARN se calentaron a  $65^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y se prepararon en una solución de tampón MOPS 1x, formaldehído 6,5% (v/v) y formamida 50% (v/v), después de lo cual se calentaron a  $55^\circ\text{C}$ , durante 10 minutos y se les añadió 0,1

volúmenes de tampón de carga (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% en tampón MOPS y con formaldehído al 1,8% (v/v). Para ello se disolvió la agarosa en 85 ml de agua, calentando en un microondas, 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 (MOPS 20 mM, pH 7,0, acetato sódico 5mM y EDTA 1 mM) 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 del ARN a membranas de nylon (Northern) se llevó a cabo básicamente como se indica en Sambrook *et al.* (1989). Una vez terminada la electroforesis del gel de agarosa, éste se lavó y equilibró en SSC 10x durante unos 20 minutos con un par de cambios de solución. La transferencia se realizó por capilaridad tal y como se describió en la transferencia de ADN (apdo. 26), con la salvedad de que la transferencia se realizó en SSC 10x (Fig. 2.5).

### 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  $^{32}\text{P}$  tal y como se indica en el apartado 28.3.



**Tabla 3.1** Sondas que se marcaron con  $^{32}\text{P}$  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.

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

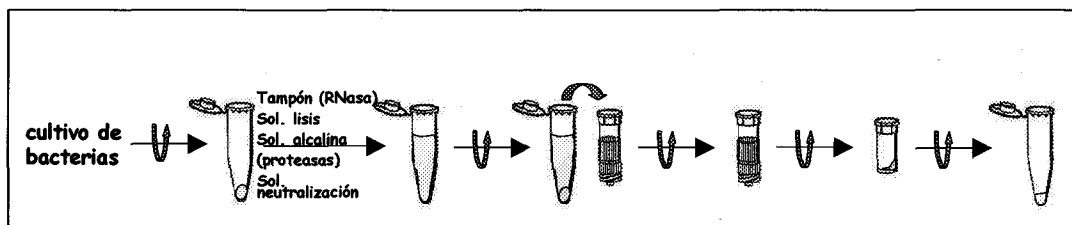
M: (A/C); R: (G/A); Y: (T/C); S: (G/C)

### 3.28.2. Transformación y Aislamiento de los Plásmidos

El método utilizado para la transformación de bacterias fue el descrito por Robinson y col., (1995). Las bacterias competentes *E. Coli* DH5 $\alpha$ , conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se sacaron del congelador y se pusieron en hielo, y cuando empezaron a descongelarse se añadieron entre 20 y 200 ng del plásmido de interés (2-5  $\mu\text{l}$ ) y se dejaron 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se calentaron las células a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  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), con un pH 7,0] y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  de 1-2 horas en un agitador orbital (Gallenkamp) a 170 rpm. Cuando se alcanzó una densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) de 0,6 se distribuyeron homogéneamente 50  $\mu\text{l}$  de suspensión en una placa de Petri con LB 1x, ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y agar al 2% y se dejaron crecer las bacterias durante 12-16 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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  $\mu\text{g/ml}$ ) que se mantuvieron en un agitador orbital a 170 rpm y 37°C hasta que alcanzaron una  $\text{DO}_{600}$  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  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, con EDTA 10 mM y 100  $\mu\text{g/ml}$  de RNasa A. Posteriormente, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de solución de lisis (NaOH 0,2 M y SDS al 1%), 10  $\mu\text{l}$  de una solución alcalina con proteasas (para inactivar endonucleasas y degradar proteínas) y 350  $\mu\text{l}$  de solución de neutralización (acetato potásico 0,759 M, guanidina-ClH 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  $\mu\text{l}$  de solución de lavado (acetato potásico 60 mM y Tris-ClH 10 mM a pH 7,5, con un 60% de etanol) y se volvió a centrifugar a 14.000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se repitió el paso anterior con 250  $\mu\text{l}$  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  $-20^\circ\text{C}$ .

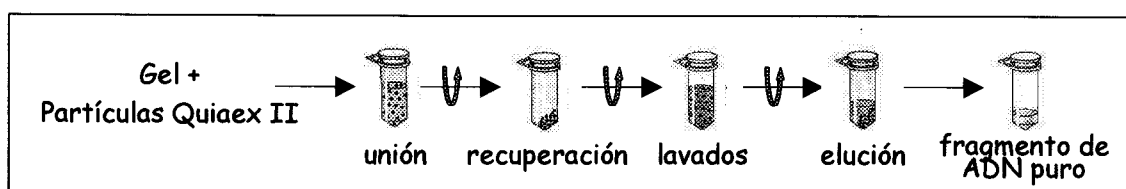


**Fig. 3.3** Obtención del ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias. Todas las centrifugaciones se realizaron a 14.000 g y el último precipitado se lavó dos veces tras lo cual se recuperó el ADN plasmídico con  $\text{H}_2\text{O}$ .

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  $\mu\text{l}$  de agua, 1,0  $\mu\text{l}$  de ADN, 1,0  $\mu\text{l}$  de tampón de la enzima de restricción 10x y 0,5  $\mu\text{l}$  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), y 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 25. 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 presencias de altas concentraciones salinas y el resto de moléculas se lavan en diferentes pasos, evitando así contaminaciones. Finalmente, el ADN se eluyó con agua.

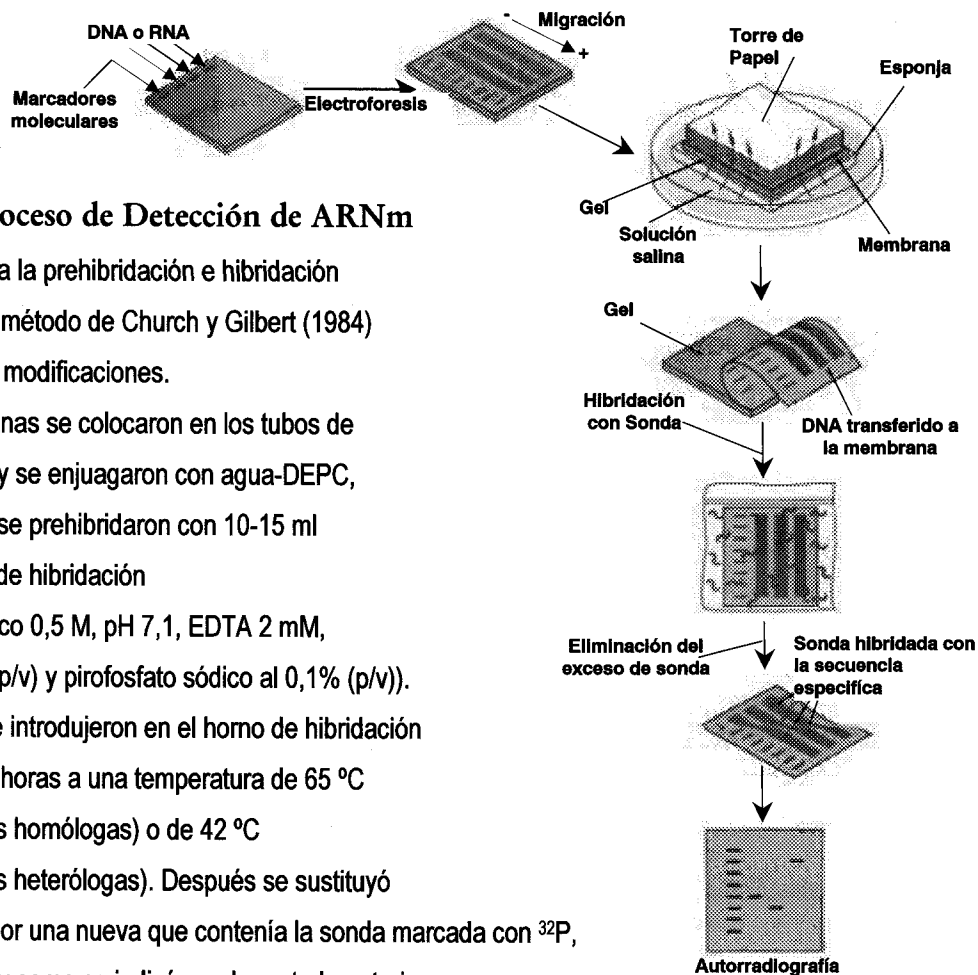


**Fig. 3.4** Extracción y purificación de ADN de los geles de agarosa con partículas de sílice (Quiaex II) optimizadas para recuperar fragmentos de ADN. Las moléculas de ADN se adsorben a las partículas en presencia de altas concentraciones salinas y el resto de moléculas se lavaron en diferentes pasos, 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 ADN molde desnaturalizado. Este ADN se marcaba en numerosos sitios a lo largo de su longitud ya que se sustituyen nucleótidos no radioactivos por el equivalente marcado radioactivamente, en la mezcla de reacción que utiliza la enzima Klenow polimerasa. El fragmento de ADN aislado, con una concentración de 2,5-40 ng en 45  $\mu$ l de tampón TE (Tris-ClH 10 mM, pH 8,0, con EDTA 1mM), se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos y se colocó en hielo durante otros 5 minutos. Se añadió este ADN a la mezcla de reacción (enzima Klenow y nucleótidos) y 5  $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos marcados (Redivue [<sup>32</sup>P] dCTP) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. La reacción se paró con 5  $\mu$ l 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 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 $\mu$ l por cada 5 ml de solución de hibridación).

Fig. 3.5 Técnicas Southern y Northern-blot



### 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 al 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  $^{32}\text{P}$ , obtenida tal y como se indicó en el apartado anterior, y se incubaron los tubos a la misma temperatura durante toda la noche.

Para sondas heterólogas se realizaron dos lavados con SSPE 5x (SSPE 20x: NaCl 3M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M y EDTA 20 mM, a 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  $\beta$ , de Amersham Pharmacia Biotech ("Hyperfilm MP<sup>TM</sup>") 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  $\text{Cd}^{2+}$  para abordar posteriores estudios a nivel subcelular, se efectuó un análisis inicial del efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  sobre algunos parámetros fisiológicos y el metabolismo oxidativo. Para ello, se cultivaron plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) con concentraciones crecientes de  $\text{CdCl}_2$  (0-50  $\mu\text{M}$ ), 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  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) determinaba la menor cosecha y se observaba una disminución progresiva de la cosecha en función del nivel de cadmio aplicado a la solución nutritiva, si bien las diferencias de los tratamientos con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que la menor superficie correspondía al tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1** Efecto del cadmio 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

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

La inhibición del crecimiento iba acompañada de una disminución significativa en la tasa fotosintética, expresada en  $\mu\text{M}$  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  $\text{Cd}^{2+}$ . La transpiración de las plantas, expresada en  $\text{mM}$  de  $\text{H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , también se veía afectada de forma altamente significativa ( $P < 0,001$ ) por la disponibilidad de  $\text{Cd}^{2+}$  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 cadmio 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.

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

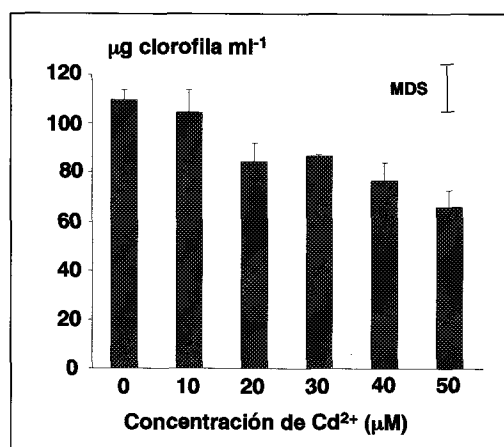


Fig. 4.2 Efecto del cadmio sobre el contenido de clorofila de las hojas de guisante. Cada valor representa una media de tres réplicas y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (MDS) según el test de Duncan ( $P < 0,05$ ).

#### 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. El cadmio se acumulaba preferentemente en la raíz aunque la capacidad para acumular el metal dependía de la concentración de Cd<sup>2+</sup> en el medio. Así, las plantas cultivadas en presencia de Cd<sup>2+</sup> 10 µg eran más eficientes acumulando el metal que las plantas cultivadas con concentraciones superiores, en términos de concentración, esto es, considerando los µg de Cd<sup>2+</sup> presentes por g de peso seco. Pero, en términos de acumulación, expresados como concentración de Cd<sup>2+</sup> por g de peso seco, la acumulación de Cd<sup>2+</sup> en raíces experimentaba un aumento lineal entre 0 y 30 µg de Cd<sup>2+</sup>, alcanzando una meseta entre 30 y 50 µM de Cd<sup>2+</sup>. En hojas también se observó que la acumulación de Cd<sup>2+</sup> que 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 50 µM de Cd<sup>2+</sup> 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 (mg Cd<sup>2+</sup> por kg de peso seco).



**Tabla 4.3.** Efecto del tratamiento con cadmio sobre el contenido de metales en hojas y en raíces de plantas de guisante. Los resultados se expresan como mg 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.

		Concentración de Cd <sup>2+</sup> (μM)					
		0	10	20	30	40	50
		μg					
<b>Hojas</b>	<b>Cd</b>	6,00 <sup>c</sup>	59,31 <sup>bc</sup>	84,42 <sup>b</sup>	95,70 <sup>b</sup>	115,70 <sup>b</sup>	205,29 <sup>a</sup>
	<b>Cu</b>	33,85 <sup>a</sup>	40,02 <sup>a</sup>	35,22 <sup>a</sup>	32,24 <sup>ab</sup>	31,76 <sup>ab</sup>	24,58 <sup>b</sup>
	<b>Zn</b>	121,06 <sup>a</sup>	99,92 <sup>b</sup>	86,29 <sup>bc</sup>	68,29 <sup>cd</sup>	68,90 <sup>cd</sup>	53,51 <sup>d</sup>
	<b>Fe</b>	973,51 <sup>a</sup>	914,78 <sup>ab</sup>	843,71 <sup>ab</sup>	795,24 <sup>a</sup>	779,03 <sup>ab</sup>	695,82 <sup>b</sup>
	<b>Mn</b>	4209,42 <sup>a</sup>	3449,55 <sup>b</sup>	2730,26 <sup>c</sup>	2490,16 <sup>c</sup>	2100,98 <sup>d</sup>	1451,85 <sup>e</sup>
<b>Raíces</b>	<b>Cd</b>	17,4 <sup>d</sup>	6868 <sup>c</sup>	13050 <sup>b</sup>	17600 <sup>a</sup>	19000 <sup>a</sup>	19500 <sup>a</sup>
	<b>Cu</b>	113,41	125,0	140,4	135,36	132,66	117,3
	<b>Zn</b>	760,94 <sup>b</sup>	1022,09 <sup>ab</sup>	1265,05 <sup>a</sup>	1050,93 <sup>a</sup>	1017,85 <sup>ab</sup>	782,19 <sup>b</sup>
	<b>Fe</b>	3938,8	4205,	4595,	4596,1	4132,5	3430,
	<b>Mn</b>	3788,5 <sup>a</sup>	3786,7 <sup>a</sup>	4049,8 <sup>a</sup>	3964,3 <sup>a</sup>	3445,5 <sup>ab</sup>	2475,1 <sup>b</sup>

**Tabla 4.4** Contenido de Cd en frutos y vainas de plantas de guisante control y cultivados con Cd<sup>2+</sup> (50 μM)

Cd <sup>2+</sup> (μM)	Fruto	Vaina
	mg Cd / kg p.s.	
0	0,28	0,16
50	4,60	2,98

El contenido de Zn en hojas disminuía conforme aumentaba el Cd<sup>2+</sup> 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<sup>2+</sup> aunque las diferencias fueron significativas sólo en las hojas del tratamiento con cadmio 50 μM, 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<sup>2+</sup>, 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 50 µM de cadmio.

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.

		Concentración de Cd <sup>2+</sup> (µM)					
		0	10	20	30	40	50
		mg					
<b>Hojas</b>	<b>N</b>	526,1 <sup>a</sup>	344,2 <sup>b</sup>	299,0 <sup>bc</sup>	269,0 <sup>bc</sup>	235,9 <sup>cd</sup>	164,2 <sup>d</sup>
	<b>P</b>	46,5 <sup>a</sup>	34,1 <sup>b</sup>	20,8 <sup>c</sup>	25,6 <sup>bc</sup>	27,7 <sup>bc</sup>	18,3 <sup>c</sup>
	<b>K</b>	441,9 <sup>a</sup>	428,1 <sup>a</sup>	305,6 <sup>b</sup>	304,1 <sup>b</sup>	226,5 <sup>c</sup>	177,6 <sup>c</sup>
	<b>C</b>	230,1 <sup>a</sup>	179,9 <sup>b</sup>	162,3 <sup>bc</sup>	133,5 <sup>cd</sup>	132,9 <sup>cd</sup>	99,5 <sup>d</sup>
	<b>M</b>	50,3 <sup>a</sup>	47,6 <sup>ab</sup>	41,4 <sup>bc</sup>	35,9 <sup>c</sup>	34,8 <sup>c</sup>	26,5 <sup>d</sup>
<b>Raíces</b>	<b>N</b>	180,3 <sup>c</sup>	260,1 <sup>ab</sup>	295,9 <sup>a</sup>	283,5 <sup>a</sup>	222,8 <sup>bc</sup>	199,9 <sup>bc</sup>
	<b>P</b>	50,4 <sup>abc</sup>	52,2 <sup>ab</sup>	62,6 <sup>a</sup>	55,2 <sup>ab</sup>	43,0 <sup>bc</sup>	37,0 <sup>c</sup>
	<b>K</b>	532,4 <sup>ab</sup>	489,0 <sup>ab</sup>	625,8 <sup>a</sup>	568,7 <sup>ab</sup>	470,5 <sup>b</sup>	304,2 <sup>c</sup>
	<b>C</b>	147,1 <sup>ab</sup>	149,1 <sup>a</sup>	156,1 <sup>a</sup>	140,9 <sup>ab</sup>	108,4 <sup>ab</sup>	96,1 <sup>b</sup>
	<b>M</b>	68,1 <sup>a</sup>	40,2 <sup>bc</sup>	44,4 <sup>abc</sup>	50,7 <sup>ab</sup>	34,7 <sup>bc</sup>	23,3 <sup>c</sup>

El contenido total de Mg se encontraba disminuído de forma significativa, tanto en hojas como en raíces con los distintos tratamientos de Cd<sup>2+</sup>. 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  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ , aunque no de forma significativa, y se reducía con  $\text{Cd}^{2+}$  40 y 50  $\mu\text{M}$ . A su vez, el K en raíces disminuía de forma significativa con la mayor concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ).

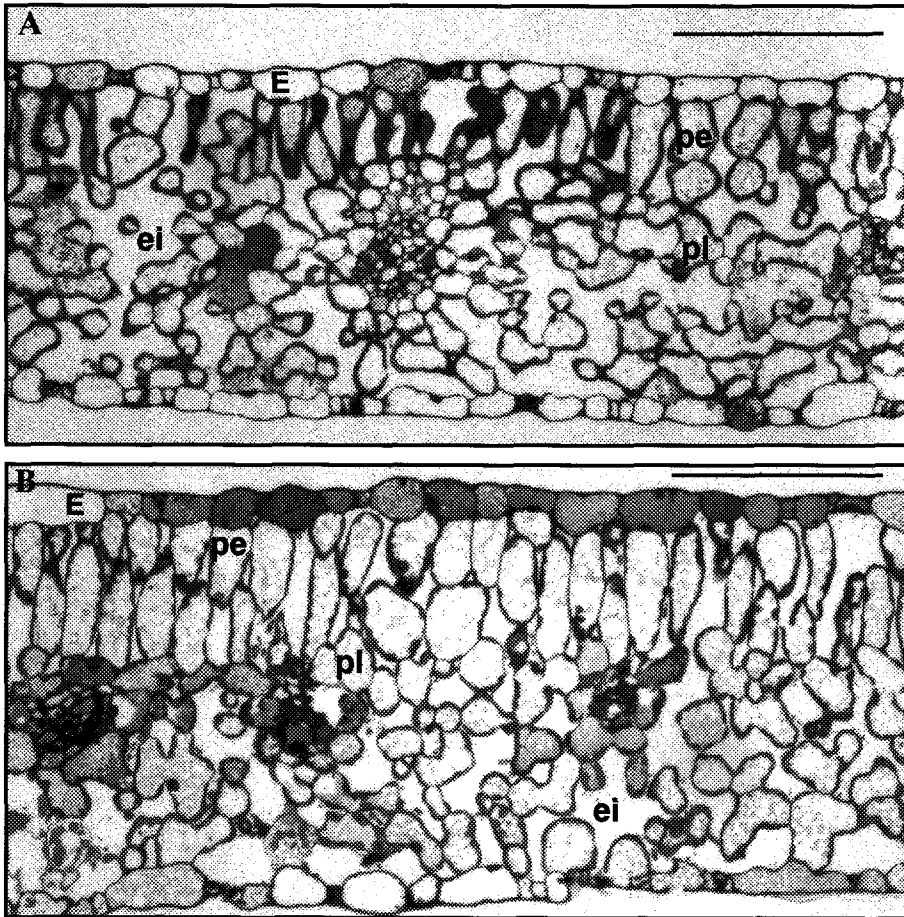
### 4.1.3. Estudios Ultraestructurales

#### 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 tratada con cadmio 50  $\mu\text{M}$ , 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).

