

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN

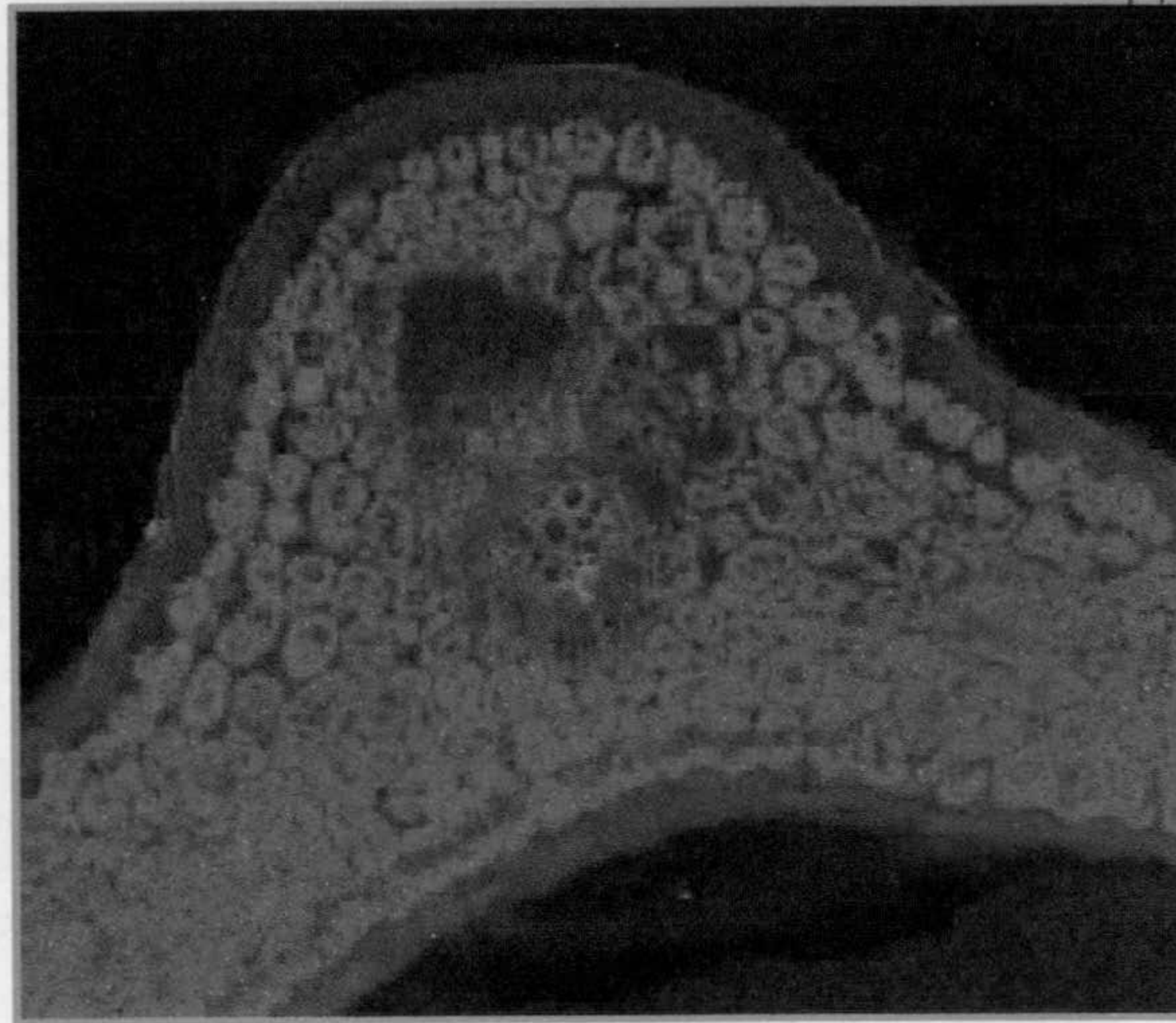


UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ..26/10/04.....
ENTRADA NUM. 3647



**ÓXIDO NÍTRICO Y ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO
SINTASA EN PEROXISOMAS DE HOJAS DE GUISANTE**

(Pisum sativum L.)

TESIS DOCTORAL

Ana M^a León López

Granada, 2004

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento <u>b 16511670</u>
N.º Copia <u>i 1782963x</u>



Biblioteca Universitaria de Granada

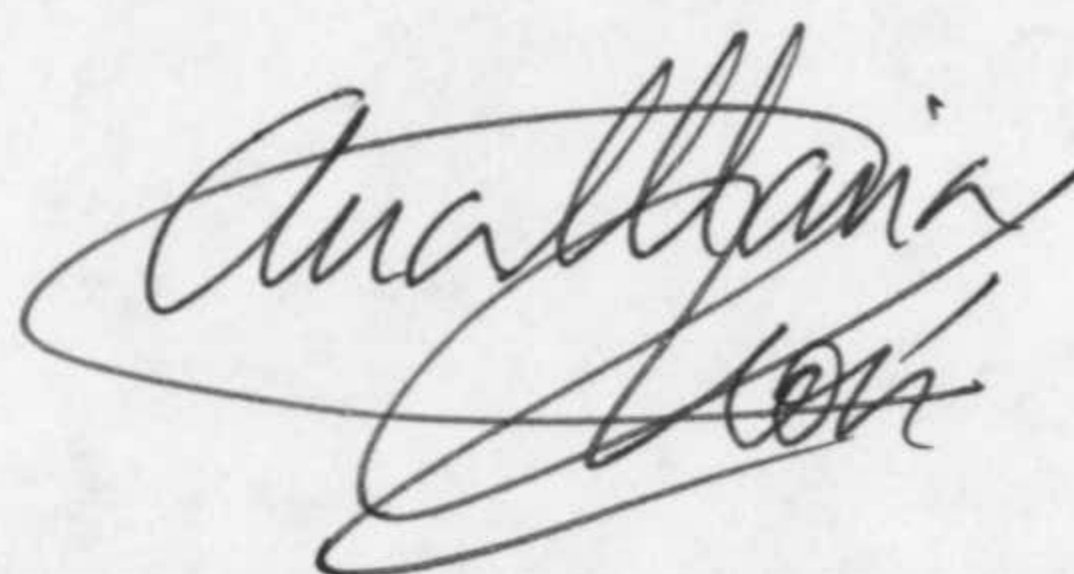


01255435

UNIVERSIDAD DE GRANADA
07 OCT. 2004
COMISION DE DOCTORADO

**Óxido nítrico y actividad óxido nítrico sintasa en peroxisomas
de hojas de guisante (*Pisum sativum* L.)**

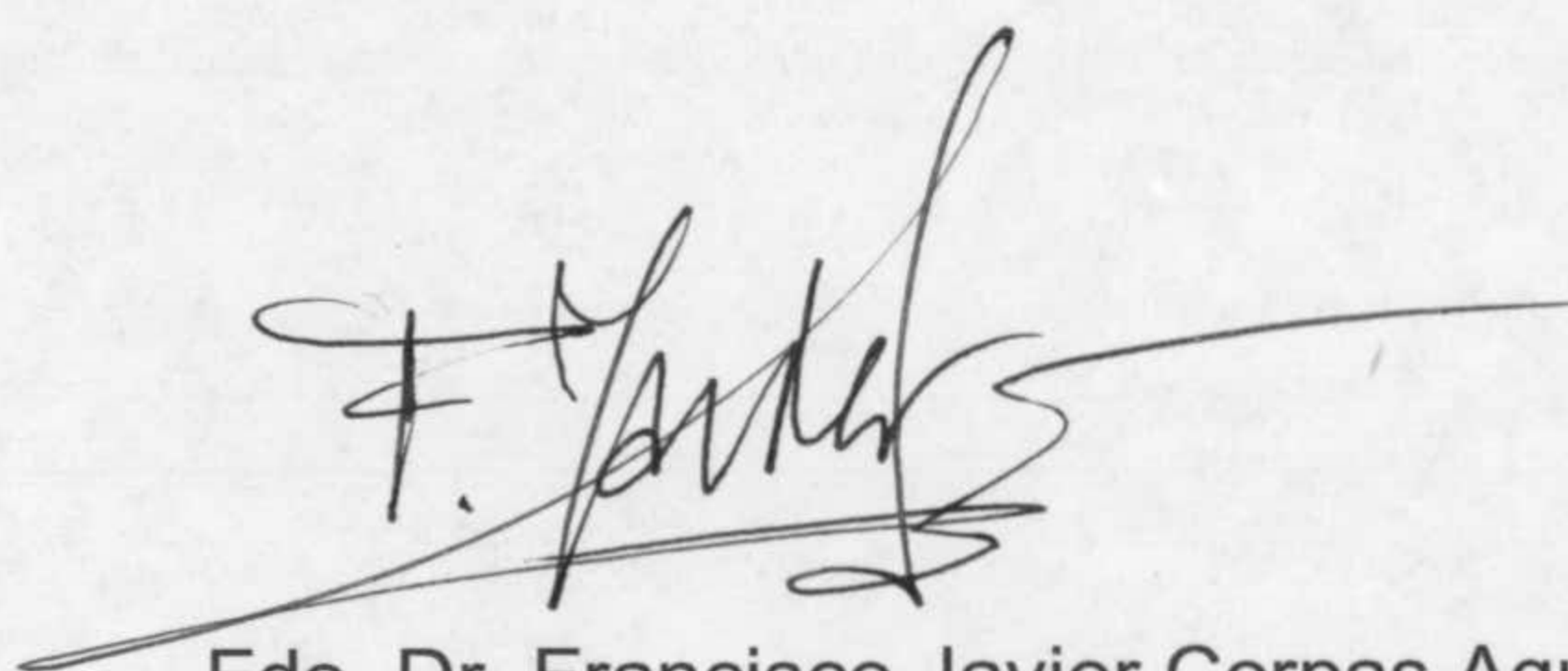
Memoria que presenta la Licenciada en Bioquímica Ana M^a León López para
optar al grado de Doctor



Fdo. Ana M^a León López

V^oB^o

Los directores del trabajo



Fdo. Dr. Francisco Javier Corpas Aguirre
Dr. en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC



Fdo. Dr. José Manuel Palma Martínez
Dr. en Ciencias Biológicas
Científico Titular del CSIC

Granada, Noviembre 2004

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

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

- *Vth Conference on "Oxygen, Free Radicals and Oxidative Stress in Plants"*. (Niza, noviembre de 2001)
- *XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International* (Paris, julio de 2002)
- XV Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (León, septiembre de 2002)
- *Conference on "Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants"* (Freising-Weihenstephan, Alemania, septiembre de 2003)
- *VI Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Ist Luso-Spanish Congress on Free Radicals* (Coimbra, Portugal, diciembre de 2003)
- *XIIIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International* (Buenos Aires, Argentina, mayo de 2004)

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

- FJ Corpas, JB Barroso, AM León, JM Palma, LM Sandalio, LA del Río "Peroxisomes as a source of nitric oxide". Nitric Oxide Signalling in Higher Plants (J R Magalhaes, R P Singh and L P Passos Eds.). Editorial: The Science Tech. Publisher. LCC. Houston, USA. (2003)
- FJ Corpas, JB Barroso, A Carreras, M Quirós, AM León, MC Romero-Puertas, FJ Esteban, R Valderrama, JM Palma, LM Sandalio, M Gómez and LA del Río (2004). Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants. *Plant Physiology* **136**: 1-12

En estos últimos años, durante la elaboración de esta tesis doctoral, he tenido la suerte de estar rodeada de gente de la cual he tenido la oportunidad de aprender, además de que han conseguido que me sienta siempre arropada y comprendida. Estoy segura de que sin ellos, este trabajo nunca hubiera sido posible realizarlo. Quiero expresar mi agradecimiento

A mis directores de tesis, el Dr. Fco. Javier Corpas y el Dr. José Manuel Palma, porque me han transmitido su pasión por la investigación, y por abordar este trabajo de una manera tan interdisciplinar, lo que me ha permitido aprender numerosas técnicas diferentes. Por resolver todas mis dudas, de cualquier tipo, y por todos los buenos ratos que hemos pasado.

A la Dra Luisa M^a Sandalio, por su inestimable ayuda con la microscopía electrónica, a pesar de estar siempre tan ocupada, y sin embargo, ser capaz de sacar tiempo para todo.

Al Dr. Luis Alfonso del Río, por poder contar con su apoyo siempre que lo he necesitado, y por su rigor científico.

Al Dr. Manolo Gómez, por toda su inestimable ayuda en el cuidado de las plantas, y por prestarse a echar una mano cuando lo he precisado.

A los doctores Juan Bautista Barroso y Alfonso Carreras, de la Universidad de Jaén, por toda su ayuda con el microscopio confocal y con el NOA, y por hacerme sentir tan bien allí con ellos.

Al Dr. José León, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas "Eduardo Primo Yúfera", de Valencia, por acogerme tan hospitalariamente, por haberme ayudado con la Molecular, y por las paellas.

A todas las personas con las que he compartido momentos en el laboratorio. A María Romero, con la que he aprendido y compartido experimentos, pero también muchos y muy buenos ratos. A Marina, nuestra francesa, por enseñarme con mucha paciencia la SQ. A Rosa, siempre dispuesta a echar una mano y a compartir un café; por todo lo que me ha apoyado durante estos años. A Elena, a mi lado siempre que he necesitado cualquier cosa, desde un medio hasta una receta. A María, por los buenos momentos. A nuestra nueva incorporación Diana, espero que todo te vaya muy bien. A Carmelo y Maripepa, por su ayuda en el laboratorio. A Ana Z, por los ratos tan buenos en el lab, por El Burgui y La Concha. A Carmen, por hacerme reír a carcajadas como nunca, por compartir Niza. A Raquel, por su admirable perseverancia y ser capaz de llevar todo para adelante. A mis compañeras de Valencia, Maricruz y Cris, gracias por hacerme sentir como en casa.