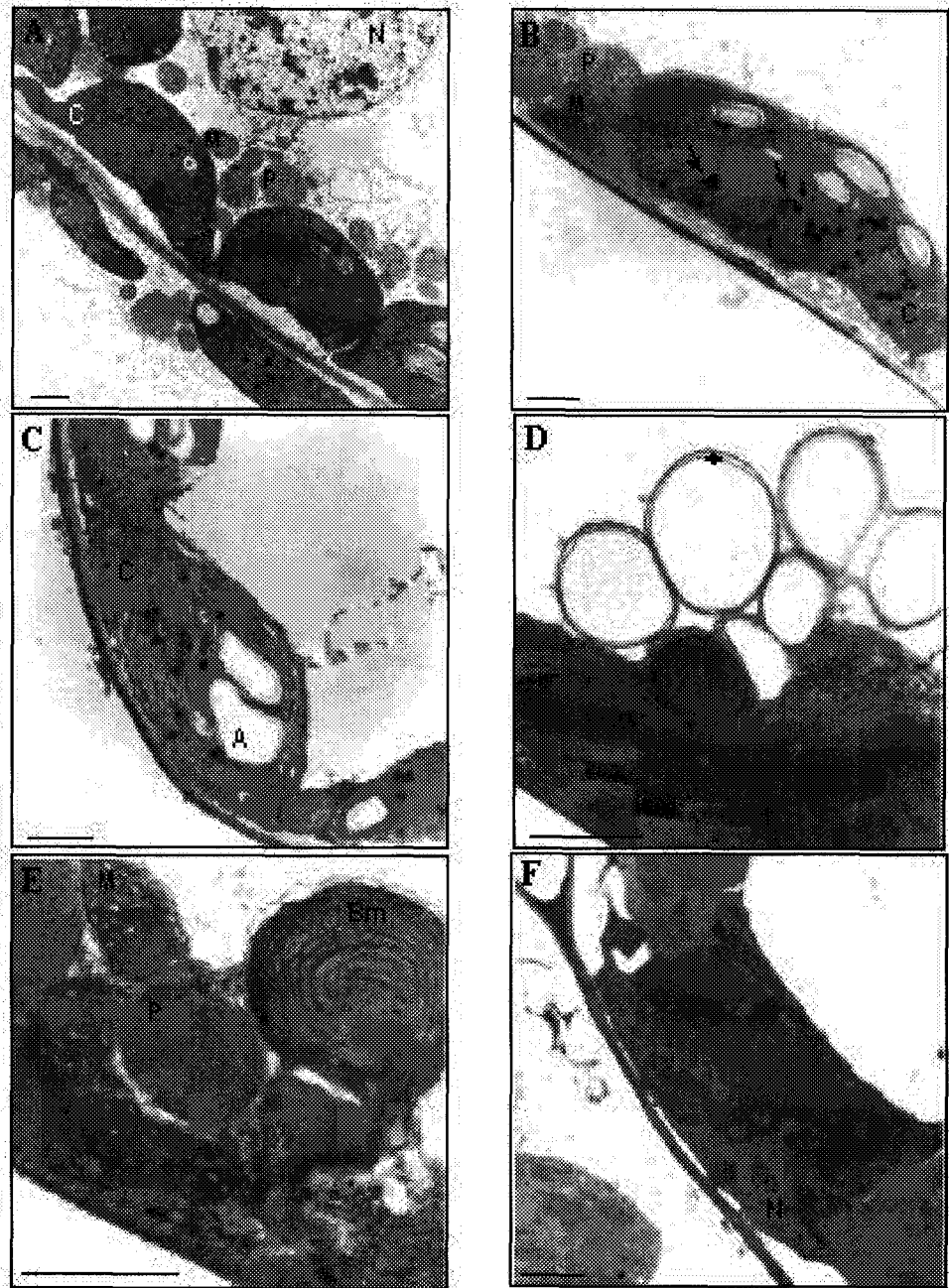
**Tabla 4.6** Efecto del tratamiento con cadmio sobre el tamaño de las células y el número de cloroplastos de hojas de guisante. Los valores presentados son media de tres cortes transversales de hojas de guisante diferentes  $\pm$  MDS. Los resultados seguidos de la misma letra no son diferentes de forma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

$\text{Cd}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Tipo de célula	Tamaño celular (a.u.)	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 cadmio 50  $\mu\text{M}$ . **E:** epidermis, **pe:** parénquima en empalizada, **pl:** parénquima lagunar, **ei:** espacio intercelular. La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

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 de los cloroplastos (Fig. 4.4 A), incremento del número y tamaño de los plastoglóbulos (Fig. 4.4 B y C) y del tamaño de los granos 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  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 4.4 F).



**Fig. 4.4** Efecto del tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de Cd 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:** granos de almidón; la flecha señala plastoglóbuli y el asterisco, invaginaciones del tonoplasto. La barra representa 1  $\mu\text{m}$ .

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.

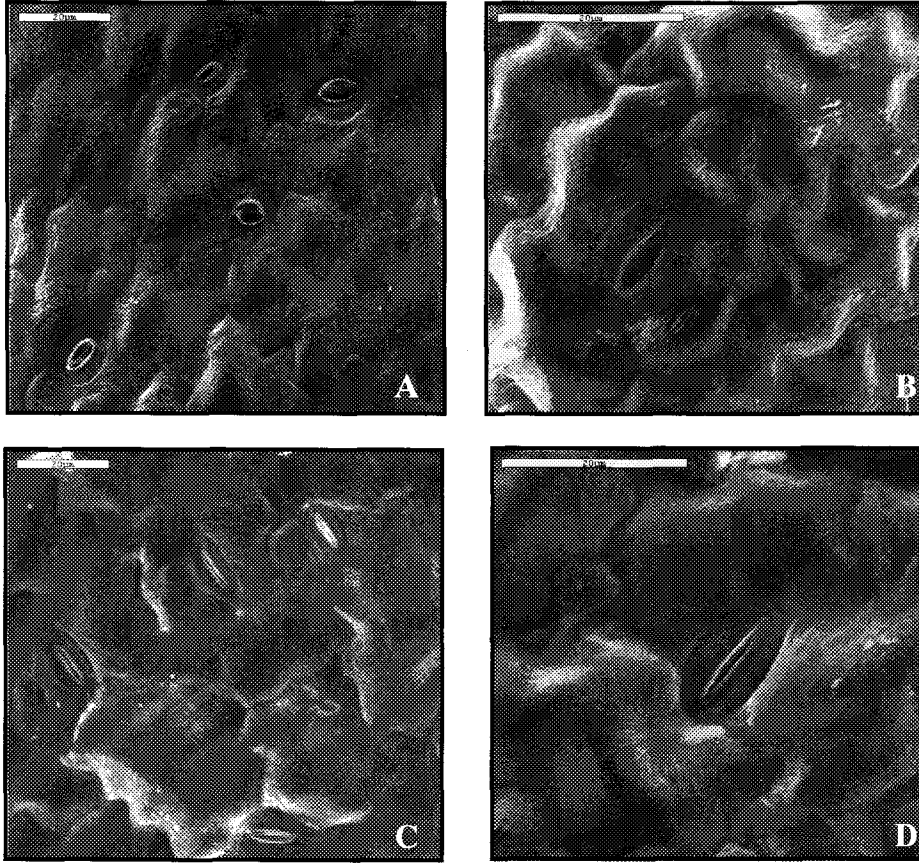


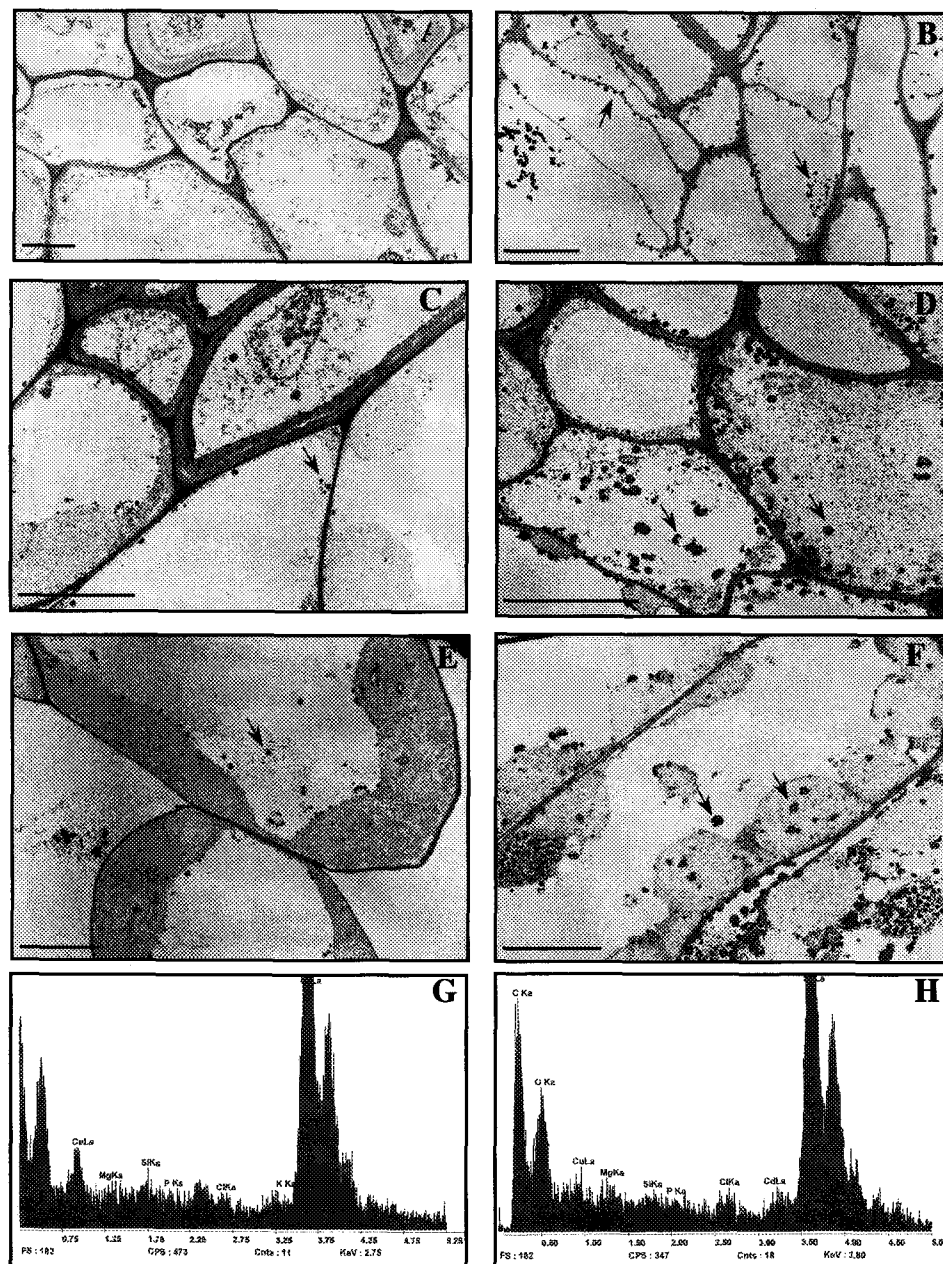
Fig. 4.5 Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de la superficie abaxial de hojas de guisante control (A y B) y tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  (C y D).

#### 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 27.3 de Material y Métodos.

Se procedió a la inmovilización de cationes, bien con piroantimoniato potásico, o con  $\text{Na}_2\text{S}$ . 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  $\text{Cd}^{2+}$ . 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  $\text{Na}_2\text{S}$ , no se detectaron precipitados específicos por lo que tampoco fue posible determinar acúmulos de cadmio.

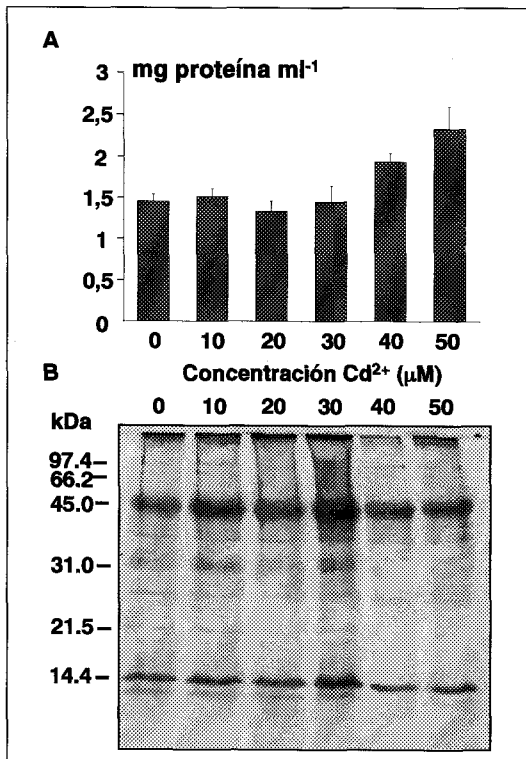


**Fig. 4.6** Micrografías electrónicas de raíces control (A) y tratadas con Cd (B), y hojas de guisante control (C y E) y tratadas con cadmio (D y F). G y H: análisis microanalítico de un acúmulo representativo, tras la inmovilización de cationes en hojas control y tratadas con Cd, respectivamente. En C y E se muestran células de transferencia, y en D 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  $\mu\text{M}$ ) 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), e 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  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$ .



**Fig. 4.7** Efecto del tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\pm$  MDS, 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 se separaron mediante EGPA-SDS al 12% y se tñieron con azul de Coomassie.

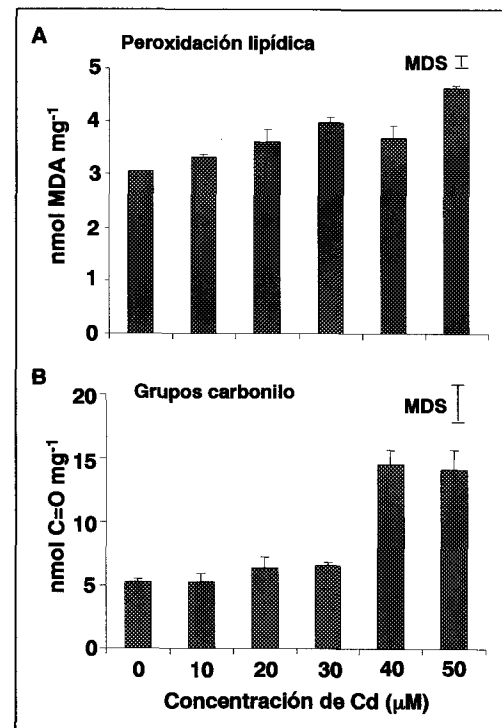
##### 4.1.4.2. Metabolismo del Oxígeno Reactivo en Hojas

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) tal y como se describió en el apartado correspondiente de Material y Métodos. 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  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  y de una forma significativa en los tratamientos de 40 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\pm$  MDS ( $P < 0,05$ ), en ambos casos.



Las actividades enzimáticas antioxidantes catalasa y guayacol peroxidasa en extractos crudos de hojas de guisante 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  $\mu\text{M}$ , como se observa en la Fig. 4.9.

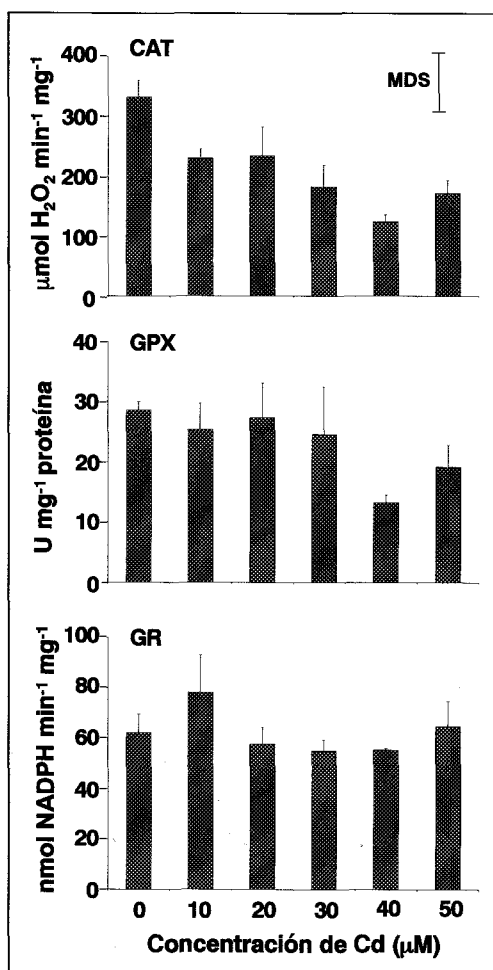
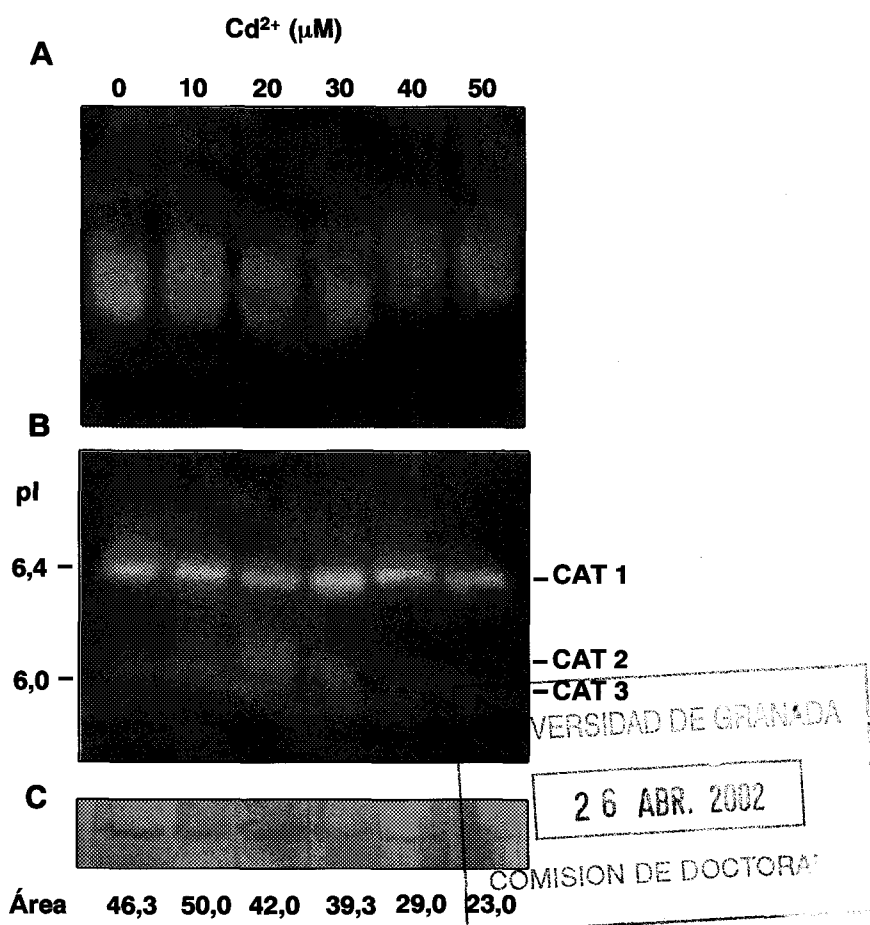


Fig. 4.9 Efecto del tratamiento con cadmio sobre enzimas antioxidantes en extractos crudos de hojas de guisante (CAT: catalasa; GPX: guayacol peroxidasa; GR:glutation reductasa). Cada valor representa la media de cuatro réplicas  $\pm$  MDS ( $P < 0,05$ ). En el caso de las actividades GR y GPX, las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

El análisis de la actividad catalasa en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, mostró una única banda difusa que disminuía ligeramente con el tratamiento de  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 4.10 A). Las bandas de actividad correspondientes a los extractos de  $\text{Cd}^{2+}$  40 y 50  $\mu\text{M}$  experimentaban además un ligero cambio de movilidad. El análisis de las muestras mediante IEF reveló la existencia de tres bandas (CAT1-CAT3) con puntos isoeléctricos (pI) comprendidos entre 6,0 y 6,5 según se muestra en la figura 4.10 B. El tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  40 y 50  $\mu\text{M}$  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  $\text{Cd}^{2+}$ , llegando a disminuir hasta un 50 % con 50  $\mu\text{M}$  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 4mg 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 $\mu\text{g}$  de proteína). La actividad catalasa se detectó con DAB. **C)** Detección de la proteína 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  $\text{Cd}^{2+}$  (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 de Cd<sup>2+</sup>, 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<sup>2+</sup> 10 μM y casi desaparecía con Cd<sup>2+</sup> 40 μM. La actividad de la CuZn-SOD II (cloroplastídica) se reducía en un 60% y un 95% con Cd<sup>2+</sup> 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.

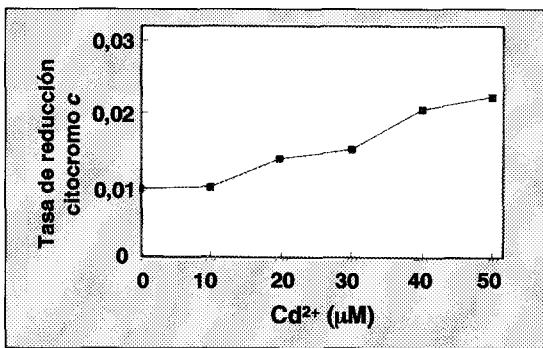


Fig. 4.11 Tasa de reducción del citocromo c en extractos crudos de hojas de guisante cultivados con distintas concentraciones de Cd<sup>2+</sup>

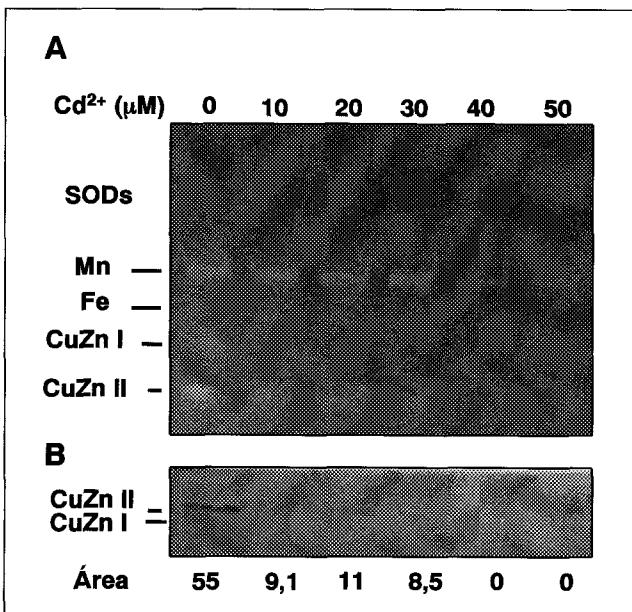


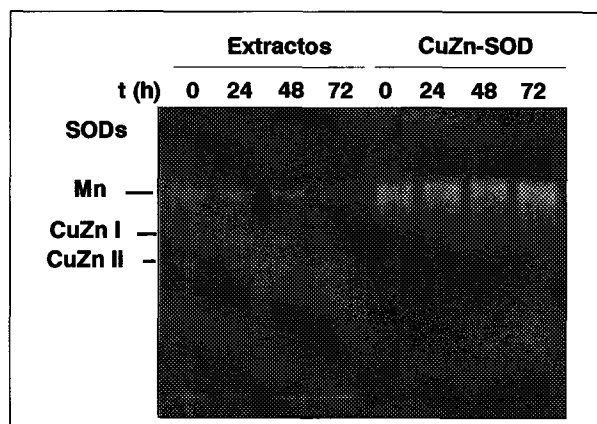
Fig. 4.12 Efecto del cadmio sobre las isoenzimas de actividad SOD de hojas de guisante.

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

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

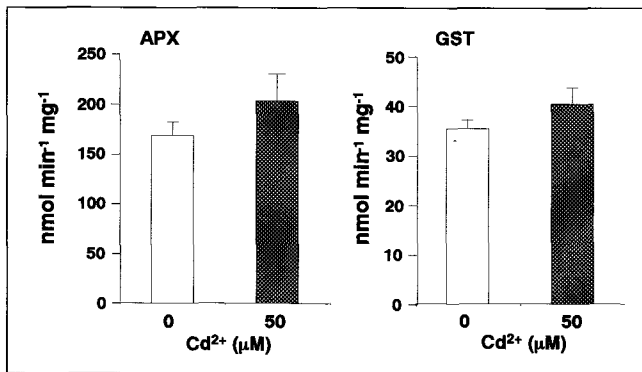
Para determinar si el cadmio podría ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la actividad SOD, se procedió a la incubación de CuZn-SOD comercial, de eritrocitos bovinos (Sigma), así como de extractos crudos de hojas de guisante, con  $\text{Cd}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  durante 24, 48 y 72 h. El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

Fig. 4.13 Efecto del  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$ ).



Sobre la base de los resultados anteriores se seleccionó una concentración de cadmio de 50  $\mu\text{M}$  como la más adecuada para llevar a cabo estudios posteriores a nivel subcelular, 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  $\text{Cd}^{2+}$ , hasta 400  $\mu\text{M}$ , pero las plantas no eran viables después de pocos días de tratamiento.

En homogenados procedentes de plantas control y cultivadas con  $\text{Cd}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  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 altamente significativas.



**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  $\pm$  MDS 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 entre tratamientos no son significativas.

#### 4.1.4.3. Determinación de Grupos Tíol (-SH)

En homogenados de hojas de guisante procedentes de plantas control y tratadas con cadmio (50  $\mu\text{M}$ ) se estudió el efecto del cadmio sobre el contenido de grupos tíol proteicos y no proteicos mediante el método del DTNB. En la Tabla 4.7 se observa un ligero aumento en el contenido de grupos tíol 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 tíol totales (proteicos y no proteicos) en extractos de hojas de guisante. Los resultados presentados son media de tres extractos independientes  $\pm$  MDS, 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.

Cd ( $\mu\text{M}$ )	Tioles totales ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tioles no proteicos ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tioles proteicos ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	149,99 $\pm$ 4,53	7,14 $\pm$ 0,45	143,02 $\pm$ 4,54
50	161,85 $\pm$ 2,20	10,01 $\pm$ 0,27	151,85 $\pm$ 2,45

#### 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  $\gamma$ -glutamil glutamato ( $\gamma$ -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  $\gamma$ -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)

**Tabla 4.8** Contenido en glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), así como la relación entre ambos y el contenido total de glutatión en extractos de hojas. Los valores presentados son media de tres medidas independientes  $\pm$  MDS. Las diferencias existentes son significativas según el test de Duncan con  $P < 0,001$  para la última columna y  $P < 0,01$  para el resto.

Cd ( $\mu$ M)	GSH	GSSG	GSH+GSSG	GSH/GSSG
	$\text{nmol ml}^{-1}$			
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).

$\text{Cd}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Ascorbato reducido ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
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  $\pm$  MDS y las diferencias son significativas según el test de Duncan ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.4.6. Peróxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Se midió la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{Cd}^{2+}$  provocaba un aumento del contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de más de 6 veces, respecto a las plantas control.

$\text{Cd}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )
0	0,231 $\pm$ 0,13
50	1,498 $\pm$ 0,51

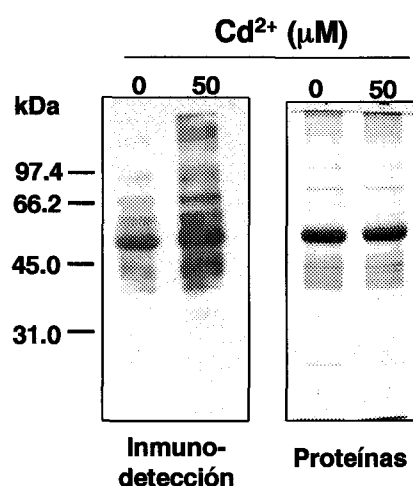
**Tabla 4.10** Efecto del cadmio sobre el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en extractos crudos de hojas de guisante. Los resultados que se presentan son media de cuatro extractos independientes  $\pm$  MDS y las diferencias son significativas según el test de Duncan ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.4.7. Estudio de Daños Oxidativos a Proteínas

Como se ha comentado anteriormente, el crecimiento de las plantas en presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  provocaba un incremento en el contenido de grupos carbonilo de proteínas que llegaba a ser hasta de un 50% con la máxima concentración de  $\text{Cd}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ). Para determinar si el daño oxidativo a proteínas era selectivo, se utilizó 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  $\text{Cd}^{2+}$ , se detectaron proteínas conteniendo grupos carbonilo en un intervalo de peso molecular de 30-120 kDa. Sin embargo, a igualdad de concentración de proteínas (10  $\mu\text{g}$ ), la intensidad de las bandas obtenidas era



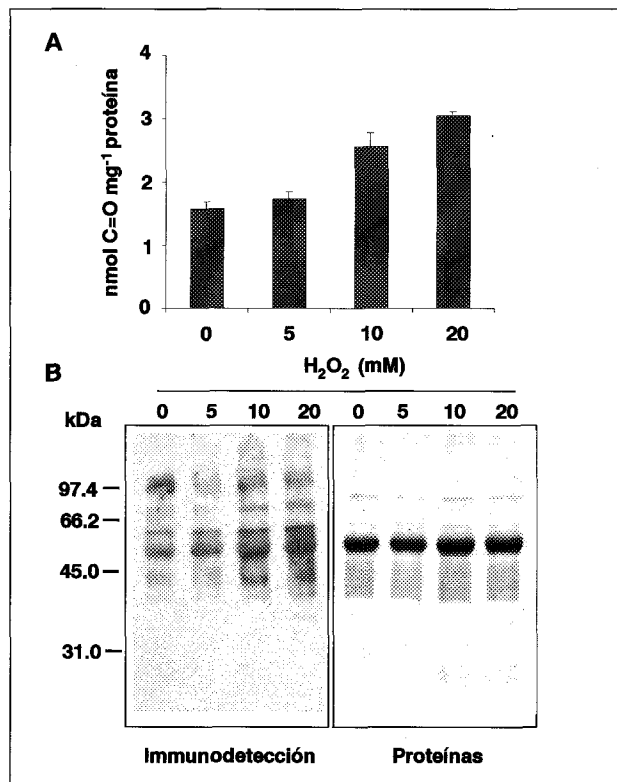
considerablemente mayor en las plantas tratadas con Cd como lo demuestra la tinción del gel con azul Coomassie (Fig. 4.15). La especificidad del anticuerpo se comprobó mediante el uso de controles consistentes en proteínas sin derivatizar con DNPH, las cuales no dieron reactividad alguna con el anticuerpo. El análisis densitométrico de las bandas de reacción con el anticuerpo mostraba un incremento de 1.9 veces en las plantas tratadas con Cd<sup>2+</sup> 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 Cd<sup>2+</sup>. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-20 mM). En la Fig. 4.16 A se observa que con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene lugar el aumento significativo del contenido de grupos carbonilo, medidos espectrofotométricamente. 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el extracto.



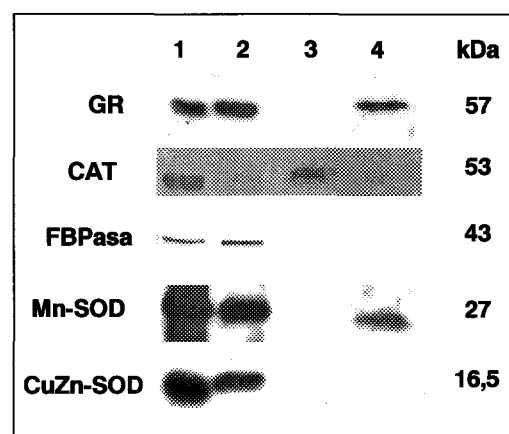
**Fig. 4.16** Oxidación de proteínas en extractos crudos de hojas de guisante. Los extractos se incubaron durante dos horas con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-20 mM), tras lo cual se derivatizaron con DNPH. **A)** Contenido en grupos carbonilo por el método espectrofotométrico. Los valores presentados son media de tres muestras diferentes  $\pm$  MDS, 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  $\mu$ 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 proteínas oxidadas, procedimos a la inmunoprecipitación de los extractos derivatizados con el anti-DNPH como se indica en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Posteriormente, este precipitado se desarrolló 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

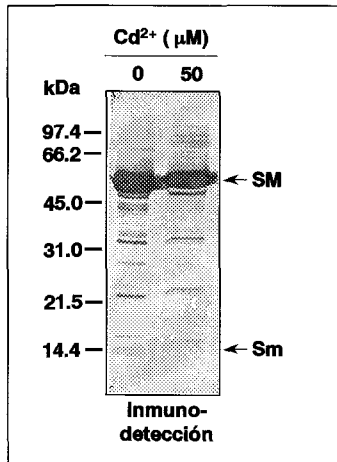
derivatizadas sin inmunoprecipitar. En la Fig. 4.17 se puede observar que los anticuerpos frente a GR (57 kDa), CAT (53 kDa) y Mn-SOD (27 kDa) dieron reacción en las proteínas derivatizadas e inmunoprecipitadas procedentes de extractos crudos de hojas tratadas con cadmio, lo que nos hace pensar que estas proteínas están modificadas oxidativamente. La catalasa también dio marcaje en extractos crudos de hojas control. 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. 4.14** 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 la Rubisco (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 correspondía a la subunidad menor (Sm) que también era detectada por el anticuerpo. Los polipéptidos que se detectan entre las dos subunidades (mayor y menor) 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 Cd<sup>2+</sup> 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  $\text{Cd}^{2+}$  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. 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  $\text{Cd}^{2+}$  (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  $\text{Cd}^{2+}$ . 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  $\text{Cd}^{2+}$  (Fig. 4.19 B).

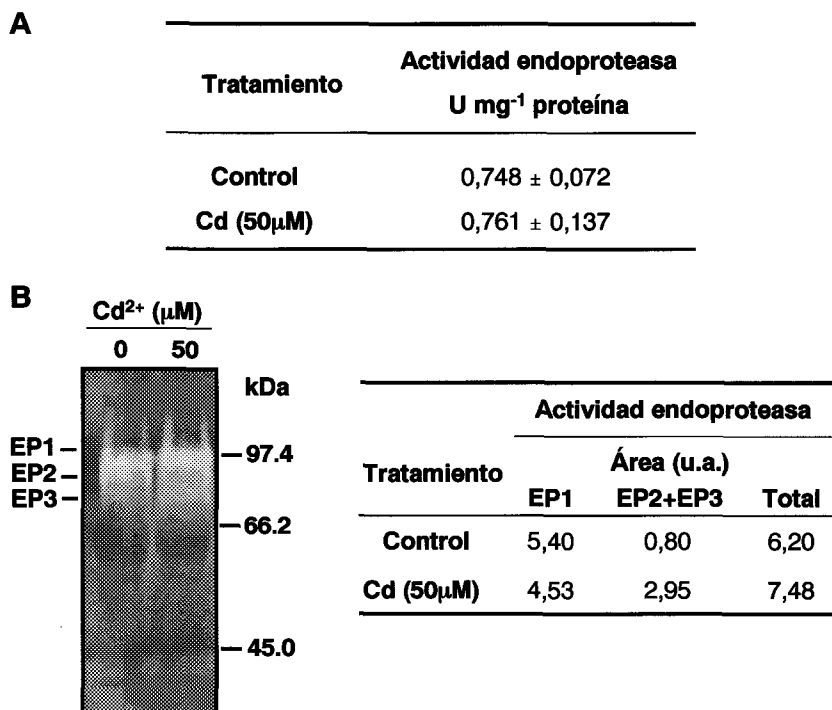
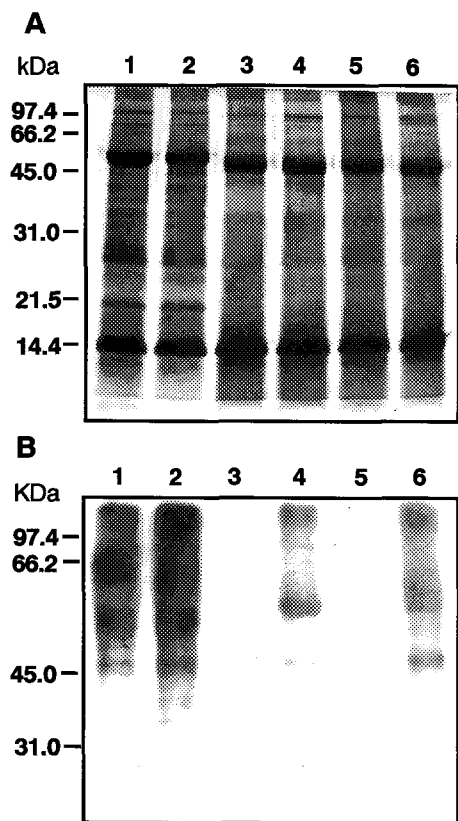


Fig. 4.19 Actividad proteolítica de extractos crudos de hojas de guisante. **A)** Actividad proteolítica total determinada por el método de la azocaseína y medido espectrofotométricamente. Los resultados son media de tres ensayos diferentes ± MDS. **B)** Detección de isoenzimas con actividad endoproteasa (EP) en geles de poliacrilamida-SDS (8%) conteniendo gelatina (0,05%) y tinción con azul de Coomassie (0,1%, p/v). 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 e 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, 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  $\text{Cd}^{2+}$  (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. Extractos crudos de hojas de guisante de plantas control y plantas tratadas con cadmio, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 h y posteriormente, fueron derivatizadas con DNPH.

**A)** Tinción con plata de las proteínas ( $10\ \mu\text{g}$ ) en un gel de poliacrilamida-SDS;

**B)** Detección inmunológica 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  $37^{\circ}\text{C}$ , sin derivatizar con DNPH (controles negativos); líneas 4 y 6, extractos crudos de plantas control y tratadas con cadmio, respectivamente, incubadas 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y derivatizadas con DNPH. En ambos casos, los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.

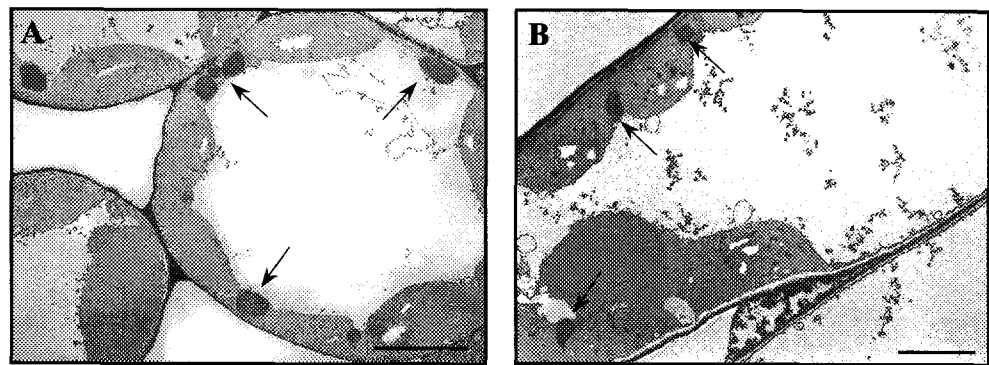
## 4.2. EFECTO DEL CADMIO EN PEROXISOMAS DE HOJAS DE GUISANTE

### 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 conteaje de los orgánulos en distintos cortes de hojas control y tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  se muestra en la Tabla 4.11. La población peroxisomal no se vio considerablemente afectada como consecuencia del tratamiento con  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\pm$  MDS. Los resultados obtenidos mostraban diferencias significativas frente a los controles ( $P < 0,0001$ )

$\text{CdCl}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	Número de orgánulos 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  $\mu\text{m}$ .

## 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  $\mu\text{M}$ , 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  $\text{g}/\text{cm}^3$  (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.

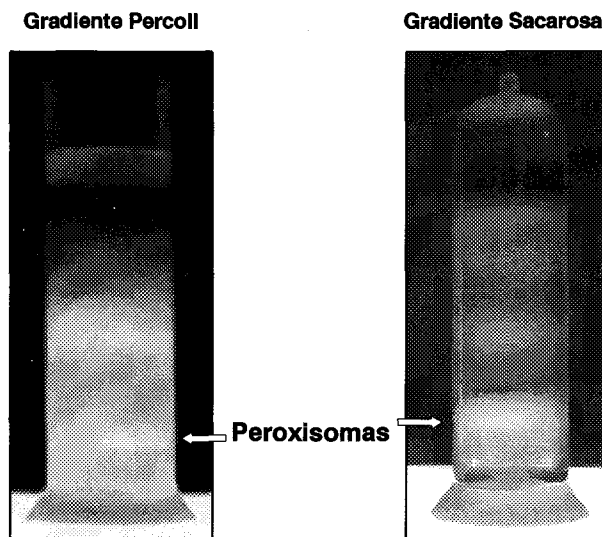


Fig. 4.22 Purificación de peroxisomas de hojas de guisante por centrifugación en gradientes de densidad de Percoll y sacarosa.

### 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  $\text{Cd}^{2+}$  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).

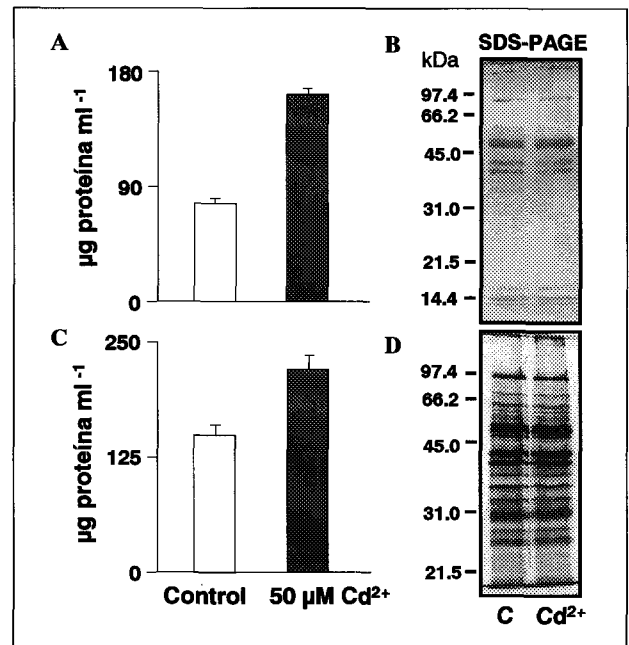


**Fig. 4.23** Efecto del cadmio sobre la concentración de proteínas totales de peroxisomas de hojas y una vez separadas por EGPA-SDS.

**A)** Fracción soluble de peroxisomas (matrices).

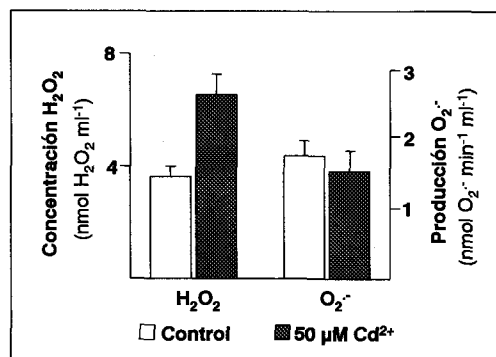
**C)** Peroxisomas completos.

**B) y D)** Matrices de peroxisomas (15  $\mu\text{g}$ ) y peroxisomas completos (10  $\mu\text{g}$ ), separados por EGPA-SDS y revelados con azul de Coomassie y plata, respectivamente..



#### 4.2.2.2. Producción de Especies de Oxígeno Reactivo (ROS)

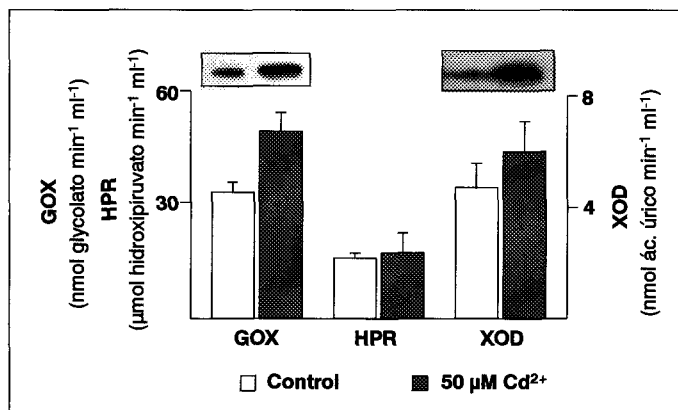
Se determinó el contenido de peróxido de hidrógeno en peroxisomas intactos, observándose una concentración de casi el doble, en peroxisomas de plantas tratadas con cadmio en comparación con los peroxisomas de las plantas control (Fig. 4.24). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la producción de radicales superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), 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 control y Cd. La concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\pm$  MDS.

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

La actividad XOD, responsable de la producción de  $O_2^-$  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 inmunológica 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).