A la gente de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada y de Jaén, por su ayuda con la microscopía electrónica y confocal.

A ASI (Asociación de Becarios de Granada), a la FJI (Federación de Jóvenes Investigadores), y a todos los que luchan porque la situación de los becarios sea mejor.

A todos los que habéis estado ahí durante todos estos años, y que espero que sean muchos más; a todos los que habéis pasado y dejado buenos recuerdos. A Inma Sampedro, por nuestro reencuentro y por todo su apoyo, por su estancia en Sevilla. A Inma Sánchez, por ser tan linda y sensible como pocas personas más que conozco. A Luis, por enseñarme tantas cosas sin él saberlo, por recordarme la importancia de cada minuto vivido. A Dani, por las (infructuosas) clases de guitarra, por su pasión por la vida, por nuestra amistad. A Juan, por las muchas veces que me ha dado ánimos. A Jorge, por apoyarnos mutuamente, y saber siempre como arrancarme una sonrisa. A Martín, por las comidas en el "pasto" y por los buenos ratos. A Carlota, mi "meit"; por su optimismo, y por tantos años juntas ya apoyándonos. A Antonio, porque admiro su capacidad de abarcar todo, por el jazz, y las diapos. A las chicas de mi laboratorio "adoptivo": Maripepa, Eli y Maribel, que la vida os sonría. A Eduardo y Ernesto, por Kamchatka y por Lisboa. A Iratxe, por llevarme a ver la Alhambra, y por el valor de la amistad a pesar de la distancia y del tiempo.

A Eva, mi apoyo incondicional en estos años. Por estar siempre a mi lado, pasara lo que pasara, sobre todo últimamente, cuando más lo he necesitado. Que sigamos siempre así.

A toda mi familia, especialmente a la abuela "Amí", por ser un ejemplo a seguir de luchadora nata, por quererme tanto (y yo a ella). A mis tíos Rafael, Javier y María, porque fueron los primeros en animarme a investigar, y por todo lo que me han ayudado y alentado.

A mi hermana Marina, a la que admiro por su perseverancia y su energía. A mis padres, por haberme sabido transmitir sus valores, y porque en ellos sé que tendré siempre un apoyo incondicional, suceda lo que suceda. Por haberme respaldado en momentos difíciles. Por haber creído en mí y en mis posibilidades.

A Aníbal, porque todo es fácil y maravilloso contigo. Por ser simplemente tú. Gracias por todo.

Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencias y conocimiento...
Que numerosas sean las mañanas de verano
en que con placer, felizmente,
arribes a bahías nunca vistas;...
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios...
Ten siempre a Ítaca en la memoria.
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años;
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Ítaca te enriquezca...

Konstantino Kavafis, "Ítaca"

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La molécula de óxido nítrico (NO [·]).....	1
1.2. Metabolismo del NO [·] y de Especies de Nitrógeno Reactivo (RNS) en sistemas biológicos.....	2
1.3. El NO [·] en animales.....	5
1.3.1. Síntesis.....	5
1.3.1.1. Óxido nítrico sintasas (NOS).....	5
1.3.1.2. Xantina oxidorreductasa.....	7
1.3.2. Funciones fisiológicas y patofisiológicas del NO [·]	9
1.3.3. Mecanismos de señalización.....	10
1.4. El NO [·] en células vegetales.....	12
1.4.1. Interacciones del NO [·] en el metabolismo celular.....	12
1.4.2. Síntesis no enzimática.....	15
1.4.3. Síntesis enzimática.....	15
1.4.3.1. Actividad óxido nítrico sintasa.....	16
1.4.3.2. Variante de la proteína P de la glicina descarboxilasa (GDC).....	17
1.4.3.3. AtNOS1.....	18
1.4.3.4. Nitrato reductasa (NR).....	18
1.4.3.5. Nitrito:NO [·] reductasa (Ni-NOR).....	19
1.4.3.6. Xantina oxidorreductasa.....	19
1.4.3.7. Hemoproteínas.....	20
1.5. Mecanismos de señalización del NO [·] en plantas.....	20
1.5.1. Señalización a través del cGMP.....	20
1.5.2. Señalización a través del riboADP cíclico (cADPR) y el calcio (Ca ²⁺)..	22
1.6. Funciones del NO [·] en plantas.....	23
1.6.1. Crecimiento y desarrollo.....	23
1.6.2. Estrés biótico y abiótico.....	25
1.6.2.1. Estrés biótico.....	25
1.6.2.2. Muerte celular programada (<i>Programmed cell death, PCD</i>) o apoptosis...	26
1.6.2.3. Estrés abiótico.....	28
1.7. Transporte del NO [·] en plantas.....	30

1.8. Peroxisomas. Metabolismo y función.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	35
3.2. Preparación de homogenados.....	37
3.3. Aislamiento y purificación de peroxisomas en gradientes de sacarosa.....	38
3.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA).....	40
3.4.1. EGPA nativa.....	40
3.4.2. EGPA en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS).....	40
3.5. Detección de proteínas en geles de acrilamida.....	41
3.5.1. Tinción con azul Coomassie.....	41
3.5.2. Tinción con plata.....	41
3.5.3. Tinción con el Kit ultra sensible.....	41
3.6. Transferencia de proteínas e inmunodetección (técnica de Western).....	41
3.6.1. Transferencia de proteínas.....	41
3.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia.....	42
3.7. Obtención, caracterización y purificación del antisuero de la iNOS.....	43
3.7.1. Determinación del título de los antisueros.....	44
3.7.2. Purificación del anticuerpo de la iNOS mediante inmunoafinidad.....	45
3.7.3. Obtención de la fracción de IgG a partir del antisuero.....	45
3.8. Preparación de la columna de afinidad con la fracción IgG del anticuerpo frente a la iNOS.....	46
3.9. Purificación de proteínas peroxisomales inmunorrelacionadas a la iNOS mediante cromatografía de afinidad.....	47
3.10. Degradación de iNOS por endoproteasas peroxisomales.....	48
3.11. Identificación/secuenciación de proteínas peroxisomales inmuno- relacionadas con la iNOS.....	48
3.11.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	48
3.11.2. Microcapillary NanoLC/MS (μ LC/MS).....	49
3.11.3. Secuenciación de EDMAN.....	49
3.12. Determinación de actividades enzimáticas.....	50
3.12.1. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6).....	50

3.12.2. Xantina oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22) y xantina deshidrogenasa (XDH; EC 1.2.1.27).....	50
3.12.2.1. Actividad total.....	50
3.12.2.2. Actividad isoenzimática.....	50
3.12.3. Glicolato oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1.).....	51
3.12.4. Hidroxipiruvato reductasa (HPR; EC 1.1.1.29).....	51
3.12.5. Actividad óxido nítrico sintasa (NOS).....	51
3.13. Determinación de la concentración de proteínas.....	52
3.14. Microscopía electrónica.....	52
3.14.1. Preparación de las muestras.....	52
3.14.2. Inmunolocalización subcelular de proteínas por marcaje con oro coloidal.....	52
3.15. Microscopía láser confocal.....	53
3.15.1. Detección de NO.....	53
3.15.2. Colocalización de catalasa y proteínas inmunorelacionadas con la iNOS.....	54
3.16. Técnicas de detección de óxido nítrico (NO).....	55
3.16.1. Resonancia paramagnética electrónica (EPR).....	55
3.16.2. Fluorimetría.....	56
3.16.3. Quimioluminiscencia de ozono.....	57
3.17. Aislamiento de ácidos nucleicos (ARN y ADN plasmídico).....	58
3.17.1. Aislamiento y cuantificación de ARN.....	58
3.17.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y ligación de fragmentos de ADN en vectores de clonación.....	59
3.17.3. Preparación de células competentes, transformación y aislamiento de plásmidos recombinantes.....	60
3.17.3.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	60
3.17.3.2. Transformación de bacterias competentes.....	60
3.17.3.3. Aislamiento de plásmido recombinantes.....	61
3.17.3.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	62
3.18. Transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), diseño y síntesis de oligonucleótidos.....	62
3.18.1. Transcripción inversa para la obtención de ADN.....	62
3.18.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	63

3.18.3. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención del ADNc de la NOS y de la xantina deshidrogenasa.....	63
3.18.4. Estudio de expresión mediante PCR semicuantitativa.....	65
3.19. Transferencia de northern y detección mediante sondas marcadas con ³² P.....	66
3.19.1. Transferencia de Northern.....	66
3.19.2. Detección mediante sondas marcadas con ³² P.....	67
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Producción de NO [·] en extractos de plántulas de guisante.....	69
4.1.1. Producción de NO [·] durante el desarrollo postgerminativo de las plántulas.....	69
4.1.2. Producción de NO [·] en plántulas sometidas a distintos tratamientos.....	71
4.2. Caracterización de un anticuerpo frente a la iNOS de macrófagos de ratón.....	72
4.3. Caracterización del antisuero frente a distintos órganos de guisante.....	73
4.4. Proteínas de hojas inmunorrelacionadas con la iNOS en plantas de guisante sometidas a distintos tratamientos.....	74
4.5. Aproximación molecular mediante análisis de secuencias de NOS en animales y diseño de cebadores.....	76
4.6. Localización subcelular de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS.....	76
4.7. Caracterización de proteínas de peroxisomas de hojas inmunorrelacionadas con la iNOS.....	82
4.8. Actividad NOS en peroxisomas de hojas.....	84
4.9. Purificación y caracterización de proteínas de peroxisomas inmunorrelacionadas con la iNOS.....	85
4.10. Producción endógena de NO [·] en peroxisomas de hojas de guisante.....	88
4.10.1. Resonancia paramagnética electrónica (EPR) o <i>resonancia de spin electrónico (ESR)</i>	88
4.10.2. Fluorimetría.....	89
4.10.3. Quimioluminiscencia de ozono.....	90
4.11. Xantina oxidoreductasa (XOR) de hojas de guisante.....	91
4.11.1. Actividad y niveles de proteína xantina oxidoreductasa en extractos de plántulas de guisante.....	91

4.10.2 Expresión de la XDH en plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos.....	92
5. DISCUSIÓN.....	97
• Producción endógena de NO [•] durante el desarrollo postgerminativo.....	97
• Producción endógena de NO [•] en situaciones de estrés.....	99
• Sistemas de generación de NO [•] en hojas de guisante.....	102
• Proteínas de peroxisomas inmunorelacionadas con la NOS animal.....	105
• Producción de NO [•] en peroxisomas.....	108
• Función de los peroxisomas en la señalización por NO [•]	111
6. CONCLUSIONES.....	115
7. BIBLIOGRAFÍA.....	117
8. ABREVIATURAS.....	141

Introducción

1.1. LA MOLÉCULA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO·)

El óxido nítrico (monóxido de nitrógeno, NO·) es una molécula gaseosa que hasta hace pocos años se consideraba tan sólo un gas tóxico. Sin embargo, durante la pasada década, se consolidó como un mensajero celular fundamental en animales. Primero se identificó como el factor de relajación endotelial (*EDRF*, *endothelium-derived relaxing factor*), debido a su potencial vasodilatador (Ignarro y col., 1987; Palmer y col., 1987), y posteriormente se descubrió que esta molécula regulaba múltiples funciones fisiológicas y patofisiológicas en mamíferos (Moncada y col., 1991; Ignarro, 2000). La revista *Science* reconoció en el año 1992 la importancia biológica del NO· eligiéndola “Molécula del Año” (Koshland, 1992), y en 1998 el Premio Nobel en Fisiología y Medicina recayó en los investigadores Ignarro, Murad y Fuchgott por sus trabajos sobre el NO· y su función como molécula señal en células de mamíferos.

El NO· contiene un electrón desapareado en un orbital π_{2p} antienlazante (Fig. 1.1). Por esta característica es una molécula paramagnética y un radical libre. El NO· puede existir como tres especies distintas e interconvertibles, ya que puede adoptar una estructura energéticamente más favorable perdiendo o ganando un electrón. Estas tres especies son: el radical (NO·), el catión nitrosonio (NO⁺), y el anión nitroxilo (NO⁻), las cuales difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química (Stamler y col., 1992; Hughes, 1999; Wojtaszek, 2000). La interconversión entre estas tres especies puede tener lugar *in vivo*, por lo que todas ellas deben tenerse en consideración para explicar la actividad biológica del NO·.