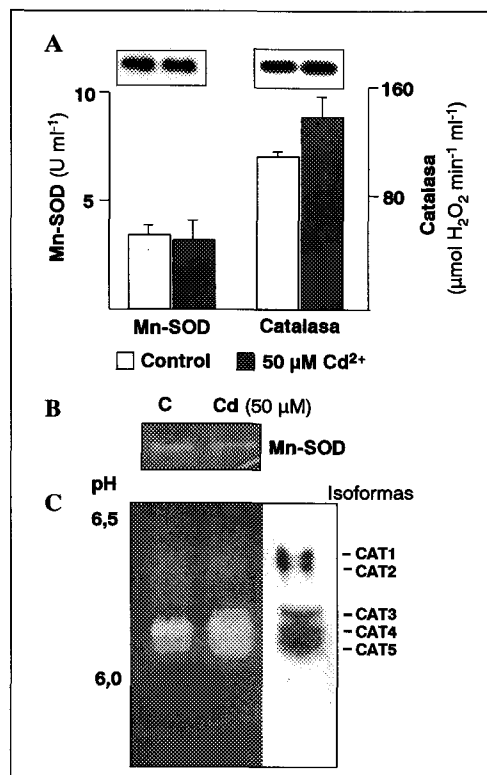


**Fig. 4.25** Efecto del cadmio sobre las actividades enzimáticas relacionadas con la producción de especies de oxígeno activado. Las medidas se realizaron en matrices de peroxisomas concentradas y cada valor representa la media de cuatro lotes de peroxisomas diferentes  $\pm$  MDS. Las bandas se obtuvieron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

#### 4.2.2.4. Mn-SOD y Catalasa

La actividad Mn-SOD, presente en matrices peroxisomales y encargada de desproporcionar los radicales  $O_2^-$ , no presentó cambios significativos en los peroxisomas de plantas tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  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 (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). El análisis de las diferentes isoformas de catalasa por isoelectroenfoque (IEF), reveló la presencia de cinco isoformas, designadas como CAT1-5, con puntos isoelectrónicos 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 más prominentes en ambos casos y mostraban un ligero aumento con el tratamiento de  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que las isoformas más básicas (CAT1 y 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 estas 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** Efecto del cadmio sobre las actividades Mn-SOD y catalasa (CAT) en peroxisomas de hojas de guisante.

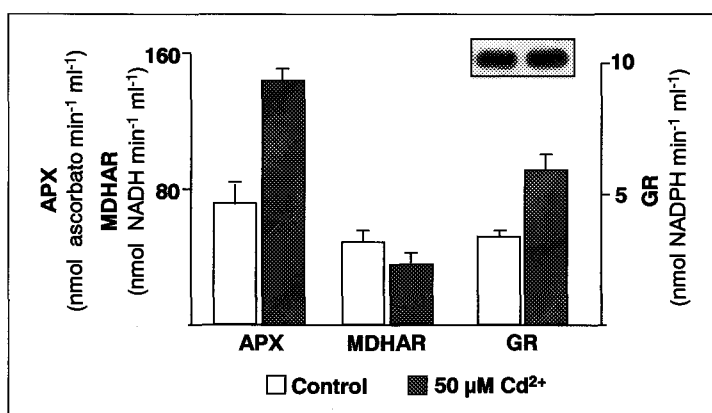
**A)** Western y actividad enzimática total. Cada valor representa la media de cuatro experimentos independientes  $\pm$  MDS.

**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 pepino.

#### 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  $\text{Cd}^{2+}$  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 (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  $\pm$  MDS. 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 incremento de 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).

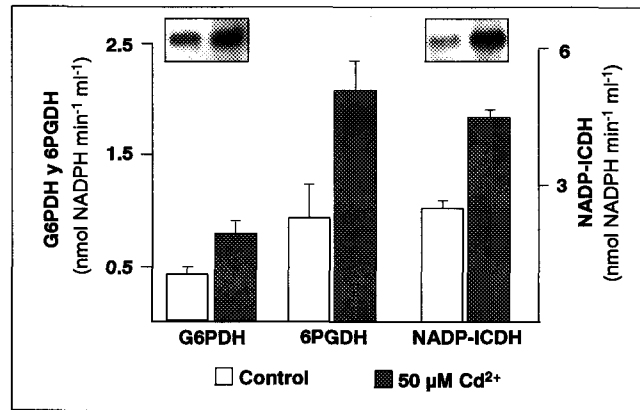
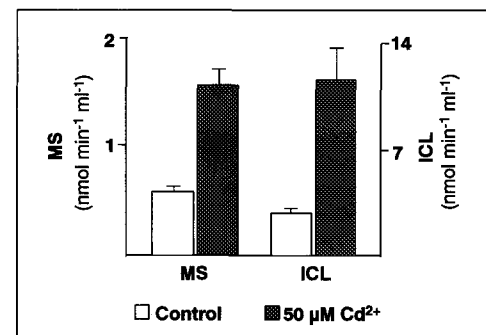


Fig. 4.28 Efecto del cadmio sobre la actividad de las deshidrogenasas dependientes de NADP, en matrices concentradas de peroxisomas de hojas. Cada valor representa la media de cuatro lotes diferentes de peroxisomas  $\pm$  MDS. Las bandas corresponden a los ensayos Western con anticuerpos específicos 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

La actividad de las enzimas del ciclo del glioxilato, malato sintasa (MS) e isocitrato liasa (ICL), en peroxisomas de hojas 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  $\pm$  MDS



### 4.2.3. Daños Oxidativos Causados por el Cadmio en Peroxisomas

#### 4.2.3.1. Integridad de los Peroxisomas

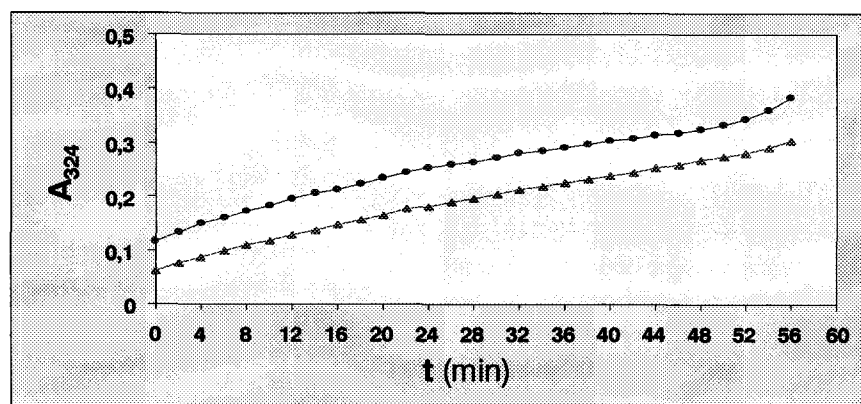
Para llevar a cabo estudios de integridad de peroxisomas se procedió al aislamiento de los orgánulos mediante centrifugación en gradientes de densidad de Percoll, que se elimina fácilmente por dilución sin que los orgánulos sufran choque osmótico. La integridad de los orgánulos obtenidos se determinó 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  $\text{Cd}^{2+}$ , 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

$\text{Cd}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Hidroxipiruvato reductasa ( $\mu\text{mol}$ hidroxipiruvato $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ )		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

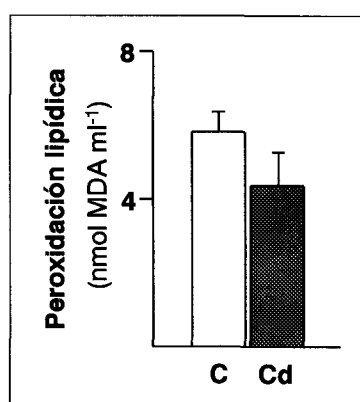
Para completar los estudios de integridad de los orgánulos se realizó un estudio de la permeabilidad de la membrana de los peroxisomas obtenidos por centrifugación en gradientes de Percoll. Para ello, los peroxisomas íntegros se incubaron con glicolato oxidasa comercial y se midió la salida de sustrato, 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  $\text{Cd}^{2+}$  (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 Cd<sup>2+</sup>, observándose incluso una ligera disminución de la peroxidación en las membranas de plantas cultivadas con Cd<sup>2+</sup> 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  $\pm$  MDS.

#### 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  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\text{Cd}^{2+}$  respecto a las plantas control, similar al observado en extractos crudos.

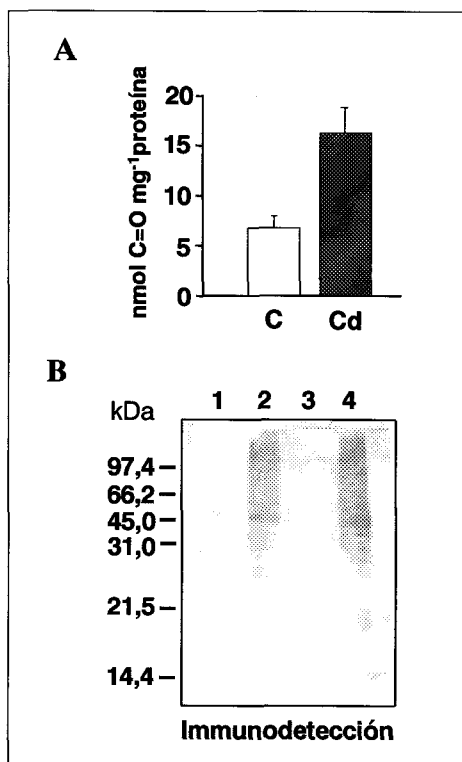


Fig. 4.32 Oxidación de proteínas de peroxisomas en hojas de plantas control y tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$ .

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

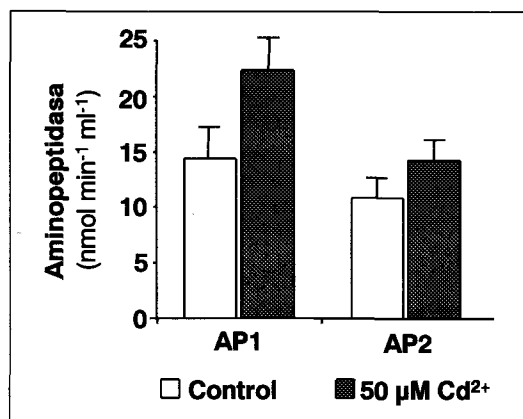
B) Detección inmunoquímica de grupos carbonilo. Las líneas 1 y 2 corresponden a peroxisomas de plantas control no derivatizados (blanco) y derivatizados con DNPH, respectivamente. Las líneas 3 y 4 corresponden a peroxisomas de plantas tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  no derivatizados (blanco) y derivatizados con DNPH, respectivamente. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de proteínas (10  $\mu\text{g}$ ). Los marcadores de masa molecular se sitúan a la izquierda.



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

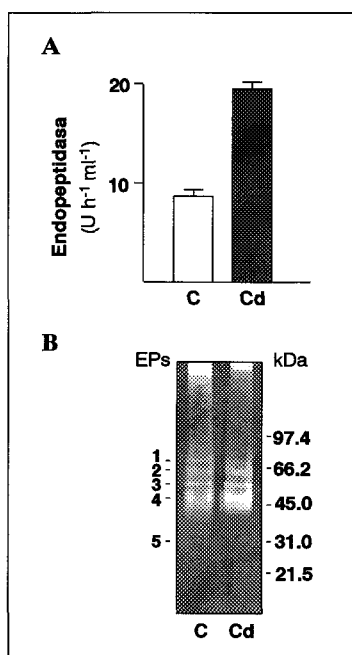
La actividad de las proteasas peroxisomales (exo- y endopeptidasas) se determinó espectrofotométricamente y mediante EGPA, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes, según se ha indicado en el apartado 11.16 de Material y Métodos. En geles de poliacrilamida en condiciones nativas se detectaron dos isoenzimas de leucina aminopeptidasa, tanto en las plantas tratadas con cadmio como en las plantas control, y de acuerdo con su movilidad electroforética 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. La cuantificación de las bandas de actividad por densitometría, mostró un incremento de ambas actividades en las plantas tratadas con Cd del 55 y 31%, 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. 4.44 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 (Fig. 4.44 B). En la Tabla 4.13 se presenta la masa molecular de cada isoenzima, así como su actividad en plantas control y tratadas con cadmio. Excepto la EP5, que apenas se observaba en peroxisomas de plantas

tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$ , la actividad de las otras isoenzimas aumentaba con el tratamiento, siendo la EP4 la isoenzima más prominente en ambos casos.



**Fig. 4.34** Actividad y patrón isoenzimático de las endopeptidasas de peroxisomas (EP) en plantas control y tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ .

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

**B)** Actividad EP de matrices peroxisomales (15  $\mu\text{g}$ ) en geles de poliacrilamida-SDS conteniendo gelatina (6-12%).

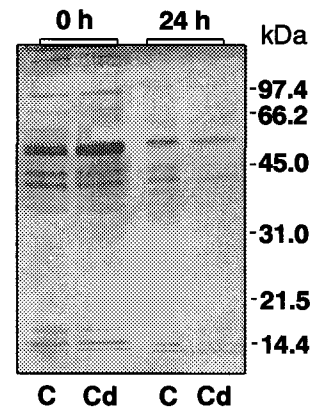
**Tabla 4.13** Endopeptidasas (EP) de peroxisomas de hojas de plantas control y tratadas con cadmio 50  $\mu\text{M}$ .

Isoenzima	Masa molecular (kDa)	Actividad (U h <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	
		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  $\text{Cd}^{2+}$  y el control.

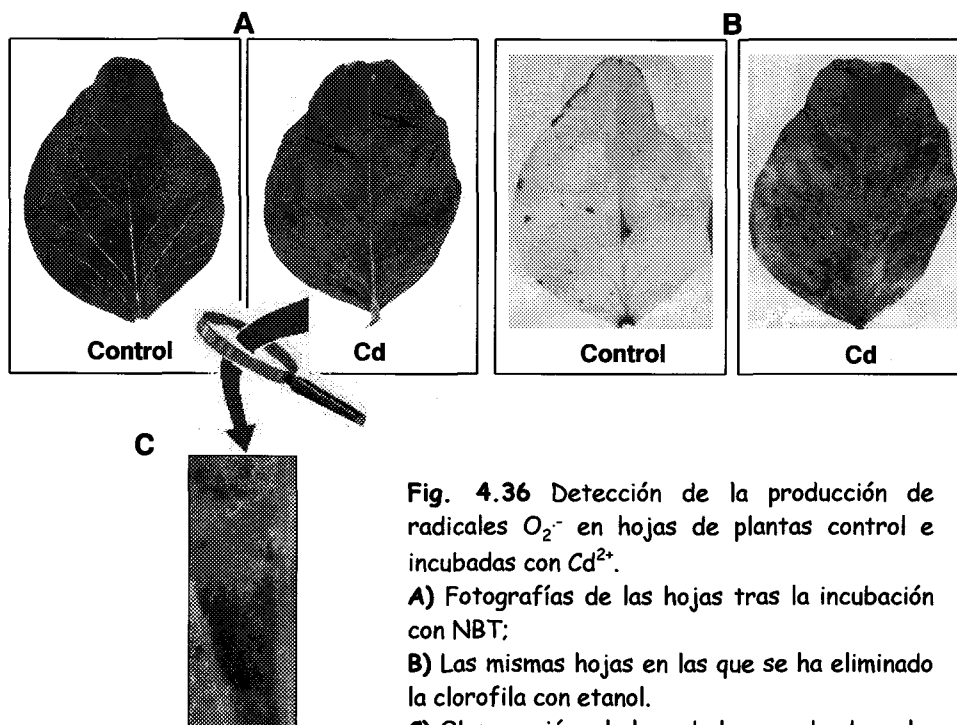
**Fig. 4.35** Degradación de las proteínas peroxisomales por EPs endógenas. Las matrices peroxisomales se incubaron durante 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y se analizaron mediante EGPA-SDS (12%) y tinción con azul Coomassie.



### 4.3. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO 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 e incubadas con  $Cd^{2+}$ .

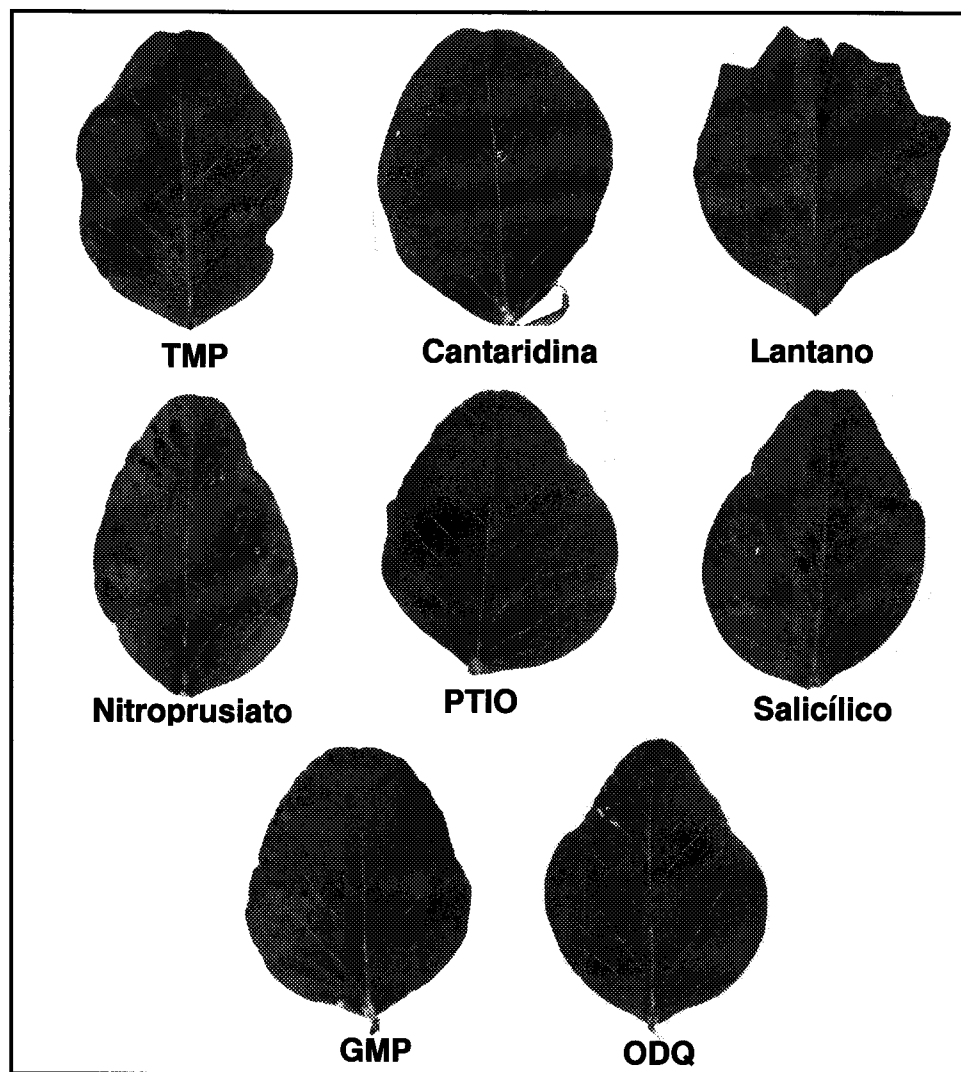
**A)** Fotografías de las hojas tras la incubación con NBT;

**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 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,

inhibidores de proteín quinasas y GMPc, respectivamente, anulaban la generación de  $O_2^-$ , 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  $O_2^-$ , mientras que el PTIO, un secuestrador de  $NO$ , anulaba los precipitados debidos al  $O_2^-$ . La incubación con 8-Br-cGMP, estimulaba la generación de radicales  $O_2^-$ , así como 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  $O_2^-$ ), **cantaridina** 5 $\mu$ M (inhibidor de proteín quinasas), **LaCl<sub>3</sub>** 1mM (bloqueante de canales de calcio), **nitroprusiato sódico** 0,5 mM (donador de NO), **PTIO** 150  $\mu$ M, (secuestrador de  $NO$ ), **ácido salicílico** 1mM, **8-Br-cGMP** 100  $\mu$ M (donador de GMP cíclico) y **ODQ** 200  $\mu$ M, (inhibidor de GMP cíclico).

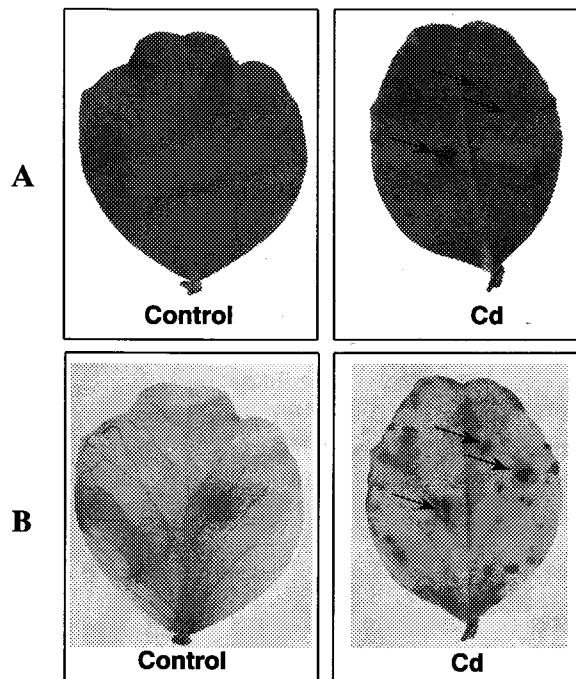
### 4.3.2. Producción de $H_2O_2$

La producción de  $H_2O_2$  se determinó mediante infiltración de las hojas con DAB al igual que en el caso de los radicales  $O_2^-$ , también se encontró una mayor acumulación de  $H_2O_2$  en hojas completas de plantas tratadas con  $Cd^{2+}$  en comparación con las plantas control (Fig 4.38 A). Para una mejor observación de las manchas provocadas por la producción de  $H_2O_2$ , 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 NAC 20 mM que actúan como secuestradores de  $H_2O_2$ . 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  $H_2O_2$  utilizado (Fig. 4.39).

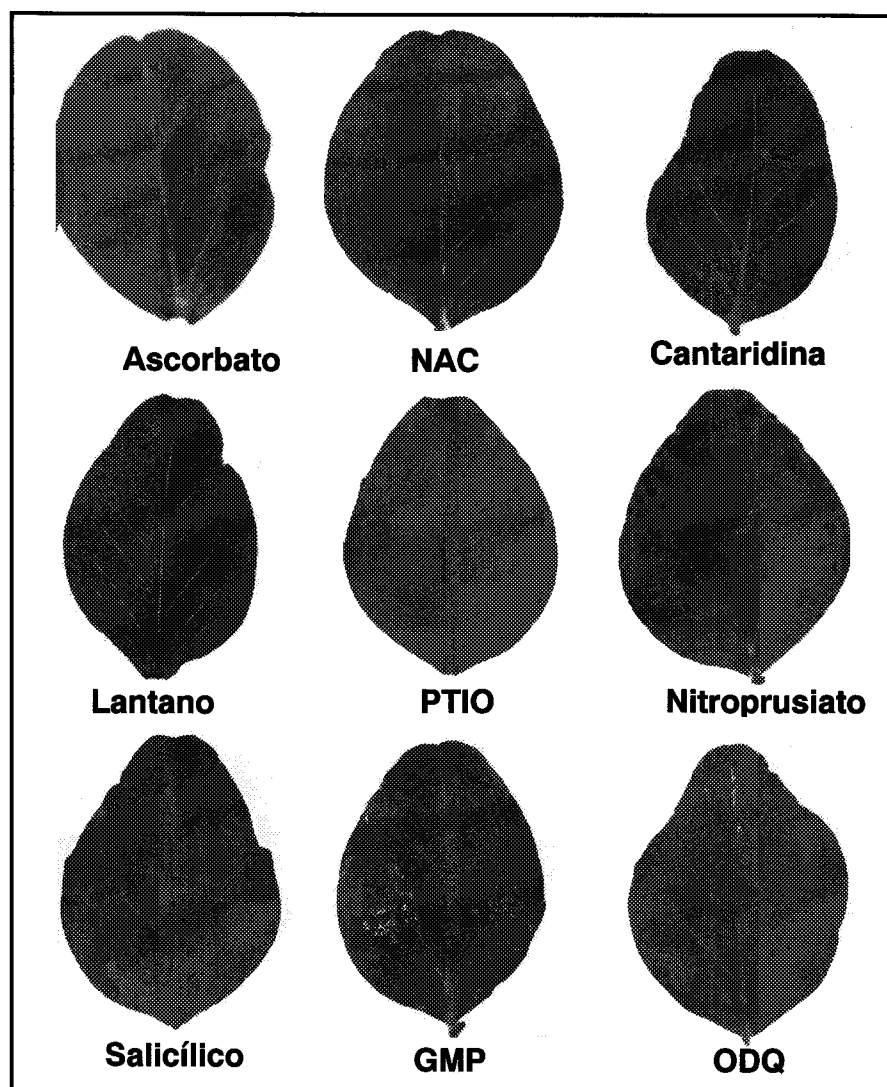
**Fig. 4.38** Detección de la producción de  $H_2O_2$  en hojas de plantas de guisante control e incubadas con  $Cd^{2+}$ .

**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  $H_2O_2$  se indica con una flecha.



El uso de diferentes inductores/inhibidores de la producción de  $H_2O_2$ , 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  $H_2O_2$ , 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).

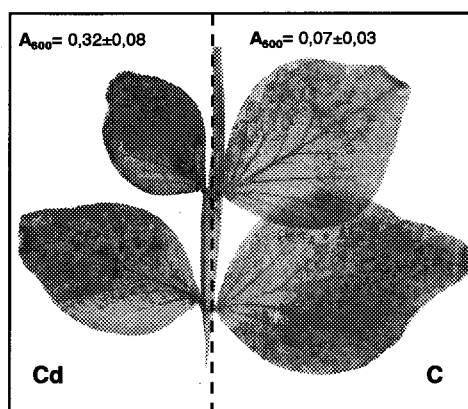


**Fig. 4.39** Efecto de diferentes inductores/inhibidores en la producción de  $H_2O_2$  en hojas completas de plantas tratadas con cadmio. El  $H_2O_2$  se visualizó en las hojas por infiltración con DAB, que origina manchas oscuras, debidas a su oxidación por el agua oxigenada. **ácido ascórbico** 1mM; **NAC** 20 mM, N-acetil-cisteína (secuestrador de  $H_2O_2$ ), **cantaridina** 5 $\mu$ M (inhibidor de protein quinasas), **LaCl<sub>3</sub>** 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-a]quinoxalin-1-ona (inhibidor de GMP cíclico).

### 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 aquéllas células que tienen dañada la membrana. Para ésto, se infiltraron peciolos de hojas de guisante según se indicó en el apartado 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  $\pm$  MDS y las diferencias son significativas según el test de Duncan ( $P < 0,001$ ).



### 4.3.4. Medidas de Conductividad

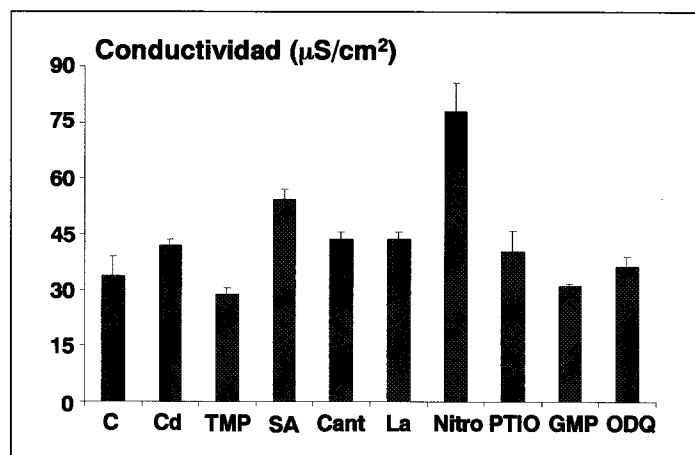
Como marcador adicional de muerte celular se determinó la pérdida de electrolitos mediante cambios de la conductividad en discos foliares de hojas incubados durante 3 h en agua ultrapura (milli-Q), utilizándose hojas de plantas control y tratadas con cadmio. Paralelamente, se determinó el efecto de distintos moduladores (inductores/inhibidores) de procesos de señalización sobre la conductividad de las hojas tratadas con Cd<sup>2+</sup>. 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<sub>2</sub><sup>-</sup>, el TMP. La incubación con ácido salicílico y el nitroprusiato sódico, un donador de NO<sup>•</sup>, 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  $\text{Cd}^{2+}$  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  $\text{O}_2^-$ ); **SA** 1mM, ácido salicílico; **Cant** 5 $\mu\text{M}$ , cantaridina (inhibidor de protein quinasas); **LaCl<sub>3</sub>** 1mM (bloqueante de canales de calcio); **Nitro** 0,5 mM, nitroprusiato de sodio (donador de NO); **PTIO** 150  $\mu\text{M}$ , (secuestrador de NO $\cdot$ );

**8-Br-cGMP** 100  $\mu\text{M}$  (donador de GMP cíclico); y **ODQ** 200  $\mu\text{M}$ , (inhibidor de GMP cíclico). Cada valor representa una media de tres réplicas y las barras de error representan la mínima diferencia significativa (MDS) según el test de Duncan.



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

### 4.4.1. Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )

En cortes de hoja de plantas de guisante control y tratadas con  $Cd^{2+}$  50  $\mu M$  se estudió la acumulación de  $H_2O_2$  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  $H_2O_2$ , 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  $H_2O_2$  en las plantas tratadas con cadmio, se preincubaron las muestras con un inhibidor de peroxidasas (Na-azida), 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-oxidasas en la producción de  $H_2O_2$  (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14** Efecto de distintos inhibidores sobre la acumulación de  $H_2O_2$  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  $CeCl_3$ . Los resultados (+) y (-) expresan presencia o ausencia, respectivamente de precipitados de Ce dependientes de  $H_2O_2$ . Los resultados presentados se han obtenido en cuatro experimentos diferentes.

Tratamiento	Acumulación de $H_2O_2$
DPI (10 $\mu M$ )	-
$NaN_3$ (1 mM)	+
Catalasa (0,25 mg/ml)	+
Aminotriazol (1 mM)	+

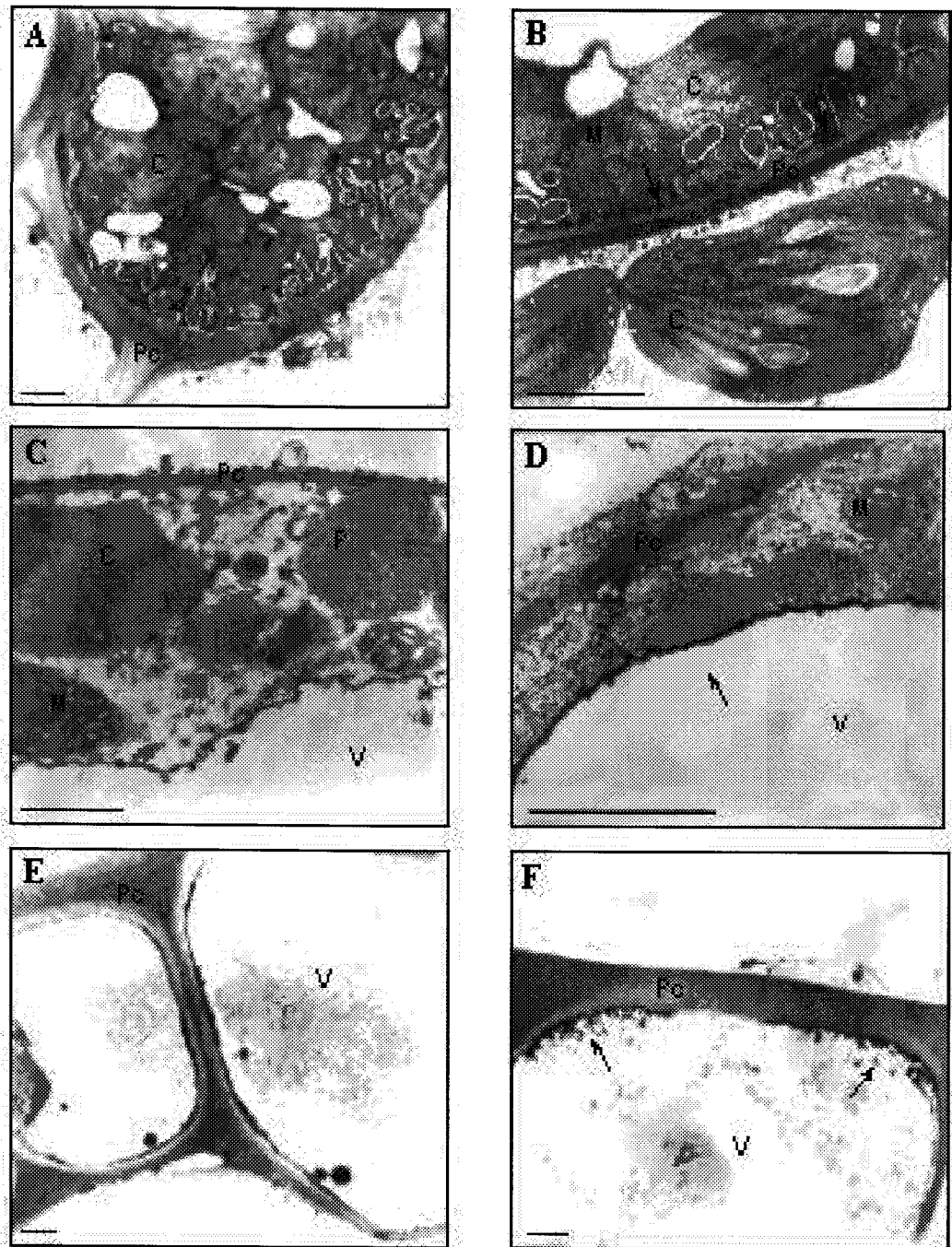
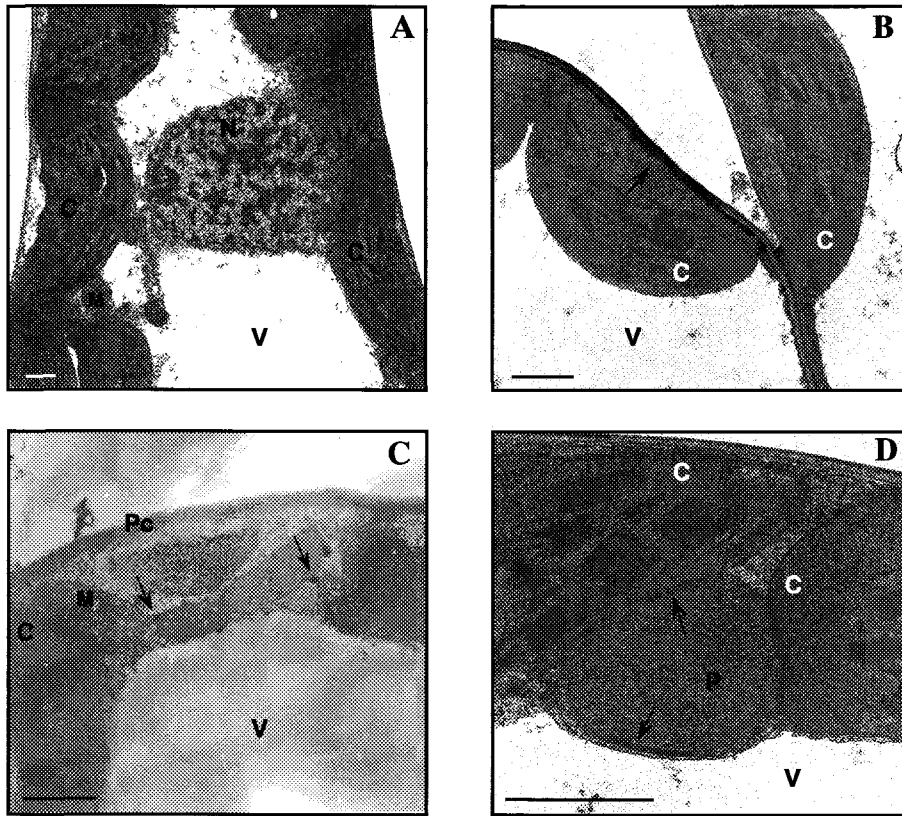


Fig. 4.42 Localización de  $H_2O_2$  en hojas de guisante mediante citoquímica con  $CeCl_3$  y microscopía electrónica de transmisión. A, C y E corresponden a cortes de hojas de plantas control, mientras que B, D y F corresponden a cortes de hojas de plantas tratadas con cadmio. A y B, células de transferencia 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  $\mu m$ . C: cloroplasto; M: mitocondria; Pc: pared celular; P: peroxisoma; V: vacuola.

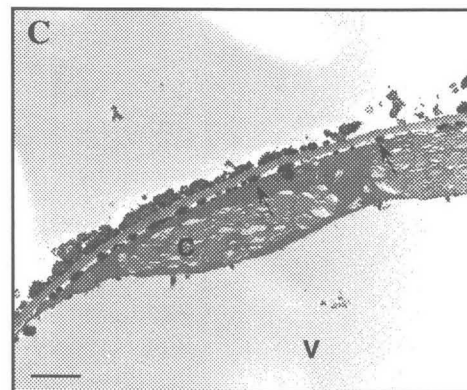
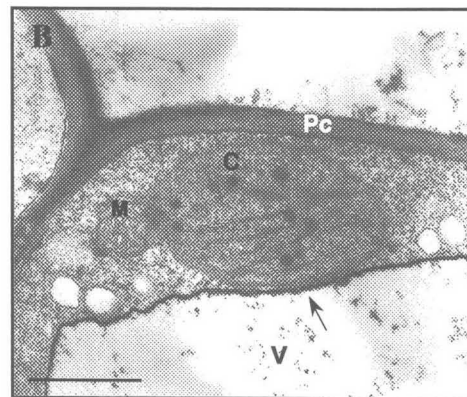
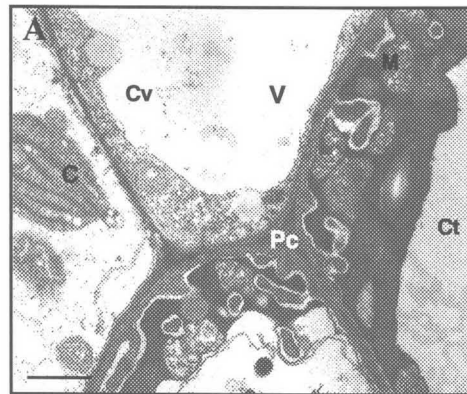


**Fig. 4.43** Localización de acumulación de  $H_2O_2$  en células del mesófilo de hojas de guisante mediante citoquímica con  $CeCl_3$  y microscopía electrónica de transmisión. **A**, cortes de hojas de guisante control; **B**, **C** y **D**, cortes de hojas de guisante tratados con cadmio. Las flechas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

#### 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 (que elimina radicales

$O_2^-$ ), 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.

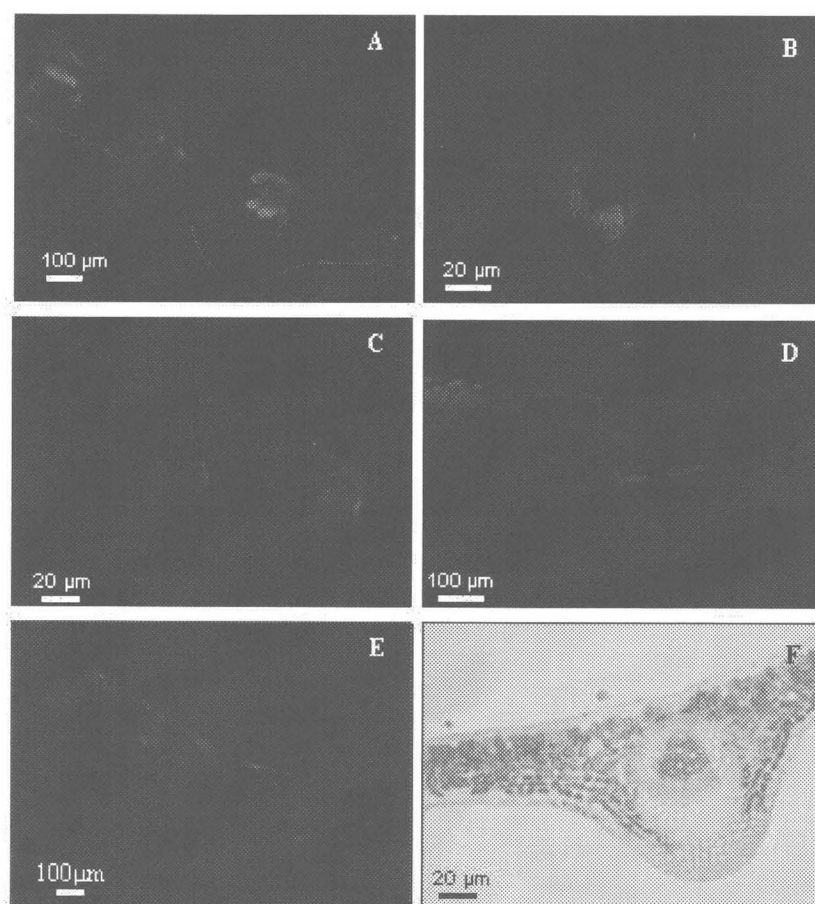
**B y C)** células de la vaina y del mesófilo, respectivamente, de cortes de hojas de guisante tratadas con cadmio. Las flechas muestran precipitados de Mn/DAB.

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

#### 4.4.3. Óxido Nítrico ( $NO^\cdot$ )

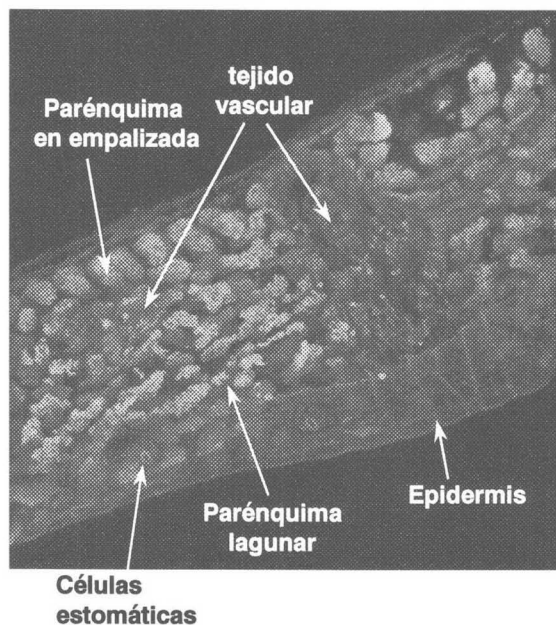
La detección de  $NO^\cdot$  se realizó mediante reacción con diacetato de diaminofluoresceína (DAF2-DA) y observación de la fluorescencia al microscopio láser confocal a una longitud de onda de

495-515 nm, como se indica en el apartado 23.3 de Material y Métodos. Como se muestra en la Fig. 4.45, en plantas control la detección de  $\text{NO}^\cdot$  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  $\text{NO}^\cdot$  observada era dependiente de esta enzima (Fig. 4.45 C). Como control negativo, se observaron cortes incubados en tampón sin DAF2-DA (Fig. 4.45 D). En la Fig. 24 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  $\text{Cd}^{2+}$  se observó una reducción de la formación de  $\text{NO}^\cdot$  (Fig. 4.45 B) y esta reducción era mayor en hojas senescentes (Fig. 4.45 E).



**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  $\text{Cd}^{2+}$ ; **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.

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  $\text{NO}^\cdot$  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  $\text{NO}^\cdot$  se detectó por su fluorescencia verde, y estaba localizado fundamentalmente en la epidermis, haces vasculares y estomas.