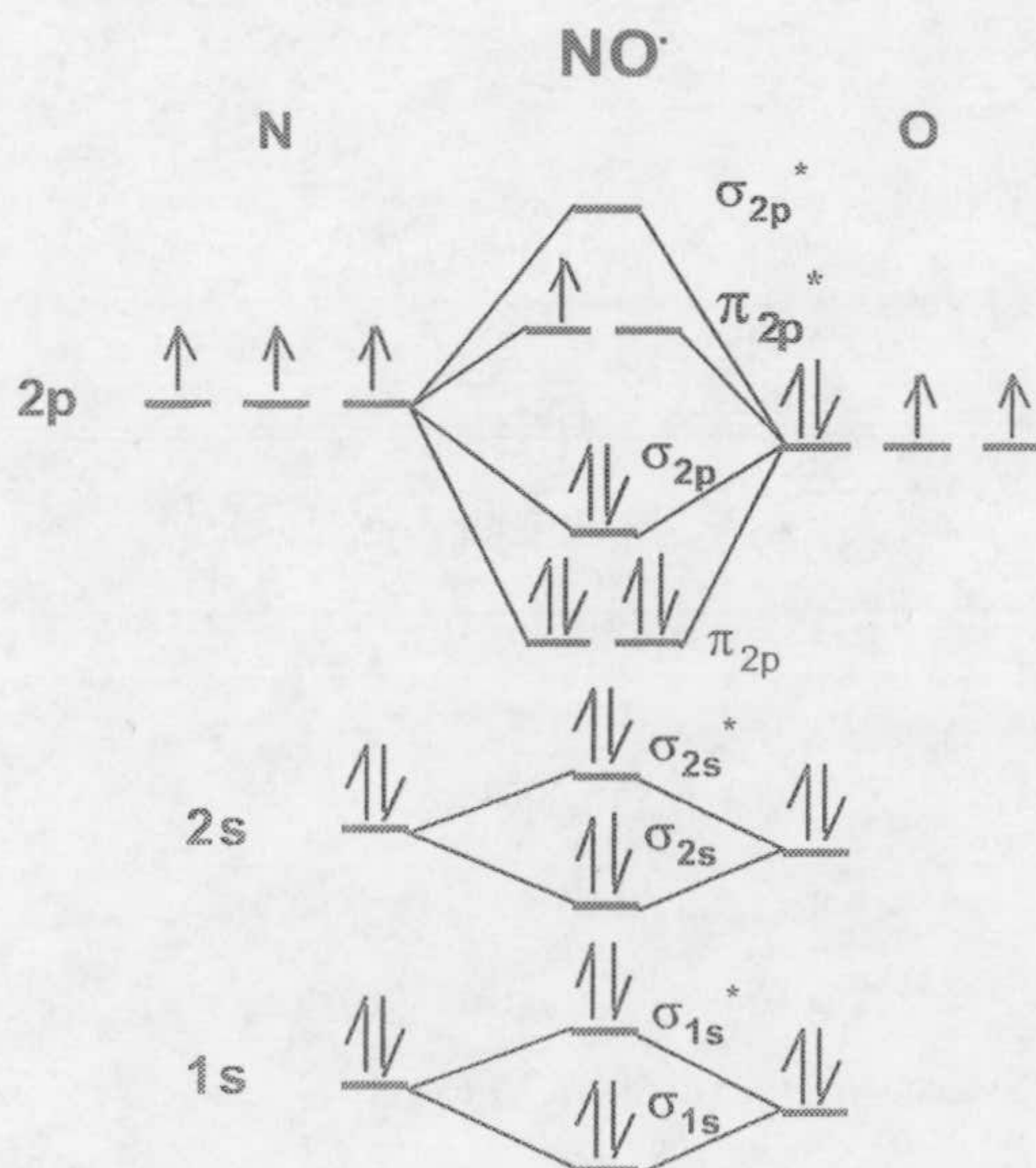


Fig. 1.1. Configuración electrónica de la molécula de óxido nítrico (NO·).

El NO· es ligeramente soluble en agua (0,047 ml · ml⁻¹ H₂O; a 20°C y 1 atm), y algo más soluble en solventes orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Por lo tanto, es capaz de moverse por difusión por las partes hidrófilas de la célula, como el citoplasma, pero también puede moverse libremente a través de la fase lipídica de las membranas. Por lo tanto, el NO· puede difundir hasta células vecinas o permanecer en la misma célula en la que se ha producido. Sin embargo, como es un radical libre reactivo, posee una vida media relativamente corta, del orden de unos segundos, de manera que el efecto que puede ejercer el NO· se limita a la célula en la cual se produce, o a las células vecinas más próximas.

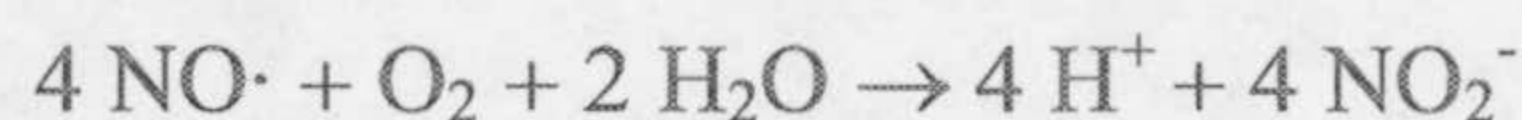
1.2. METABOLISMO DEL NO· Y DE ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO (RNS) EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

De una manera sencilla, se define radical libre como cualquier molécula independiente que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular (Halliwell y Gutteridge, 2000). El término “especies de nitrógeno reactivo” (*reactive nitrogen species, RNS*) engloba gran cantidad de moléculas y compuestos distintos, con propiedades también diferentes, cuya única característica común es ser derivados del NO· (Tabla 1.1). La mayoría de estos compuestos no son radicales, y algunos de ellos, como el peroxinitrito (ONOO⁻) también pueden ser englobados dentro del término especies de oxígeno reactivo (*reactive oxygen species, ROS*).

Tabla 1.1. Especies de nitrógeno reactivo.

Radicales	Óxido nítrico (NO·)
	Dióxido de nitrógeno (NO ₂ ·)
No radicales	Ácido nitroso (HNO ₂)
	Trióxido de dinitrógeno (N ₂ O ₃)
	Tetróxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄)
	Ión tritronio (NO ₂ ⁺)
	Peroxinitrito (ONOO ⁻)
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)
	Alquil peroxinitrito (RNOONO)
	Anión nitroxilo (NO ⁻)
	Catión nitrosonio (NO ⁺)
	Cloruro de nitrilo (ClNO ₂)

En soluciones acuosas, el NO· se oxida produciendo principalmente el ión nitrito (NO₂⁻), según la siguiente reacción:

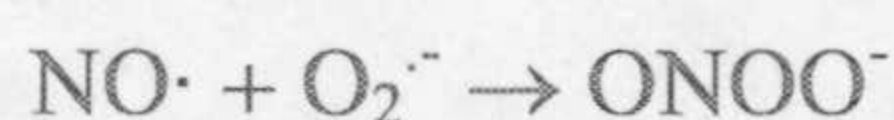


De hecho, la formación de nitratos y nitritos se usa frecuentemente para determinar la presencia de NO· en los sistemas biológicos.

El NO· generalmente no reacciona con la mayoría de los compuestos no radicales; por ejemplo, la velocidad de reacción con el grupo tiol (-SH) es baja. Para generar tio-nitritos (normalmente llamados nitrosotioles, -SNO), el NO· se convierte previamente en un óxido mayor de nitrógeno (por ejemplo, N₂O₃) o en peroxinitrito (ONOO⁻).

El NO· reacciona rápidamente con muchos compuestos radicales, como el peroxilo (RO₂[·]) o el hidroxilo (OH[·]). Por ejemplo, su constante de velocidad con el radical tirosilo (TyrO[·]) es muy elevada. Los radicales de tirosina son esenciales en los centros activos de algunas enzimas, como la ribonucleótido reductasa. Uno de los efectos tóxicos del exceso de NO· sobre las células puede ser la inhibición de esta enzima, aparentemente porque el NO· reacciona con el radical tirosilo necesario para su actividad catalítica (Lepoivre y col., 1994).

El NO· reacciona con el ión superóxido (O₂^{-·}) para dar lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO⁻) (Beckman y Koppenol, 1996; Squadrito y Pryor, 1998), según la siguiente reacción química:



Esta reacción transforma dos radicales relativamente poco reactivos en una especie radical mucho más reactiva (Beckman y col., 1990; Pryor y Squadrito, 1995) y tiene una de las constantes de reacción más altas conocidas para el NO· (Goldstein y Czapski, 1995). Por lo tanto, la formación de peroxinitrito depende de las concentraciones de ambos radicales libres y, por lo tanto, de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) y superóxido dismutasa (SOD). De hecho, las células pueden controlar la formación de peroxinitrito intracelular limitando la concentración de O₂^{-·} a través de la SOD.

Esta reacción tiene además importancia biológica ya que se antagonizan los efectos biológicos de los radicales que la forman. Así, el NO· puede proteger del daño causado por el O₂^{-·}, e inhibir la peroxidación lipídica en algunos sistemas eliminando los radicales RO₂[·] (Rubbo y col., 1995).

Se ha demostrado que el ONOO^- es capaz de reaccionar con la mayoría de la biomoléculas (Beckman y col., 1990), incluyendo proteínas de bajo peso molecular y grupos tioles de proteínas (Radi y col., 1991; Karoui y col., 1996; Quijano y col., 1997). No obstante, *in vivo*, sólo un número limitado de moléculas interaccionan directamente con el ONOO^- , ya que esta especie reacciona rápidamente con el dióxido de carbono en una reacción compleja para dar lugar a intermediarios nitrantes, nitrosilantes y especies oxidantes como los radicales libres NO_2^\cdot y CO_3^\cdot (Squadrito y Pryor, 1998). Estas especies reactivas serían realmente las responsables de la mayoría de los efectos causados por el ONOO^- en las células. Una de las formas protonadas del ONOO^- es el ONOOH , una poderosa especie oxidante. Al añadir ONOO^- a las células se protona rápidamente provocando la oxidación de lípidos (Graham y col., 1993) y de los grupos $-\text{SH}$, la nitración y la desaminación de las bases del ADN (Yermilov y col., 1996), la nitración de los aminoácidos aromáticos de las proteínas, y la nitrosilación de otros compuestos, como el glutatión (GSH) para dar lugar a *S*-nitrosoglutation (Patel y col., 1999). La formación de *S*-nitrosoglutation es un mecanismo fundamental de protección de la célula frente al daño oxidativo provocado por el ONOO^- (Karoui y col., 1996), pudiendo además intervenir en varias rutas de señalización celular (Moro y col., 1994; Mayer y col., 1995).

En la figura 1.2 se esquematizan las principales reacciones del NO^\cdot en sistemas biológicos.

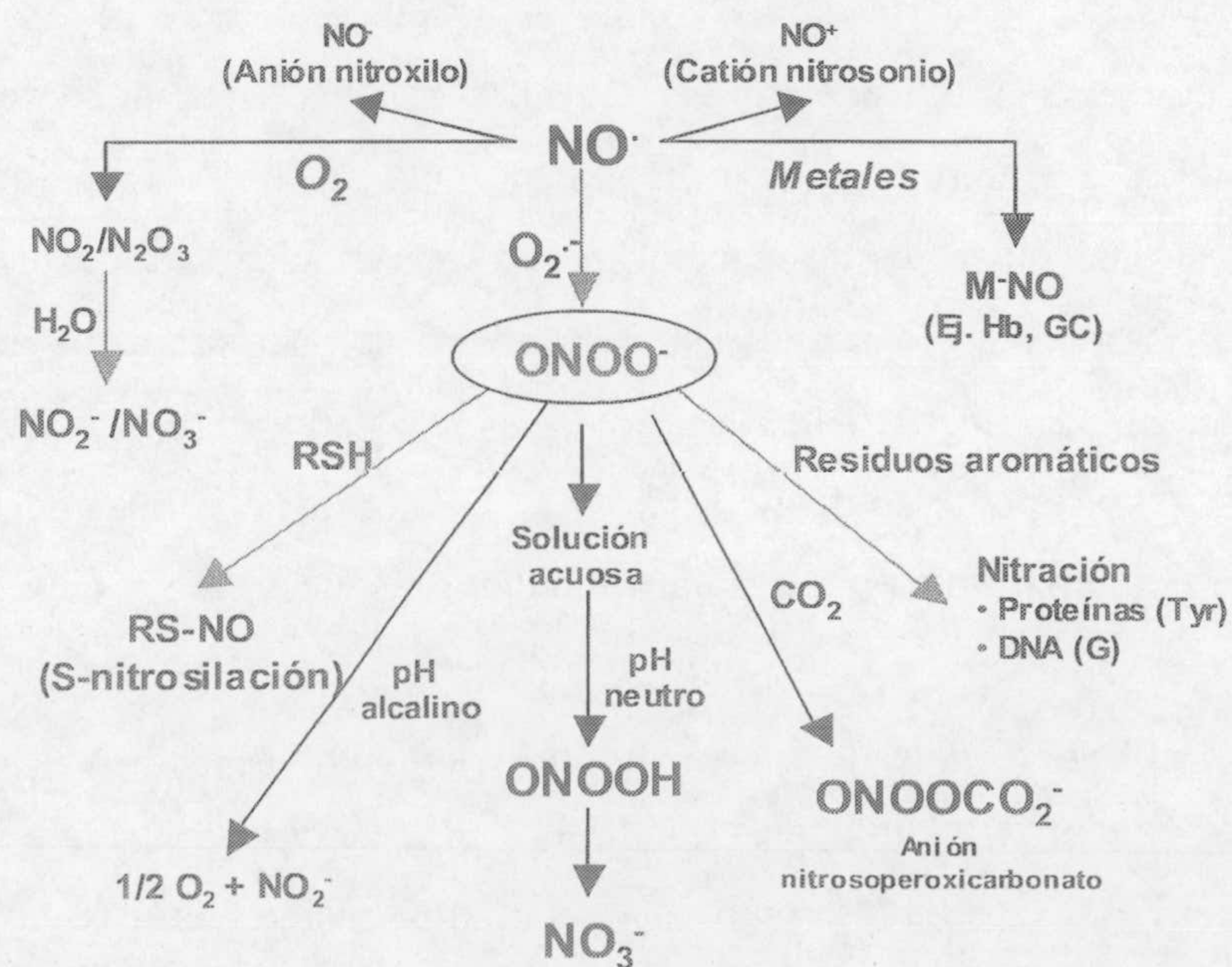


Fig. 1.2. Principales reacciones bioquímicas del NO^\cdot en sistemas biológicos.