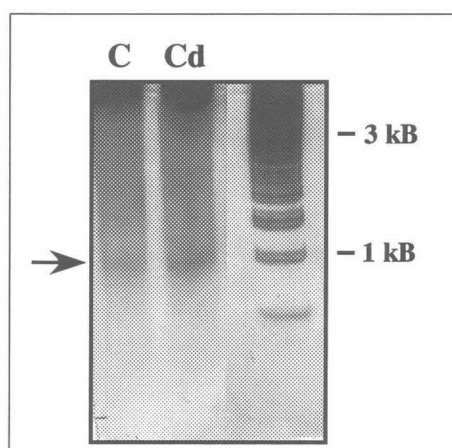


## 4.5. ESTUDIOS DE MUERTE CELULAR Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES INDUCIDAS POR CADMIO

### 4.5.1. Ensayos de Apoptosis

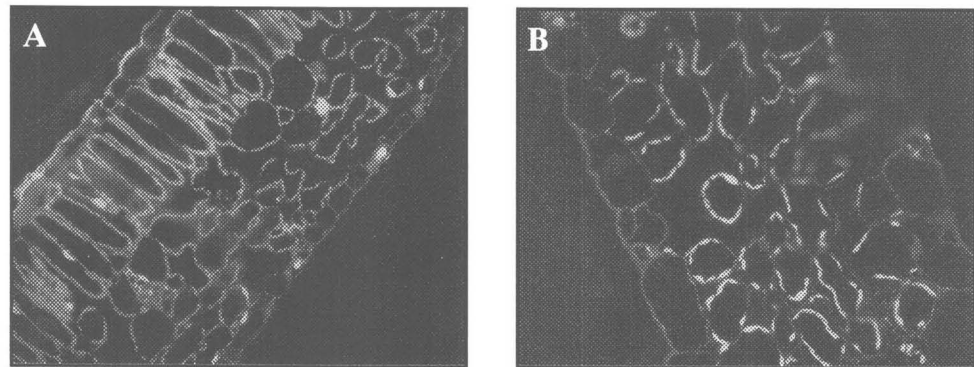
Uno de los marcadores bioquímicos de la apoptosis es la degradación del ADN genómico por endonucleasas internas, con formación de fragmentos mono- y oligonucleosómicos. Estos fragmentos cuando se someten a electroforesis se distribuyen en forma de escalera constituida por múltiples subunidades de aproximadamente 180 pares de bases. Con el fin de detectar posibles procesos de apoptosis inducidos por  $\text{Cd}^{2+}$ , 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  $\text{Cd}^{2+}$ . 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-naiva 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  $\text{Cd}^{2+}$  preparados en resina LRW, tal y como se describe en el apartado 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  $\text{Cd}^{2+}$ . En ambos casos, no se observó la reacción positiva de núcleos apoptóticos caracterizada por la aparición de fluorescencia de color verde-amarillo intenso.

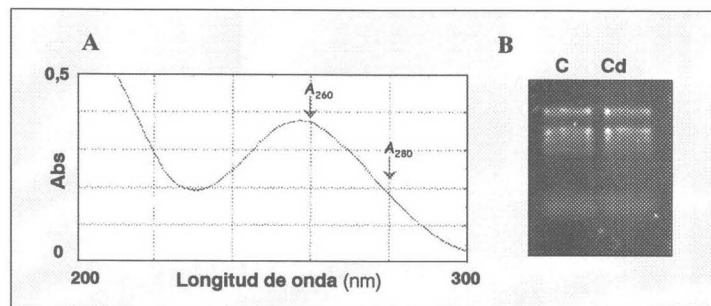




**Fig. 4.48** Técnica TUNEL para la detección de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia en cortes de hojas de plantas control (A) y tratadas con  $\text{Cd}^{2+}$  (B)

#### 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 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% (Fig. 4.49).

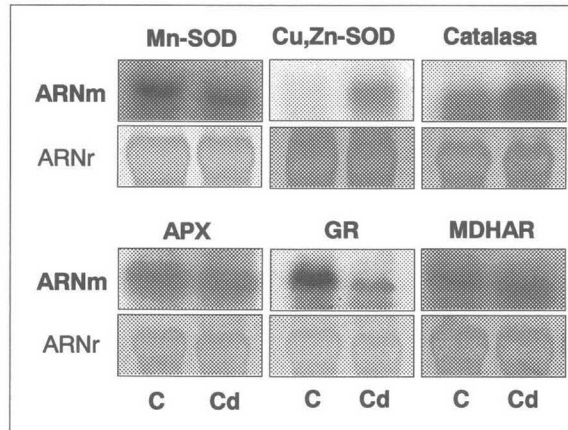


**Fig.4.49** Cuantificación e integridad del ARN de hojas de guisante. A) Para determinar la pureza del ARN se midió la absorbancia entre 200-300 nm y se cuantificó a partir de la  $\text{DO}_{260}$ . B) La integridad del ARN (150 ng) se comprobó en geles de agarosa-TBE al 0,8%.

Para determinar la expresión de enzimas antioxidantes, se partió de 15  $\mu\text{g}$  de ARN total obtenido de hojas de plantas control y tratadas con cadmio 50  $\mu\text{M}$ , 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 27 de Material y Métodos y las membranas se hibridaron con distintas sondas específicas marcadas con  $^{32}\text{P}$ . Después de la exposición de las películas autorradiográficas entre 2 y 15 días, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se observó una inducción de la expresión de las enzimas CuZn-SOD y CAT, por efecto del tratamiento con cadmio, mientras que

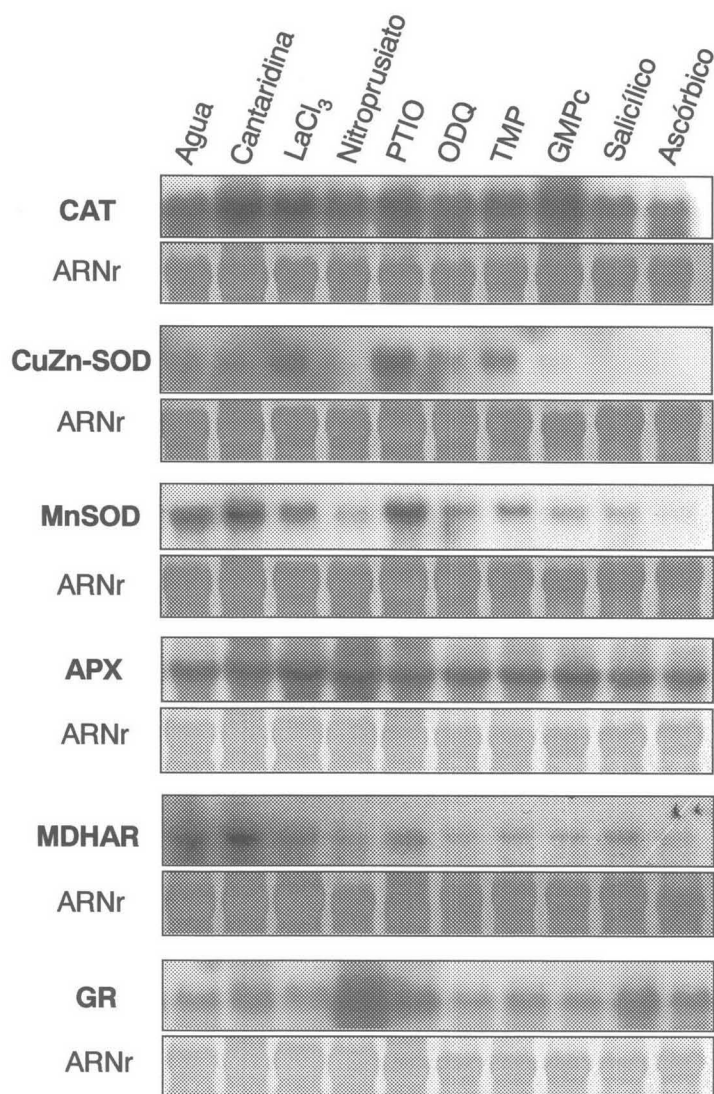
disminuía la expresión de la GR. Sin embargo, no se observaron diferencias claras en los niveles de transcritos de la Mn-SOD, APX y MDHAR como consecuencia del tratamiento con el metal (Fig. 4.50).

**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 5mM (inhibidor de protein quinasas), LaCl<sub>3</sub> 1mM (bloqueante de canales de calcio), nitroprusiato sódico 0,5 mM (donador de NO<sup>•</sup>), PTIO 150 mM, 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolinona-3-óxido (secuestrador de NO<sup>•</sup>), ODQ 200 mM, 1H-[1,2,4]-oxadiazol<sup>o</sup> [4,3-a]quinoxalin-1-ona (inhibidor de GMP cíclico), TMP 1mM, tetrametilpiperidonooxi (secuestrador de radicales O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), 8-Br-cGMP 100 mM (donador de GMP cíclico) y ácido salicílico 1mM. El ARN se transfirió a una membrana de nylon en las condiciones indicadas en el apartado 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 $\mu$ M (inhibidor de protein quinasas), **LaCl<sub>3</sub>** 1mM (bloqueante de canales de calcio), **nitroprusiato sódico** 0,5 mM (donador de NO<sup>•</sup>), **PTIO** 150  $\mu$ M (secuestrador de NO<sup>•</sup>), **ODQ** 200  $\mu$ M (inhibidor de GMP cíclico), **TMP** 1mM (secuestrador de radicales O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), **8-Br-cGMP** 100  $\mu$ M (donador de GMP cíclico), **ácido salicílico** 1mM y **ácido ascórbico** 1mM.

Como se puede observar en la Fig. 4.51, el nivel de transcritos de la CAT aumentaba por incubación con la cantaridina (un inhibidor de proteín fosfatasas), el  $\text{LaCl}_3$  (un inhibidor de canales de calcio), el PTIO (un secuestrador de  $\text{NO}\cdot$ ) y con el GMPc en forma de 8-Br-GMP. La incubación con ácido ascórbico, utilizado como secuestrador de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producía una reducción considerable del nivel de transcritos de CAT. La expresión de la CuZn-SOD aumentaba por efecto del  $\text{LaCl}_3$ , el PTIO y el TMP (secuestrador de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), y era fuertemente reprimida por el ácido ascórbico, el ácido salicílico y el GMP. A su vez, el nivel de transcritos de la Mn-SOD se incrementaba por la cantaridina y el PTIO y era reprimida por el nitroprusiato sódico (un donador de  $\text{NO}\cdot$ ), y por el ácido ascórbico y, en menor medida, por el ácido salicílico, el GMP, el TMP y el ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa). La expresión de la APX era ligeramente inducida por el  $\text{LaCl}_3$ , el nitroprusiato y el GMP, y ligeramente reducida por la incubación con la cantaridina y el PTIO. El nivel de transcritos de MDHAR era fuertemente reprimida por todos los compuestos utilizados, salvo la cantaridina que inducía ligeramente su nivel. 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***

## 5.DISCUSIÓN

El propósito del trabajo que se presenta en esta memoria 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 su toxicidad. Para ello, se ha abordado el estudio utilizando distintas aproximaciones: estudios fisiológico, bioquímicos, estructurales y a nivel molecular, haciendo especial incapié en cambios inducidos por Cd en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y sus posibles implicaciones en el metabolismo celular.

Los diferentes abordajes utilizados tienen como finalidad integrar el mayor número de información a distintos niveles que nos permita avanzar en nuestro conocimiento de los mecanismos íntimos implicados en la toxicidad del Cd, y de esta forma, establecer las bases para posteriores investigaciones encaminadas a aliviar la sintomatología o bien prevenir su toxicidad.

### 5.1 Efecto del Cadmio sobre el Crecimiento y Metabolismo Oxidativo en Extractos de Hojas de Guisante

En primer lugar se ha analizado el efecto de distintas concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  (0-50  $\mu\text{M}$ ) sobre el crecimiento y distintos parámetros fisiológicos y en definitiva, sobre el estado fisiológico de la planta, con el fin de seleccionar una concentración adecuada para realizar posteriores estudios a nivel subcelular. Como resultado de ello hemos 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 de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  en el medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los descritos en la misma especie vegetal por Hernández y col. (1998) y Dixi y col. (2001). Este efecto era más acusado en hojas, mientras que en raíces solo se ha detectado reducción significativa del crecimiento con la mayor concentración de cadmio (50  $\mu\text{M}$ ), 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 sulfuro-Cd tal como se ha descrito en *Arabidopsis* (Howden y col., 1995). Posiblemente, la menor sensibilidad de las raíces al cadmio se deba a su capacidad para acumularlo de forma no activa, 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 bien 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 la presencia de Cd induce la aparición de síntomas de clorosis,

pardecimiento de los márgenes de las hojas o curvatura de las mismas (Ouzounidou y col., 1997; Skórzynska-Polit y Baszynski, 1997; Baryla y col., 2001). Sin embargo, el análisis de la estructura de la hoja a microscopía óptica muestra alteraciones de la misma caracterizadas por aumento del tamaño de las células del parénquima en empalizada y de los espacios intercelulares, así como una reducción del número y tamaño de los cloroplastos.

La reducción del crecimiento dependiente de Cd podría deberse a una inhibición de 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\gamma$ -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 50  $\mu\text{M}$  de cadmio. En esta inhibición de la tasa fotosintética está presuntamente implicada la disminución en el contenido de clorofila dependiente de la concentración de Cd. De hecho, en otras especies vegetales se ha demostrado que el cadmio provoca una merma 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  $\text{CO}_2$  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), la deficiencia de Ca inducida por Cd podría de esta forma afectar al PSII, como se ha descrito en trigo (Ouzounidou y col., 1997). El transporte electrónico en el PSII también se encuentra reducido en respuesta al Cd en plantas de *Beta vulgaris* (Greger y Ögren, 1991), mientras que no se ve afectado en plantas de *Brassica juncea* (Haag-Kerver y col., 1999). En plantas de guisante también se ha descrito reducción de la fotosíntesis neta por Cd que iba acompañado de inhibición de las actividades Rubisco, gliceraldehído-3-P-deshidrogenasa y fructosa 1,6-bifosfatasa (Lakshaman y Surinder, 1999). 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). La reducción observada en el número de cloroplastos también contribuye a la reducción de la fotosíntesis neta y la productividad. En plantas de *Brassica napus* la reducción del número de cloroplastos por célula ha sido relacionada con interferencias del cadmio en la replicación de los cloroplastos (Baryla y col., 2001). La inhibición de las actividades implicadas en el ciclo de Calvin podría ser responsable de la disminución en la productividad de las plantas (de Filippis y Ziegler, 1993; Siedlecka y col., 1997; Skórzynska-Polit y Baszynski, 1997; Lakshaman y Surinder, 1999).

Alteraciones en el intercambio gaseoso a través de los estomas pueden limitar la fotosíntesis neta y por tanto la productividad vegetal. En este sentido, el análisis mediante microscopía de barrido de la superficie abaxial de hojas de guisante muestra un mayor número de estomas cerrados en respuesta al Cd, lo que llevaría consigo una disminución del CO<sub>2</sub> 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 presente en la solución nutritiva. El efecto del Cd sobre la transpiración es complejo y aparentemente va a depender de la concentración del metal, especie vegetal, y periodo de tratamiento. Así, el Cd produce una reducción de la transpiración en *Picea abies* (Schlegel y col., 1987), y *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 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<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) 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). Así, la deficiencia de Ca observada en plantas de guisante podría afectar 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 alteraciones en el balance hormonal (Poschenrieder y Barceló, 1999).



El análisis del contenido de Cd en distintos tejidos demuestra que as plantas de guisante acumulan cadmio fundamentalmente en la raíz existiendo una relación lineal entre la concentración de Cd en el medio y la acumulación del metal en la raíz en un rango comprendido entre 0 y 30  $\mu\text{M}$  de cadmio, alcanzando una meseta con 30-50  $\mu\text{M}$ . Esta capacidad para acumular Cd en las raíces está de acuerdo con resultados previos obtenidos en la misma especie vegetal (Leita y col., 1993; Lozano-Rodríguez y col., 1997), en maíz (Lozano-Rodríguez y col., 1997), judía (Leita y col., 1993) o mostaza (Salt y col., 1995), entre otros la entrada del metal en células de la raíz parece llevarse a cabo de un modo bifásico: a través de transportadores saturables y a través de canales de membrana por difusión y asociados al apoplasto (Cohen y col., 1998; Nies, 1995). Una vez en la raíz, el cadmio puede asociarse con grupos carboxilos o sulfhidrilos componentes de la pared celular o acomplejarse a 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 células de la raíz, siendo este un comportamiento característico de aproximadamente el 50% de las leguminosas (Lozano-Rodríguez y col., 1997). La translocación del  $\text{Cd}^{2+}$  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., 1995). 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 detectaron acúmulos específicos de Cd debido probablemente a la baja concentración de Cd en la muestra, o bien, a que el cadmio se encuentra en forma soluble y no formando precipitados como han observado Lozano-Rodríguez y col. (1997) en la misma especie vegetal. 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. 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 gránulos densos a los electrones en citoplasma, núcleo y vacuola en raíces de maíz y *Agrostis*. 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 en el apoplasto de la raíz fundamentalmente y en la vacuola asociado a Ca y Fe (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* (Chardonnnes y col., 1998). Los tricomas de las hojas también pueden acumular Cd como mecanismo de protección (Salt y col., 1995).

El estado nutricional de la planta se ve alterado por la presencia del cadmio, disminuyendo la entrada de Zn y Mn, y en menor medida, de Fe y Cu en las hojas, mientras que en raíces sólo se afecta la entrada de Mn y sólo con la mayor concentración de Cd. Esto sugiere que el cadmio interfiere fundamentalmente 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 transportadores relacionados con el transporte hacia la parte aérea de la planta, la entrada al xilema o cambios morfológicos en el mismo (Barceló y col., 1998) o problemas en la absorción desde la hoja. Ya se ha encontrado disminución de la entrada de Mn por causa del tratamiento con Cd en otras especies vegetales (Yang y col., 1996; Hernández y col., 1998; Salt y col., 1995; Hernández y col., 1998). En cuanto al resto de nutrientes, el comportamiento varía según la planta, cantidad de cadmio suministrada y condiciones experimentales (fundamentalmente, tiempo de exposición). Por ejemplo, el contenido en Fe disminuye en remolacha, maíz y abedul (Greger y Lindberg, 1987; Siedlecka y Baszinski, 1993 y Gussarson y col., 1996, respectivamente) mientras que aumenta en plantas de habichuela y tomate (Chaoui y col., 1997 y Moral y col., 1994, respectivamente). En definitiva, los factores que determinan el transporte de metales en presencia de cadmio, son numerosos: cambios en la actividad H<sup>+</sup>-ATPasa, cambios en la selectividad de transportadores como el IRT1 o modificaciones de actividades enzimáticas como la reductasa de hierro. La actividad H<sup>+</sup>-ATPasa en raíces de girasol y trigo se redujo en presencia de cadmio, cambio que se asocia a modificaciones en los constituyentes de la membrana (Fodor y col., 1995). El transportador de hierro IRT1, puede además transportar Zn, Mn y Cd, dependiendo su selectividad del pH de la solución nutritiva (Korshunova y col., 1999). Además, se ha observado la inhibición de la entrada de Fe y Zn en *Arabidopsis* por un exceso de Cd (Rogers y col., 2000). En este trabajo el aporte de Fe fue en forma de EDTA-Fe(III), que debe ser reducido a Fe (II) por la reductasa, así que cualquier modificación en su actividad limita la disponibilidad de este nutriente.

En general, la concentración de micronutrientes se ha visto reducida de forma severa en hojas mientras que en raíces, sólo en los casos de concentración de Cd más alta (40 y 50  $\mu$ M). Resultados similares se han observado en abedul (Gussarson y col., 1996) y con anterioridad en remolacha (Greger y Lindberg, 1987). La presencia de cadmio puede afectar por la competencia con otros elementos por los sitios de unión o por los transportadores (Gussarson y col., 1996). Así mismo,

la entrada de K puede verse afectada por la modificación dependiente de Cd de las actividades ATPasa y reductasa (Gussarson y col., 1996; Welch y col., 1993).

El cadmio produce un incremento de sustancias que reaccionan con TBA, marcador de peroxidación lipídica y en definitiva, de estrés oxidativo. Un incremento similar se ha observado en distintas especies vegetales como *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992; Shaw, 1995; Chaoui y col., 1996), *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996) y *Pisum sativum* (Lozano-Rodriguez y col., 1997). Si bien el cadmio no es un metal que participe en las reacciones tipo Fenton, como el Cu o el Fe, generando especies de oxígeno reactivas de forma directa, sí que puede inducir un estrés oxidativo de forma indirecta, alterando el metabolismo de cloroplastos. Ya que se ha encontrado que este metal induce inhibición de la biosíntesis de clorofila y carotenoides, así como su degradación (Somashekaraiah y col., 1992; Bazzaz y col., 1992) lo que provoca cambios en el transporte de electrones de PSI y PSII, dando lugar a la formación de radicales libres. La disminución de GSH, utilizado entre otras cosas, para la formación de PCs puede contribuir al estrés oxidativo al disminuir la respuesta antioxidante (Gallego y col., 1996; Dixit y col., 2001). En nuestro caso hemos observado una disminución en el contenido de glutatión total (oxidado más reducido), así como una menor presencia de GSH frente a GSSG. La relación GSH/GSSG no da una idea de la situación a nivel oxidativo de la planta, indicando en nuestro caso estrés oxidativo causado por el tratamiento con Cd.

Otra diana para los radicales libres son las proteínas, que se pueden ver afectadas por las especies de oxígeno reactivas bien por la oxidación de sus aminoácidos, bien por reacciones secundarias con productos aldehídicos 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. 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 40 y 50  $\mu\text{M}$  de cadmio. Se ha realizado un estudio más profundo en extractos de hojas de guisante control y tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de cadmio a fin de identificar el patrón de proteínas oxidadas, realizando una detección inmunoquímica con un anticuerpo frente a dinitrofenilhidrazona (DNPH), encontrando una serie de bandas con pesos moleculares entre 55 y 120 kDa que contienen grupos carbonilo. En cloroplastos aislados de hojas de trigo bajo condiciones de estrés hídrico, se ha obtenido también un incremento en los daños oxidativos identificados con este anticuerpo, con pesos moleculares similares, especialmente las proteínas de 68, 54 y 41 kDa (Tambussi y col., 2000). La proteína de 55 kDa que contiene grupos carbonilos se ha identificado como la subunidad mayor de la Rubisco, una enzima clave en la fijación del carbono en fotosíntesis. Fragmentos más pequeños son

reconocidos por el anticuerpo frente a esta proteína, de 48, 34, 24 y 16 kDa, este último correspondiente a la subunidad menor, y el resto probablemente son fragmentos de degradación de la subunidad mayor. Una degradación similar se ha observado en cebada (Desimone y col., 1996), trigo (Ishida y col., 1997) y maíz (Kingstone-Smith y Foyer, 2000) bajo condiciones de estrés oxidativo. La Rubisco es una proteína sujeta a continua degradación (Esquivel y col., 1998) lo que explicaría los fragmentos obtenidos también en plantas control, así como la reducción de la subunidad mayor después de la incubación de los extractos crudos a 37°C. La inhibición de la Rubisco se ha considerado como una de las primeras respuestas de la planta frente al cadmio (Siedlecka y col., 1997), relacionándose con procesos de senescencia (Landry y Pell, 1993).