1.3. EL NO· EN ANIMALES

1.3.1. Síntesis

1.3.1.1. Óxido nítrico sintasas

El NO· en mamíferos se sintetiza principalmente por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOSs) (Nathan y Xie, 1994), que convierten el aminoácido L-arginina en NO· y L-citrulina (Fig. 1.3). La reacción requiere oxígeno y NADPH, y la participación de cuatro cofactores: FAD, FMN, tetrahidrobiopterina (BH₄) y el grupo hemo. El centro hemo presenta propiedades espectrales similares a las del citocromo P-450.

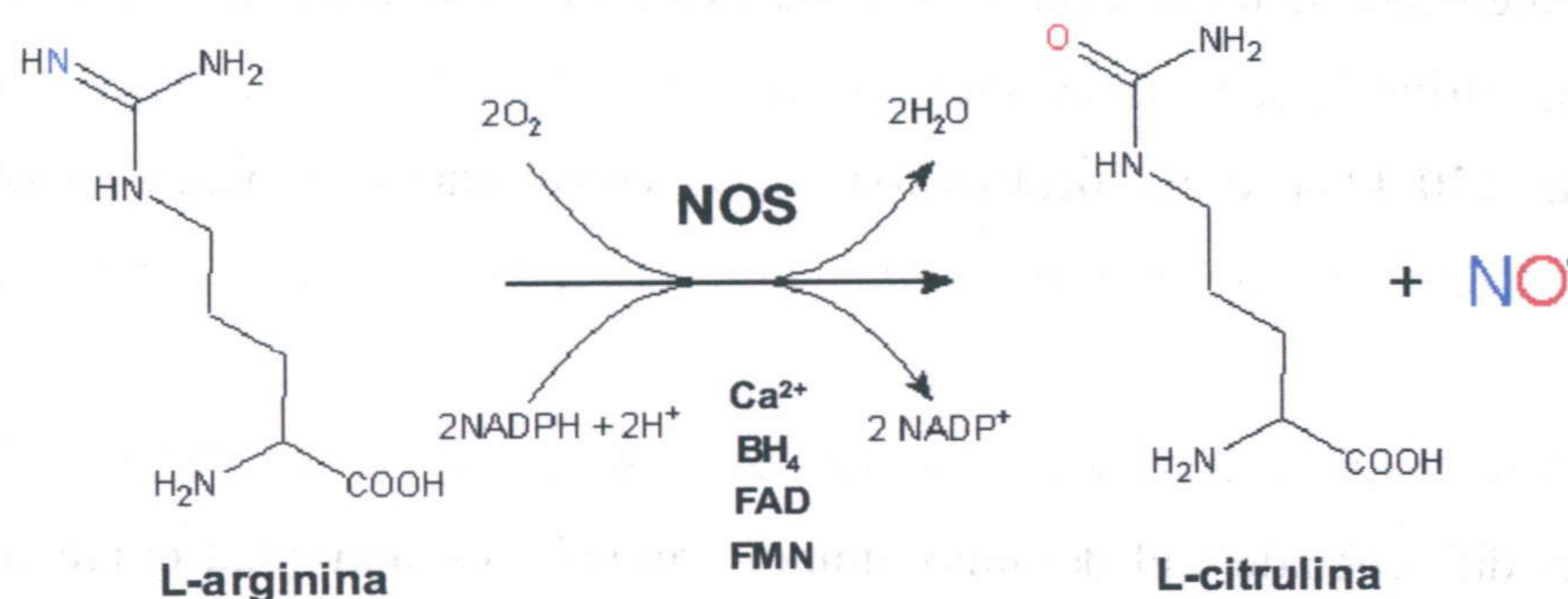


Fig. 1.3. Reacción química catalizada por la NOS.

Se han identificado tres isoformas de NOS en mamíferos (Nathan y Xie, 1994; Stuehr, 1999), que se denominan según el tejido donde se detectaron por primera vez: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), y la NOS inducible, en macrófagos (iNOS). La nNOS es la de mayor tamaño molecular, con una masa de aproximadamente 160 kDa. La eNOS y la iNOS poseen un tamaño de aproximadamente 135 y 130 kDa, respectivamente. Tanto la nNOS como la eNOS se expresan de forma constitutiva y requieren calcio (Ca²⁺) y calmodulina para ser activas, de manera que su actividad se puede ver disminuida por niveles bajos de Ca²⁺ intracelular. La iNOS se identificó por primera vez en macrófagos y en células hepáticas después de un tratamiento con endotoxinas o ciertas citoquinas. La iNOS se une fuertemente a la calmodulina y su actividad es independiente de Ca²⁺. Esta enzima cataliza la formación rápida de NO·, generando concentraciones localizadas mucho más elevadas de lo normal, en el rango micromolar (Knowles y Moncada, 1994).

Las NOSs pueden expresarse en muchos órganos y tejidos del cuerpo humano (Halliwell y Gutteridge, 2000). Por ejemplo, la nNOS se encuentra de manera

constitutiva en varios tipos de neuronas, tanto en el sistema central como en el periférico, aunque se puede inducir por algunos tratamientos. La eNOS es igualmente constitutiva, pero sus niveles pueden también inducirse en el endotelio vascular. Por otro lado, la iNOS puede expresarse en el epitelio del pulmón.

Se ha purificado una nueva isoforma de NOS a partir de mitocondrias aisladas de hígado de rata (mtNOS) (Tatoyan y Giuvili, 1998). Esta NOS se encuentra asociada a membranas y posee una subunidad de 130 kDa. Esta enzima muestra reactividad frente a anticuerpos de la iNOS, por lo que se piensa que se asemeja a ella, si bien esta mtNOS es constitutiva y requiere Ca^{2+} para ser activa.

Recientemente se ha detectado otra NOS en peroxisomas de hepatocitos de rata después de la estimulación con citoquinas (Stolz y col., 2002). Esta NOS posee una subunidad de 130 kDa y su localización se ha corroborado mediante estudios de inmunofluorescencia pues se colocalizaba con la catalasa, enzima marcadora de peroxisomas.

Todas las NOS son activas en forma homodimérica. Cada subunidad presenta dos dominios diferenciados: el dominio amino-terminal, con actividad oxigenasa, y el dominio carboxilo-terminal, con actividad reductasa (Mayer y Hemmens, 1997). El dominio oxigenasa contiene un grupo hemo semejante al del citocromo P-450, y un sitio de unión para el cofactor BH_4 . El dominio reductasa contiene los sitios de unión para el NADPH, FAD y FMN, y presenta bastante homología con la NADPH citocromo P-450 reductasa. Ambos dominios están conectados por un sitio de unión para la calmodulina (CaM) (Fig. 1.4). Cada isoforma presenta un dominio amino terminal diferente que determina su localización intracelular (Mayer y Hemmens, 1997).

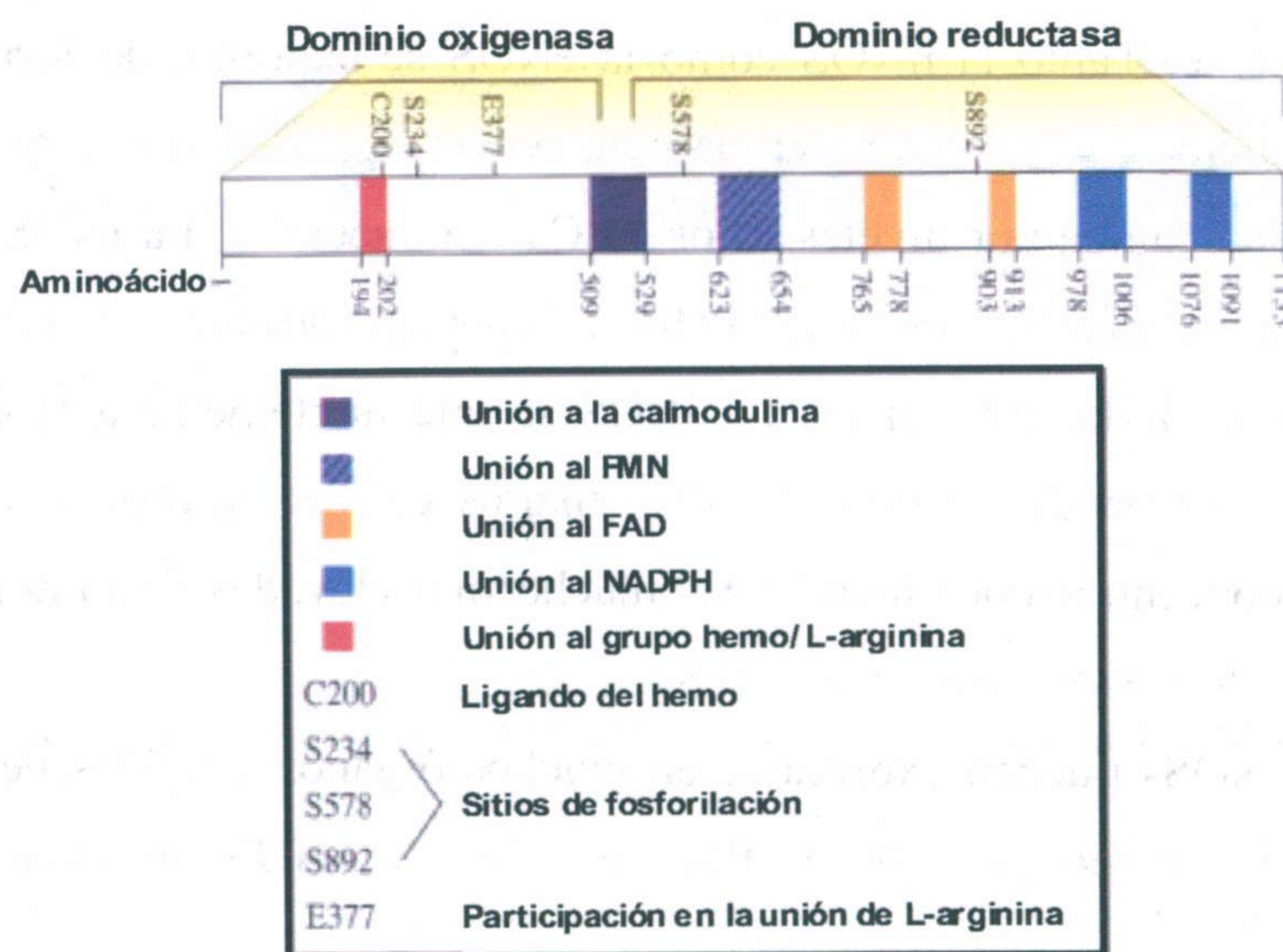


Fig. 1.4. Dominios y zonas de unión de los diferentes cofactores de la iNOS humana.

La reacción total supone una oxidación en la que entran en juego 5 electrones, suministrados por el NADPH, y tiene lugar en dos etapas. Primero tiene lugar la oxigenación de la L-arginina a N^G-hidroxiarginina, y posteriormente la oxigenación de la N^G-hidroxiarginina hasta L-citrulina y NO[•]. En primer lugar, los electrones se transportan desde el NADPH, unido al extremo C-terminal, hasta el hierro del grupo hemo, a través del FAD. El O₂ entonces se reduce y se incorpora al grupo guanido de la L-arginina. La calmodulina unida permite el paso de los electrones desde las flavinas al grupo hemo (Fig. 1.5).

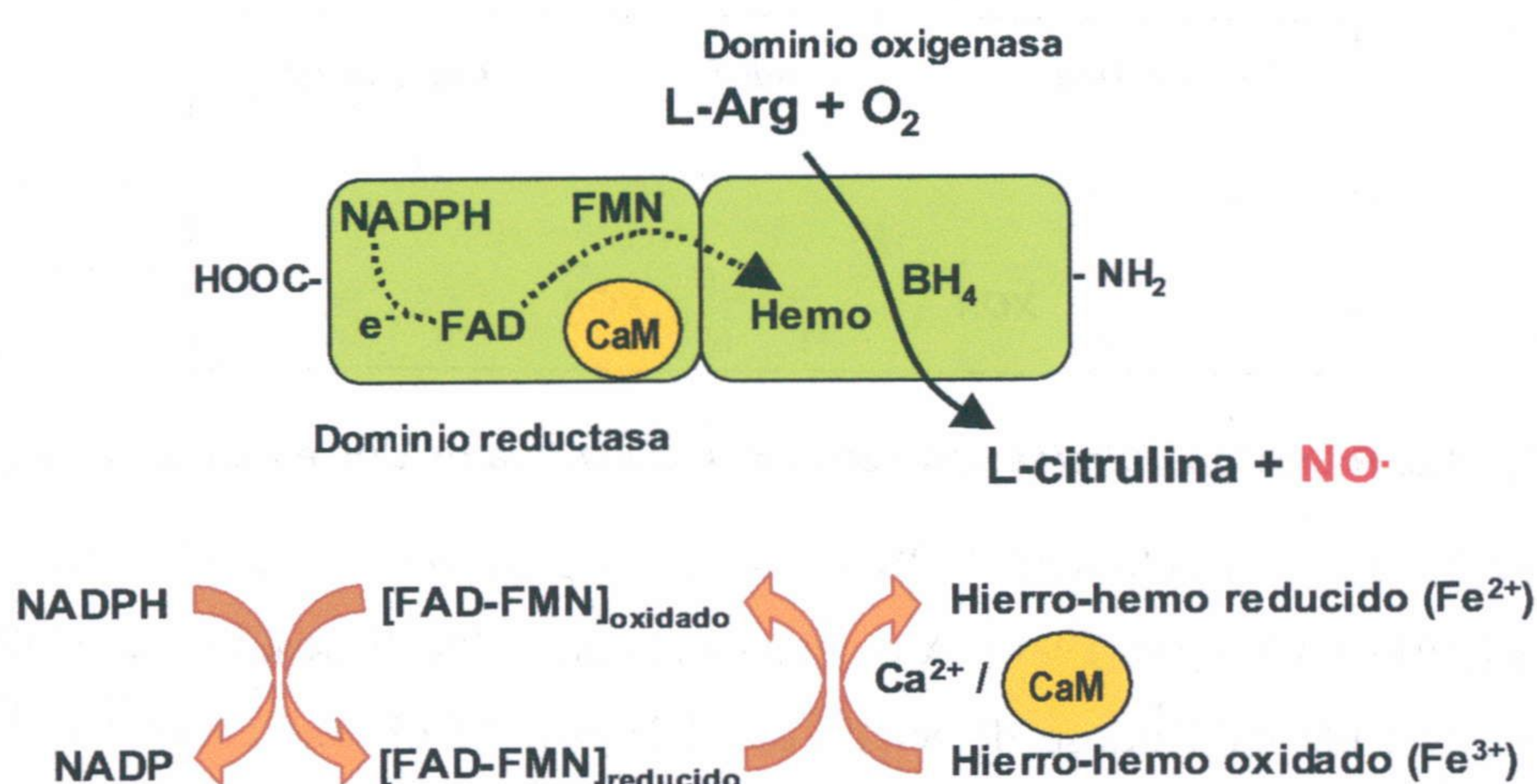


Fig. 1.5. Mecanismo de transferencia de electrones en el dímero de NOS animal para la producción de NO[•].