Para la identificación del resto de proteínas que contenían grupos carbonilo, se procedió a la inmunoprecipitación de los extractos derivatizados con el anticuerpo frente a DNPH, para su posterior utilización en geles de poliacrilamida con SDS y transferencia a membranas de PVDF, donde se probaron distintos anticuerpos. 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 no da señal positiva en las que poseen grupos carbonilo, señal de oxidación. Sin embargo, la CAT, GR y Mn-SOD con pesos moleculares de 53, 57 y 27 kDa, respectivamente, fueron reconocidas por el anti-DNPH en plantas tratadas con cadmio. La CuZn-SOD, aparentemente no está oxidada puesto que no da reacción con este anticuerpo, aunque sí disminuye la cantidad de proteína con el tratamiento como ya habíamos visto. La oxidación de la Mn-SOD podría explicar la disminución de actividad observada durante el tratamiento con cadmio, mientras que la disminución de la actividad CuZn-SOD, así como de cantidad de proteína podría ser debido a modificaciones en su biosíntesis a nivel traduccional ya que se ha observado que los niveles de ARNm aumentan con el tratamiento. Las diferencias en la respuesta de estas SODs frente a modificaciones oxidativas puede deberse a diferencias en su estructura primaria y tridimensional, de hecho, ya se ha observado con anterioridad la mayor susceptibilidad de la Mn-SOD frente a la oxidación en la purificación de ambas enzimas (Palma y col., 1998). La CAT es reconocida tanto en extractos de hojas control como de hojas tratadas con cadmio, esto puede ser debido a que la proteína presenta una alta tasa de recambio (Streb y col., 1993). Por otro lado, hemos observado que la GR parece estar oxidada a pesar de que no encontramos disminución en su actividad por lo que puede ser que el centro activo no se haya modificado. Si bien, no se puede descartar la degradación proteolítica aunque se ha observado una disminución en los niveles de ARNm para esta proteína.

Para demostrar que las especies de oxígeno reactivas están implicadas en la modificación oxidativa de proteínas, incubamos extractos de hojas de guisante con concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  y los resultados eran muy similares a los obtenidos en plantas cultivadas con cadmio. Este resultado apoya la idea de que el estrés oxidativo generado por el cadmio puede ser el responsable de la oxidación de las proteínas *in vivo*.

Las especies de oxígeno reactivas pueden verse incrementadas también por una disminución en la respuesta antioxidante de la planta, esto es por que las actividades tales como SOD, CAT, GR o peroxidasas se vean inhibidas. Hemos encontrado una disminución de la actividad catalasa con el aumento de la concentración de cadmio en la solución nutritiva, que también se ha observado en otras especies como *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992; Chaoui y col., 1996), *Phaseolus aureus* (Shaw, 1995), *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996) y *Secale cereale* (Streb y col., 1993). Se ha encontrado que el efecto del cadmio sobre la actividad catalasa no es directo por incubación de la proteína con  $100 \mu M$  de Cd, sin alteración de la actividad observada en geles de poliácridamida en condiciones nativas. Se ha obtenido de forma paralela una disminución de la cantidad de proteína según la detección con el anticuerpo para catalasa. Esta disminución en actividad y proteína puede estar asociada a degradación proteolítica ya que como se ha dicho anteriormente, la catalasa parece estar oxidada, si bien existe un ligero aumento en los transcritos para esta proteína con el tratamiento de Cd. También se ha observado fotoinactivación en hojas de centeno bajo diferentes situaciones de estrés, incluida concentraciones tóxicas de Cd (Streb y col., 1993).

Los análisis de guayacol peroxidasa muestran una disminución de esta actividad por cadmio, a pesar de que las diferencias son sólo significativas con las concentraciones de Cd mayores ( $40$  y  $50 \mu M$ ). Con la merma de catalasa y guayacol peroxidasa, parece que las células no son capaces de eliminar el  $H_2O_2$  que podría acumularse hasta alcanzar niveles tóxicos. Por otro lado, la glutatión reductasa es una enzima clave del ciclo ascorbato-glutatión, también implicado en la eliminación de  $H_2O_2$ , pero no muestra cambios significativos con el tratamiento, excepto un incremento que se produce a  $10 \mu M$  de Cd. Se ha observado que niveles bajos de cadmio pueden inducir la actividad GR en *Alyssum argenteum*, que es una planta hiperacumuladora, mientras que su actividad se reduce a mayores concentraciones del metal (Schickler y Caspi, 1999). La actividad APX aumenta ligeramente con el tratamiento aunque las diferencias no son significativas, tampoco se ven alterados los niveles de ARNm para esta proteína, por lo que parece que el ciclo ascorbato-glutatión en extractos de hojas de guisante no se ve inducido por el tratamiento con Cd. Sin embargo, la actividad GST sí que se ve incrementada con el tratamiento al igual que ocurre en tallos y raíces de trigo y en semillas, tallos y

raíces de guisante (Votila y col., 1994), también se ha observado que el cadmio es capaz de inducir transcritos de GST pero que no van a dar lugar a esta proteína sino a otra con función específica frente a metales pesados, posiblemente para unirse a complejos PC-Cd y servir de transportador hacia la vacuola. Así pues, el cadmio modula la maduración de este ARNm (Marrs y Walbot, 1997).

La actividad SOD es una enzima clave en la protección de las células frente a estrés oxidativo. En los análisis de esta actividad en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, todas las isoenzimas presentes en hojas decrecen. La isoforma más sensible al cadmio es la CuZn-SOD, especialmente la isoforma citosólica, seguida de la cloroplastídica (Fig.). La Fe-SOD también se ve afectada por el tratamiento, mientras que la más resistente es la Mn-SOD, localizada en mitocondrias y peroxisomas. Además, se obtiene una disminución en la cantidad de proteína CuZn-SOD según se observa de la detección inmunológica. Sin embargo, este decrecimiento no es debido a una acción directa del cadmio sobre la proteína, ya que su incubación con el metal no afecta a esta actividad incluso después de 72 horas. Tanto la Fe-SOD como la CuZn-SOD, son isoformas sensibles a  $H_2O_2$ , mientras que la Mn-SOD es resistente, ésto parece indicar que un exceso de peróxido de hidrógeno en las células podría ser el responsable de esta inhibición. Por otro lado, la reducción del contenido de Cu, Zn, Fe y Mn en hojas podría afectar a la síntesis de las isoenzimas que contienen estos metales (del Río y col., 1991). Una reducción de la actividad SOD se ha encontrado también en *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah y col., 1992) y *Helianthus annuus* (Gallego y col., 1996), así como en cadenas de levaduras (Romandini y col., 1992). Por el contrario, se ha observado un incremento de la actividad SOD en *Lemna*, si bien las concentraciones de Cd aplicadas eran bajas (Srivastave y Tel-Or, 1991).

Los resultados obtenidos en extractos de hojas de guisante sometidos a diferentes concentraciones de Cd sugieren la inducción de estrés oxidativo, ya que se produce un aumento de peróxidos de lípidos, oxidación de proteínas, reducción en la relación GSH/GSSG e incremento en la concentración de  $H_2O_2$  y favorecido posiblemente por una disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes como catalasa y peroxidasas. Siendo la concentración de 50  $\mu M$  la que más afecta a las plantas y la utilizada para estudios a nivel subcelular.

Se sabe que la modificación oxidativa de proteínas puede ser una señal para la degradación proteolítica, de hecho se ha relacionado con el reciclaje de proteínas (Pacifie y Davies, 1990). Es por ello que se ha determinado la actividad proteolítica en extractos de hojas de guisante para ver se ha visto afectada por el tratamiento con Cd y sólo se ha obtenido un pequeño aumento en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Tampoco se han encontrado cambios en la actividad proteasa

de hojas de *Populus* sometido a condiciones prooxidantes de ozono (Landry y Pell, 1993), ni en semillas de maíz crecidas a bajas temperaturas, aunque sí se observa también una acumulación de proteínas oxidadas (Prasad, 1996).

El cadmio induce cambios observados a microscopía óptica en la estructura del cloroplasto que muestra el mismo aspecto que en otras especies tratadas con el mismo metal, y muy similar al que se presenta en tejidos senescentes (Barceló y col., 1988; Ouzounidou y col., 1997). Los cloroplastos son uno de los primeros lugares donde tiene lugar el catabolismo en senescencia foliar (Smart, 1994). A microscopía óptica, los cloroplastos de hojas senescentes muestran un incremento en el número y diámetro de plastoglóbuli, relajación de las membranas y desorientación del grana, así como dilatación de los tilacoides (Smart, 1994). La formación de plastoglóbuli podría estar ligada a la rotura de tilacoides que acompaña a la senescencia y se ha visto que contienen plastoquinonas, carotenoides, glicerolípidos y proteínas (Buchanan-Wollaston, 1997; del Río y col., 1998 a; Inada y col., 1998). También se ha observado en tejido senescente la formación de invaginaciones en el tonoplasto que acompaña al crecimiento de la vacuola, mientras que las mitocondrias mantienen su integridad (Timan, 1983; Thomsom y Platt-Aloia, 1987; Inada y col., 1998; Quirino y col., 2000). Todos estos efectos se han observado en hojas de guisante tratadas con Cd.

Sin embargo, hay otros síntomas característicos de un proceso de senescencia que no se han observado en el tratamiento con Cd, como son, el menor contenido en proteínas y una mayor actividad de las proteasas (Timan, 1983; Buchanan-Wollaston, 1997), esto indica que si bien, se han encontrado resultados similares a los inducidos por el proceso de senescencia, la respuesta al Cd puede ser específica para este tratamiento.

Puesto que se ha observado un estrés oxidativo en las plantas de guisante tratadas con Cd, se ha estudiado la localización a nivel subcelular de las especies reactivas de oxígeno ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) y de nitrógeno ( $NO\cdot$ ) para ver su posible inducción por el metal y células u orgánulos implicados en su producción. Ya se ha demostrado una producción masiva de especies de oxígeno reactivas (ROS) en suspensiones celulares de tabaco provocada por el tratamiento con Cd (Piqueras y col., 1999). Y es bien conocido que en la respuesta de las plantas a ataques por patógenos hay una producción masiva de ROS en la zona donde se ha producido el ataque (Bestwick y col., 1997, 1998). En contraste con el estrés biótico, donde las zonas necróticas se pueden observar en el punto de infección, en el estrés causado por metales pesados no se encuentran síntomas visibles lo que hace más difícil el estudio de la respuesta de la planta a nivel subcelular. En secciones de hojas obtenidas al azar, se han podido observar pequeñas acumulaciones de  $H_2O_2$  utilizando  $CeCl_3$  para precipitarlo, asociadas a tejido

vascular y células epidérmicas y del mesófilo lagunar. La especificidad de estos precipitados se ha confirmado infiltrando el tejido, antes de la incubación con  $\text{CeCl}_3$ , con catalasa que descompone el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hay que tener en cuenta que parte del  $\text{H}_2\text{O}_2$  observado puede ser derivado de los radicales superóxido, los cuáles son dismutados por la SOD a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  (Fridovich, 1986). 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). A pesar de esto, la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observada en hojas procedentes de plantas tratadas con Cd es mayor que en las control.

Las células de la vaina, localizadas cerca de las células de transferencia, no presentan clorofila y tienen algunas diferencias estructurales con las células del mesófilo. Los cloroplastos no poseen grana y son más pequeños que los de las células del mesófilo y no hay asociaciones de estos orgánulos con peroxisomas ni mitocondrias. En las células de la vaina, el tratamiento con Cd induce la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$  en el tonoplasto, rodeando la vacuola. La producción de ROS en las células de transferencia puede ser debido a una disminución en la capacidad antioxidante de estas células como ha sido descrito en plantas de maíz (Kingston-Smith y Foyer, 2000). Sin embargo, en plantas  $\text{C}_3$ , como el guisante, no hay datos sobre una posible distribución diferencial en la capacidad antioxidante de las células del mesófilo. En hojas de maíz (planta  $\text{C}_4$ ) se ha observado una mayor susceptibilidad de las células de la vaina al estrés oxidativo provocado por factores abióticos frente a las células del mesófilo debido a una deficiencia en el NADPH de estas células, necesario para la reducción del ascorbato oxidado (Kingston-Smith y Foyer, 2000).

También se ha observado producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las células de la epidermis, encontrando los precipitados de Ce en la membrana plasmática. Estas células podrían ser más susceptibles a los daños provocados por Cd ya que el metal puede ser acumulado en estas células debido a la fuerza de la transpiración (Chardonens y col., 1998). Una alta concentración de Cd podría provocar daños en el metabolismo de las células epidérmicas, afectando al balance catiónico, a la relación GSH/GSSG y a las defensas antioxidantes (Gallego y col., 1996; Sandalio y col., 2001).

En las células del mesófilo no se han observado cambios en el tonoplasto aunque sí en la membrana plasmática. Algunos precipitados se han encontrado también en mitocondria y, en presencia de aminotriazol, un inhibidor de catalasa, se han observado unas bandas muy delgadas de precipitado en las membranas de peroxisomas, en las zonas en contacto con el tonoplasto y los cloroplastos. La incubación de las hojas con aminotriazol no produce una intensificación de los precipitados de Ce en otros orgánulos que no sean peroxisomas, debido a que en hojas de guisante,



la catalasa está localizada sólo en estos orgánulos (Corpas y col., 1999). Por otro lado, la inhibición de la CuZn-SOD con dietilditiocarbamato da lugar a la formación de precipitados dependientes de  $O_2^-$  en la membrana plasmática, pero no se observan precipitados ni de Ce ni de DAB en cloroplastos. Los cloroplastos son una de las principales fuentes de ROS en condiciones de estrés (Foyer y col., 1994) y su tasa de fotosíntesis es muy sensible al Cd (Greger y Ögren, 1991; Sandalio y col., 2001). La ausencia de precipitados dependientes de  $H_2O_2$  o de  $O_2^-$  en cloroplastos podría ser debida a la capacidad de estos orgánulos para eliminar especies reactivas de oxígeno gracias a un eficiente sistema antioxidante (Foyer y col., 1994; Halliwell y Gutterdige, 2000). De la misma forma, no se ha detectado acumulación de ROS en cloroplastos de hojas de abedul expuestas a ozono, mientras que sí se ha observado la producción de  $H_2O_2$  en la membrana plasmática, pared celular, mitocondria y peroxisomas (Pellinen y col., 1999).

Se ha tratado de identificar la fuente de producción de  $H_2O_2$  mediante el uso de inhibidores de NADPH oxidasas (DPI) y de peroxidasas (azida). Los resultados obtenidos sugieren que es una oxidasa la fuente del  $H_2O_2$  detectado ya que su producción en forma de precipitados de Ce desaparece en presencia de DPI, mientras que en presencia de azida, estos precipitados son visibles. Tanto oxidasas como peroxidasas están implicadas en la producción de especies reactivas de oxígeno en la infección por patógenos (Alan y Fluhr, 1997; Bolwell y col., 1999b) y en la exposición a ozono (Pellinen y col., 1999). En ambos casos, la acumulación de  $H_2O_2$  tiene lugar normalmente, en la pared celular o en la cara externa de la membrana plasmática. En la producción de ROS inducida por patógenos u ozono, se ve incrementada la actividad de la SOD extracelular y de las peroxidasas (Pellinen y col., 1999), pero en plantas tratadas con Cd se ha observado una reducción de ambas actividades, especialmente la SOD (Sandalio y col., 2001). Estas diferencias apuntan la existencia de diferentes mecanismos en la producción de ROS inducida por Cd y por factores bióticos e incluso un papel diferente para los mismos. En el estrés causado por Cd, la generación de ROS en las membranas puede ser el resultado de daños producidos por el crecimiento de la planta durante un largo periodo de tiempo con el metal. Si bien el Cd no es un metal (como el Fe o el Cu) que participe de forma directa en las reacciones tipo Fenton, relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno, sí que presenta una gran afinidad por las superficies de membrana (Fodor y col., 1995). La acumulación de Cd en las membranas podría promover el daño oxidativo caracterizado por la peroxidación lipídica y la producción de  $H_2O_2/O_2^-$  en las células donde el metal es almacenado. De hecho, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas está asociada con la toxicidad del Cd como se ha observado en guisante (Lozano-Rodríguez y col., 1997; Sandalio y col., 2001). Se han

encontrado cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática de células de la raíz como consecuencia de una larga exposición de las plantas a altas concentraciones de Cd. Estas alteraciones se caracterizan por un incremento en el grado de insaturación de los ácidos grasos que las componen lo que los hace más susceptibles de oxidación (Hernández y Cooke, 1997). También se han observado cambios en la fluidez e integridad de las membranas de girasol y trigo, inducidos por Cd (Fodor y col., 1995). Se ha propuesto que los daños estructurales producidos por el Cd en las membranas podrían activar las NADPH oxidasas e inducir una oxidación masiva (Piqueras y col., 1999).

La pequeña producción de  $H_2O_2$  detectada en mitocondrias y peroxisomas podría estar envuelta en procesos de transducción de señales. La localización de  $H_2O_2$  en la membrana de peroxisomas, en las zonas de contacto con otros orgánulos apoyaría la idea de que el  $H_2O_2$  producido en peroxisomas podría actuar como una molécula señal. De hecho, se ha observado en este trabajo que existe en peroxisomas un incremento de dos veces en la producción de  $H_2O_2$  como consecuencia del tratamiento con Cd (Romero-Puertas y col., 1999). Recientemente, se ha propuesto un nuevo papel para peroxisomas como fuente de moléculas señal (ROS y  $NO\cdot$ ) implicadas en el proceso de transducción que induce/inhibe la expresión de determinados genes (Corpas y col., 2001) como respuesta a diferentes estreses, entre ellos el causado por metales pesados como el Cd. Esta producción de segundos mensajeros podría también estar implicada en la comunicación entre diferentes compartimentos celulares (Corpas y col., 2001).

Se podría ver entonces la producción de ROS como una doble función en la respuesta de la planta al estrés causado por Cd y dentro de lo observado en la respuesta de las plantas ante diferentes tipos de estrés (Dat y col., 2000). Altas concentraciones de ROS pueden inducir un estrés oxidativo tóxico para la planta mientras que bajas concentraciones de pueden ser utilizadas como señales celulares en distintos procesos. La producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  en la membrana plasmática y tonoplasto podría ser considerada como una consecuencia de la fitotoxicidad del Cd, mientras que la pequeña acumulación en peroxisomas y mitocondrias sugiere la función de estas especies reactivas de oxígeno como moléculas señales implicadas en la inducción de genes relacionados con la defensa de la planta frente a la toxicidad del Cd.

Para profundizar un poco más en el papel del  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  generado por las hojas de guisante como consecuencia del tratamiento con Cd, se estudió su producción *in situ*, en hojas completas de plantas control y tratadas con Cd y además se incubaron con distintos inhibidores/inductores estudiando el efecto de los mismos sobre la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$ .

## 5.2 Efecto del Cadmio sobre el Metabolismo Oxidativo en Peroxisomas de Hojas de Guisante

Se ha encontrado un ligero aumento, aunque significativo, de 1,4 veces en el número de peroxisomas, inducido por el tratamiento con Cd. En la levadura *Candida albicans* ya se había encontrado un incremento de hasta seis veces en la población de peroxisomas (Chen y col., 1995), lo que podría estar implicado en la toxicidad del Cd sobre dicha levadura, ya que se podría inducir un estrés oxidativo como resultado del incremento de  $H_2O_2$ , metabolito de peroxisomas y de una reducción de enzimas antioxidantes resultado del tratamiento con algunos xenobióticos (Palma y col., 1991). Si bien el aumento en el número de peroxisomas causado por el Cd en hojas de guisante no es tan acusado como en *Candida albicans*, podría contribuir de alguna forma en la toxicidad del metal. La producción de  $H_2O_2$  en peroxisomas procedentes de plantas tratadas con Cd aumenta dos veces con respecto a los peroxisomas de plantas control. Una de las fuentes de producción de  $H_2O_2$  en peroxisomas es la reacción catalizada por la GOX, que convierte el glicolato en glioxilato con la producción concomitante de  $H_2O_2$ , es la primera enzima de la fotorrespiración, ruta metabólica que ocurre en peroxisomas. Esta actividad se ve incrementada en los peroxisomas como consecuencia del tratamiento con Cd y este aumento parece ser debido a un mayor contenido de proteína GOX. La fotorrespiración suministra  $CO_2$  que puede ser utilizado por el cloroplasto para la realización de la fotosíntesis, especialmente en condiciones limitantes en lo que al intercambio de gases se refiere, por cierre estomático, como hemos observado que ocurre a causa de la toxicidad del Cd en guisante y también se ha visto en otras especies vegetales (Barceló y Poschenrieder, 1990). Por otro lado, se ha sugerido que una de las funciones de la fotorrespiración puede ser la prevención del daño oxidativo que podría resultar de una producción excesiva de radicales libres en el cloroplasto. El aumento observado en la actividad GOX podría indicar un incremento en la fotorrespiración a fin de evitar daños oxidativos en el cloroplasto, si bien, la mayor producción de  $H_2O_2$  podría causar estrés oxidativo si no va acompañado de un aumento simultáneo de los sistemas antioxidantes. Sin embargo, la actividad HPR, otra enzima peroxisomal de la fotorrespiración que cataliza la reducción, dependiente de NADPH, del hidroxipiruvato a glicerato, no muestra cambios con el tratamiento. Esto parece indicar que no todo el proceso de la fotorrespiración está afectado por el tratamiento con Cd, aunque sí puede existir alguna regulación a nivel de la GOX. Una posibilidad es que bajo condiciones de toxicidad causada por el Cd, la GOX podría verse regulada a fin de proporcionar más glioxilato para la MS, lo que contribuiría a incrementar 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., 1998a).

La producción de radicales superóxido ( $O_2^-$ ) en membranas de peroxisomas parece no verse afectada por el tratamiento con Cd, ni tampoco las actividades encargadas de su producción (XOD) y de su eliminación (Mn-SOD) en matrices de peroxisomas.

La tasa de peroxidación lipídica en las membranas peroxisomales no se ve significativamente afectada por el tratamiento con Cd, quizás por el efecto protector de la actividad APX, localizada en las membranas de peroxisomas y cuya actividad aumenta como consecuencia del tratamiento con el metal. Esta enzima podría encargarse de eliminar el  $H_2O_2$  que escapa a la acción de la CAT, encargada de eliminarlo en la matriz. También se ha observado un incremento en la actividad GR, que unido al de 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. La actividad APX también se ha visto incrementada en *Phaseolus aureus* y *Phaseolus vulgaris* bajo tratamiento con Cd, así como la GR en *P. vulgaris* (Chaoui y col., 1997).

Por otro lado, la actividad CAT sólo aumenta ligeramente mientras que el contenido en proteína no se ve modificado por el tratamiento con Cd. El análisis de los peroxisomas por IEF ha permitido encontrar 5 isoformas diferentes con actividad CAT, con pequeñas diferencias en su punto isoelectrónico. Existe un ligero aumento en las isoformas más ácidas (CAT3-5) que puede ser el responsable de los cambios en la actividad CAT total observados en plantas tratadas con Cd. Todas estas isoformas están formadas por una sola subunidad de masa molecular 57 kDa y sus diferentes puntos isoelectrónicos posiblemente sean debidos a que tengan diferente carga. 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).

Se ha observado también un incremento en las actividades G6PDH y 6PGDH, enzimas de la ruta de las pentosas fosfato y encargadas de aportar el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation, presente en peroxisomas (Corpas y col., 1998). El tratamiento con Cd incrementa dos veces la actividad G6PDH así como la cantidad de proteína presente en los peroxisomas. Este resultado está de acuerdo con el aumento observado en las enzimas que participan en el ciclo ascorbato-glutation (APX y GR) que podría formar parte de los mecanismos de defensa de la planta frente a la toxicidad del Cd. Una respuesta similar se ha encontrado en extractos de *Silene italica* expuesta a Ni y Cd (Mattioni y col., 1997). La presencia de la actividad NADP-ICDH

en matrices de peroxisomas se ha demostrado en trabajos anteriores (del Río y col., 1998) y en este trabajo se ha observado un incremento de esta actividad como consecuencia del tratamiento con Cd. El papel de la actividad NADP-ICDH en peroxisomas no ha sido determinado con claridad todavía, pero parece estar implicado en los mecanismos de reducción del NADP, lo que contribuiría a mantener alta la tasa NADPH/NADP para favorecer el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation.

El peróxido de hidrógeno es bien conocido como oxidante y se ha visto que su producción en peroxisomas se ve incrementada dos veces como consecuencia del tratamiento con Cd. Por tanto, se ha estudiado el efecto del cadmio sobre el contenido de grupos carbonilo en peroxisomas de hojas de guisante, como marcador de estrés oxidativo en los orgánulos. Los resultados obtenidos sugieren que el Cd produce daño oxidativo en las proteínas de peroxisomas, a pesar de que la permeabilidad de su membrana no se ve alterada por el tratamiento, ni en integridad ni en pérdida de sustratos, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en la peroxidación lipídica de las membranas peroxisomales que no se ve modificada por el tratamiento con Cd. La ausencia de daños en las membranas de peroxisomas puede deberse al incremento de actividad APX situada en las mismas. Estudios cinéticos llevados a cabo en hígado de rata han demostrado que la oxidación de proteínas precede a la formación de TBARS en condiciones de estrés oxidativo (Reinheckel y col., 1998), lo que podría explicar la ausencia de daños oxidativos que se ha observado en membranas mientras que las proteínas parecen más afectadas. En mitocondrias de cultivos celulares de condrocitos de conejo, la senescencia produce un incremento de las especies de oxígeno reactivas así como del contenido de grupos carbonilo mientras que no se observan cambios en la estructura ni funcionalidad de la membrana mitocondrial (Pfeuty y Gueride, 2000). Sin embargo, no podemos olvidar la posible difusión del  $H_2O_2$  fuera del orgánulo, ya que los peroxisomas también contribuyen a la producción de  $H_2O_2$  a partir de la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) realizada en la cara citosólica de la membrana peroxisomal (López-Huertas y col., 1999), que podría escapar a la acción de la actividad APX.

Las proteínas oxidadas en peroxisomas pueden ser eliminadas de forma eficiente por la acción de las proteasas presentes en estos orgánulos (Distefano y col., 1997). El patrón de endopeptidasas (EP) encontrado en peroxisomas de hojas de guisante, es muy similar al que se presenta en peroxisomas de hojas senescentes (Distefano y col., 1997). Las isoenzimas EP1 y EP2 se habían determinado como serín-proteasas, mientras que EP5 era una metalo-proteasa, sin embargo, EP3 y EP4 no se habían caracterizado (Distefano y col., 1997). El incremento observado en la actividad proteolítica de peroxisomas, puede estar también asociado a cambios metabólicos que puedan tener lugar en estos orgánulos como consecuencia del tratamiento con Cd, principalmente, la

conversión de peroxisomas a glioxisomas característica de procesos de senescencia (Distefano y col., 1999). En relación a lo dicho anteriormente, se ha encontrado una inducción de las enzimas del ciclo del glioxilato, MS e ICL, enzimas que están presentes fundamentalmente en glioxisomas, que es un tipo de peroxisomas presentes en cotiledones de semillas oleaginosas que convierten las reservas lipídicas en azúcares, 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 divide 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 hacia glioxisomas (de Bellis y col., 1990; Landolt y Matilde, 1990; Nishimura y col., 1996; del Río y col., 1998a).

Otro efecto del Cd a tener en cuenta es el incremento en la concentración de proteínas en peroxisomas procedentes de hojas de plantas tratadas. Este aumento podría explicarse por el incremento observado en el número de peroxisomas, que aunque ligero, es significativo y por una mayor síntesis de las proteínas ya presentes en el orgánulo, ya que no se han detectado nuevos polipéptidos en peroxisomas procedentes de plantas tratadas con Cd en los geles SDS- PAGE, pero si hay un incremento general en la actividad de muchas proteínas peroxisomales (GOX, MS, ICL, GR, G6PDH, ICDH etc), así como en el contenido de dichas proteínas detectado con anticuerpos específicos. Esto está de acuerdo con la síntesis de nuevos peroxisomas en la mayoría de las células eucariotas que ocurre por una incorporación postranslacional de nuevas proteínas tanto de la matriz como de la membrana de peroxisomas a los ya existentes, los cuales se dividen posteriormente para dar lugar a los peroxisomas hijos (Lazarow y Fujiki, 1985; Titorenko y Rachubinski, 1998). El hecho de que el incremento de proteínas peroxisomales causado por el Cd se utilice para la proliferación de orgánulos se ha visto en otros trabajos (Chen y col., 1995). Por otro lado, durante el proceso de senescencia también se ha visto que se induce la proliferación de peroxisomas en hojas de guisante (Pastori y del Río, 1997) y en pétalos de claveles (Droillard y Paulin, 1990), así como con ozono (Morré y col., 1990) y con los xenobióticos isoproturón (de Felipe y col., 1988) y clofibrato (Palma y col., 1991).



## ***CONCLUSIONES***

## 6. CONCLUSIONES

1. En plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) cultivadas en medios hidropónicos, niveles de cadmio de 20-50  $\mu\text{M}$  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, como la Rubisco, y provocando daños en las membranas biológicas. Su efecto sobre las distintas enzimas antioxidantes parece responder, bien a modificaciones transcripcionales, traduccionales o post-traduccionales.
2. El cadmio induce la proliferación de la población de peroxisomas en hojas de guisante, y en orgánulos aislados origina un incremento en el contenido de peróxido de hidrógeno y en las actividades enzimáticas implicadas en 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  $\text{Ca}^{2+}$ , la NADPH-oxidasas, y el óxido nítrico. Las especies de oxígeno reactivo generadas, además de actuar como especies tóxicas 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.





***BIBLIOGRAFÍA***

- ADRIANO DC, CHLOPECKA A, KAPLAN DL, CLIJSTERS H, VANGRONSVELD J (1997) Soil contamination and remediation: philosophy, science and technology. En: *Contaminated Soils*. Prost (ed) INRA. Paris
- AEBI H (1984) Catalase *in vitro*. *Meth 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. *The 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 (1995) Heavy metals in soils. *Blackie Academic & Professional*. New York. 368p
- ALLOWAY BJ, STEINNES E (1999) Antropogenic additions of cadmium to soils. Chapter 5. En: *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- ALLOWAY BJ, JACKSON AP, MORGAN H (1990) The accumulation of cadmium by vegetables grown on soils contaminated from a variety of sources. *The Sci of Total Environ* **91**: 223-236
- 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, PETERSON O (1981) *Cadmium* in swedish winter wheat: regional differences and their origin. *Swed J Agric Res*. **11**: 49-66
- ARCHER EK , TING BL (1996) A virescent plastid mutation in tobacco decreases peroxisome enzyme activities in seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **149**: 520-526.
- ARNON DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, **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
- ARRIGONI O, DIPIERRO S, BORRACCINO G (1981) Ascorbate free radical reductase: a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters*, **125**: 242-244

ASADA K (1984) Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in enzymology*, **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

BAKER AJM, WALKER PL (1989) Physiological responses of plants to heavy metals and quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Spec. and Bioavail.* **1**: 7-17

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 Cd<sup>2+</sup> 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

BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I (1971) Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276-287

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

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

BETHGEN Y ALLEY, 1989, nitrógeno

BOLWELL GP (1999a) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294

BOLWELL GP, WOJTASZEK P (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol and Mol Plant Pathol*. **51**: 347-366

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 apoptotic 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. *Meth 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. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

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

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

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*, (pp, 151-155) Ed RA Greenwald CRC Pres, Boca Raton

- BUNKELMANN R, TRELEASE RN (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589-598
- BUTT (1980) Metabolism and Respiration. En: *The Biochemistry of Plants* (David D, Davies Ed), Vol. 2, Chapter 3. Academic Press
- CABOT C, POSCHENRIEDER Ch AND BARCELÓ J (1988) Cadmio I. Presencia natural y antropogénica del Cd en el medio ambiente. *Cir Far* **298**: 91-108
- CABOT C, POSCHENRIEDER Ch AND BARCELÓ J (1988) 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
- 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 mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527-535
- CHARDONNENS AN, BOOKUM WM, KUIJPER LD, VERKLEIJ JA, ERNST WH (1998) Distribution of cadmium in leaves of cadmium sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plantar* **104**: 75-80
- CHAUDIÈRE J, FERRARI-LIOU 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
- 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 containing 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. Chapter 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. *Envir. Pollut* **4**: 231-237

CHURCH GM, GILBERT W (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1991-1995.

CIIAF, 1969, usando un fotómetro de llama Corning mod. 400), potasio, calcio y magnesio

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. *Analytical Biochemistry* **140**: 532-537.

CLEMENS S, KIM EJ, NEUMANN D, SCHROEDER J (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The 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

COOMBS J, HALL DO, LONG SP, SCURLOCK JMO (1985) En: *Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. pp 62-93. 2nd edition. Oxford. Pergamon Press

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, SANDALIO LM, DEL RÍO LA, TRELEASE RN (1998a) 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, BARROSO JB, SANDALIO LM, DISTEFANO S, PALMA JM, LUPIÁÑEZ JA, DEL RÍO LA (1998b) A dehydrogenase-mediated recycling system of NADPH in plant peroxisomes. *Biochemical Journal* **330**: 777-784.

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 in Plant Sci* **6 (4)**: 145-150

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. *The Plant Cell* **11**: 1277-1291

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. *The 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

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 of the New York Academy of Sciences* **121**: 407-427

DE DUVE C (1965) Function of microbodies (peroxisomes). *J. Cell. Biol.* **27**: 25

- 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. *Journal of Inorganic Biochemistry* **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, 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, 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. *Analytical Biochemistry* **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, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GÓMEZ M, BARROSO JB (2001) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot*, en prensa
- DEL RÍO LA, SANDALIO LM, PALMA JM, CORPAS FJ, LÓPEZ-HUERTAS E, ROMERO-PUERTAS MC, McCARTHY I (2002) Peroxisomes, reactive oxygen metabolism, and stress-related enzyme activities. En: *Plant Peroxisomes*. ( Baker A, Graham I, eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, in press
- 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. *PNAS 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
- 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
- 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, GÓMEZ M, DEL RÍO LA (1997) Characterization of endopeptidases from plant peroxisomes. *Biochem. J.* **327**: 399-405
- DIXIT V, PANDEY V, SHYAM R (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) *Journal of Experimental Botany* **52**, nº 358: 1101-1109
- DONALSON RP (1982) Nicotinamide cofactors (NAD and NADP) in glyoxysomes, mitochondria, and plastids isolated from castor bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**: 274-279
- DROTAR A, PHELPS P, FALL R (1985) Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**: 35-40
- DUKE MV, SALIN ML (1985) Purification and characterization of an iron-containing SOD from a eukariote, *Ginkgo biloba*. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 305-314
- EDWARDS EA, RAWSTHON 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. Plantar* **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 E. F. (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
- FAHIMI H. D. and BAUMGART E. (1999) Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes: A review. *J Histochem, Citochem* **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
- FERGUSON JE (1990) *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental impact and Health effects*. Pergamon Press, Oxford.
- FLOHÉ L, GÜNZLER WA (1985) Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* **105**: 114-121
- FODOR A, SZABÓ-NAGY A, ERDEI L (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J. Plant Physiol.* **147**: 87-92
- 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 I. M. (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. *Analytica Chimica 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 ( $\alpha$ -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 peroxynitrite 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
- GHUG LK, SAWHNEY SK (1997) Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol Biochem* **37** (4): 297-303
- GOLDBERG DM, ELLIS G (1983) Isocitrate. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (HU Bergmeyer ed), pp. 183-190. Academic Press, New York
- 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
- 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
- GREGER M, ÖGREN E (1991) Direct and indirect effects of  $Cd^{2+}$  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
- GUERINOT ML, SALT DE (2001) Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol* **125**: 164-167.
- 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, GUTTERIDGE JMC (1992) Biologically relevant metal ion dependent OH<sup>•</sup>. *FEBS 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
- 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, COLE DJ, EDWARDS R (1999) Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Physiol Plant* **105**: 9-16
- 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
- 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.

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 C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>-, and CAM-plants and green algae. *Planta* **145**: 95-104

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 CdCl<sub>2</sub>: electron probe microanalysis. *Biol Cell* **58**: 79-86

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

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
- 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
- JACOB C, COURBOT M, BRUN A, STEINMAN HM, JACQUOT JP, BOTTON B, CHALOT M (2001) Molecular cloning, characterization and regulation by cadmium of a superoxide dismutase from the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Eur J Biochem* **268**: 3223-3232
- 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.) *Bioresource 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.
- 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
- 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. *Phytochemistry* **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, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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
- 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 a/b protein complex II in radish cotyledons. *Physiol Plant* **73**: 518-524
- KUNCE CM, TRELEASE RN (1986) Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol* **81**: 1134-1139
- KÜPER 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
- 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

- LAEMMLI UK (1979) 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
- LAUCHLI A (1993) Selenium plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Bot Acta* **106**: 455-468
- LAVID N, BARKAY Z, TEL-OR E (2001) Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* **212**: 313-322
- LEITA L, BACA-GARCÍA MT, MAGGIONI A (1992) Cadmium uptake by *Pisum sativum*: accumulation and defense mechanism. *Agrochimica* **36** (3): 253-259
- 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. *Meth Enzimol* **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) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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, 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-HUERTASE, SANDALIO LM, DEL RÍO LA (1995) Integral membranes polypeptides of pea leaf peroxisomes: Characterization and response to plant stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **33**: 295-302
- LÓPEZ-HUERTAS E, CORPAS FJ, SANDALIO LM, DEL RÍO LA (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochem J* **337**: 531-536.
- LOW PS, MERIDA JR (1996) The oxidative burst in plant defense: Function and signal. *Physiol. Plantar* **96**: 533-542
- LUDLOW MM, MUCHOW RC (1990) A critical evaluation of trials for improving crops yield in water-limited environmental. *Advances in Agronomy* **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

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

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

MCCORD JM, FRIDOVICH I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biol Chem* **244**: 6049-6053

McLAUGHLIN M. J. and SINGH B. R. (1999) Cadmium in soils and plants. Chapter 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. in 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 in Biotech.* **19** (2): 67-73

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 Cd<sup>2+</sup>. *J. Bacteriol.*, 121: 1180-1188

- 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
- MOLLER (1998) *Plant physiol* **116**: 1029-1036
- 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
- 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
- MORTVEDT JJ (1996) Heavy metal contaminants in inorganic and organic fertilisers. *Fert. Res* **43**: 55-61
- 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
- MULLINEAUX PM, CREISSEN GP. Molecular biology of the ascorbate-glutathione cycle in higher plants.
- 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.
- NAVARI-IZZO F, IZZO R (1994) Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO<sub>2</sub> fumigation. *Plant Sci* **96**: 31-40
- NEDEKKOSKA TV, DORAN PM (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotech. and Bioeng* **67 (5)**: 607-615
- NEUMANN D, LICHTENBERGER O, GÜNTER D, TSCHIRSCH 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 Morr , HE L w, 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*. *The J. Biol. Chem* **274** (49): 34832-34837
- O'NEIL RA, SCCO TK (1987) Rapid effects of IAA on cell surface proteins from intact carrot suspension culture cells. *Plant Physiol* **84**: 443-446
- 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.
- 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 Mo. Biol* **46**: 123-146
- OLSON PD, VARNER JE (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* **4**: 887-892
- 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, NARV EZ-V SQUEZ 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. *The 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
- OUARITI O, BOUSSAMA N, ZARROUK M, CHERIF A, GHORBAL MH (1997) Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, **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
- PACIFI RE, DAVIES KJA. (1990) Protein degradation as an index of oxidative stress. *Methods in Enzymol* **186 B**: 485-502
- PACIFI 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 Radical Biol. Med* **7**: 521-536
- 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), SCOPE 31. John Wiley and Sons, Chichester.
- 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. *Physiologia Plantarum* **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. *PPB*, 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
- PATRA J, LENKA M, PANDA B (1994) Tolerance and co-tolerance of the grass.....*New Phytol* **128**: 165-171

- PATTERSON BD, MACRAE EA, FERGUSON IB (1984) Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analit. 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*. *PNAS*, **97**, nº 9: 4956-4960
- 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
- POSCHENRIEDER Ch., GUNSÉ B. and BARCELÓ J. (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol* **90**: 1365-1371
- 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
- RABIE ET AL..(ESTERILIZACIÓN SEMILLAS)
- 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* (ed. RA Greenwald), pp. 21-23, CRC Press, Boca Ratón. FL,
- 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, pp142-156
- 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.
- ROBINSON N. ... (1995) transforamción de bacterias
- 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
- RÚÍZ-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
- 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, BLAYLOCK M, KUMAR NP, DUSHENKOV V, ENSLEY BD, CHET I, RASKIN I (1995) Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13 May, 468-474
- SALT DE, PRINCE RC, PICKERING IJ, RASKIN I (1995) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol* 109: 1427-1433
- 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 J M. and DEL RÍO L. A. (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci* 51: 1-8
- SANDALIO LM, FERNÁNDEZ VM, RUPÉREZ FL, DEL RÍO LA (1988) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* 1-4.

- 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
- 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
- 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  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol. Biol* **37**: 87-97
- 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. *The Plant Journal* **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
- 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, HUTTERMANN A (1988) Localization and toxic effects of cadmium, copper and uranium in *Azolla*. *Plant Physiol* **88**: 30-36
- SEVANIAN 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
- 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

- 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 y 10)**: 916-921
- SIMON M, ORTÍZ I, GARCÍA I, FERNÁNDEZ E, FERNÁNDEZ J, DORRONSORO C, AGUILAR J (1999). El desastre ecológico de Doñana. *Edafología* **5**: 153-161
- 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 et al. 1987 Inmunoprecipitación carbonilos.
- 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
- STADTMAN TC (1990) Selenium biochemistry. *Annu. Rev. Biochem* **59**: 111-127
- STEINBECK MJ, KHAN AU, APPEL JR, WH, KARNOVSKY MJ (1993) The DAB-Mn<sup>++</sup> cytochemical method revisited: validation of specificity for superoxide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **41**, nº11: 1659-1667.
- 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 Molecular Biology* **35**: 641-654.
- SVALHEIM O, ROBERTSEN B (1993) Elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- $\alpha$ -D-galacturonides and an oligo- $\beta$ -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. *Physiol. Plantar* **88**: 675-681
- TAKAHAMA U (1988) Oxidation of flavonoids by hydrogen peroxide in epidermal and guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* **29**: 433-438
- 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.



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 C<sub>2</sub> 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

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

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 (1990) 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 Biologica Hungarica* **45** (1): 11-16
- WAGNER GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. in Agronomy* **51**: 173-217
- 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.
- WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J (2001) *Trends Plant Sci* **6**: 177-183.
- WILLEKENS H, CHAMNONGPOL S, DAVEY M, SCHRAUDNER M, LANGEBARTELS C, VAN MONTAGU M, INZÉ D, VAN CAMP W. (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stresses defence in C<sub>3</sub> plants. *The EMBO J* **16**: 4806-4816
- 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
- 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 (mineralización de muestras)
- WONG-VEGA L, BURKE JJ, ALLEN RD (1991) Isolation and sequence of a cDNA that encodes pea manganese superoxide dismutase. *Plant Molecular Biology* **17**: 1271-1274.
- WOOLHOUSE HW (1983) Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. En: *Encyclopaedia of Plant Physiology (New Series)*. (OL Lange, PS Nobel, CB Osmond, H Ziegler, eds), Springer-Verlag, Berlin, vol 12c, 245-300
- XIANG C, OLIVER D (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**: 1539-1550
- XIANG C, OLIVER DJ (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10**: 1539-1550

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. *Analytical Biochemistry* **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

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 O<sub>2</sub>-resistant photosynthesis. *Plant Physiology* **97**: 1529-1559.

ZENK MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene* **179**: 21-30

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  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol* **121**: 1169-1177



Biblioteca Universitaria de Granada



01052977