1.3.1.2. Xantina oxidorreductasa

La xantina oxidorreductasa (XOR) es una sulfo-molibdo-flavoenzima, presente en la leche y en muchos otros tejidos, que ha sido estudiada durante más de 100 años gracias a su facilidad para ser purificada (Massey y Harris, 1997). Está compuesta de dos subunidades idénticas de aproximadamente 150 kDa, y cada subunidad contiene como cofactores molibdeno, FAD, y dos centros redox Fe-S (Harrison, 2002). La XOR es la última enzima del catabolismo de las purinas, y cataliza la oxidación de la hipoxantina y/o de la xantina a ácido úrico (Fig 1.6). La XOR puede existir en dos formas interconvertibles: la xantina oxidasa (XOD) y la xantina deshidrogenasa (XDH). La xantina oxidasa transfiere los electrones al oxígeno, produciendo radicales superóxido (O₂⁻), mientras que la XDH los transfiere al NAD⁺ (Halliwell y Gutteridge, 2000). *In vivo*, la XDH es la forma predominante. La XDH puede convertirse en XOD bien por oxidación de sus grupos tioles (-SH) o por rotura proteolítica, lo cual puede ocurrir

cuando se dañan los tejidos. Hasta hace unos años se conocía poco acerca de la XOR humana, excepto que su deficiencia hereditaria causaba una enfermedad asintomática conocida como xantinuria (Simmonds y col., 1995). Hace dos décadas, se propuso que la XOR podría participar, por su capacidad para generar ROS, en el proceso de isquemia-reperfusión (Granger y col., 1986; McCord, 1985). Desde la publicación de esta hipótesis, esta enzima cobró un fuerte interés como fuente de ROS, no sólo en múltiples procesos patofisiológicos, sino también en procesos de señalización (Harrison, 2002).

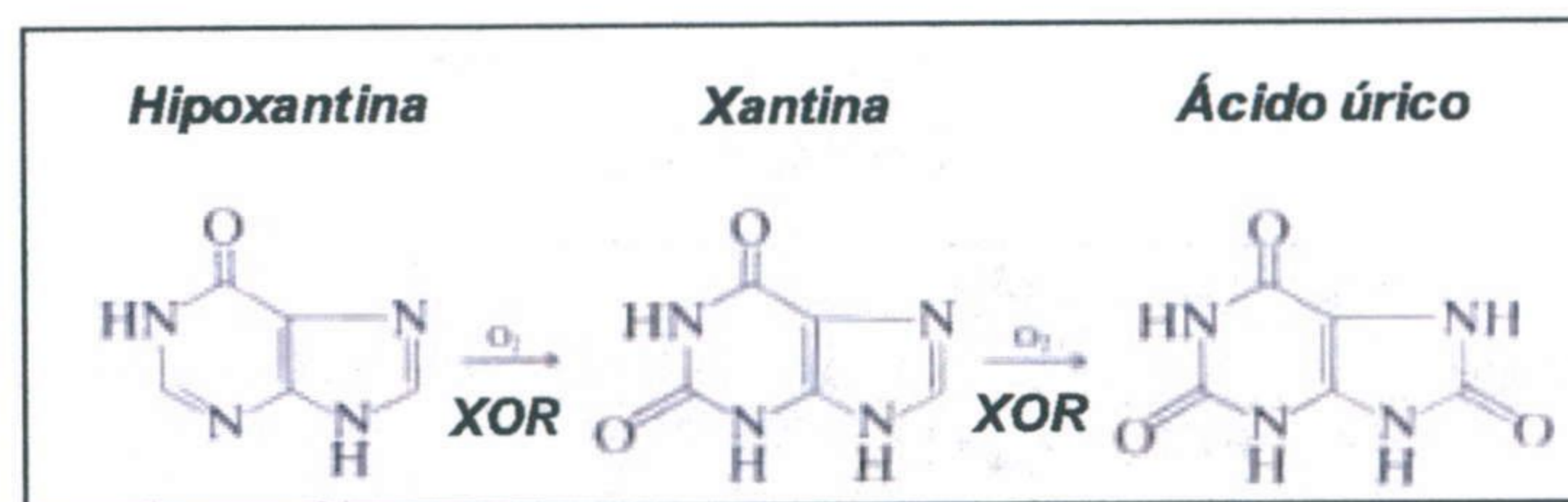


Fig. 1.6. Reacción química catalizada por la xantina oxidoreductasa (XOR).

Se ha descrito actividad XOR en todas las especies estudiadas, incluidas las bacterias (Parks y Granger, 1986). A nivel subcelular, la localización de la XOR ha sido muy controvertida habiéndose detectado en el citosol de células endoteliales bovinas (Jarasch y col. 1981), así como en peroxisomas y citosol de hepatocitos de rata (Angermuller y col., 1987; Dikov y col., 1988; Ichikawa y col., 1992). Más recientemente, estudios de microscopía confocal en células endoteliales humanas mostraron que la XOR, además de encontrarse en el citosol, se localiza en la parte externa de la membrana celular (Rouquette y col., 1997). La enzima se distribuía de forma asimétrica, siendo el marcaje más intenso en zonas próximas a células vecinas. Esta localización externa se ha descrito también en células endoteliales bovinas y porcinas (Vickers y col., 1998), y en la superficie luminal de las células endoteliales sinusoidales del hígado de rata (Frederiks y col., 1999).

Se ha demostrado que la XOR de animales es capaz de producir $NO\cdot$. Los primeros trabajos detectaron la producción de $NO\cdot$, por quimioluminiscencia de ozono, tras la incubación de la XOR con NADH y nitrato (Millar y col., 1998) o nitrito (Zhang y col., 1998) bajo condiciones anaeróbicas. Posteriormente, se comprobó que la reducción del nitrito tiene lugar en el sitio de unión de molibdeno, en contraste con la reducción del NAD^+ y el oxígeno, que ocurren en el sitio de unión del FAD (Fig. 1.7) (Godber y col., 2000a).

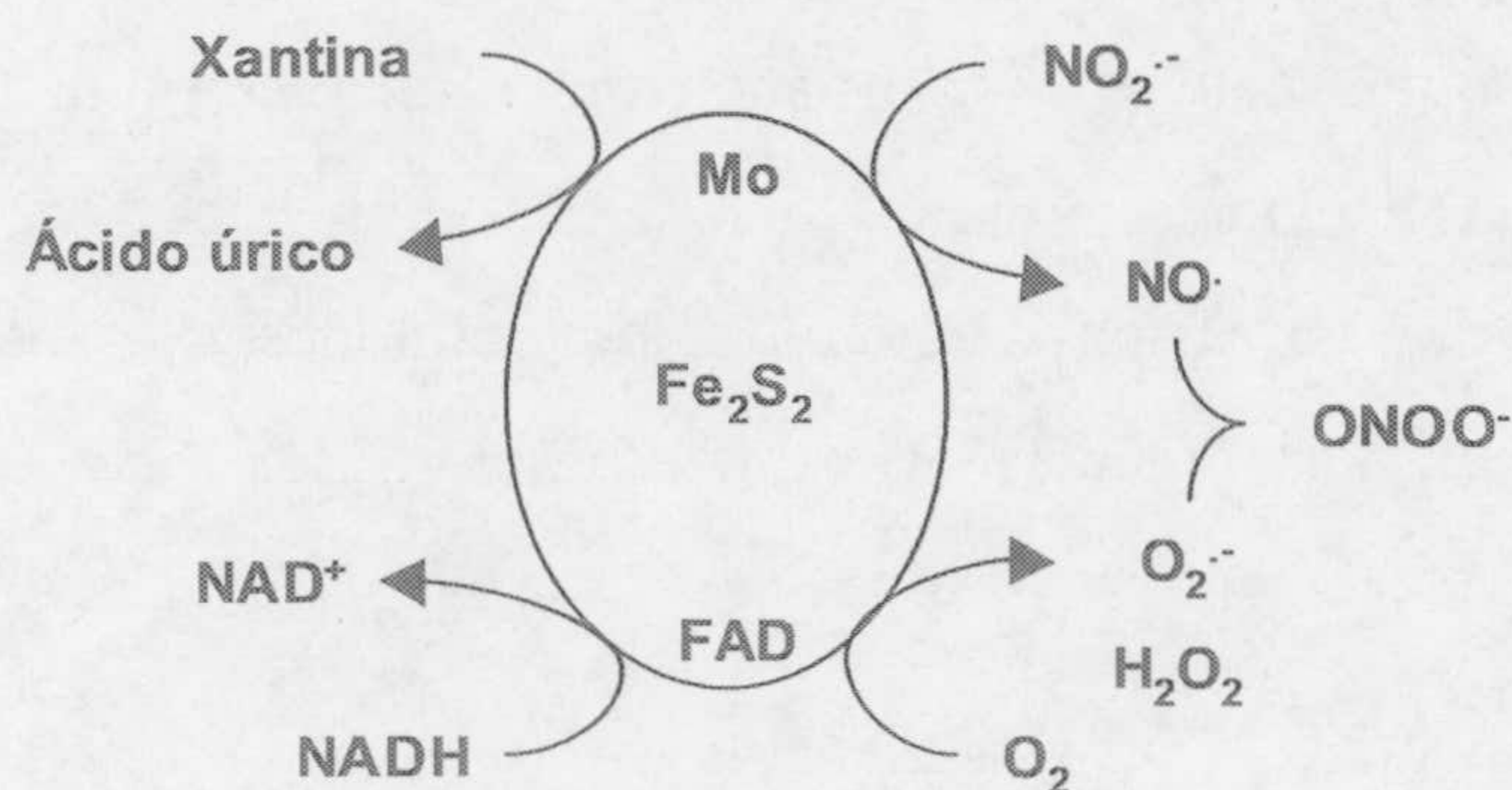


Fig. 1.7. Modelo propuesto para la producción de NO· y peroxinitrito por la enzima xantina oxidoreductasa (XOR) (Harrison, 2002). Bajo condiciones anaeróbicas y en presencia de nitrito y un sustrato reductor, como xantina o NADH, el NO· se genera en el sitio Mo. En presencia de O₂, se reduce en el sitio FAD para dar lugar a superóxido (O₂⁻), que puede reaccionar con el NO· para producir peroxinitrito (ONOO·).

Otros autores han demostrado que el molibdeno unido orgánicamente puede reducir el nitrito a NO· en ausencia del componente proteico (Murray y col., 2001). Mediante el estudio de la cinética de producción de NO· y utilizando espectroscopía de resonancia electrónica paramagnética, se ha sugerido que la reducción del nitrito por la XOR en el miocardio isquémico puede generar niveles de NO· comparables a los producidos por la NOS (Li y col., 2001).

La producción de NO· catalizada por la XOR es potencialmente importante en los mecanismos de señalización en el endotelio vascular, así como un sistema Fe₂S₂ bactericida en el tracto digestivo (Hancock y col., 2002). También puede tener una función importante en los procesos de isquemia-reperfusión, donde la disponibilidad inicial de oxígeno es baja, y por lo tanto la producción de NO· por las NOS se ve limitada.

1.3.2. Funciones fisiológicas y patofisiológicas del NO·

El NO· interviene en numerosos procesos fisiológicos y patofisiológicos en distintos sistemas y órganos de los mamíferos (Moncada y col., 1991; Ignarro, 2000). En el sistema nervioso interviene en la respuesta frente a aminoácidos que participan en la neurotransmisión (Jeffrey y Snyder, 1995) y en la plasticidad neuronal, fortaleciendo las sinapsis utilizadas más frecuentemente, y participando en el desarrollo de la memoria a largo plazo. Su exceso en este sistema se encuentra asociado a la aparición de la epilepsia y de varias enfermedades neurodegenerativas. En el sistema vascular controla la presión sanguínea, inhibe la agregación plaquetaria (Lloyd-Jones y Bloch, 1996), e

interviene en la defensa frente a patógenos. Su exceso en este sistema está implicado en la aparición de choque séptico, en la inflamación crónica, como la artritis reumatoide, y en el rechazo a transplantes. Además, interviene en la erección penil, la peristalsis gastrointestinal y en la vasodilatación de los pulmones. Su exceso en el sistema respiratorio provoca asma (Zinder, 1995).

1.3.3. Mecanismos de señalización

Los estudios sobre la reactividad química del $\text{NO}\cdot$ han permitido comprender que los mecanismos de señalización tienen lugar gracias a su interacción con moléculas diana a través de una amplia cantidad de reacciones químicas de adición y de óxido-reducción (Stamler, 1994). Es importante tener en cuenta que el $\text{NO}\cdot$ puede estar en distintas situaciones redox, y que cada una de ellas podría activar o modular distintas dianas celulares.

Las rutas de señalización del $\text{NO}\cdot$ se diferencian en base a si son dependientes o independientes del nucleótido cGMP (Hausladen y Stamler, 1998) (Fig. 1.8). La vía dependiente de cGMP se inicia por la activación por parte del $\text{NO}\cdot$ de la guanilato ciclasa soluble (GCs), al unirse al Fe del grupo hemo, lo cual induce un cambio conformacional de la enzima que resulta en una activación de la misma. Esta activación es transitoria, persistiendo tan sólo mientras que el $\text{NO}\cdot$ esté presente, de manera que los efectos del $\text{NO}\cdot$ son relativamente cortos, al ser el cGMP degradado rápidamente por las fosfodiesterasas (PDE). La guanilato ciclasa sintetiza cGMP a partir de guanosina trifosfato (GTP), y al activarse, provoca un aumento en la concentración de cGMP, segundo mensajero implicado en la relajación del músculo liso, inhibición de la agregación plaquetaria y en la visión y el olfato (Schmidt y Walter, 1994). Estos efectos son llevados a cabo por dianas directas del cGMP, como la protein-quinasa dependiente de cGMP (*NO*-G-kinase), canales regulados por nucleótidos cíclicos y fosfodiesterasas (Beck y col, 1999).

La vía de señalización independiente de cGMP propiciada por el $\text{NO}\cdot$ tiene lugar a través de la nitrosilación. Las proteínas que responden al $\text{NO}\cdot$ poseen metales de transición y/o residuos de tirosina y tioles localizados estratégicamente en los sitios activos o alostéricos que son susceptibles de nitrosilación (Stamler, 1994; Stamler y col., 1992). Estas proteínas pueden ser receptores, canales iónicos, fosfatasas, kinasas y factores de transcripción. La nitrosilación puede aumentar o disminuir la actividad de estas proteínas, con el consiguiente efecto sobre el metabolismo celular o la

activación/represión de varias rutas de señalización. Hasta ahora se han identificado sólo unas pocas proteínas nitrosiladas, entre ellas la p21^{ras}, proteína de unión al GTP, y que parece ser una diana clave del NO· (Stamler y col., 1992; Lander y col., 1996). La p21^{ras} activada por nitrosilación es capaz de modular, entre otras, la cascada de las MAP (*mitogen-activated protein*) quinasas, y según las interacciones entre los componentes de la cascada se pondrán en marcha distintas respuestas específicas de cada tipo celular, como, por ejemplo, la apoptosis (Beck y col., 1999). De hecho, el NO· puede inducir apoptosis o proteger a la célula frente a ella. Las caspasas son cisteín proteinasas fundamentales en la cascada de señalización que induce la apoptosis (Kim y col., 1997).

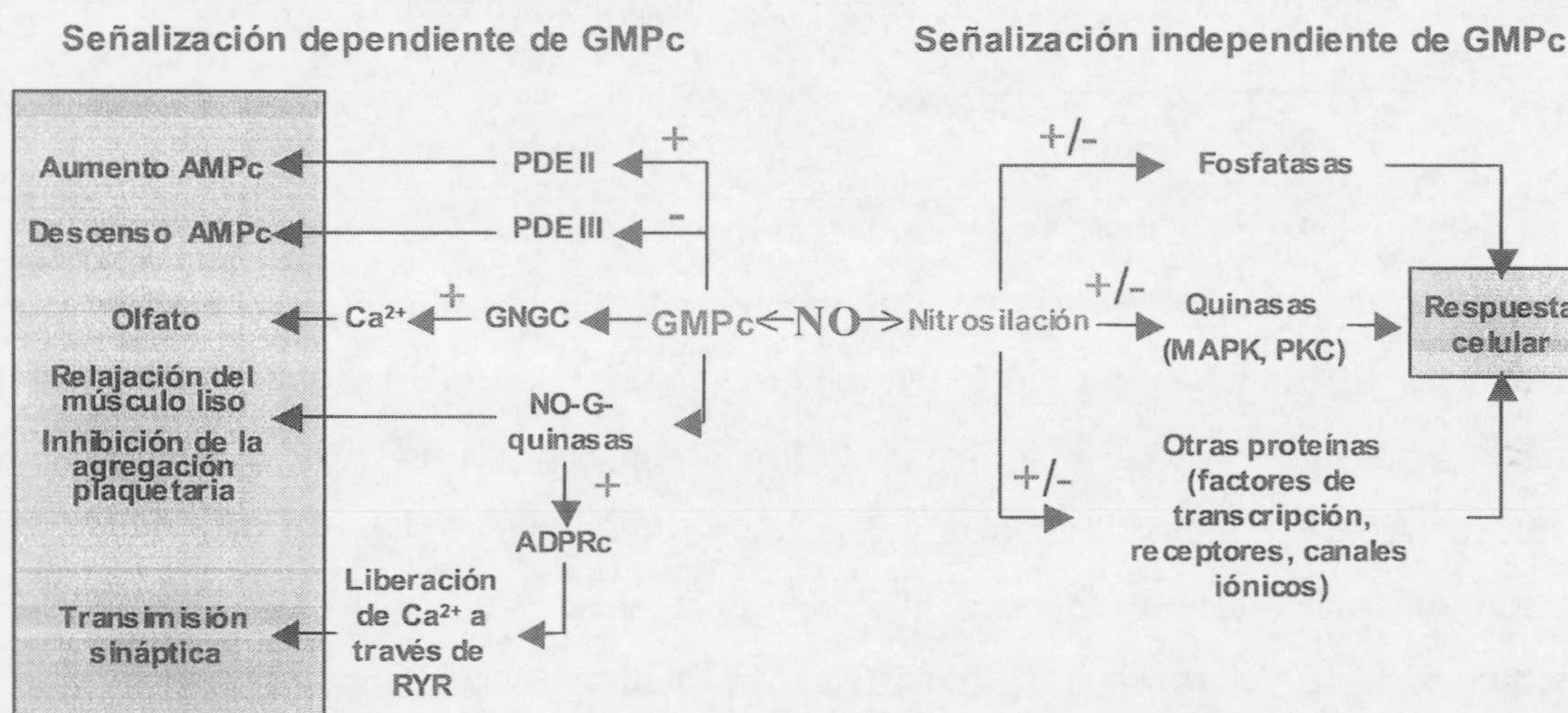


Fig. 1.8. Señalización por NO· en células animales. Las vías de señalización pueden clasificarse en dependientes o independientes de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). La activación de la guanilato ciclasa aumenta los niveles de cGMP, lo cual altera principalmente la actividad de tres proteínas: las fosfodiesterasas (PDE), los canales regulados por nucleótidos cíclicos (GNGC) y las quinasas dependientes de cGMP (NO-G-quinasas). Las vías independientes de GMPc son menos conocidas, pero se sabe que tiene lugar a través de la nitrosilación de proteínas de señalización como fosfatasas, quinasas o factores de transcripción. cAMP: adenosina monofosfato cíclico; cADPR: riboADP cíclico; RYR: canales de calcio sensibles a rianodina; PKC: proteinquinasa C; MAPK: quinasa de la proteína activada por mitógenos.

El NO· puede limitar la apoptosis inhibiendo directamente a las caspasas por nitrosilación (Mannick y col., 1999) y a través de mecanismos desconocidos dependientes de cGMP (Kim y col., 1999). Pero, por otro lado, se ha comprobado que el NO· propicia la muerte celular dependiente de caspasas en otros tipos de células (Kim y col., 2000). La razón de esta contradicción no se conoce del todo, pero parece que depende de varios factores; entre otros, del tipo de célula y del contenido en hierro no

hemínico. Las proteínas quinasas C, fosfatasa, canales de potasio y receptores de N-metil-D-aspartato son otros ejemplos de proteínas de señalización controladas por nitrosilación (Stamler, 1994).

1.4. EL NO· EN CÉLULAS VEGETALES

Desde mediados de los años 70 se tuvieron los primeros datos que apuntaban a que las plantas son capaces de emitir NO· (Klepper, 1979). Hoy en día está bien establecido que, efectivamente, las células vegetales son capaces de generar NO· (Leshem, 2000; Lamattina y col., 2003; Neill y col., 2003; del Río y col., 2004), y, en los últimos años, se ha demostrado que el NO·, como en animales, interviene en varios procesos fisiológicos de las plantas.

1.4.1. Interacciones del NO· en el metabolismo celular

Los cloroplastos son orgánulos importantes para la transducción de energía en las plantas, ya que llevan a cabo la fotofosforilación. Los primeros estudios del efecto del NO· atmosférico sobre la actividad de los cloroplastos demostraron que esta especie puede reducir la fotosíntesis neta y se ha demostrado que el NO· es capaz de regular la fotofosforilación (Hill y Bennett, 1970; Bruggink y col., 1988). El NO· inhibe además el transporte de electrones en el fotosistema II (Takahashi y col., 2002) y la formación del gradiente de pH a través de la membrana tilacoidal, inhibiendo así la síntesis de ATP.

El NO· también interviene, de alguna manera, en la biosíntesis de clorofila. En hojas de patata infectadas con *Phytophthora infestans*, donde el contenido en clorofila decaía fuertemente, el NO· revirtió parcialmente esta pérdida, de una manera que era dependiente de la dosis del donador de NO· administrado (Lazalt y col., 1997).

En mitocondrias de animales, el NO· inhibe el complejo VI de la cadena respiratoria (Beltrán y col., 2000), y puede liberar proteínas que permanecen en el espacio intermembranal de la mitocondria, como el citocromo *c* y varios factores inductores de apoptosis (Bal-Price y Brown, 2000). En plantas, tanto en mitocondrias aisladas como en cultivos celulares, se ha demostrado que el NO· inhibe la fosforilación oxidativa a nivel de la citocromo *c* oxidasa (Yamasaki y col., 2001; Zottini y col., 2002). Esto llevaría a una superproducción de superóxido en la mitocondria debido a un descenso drástico del contenido de ubiquinona (Shiva y col., 2001), pudiéndose formar, junto con el NO·, ONOO⁻, causando importantes daños en este orgánulo. En plantas, hongos y protozoos existe, además, la denominada respiración alternativa, cuya

principal diferencia es que produce calor en lugar de ATP, al transferir los electrones al oxígeno sin acoplarlos a la translocación de protones a través de la membrana interna (Wagner y Krab, 1995). Esto se debe a una oxidasa terminal llamada oxidasa alternativa (AOX, *alternative oxidase*) (Vanlergerhe y McIntosh, 1997). La AOX no se inhibe por el NO·, y se ha propuesto que esta respiración alternativa serviría para disipar el exceso de electrones en forma de calor, de manera que se prevendría la formación de ROS cuando la vía del citocromo *c* se encuentre inhibida por el NO· (Millar y Day, 1996, 1997). Se ha comprobado, en cultivos celulares de *Arabidopsis* y de zanahoria, que el NO· induce fuertemente la transcripción del gen de la oxidasa alternativa (Huang y col., 2002; Zottini y col., 2002).

Las peroxidasas y la catalasa contienen grupos hemo y, por lo tanto, son susceptibles de ser dianas del NO·. Una de las principales funciones de las peroxidasas es la lignificación de los vasos del xilema (Ros Barceló, 1997). Se ha demostrado que la actividad de algunas peroxidasas presentes en el xilema de *Zinnia elegans* se inhiben con la adición de varios donadores de NO· (Ferrer y Ros Barceló, 1999; Ros-Barceló 2002). El NO· podría participar así en los procesos de diferenciación y de formación del xilema. En extractos crudos de hojas de tabaco, la adición de donadores de NO· inhibía también de manera reversible la actividad peroxidasa, así como la actividad de la catalasa. Sin embargo, el peroxinitrito inhibía esta actividad de forma irreversible (Clark y col., 2000). Los autores postularon una función para el NO· en la regulación de los niveles de H₂O₂ durante la respuesta frente a patógenos inhibiendo de forma reversible a la peroxidasa y la catalasa (Clark y col., 2000).

Por otro lado, el NO· inhibe de forma reversible la actividad de la aconitasa citosólica y mitocondrial en plantas de tabaco (Navarre y col., 2000). Además del efecto que causa en el metabolismo celular, es posible que el NO· convierta a la aconitasa citosólica en una proteína reguladora de hierro (*IRP1, iron-regulatory protein*), al igual que ocurre con la aconitasa animal (Klausner y col., 1993). La aconitasa citosólica de plantas es semejante a la IRP-1 humana y además conserva los residuos aminoacídicos involucrados en la unión del IRP-1 al ARNm. En células animales, la IRP1 se une a aquellos ARNm que contienen una secuencia consenso denominada “elemento de respuesta al hierro” (*IRE, iron-responsive element*) regulando su traducción y/o su estabilidad. La IRP-1 inhibe la traducción del gen de la ferritina, uniéndose a los elementos de respuesta al hierro presentes en la región 5' no traducida del ARNm. Esto causaría un aumento en el contenido de hierro libre en la célula, lo cual llevaría a un

aumento en la generación de ROS a través de la reacción de Fenton (Wendehenne y col., 2001), lo que puede contribuir al desarrollo de la respuesta hipersensible. Se ha demostrado que en *Arabidopsis* el NO· produce un aumento de la ferritina a través de secuencias reguladoras presentes en su promotor que son dependientes de hierro (Murgia y col., 2002).

En animales, se ha propuesto que la inhibición de la aconitasa mitocondrial por el NO· podría tener un efecto de protección frente a un estrés oxidativo adicional (Gardner y Fridovich, 1991), ya que la inactivación provocaría un descenso del flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, y por lo tanto, disminuiría la generación de ROS.

También se han descrito interacciones bioquímicas entre el NO· y distintos tipos de hemoglobinas. Así, se ha detectado NO· en nódulos de soja utilizando la espectroscopía de EPR (Mathieu y col., 1998) y mediante microscopía confocal en nódulos de alfalfa (Herouart y col., 2002). Además se han detectado proteínas inmunorelacionadas con las NOS en nódulos de *Lupinus* (Cueto y col., 1996). Sin embargo, se desconoce la función del NO· durante la simbiosis, aunque hay algunos estudios que parecen indicar que el NO· actúa como un regulador de los genes implicados en la fijación de nitrógeno (Mathieu y col., 1998), aunque también se sabe que, al menos *in vitro*, es capaz de inhibir a la nitrogenasa de bacteroides (Trinchant, 1994).

Por otro lado, existen datos que sugieren una modulación de los niveles de hemoglobina por el NO·, lo que puede estar estrechamente relacionado con la supervivencia a corto plazo de los tejidos bajo condiciones de hipoxia o anoxia (Hill y col. 1998; Hunt y col, 2002; Dordas y col., 2003a, 2004).

Más recientemente, Igamberdiev y col. (2004), han demostrado la presencia de una actividad NO· dioxigenasa dependiente de NAD(P)H en plantas que se inhibía con anticuerpos de la hemoglobina. Parece que la hemoglobina podría formar un dímero con una flavoproteína para metabolizar el NO·. Los autores proponen que la hemoglobina puede participar en el mantenimiento del estado redox de la célula, ayudando a la célula a la inhibición del transporte electrónico mitocondrial producido por el NO· y la hipoxia.

Además, en otros trabajos se ha descrito que semillas de tabaco que sobreexpresan la fitoglobina de alfalfa Mhb1 (Seregélyes y col., 2003a) crecieron más lentamente con el tratamiento con un donador de NO· (nitroprusiato sódico) que las

semillas no transformadas. Ello sugería una interacción entre el NO· y este tipo de hemoglobina.

Por último, se ha demostrado también que el NO· induce determinados genes antioxidantes como la glutathion peroxidasa, glutathion S-transferasas y glutarredoxinas, entre otros (Huang y col., 2002). Estos resultados apuntan a una relación entre el NO· y el metabolismo del glutathion, tal y como se ha descrito para animales y que aún se discute en plantas (Stamler y col., 1992; Durner y Klessig, 1999; Liu y col., 2001).

1.4.2. Síntesis no enzimática

Se ha comprobado que el NO· en plantas se puede producir de forma no enzimática. Los ciclos de nitrificación y desnitrificación de las plantas liberan NO· a la atmósfera como producto de la oxidación del N₂O (Wojtaszek, 2000). Además, puede generarse a partir de nitrito (NO₂⁻) por reducción a pH ácido (Stöhr y Ullrich, 2002) o por carotenoides, proceso que es propiciado por la luz (Cooney y col., 1994). El nitrito puede reducirse por ácido ascórbico a pH 3-6 para dar lugar a NO· y ácido deshidroascórbico (Henry y col., 1997; Beligni y col., 2002). Esta reacción puede tener lugar en condiciones de pH microlocalizadas en el cloroplasto y en el espacio apoplástico donde se localiza el ácido ascórbico (Horemans y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que el NO· se sintetiza de forma no enzimática en el apoplasto por reducción química del nitrito a pH ácido, en respuesta a giberelina y ácido abscísico (ABA), dos hormonas que acidifican el medio apoplástico (Bethke y col., 2004). Esta producción se acelera por agentes reductores, como compuestos fenólicos.

1.4.3. Síntesis enzimática

La identificación de las proteínas responsables de la síntesis enzimática de NO· en plantas está siendo muy controvertida. Al principio se buscaba una enzima semejante a alguna de las distintas NOSs de animales, y aunque existen evidencias que apuntan a una enzima con características similares en plantas, aún no se ha clonado ni purificado. Además, en el genoma de *Arabidopsis* no se encuentra ningún gen ni proteína con similitud en su secuencia a las NOSs animales (*The Arabidopsis genome initiative*, 2000). Sin embargo, recientemente se han descubierto varias enzimas capaces de sintetizar NO· en plantas. Estas proteínas no muestran similitud en su secuencia con las NOSs animales, y con una función ya conocida anteriormente, pero que, sorprendentemente, sintetizan NO· además de llevar a cabo su reacción "normal". Todo

esto nos indica que en plantas, existen varias fuentes de $\text{NO}\cdot$, y que probablemente, aún queden proteínas con esta función por identificar. El concepto generalizado de que a una proteína determinada le corresponde una única función es, en este caso, inapropiado (Corpas y col., 2004).

1.4.3.1. Actividad óxido nítrico sintasa

Desde 1996 numerosos experimentos han demostrado la existencia en plantas de actividad óxido nítrico sintasa similar a la descrita en mamíferos. Uno de los primeros métodos utilizados para la detección de la actividad NOS en plantas fue la medida de la conversión de L-arginina, marcada radiactivamente, a L-citrulina (Cueto y col., 1996; Ninneman y Maier, 1996). Desde entonces, utilizando diversas metodologías, numerosos grupos han demostrado la existencia de actividad óxido nítrico sintasa en distintas especies vegetales, y/o la inhibición de esta actividad por inhibidores de la NOS de mamíferos. Muchas de estas actividades son dependientes de Ca^{2+} , con lo que se asemejan a la NOS constitutiva de mamíferos.

Igualmente, mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) también se ha demostrado la producción de $\text{NO}\cdot$ derivada de una actividad NOS en extractos crudos de sorgo, utilizando como trampa de spin el complejo formado por Fe (II) y ditiocarbamato $[\text{Fe}(\text{MGM})_2]$ (Simontacchi y col., 2004).

También se han utilizado distintos anticuerpos frente a las NOSs de mamíferos para detectar la presencia de proteínas inmunorelacionadas con ellas. Anticuerpos frente a la NOS de cerebro de ratón y la nNOS de conejo dieron lugar a bandas inmunorreactivas en extractos de germen de trigo y tejido embriónico de guisante, respectivamente (Kuo y col., 1995; Sen y Cheema, 1995). En raíces y hojas de maíz, el empleo de anticuerpos frente a la iNOS de ratón y a la nNOS de conejo dieron lugar a bandas inmunorreactivas (Ribeiro y col., 1999). Además, en experimentos de inmunofluorescencia en raíces de maíz se localizó en el citoplasma de células en la zona de división una proteína con semejanza a la NOS que se translocaba al núcleo dependiendo de la fase de crecimiento de la célula (Ribeiro y col., 1999). Esta localización subcelular dependiente de la fase de crecimiento no se ha detectado en células animales, y podría ser específica de plantas.

Sin embargo, Butt y col. (2003), en un estudio proteómico de extractos de maíz con anticuerpos policlonales de conejo frente a la nNOS humana y la iNOS de ratón, encontraron que estos anticuerpos reconocían varias proteínas no relacionadas

aparentemente con las NOSs. La falta de especificidad de los anticuerpos puede ser un problema en los ensayos inmunoquímicos, y deben ser siempre considerados con precaución. A pesar de ello los resultados de este estudio proteómico no deberían descalificar todos los resultados obtenidos por distintos grupos con extractos de distintas especies vegetales y con distintos tipos de anticuerpos.

1.4.3.2. Variante de la proteína P de la glicina descarboxilasa (GDC)

El complejo glicina descarboxilasa (GDC) cataliza, a través de una reacción de múltiples etapas, la desaminación y descarboxilación oxidativa de la glicina hasta CO_2 , NH_3 , y ácido N^5N^{10} -metilen-5,6,7,8-tetrahidropteril-poliglutámico, con la reducción de NAD^+ a NADH (Douce y col., 2001). Este sistema enzimático se encuentra tanto en bacterias como en células eucarióticas. En mamíferos representa la ruta principal de degradación catabólica de la glicina (Yoshida y Kikuchi, 1971). En plantas, el complejo GDC se localiza en mitocondrias de hojas donde cataliza, junto con la serinahidroximetiltransferasa (SHMT), la transformación de la glicina proveniente de los peroxisomas en serina (Husic y col., 1987). La GDC y la SHMT se encuentran en elevadas concentraciones en la matriz mitocondrial, donde representan, aproximadamente, la mitad de la proteína mitocondrial de hojas de guisante o de espinaca (Oliver y col., 1990).

El complejo GDC se ha purificado a partir de diversas plantas (Neuburger y col., 1986; Walker y Oliver, 1986) y está compuesto por cuatro proteínas distintas denominadas proteínas P, H, L y T, que son codificadas por genes nucleares, y que tienen un tamaño molecular total de 1300 kDa (Douce y col., 2001).

Recientemente se ha demostrado que una variante de la proteína P es capaz de producir $\text{NO}\cdot$ (Chandok y col., 2003). Los autores obtuvieron un polipéptido de 120 kDa que coincidía con el homólogo de la variante de la proteína P de la GDC de *Arabidopsis* (*At4g33010*). Además, la actividad NOS de esta proteína se inhibió por dos inhibidores de la proteína P, carboximetoxilamina y aminoacetonitrilo, por lo que se dedujo que la proteína P es la responsable de la síntesis de $\text{NO}\cdot$ en estas plantas de tabaco. La actividad específica de la proteína resultó ser de 20-40 $\mu\text{moles NO}\cdot \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, unas 30 veces mayor que la iNOS animal.

El análisis de la secuencia de la proteína de *Arabidopsis* identificó algunos motivos con función similar a las NOSs de mamíferos. La homología del posible lugar de unión de flavinas de la variante P con el de las NOSs de mamíferos, y otras enzimas

que utilizan FAD, es limitado. Sin embargo, la enzima de tabaco requiere FAD y tiene un espectro de emisión correspondiente a la flavina, por lo que debe tener un lugar de unión del FAD. Es probable que esta enzima sea activa como dímero, ya que la masa molecular nativa estimada por filtración molecular resultó ser de unos 289 kDa.

1.4.3.3. AtNOS1

Guo y col. (2003) identificaron un gen de *Arabidopsis*, denominado *AtNOS1* que codificaba una proteína cuya secuencia era similar a la de la proteína implicada en la síntesis de NO· en la serpiente *Helix pomatia* (Huang y col., 1997). La proteína codificada por dicho gen se expresó en *E. coli* y se purificó, presentando una actividad NOS dependiente de NADPH, CaM y Ca²⁺, que se inhibía por L-NAME, y no dependía de los cofactores BH₄, FAD, FMN y hemo.

Además, se demostró que la AtNOS1 participaba en el crecimiento de la planta, y que catalizaba la producción de NO· en respuesta a un amplio rango de señales hormonales. Por otro lado, en plantas tratadas con ABA, la producción de NO· era mucho menor en las células guarda de las plantas mutantes con deficiencia en el gen *AtNOS1*, demostrando que la enzima se requiere para la generación de NO· inducido por el ABA (Guo y col., 2003).

Esta enzima es similar a las nNOS y eNOS, ya que se expresa constitutivamente, se estimula por Ca²⁺ y CaM, y presenta una actividad específica menor que la variante P. Esta proteína tampoco comparte ninguna similitud en su secuencia con las NOS de animales, ni con la variante P de la GDC. Es similar a un grupo de hipotéticas proteínas bacterianas que contienen dominios de unión de GTP o dominios GTPasa (Huang y col., 1997).

1.4.3.4. Nitrato reductasa

La nitrato reductasa (NR) es la enzima limitante en el metabolismo de asimilación del nitrógeno (Kaiser y col., 1999). La producción de NO· por la enzima NR se conoce desde principios de los años 80 (Harper, 1981; Dean y Harper, 1988). Esta enzima genera NO· utilizando nitrito (NO₂⁻) y NADH como donador de electrones. El sitio de catálisis es probablemente el cofactor de molibdeno (Moco) (Yamasaki y col., 1999; Rockel y col., 2002). Además, la NR es capaz de producir peroxinitrito de forma simultánea (Yamasaki y Sakihama, 2000). Sin embargo, la capacidad de producir NO·

de la nitrato reductasa, a concentraciones saturantes de nitrito y NADH, sólo representa aproximadamente un 1 % de su capacidad de reducción del nitrato.

Evidencias genéticas, farmacológicas y fisiológicas apuntan a que la síntesis de NO· por parte de la NR es imprescindible para la señalización propiciada por ABA en células guarda de *A. thaliana*, función que también se asigna a la *AtNOS1*. La generación de NO· después de tratar las células guarda con ABA o nitrito se correlaciona con el cierre de estomas (García-Mata y Lamattina, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado la inducción de la NR en tubérculos de patata infectados con el hongo *Phytophthora infestans*. En dicho caso, la NR podría participar en la síntesis de NO· durante la repuesta de la planta frente a patógenos (Yamamoto y col., 2003).

1.4.3.5. Nitrito:NO· reductasa (Ni-NOR)

Esta actividad enzimática se ha detectado en membranas plasmáticas purificadas de raíces de tabaco (Stöhr y col., 2001). Se demostró que esta enzima es distinta a la nitrato reductasa unida a membrana (NR-PMP) porque no se inhibió su actividad con anticuerpos frente a la NR ni con cianuro, inhibidor del dominio molibdopterina de la NR. Además, la producción de NO· a partir de estas membranas purificadas no utilizaba NADH como sustrato. Ambas enzimas se separaron por cromatografía de filtración molecular, presentando tamaños moleculares distintos. La Ni-NOR poseía una masa molecular nativa de 310 kDa, mientras que masa molecular de la NR-PM es de unos 200 kDa. Los autores proponen un modelo en las membranas de raíces en el cual la NR-PMP sólo reduce el nitrato y produce nitrito como sustrato para la Ni-NOR, y postulan el papel del NO· sintetizado a partir de la Ni-NOR como molécula señal en la asimilación de nitrato (Stöhr y col., 2001).

1.4.3.6. Xantina oxidoreductasa

En animales, se ha demostrado recientemente que la xantina oxidoreductasa (XOR) es capaz de sintetizar NO· (Millar y col., 1998; Harrison, 2002). En tejidos vegetales, la XOR se ha localizado en peroxisomas de hojas de guisante donde la forma preponderante de la enzima es la xantina oxidasa, y sólo un 30 % se encuentra como xantina deshidrogenasa (Sandalio y col., 1988; Corpas y col., 1997). La capacidad de producir radicales O₂⁻ y NO· por parte de esta enzima le conferiría a la XOR un papel fundamental como fuente de moléculas señal en células vegetales (Corpas y col., 2001).

1.4.3.7. Hemoproteínas

Se ha comprobado que la peroxidasa de rábano produce NO \cdot a partir de N-hidroxi-arginina (NOHA) y H $_2$ O $_2$ (Boucher y col., 1992a). Más recientemente, también se ha demostrado que es capaz de generar NO \cdot a partir de hidroxiiurea y H $_2$ O $_2$ (Huang y col., 2002). Otras enzimas candidatas a producir NO \cdot en plantas son los citocromos P-450, que en animales se ha demostrado que son capaces de catalizar la oxidación de NOHA por el NADPH y O $_2$ generando NO \cdot (Boucher y col., 1992b; Mansuy y Boucher, 2002). La hemoglobina y la catalasa también son capaces de producir NO \cdot y otros óxidos de nitrógeno catalizando la oxidación del NOHA por el cumilhidroperóxido (Boucher y col., 1992a). Recientemente se ha descrito también la producción *in vitro* de NO \cdot por catalasa a partir de hidroxiiurea (Huang y col., 2004).

En la Tabla 1.2 se muestran las fuentes enzimáticas generadoras de NO \cdot más importantes descritas en plantas hasta la fecha, así como otras potenciales productoras de esta especie.

1.5. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DEL NO \cdot EN PLANTAS

Comparativamente, en plantas se conoce mucho menos acerca de los mecanismos de señalización por el NO \cdot que en animales, aunque existen algunas similitudes con los descritos hasta ahora (Wendehenne y col., 2001; Neill y col., 2003).

1.5.1. Señalización a través de cGMP

En plantas parece que existe un sistema similar de transducción de señales al que se indicó en animales, aunque aún quedan por identificar la mayoría de los componentes de esta ruta de señalización. La presencia de cGMP en plantas se ha demostrado por espectrometría de masas y radioinmunoensayo en varias especies (Newton y col., 1999; Trewavas y col., 2002). Aunque aún no se ha clonado ninguna guanilato ciclasa en plantas ni se ha caracterizado funcionalmente ninguna fosfodiesterasa (PDE), sí se ha demostrado la existencia de actividad PDE (Reggiani, 1997; Newton y col., 1999) y existen varios genes en *Arabidopsis* que pueden corresponder potencialmente a fosfodiesterasas.

Tabla 1.2. Resumen de las posibles fuentes enzimáticas de NO· descritas en células vegetales. Se incluyen asimismo algunos sistemas que potencialmente pueden generar NO· en base a su actividad obtenida en ensayos *in vitro*.

Fuente	Sustrato	Referencia
Diferentes extractos vegetales	L-Arg y cofactores NOS	<i>Neill y col. (2003)</i>
Peroxisomas	L-Arg y cofactores NOS	<i>Barroso y col. (1999)</i> <i>Corpas y col. (2002, 2004)</i>
Variante de la proteína P	L-Arg y cofactores NOS	<i>Chandok y col. (2003)</i>
AtNOS1	L-Arg y cofactores NOS excepto BH ₄ , FAD y FMN	<i>Guo y col. (2003)</i>
Nitrato reductasa	NO ₂ ⁻ y NADH	<i>Dean y Harper (1998)</i> <i>Yamasaki y col. (1999)</i>
Xantina oxidorreductasa	NO ₂ ⁻ y NADH	<i>Millar y col. (1998)</i> <i>Harrison (2002)</i>
Peroxidasa de rábano	Hidroxiurea + H ₂ O ₂ NOHA + H ₂ O ₂	<i>Huang y col. (2002b)</i> <i>Boucher y col. (1992a)</i>
Hemoproteínas	NOHA + H ₂ O ₂ /ROOH	<i>Boucher y col. (1992a)</i>
Catalasa	Hidroxiurea	<i>Huang y col. (2004a)</i>
Citocromo P-450	NOHA + NADPH + O ₂	<i>Boucher y col. (1992b)</i>
Nitrito:NO· reductasa	NO ₂ ⁻ + Cit <i>c</i> reducido	<i>Stöhry col. (2001)</i>

NOHA, *N*-hidroxiarginina; ROOH, alquilhidroperóxidos

Varios estímulos, como el ácido giberélico, el tratamiento con NO· o con un péptido análogo a un inhibidor de la fosfodiesterasa causaron aumentos transitorios en los niveles de cGMP en aleurona de cebada, patata y semillas de pinsapo, y en la estela de raíces de maíz, respectivamente (Penson y col., 1996; Pfeiffer y col., 1994, 1995; Pharmawati y col., 1998). Los efectos de algunos donadores de NO· sobre la germinación controlada por fitocromo en semillas de *Pulowinia tomentosa* se han atribuido a la producción de cGMP dependiente de NO· (Giba, 1998). El tratamiento de suspensiones celulares de tabaco con donadores de NO· (GSNO), o la transformación de hojas de plantas de tabaco con NOS recombinante de rata produjeron una inducción rápida y elevada de la concentración de cGMP (Durner y col., 1998). Además, la inducción de los genes de la PR1 (*pathogenesis-related protein*) y de la fenilalanina amonioliasa (PAL) en las suspensiones celulares de tabaco se inhibían por inhibidores

de la GCs, y esta inhibición se restauró por un análogo del cGMP permeable a las membranas (8-Br-cGMP). En otros trabajos, se ha demostrado además que los inhibidores de la GCs también inhiben el desarrollo de las raíces de pepino propiciada por NO· y auxinas (Pagnussat y col., 2003)

Una diana del cGMP en células animales es la protein quinasa (PK) que se activa con este nucleótido (Wendehenne y col., 2001). En plantas, se ha comprobado que el NO· activa algunas PKs en *Arabidopsis* y tabaco (Clarke y col., 2000; Kumar y Klessig, 2000). No obstante, se desconoce si los efectos del NO· son directos, o se producen a través de otras moléculas que a su vez activan a las PKs. En la figura 1.9 se muestra un esquema de la señalización a través del GMPc en plantas.

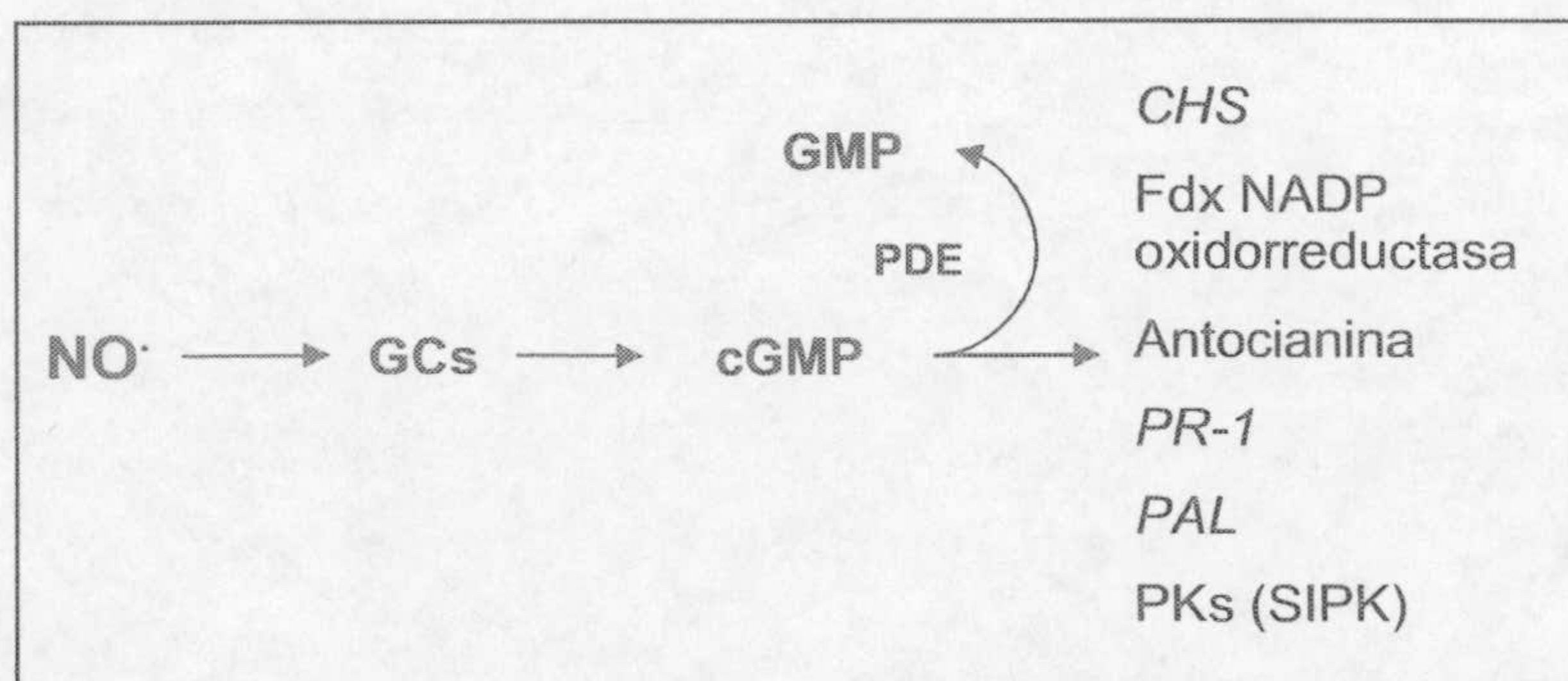


Fig. 1.9. Hipotético mecanismo de señalización del NO· en células vegetales a través de cGMP. El NO· activa a la GCs, que se activa y eleva la concentración intracelular de cGMP. El cGMP actúa sobre distintas dianas celulares; y es degradado por las PDE. NO·, óxido nítrico; GCs, guanilato ciclasa soluble; cGMP, monofosfato de guanosina cíclico; GMP, monofosfato de guanosina; PDE, fosfodiesterasa; CHS, chalcona sintasa; Fdx, ferredoxina; PR-1, proteína de resistencia; PAL, fenilalanina amonioliasa; PKs, protein quinasa; SIPK, protein quinasa activada por los mitógenos activados por SA.

1.5.2. Señalización a través de riboADP cíclico (cADPR) y calcio (Ca²⁺)

Se ha comprobado que el NO· en plantas también actúa a través del cADPR y de la movilización de Ca²⁺. El Ca²⁺ intracelular se almacena en varias localizaciones subcelulares, y su salida está regulada por canales permeables al Ca²⁺ que reconocen y se unen a mensajeros secundarios como el IP₃ y el cADPR, denominados canales receptores de rianodina (*RYR*, *ryanodine receptor channels*). La síntesis de cADPR en animales se activa por NO·, siendo esta activación favorecida por cGMP, probablemente a través de una quinasa dependiente de este nucleótido (Wendehenne y col., 2001). En plantas de tabaco, el cADPR induce la expresión de los genes *PR-1* y *PAL*, de igual forma que lo hace el NO·, y estos efectos se inhiben por rojo de rutenio, un inhibidor de los canales *RYR* (Durner y col., 1998). Además, un antagonista del cADPR, el 8-Br-

cADPR, inhibe la expresión del gen *PR-1* inducido por la NOS recombinante (Klessig y col., 2000).

En células guarda de *Vicia faba*, el NO· induce el aumento de los niveles de Ca²⁺ citosólico (García-Mata y col, 2003). Se ha demostrado que el NO· participa en el cierre de estomas inducido por ácido abscísico (ABA) (García-Mata y Lamattina, 2001; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill y col., 2002) y para ello se requiere tanto un flujo de Ca²⁺ desde el exterior celular como una liberación desde los almacenes celulares (MacRobbie, 2000). La inducción del cierre de estomas propiciada por NO· requiere la activación de los canales permeables al Ca²⁺ (RYR), proceso que ocurre a través de una ruta de señalización donde intervienen el cGMP y el cADPR (García-Mata y col., 2003).

1.6. FUNCIONES DEL NO· EN PLANTAS

1.6.1. Crecimiento y desarrollo

En los últimos años, se ha demostrado que el NO· en plantas, al igual que en animales, interviene en distintos procesos fisiológicos, como el crecimiento y el desarrollo. De forma general, parece que el NO· se sintetiza principalmente en tejidos que se encuentran en fase de crecimiento, como en ejes embrionarios y en cotiledones, y los niveles decrecen en órganos senescentes y maduros (Beligni y Lamattina, 2001).

Uno de los primeros trabajos en plantas sobre el NO· fue el de Leshem y Haramaty (1996), donde demostraron la producción de NO· endógeno en hojas de plantas y sugirieron la posible existencia de una actividad NOS como la descrita en animales. Además, observaron que la emisión de NO· por plantas de guisante privadas de sus raíces aumenta sometiendo a las plantas a un estrés por sequía, y que el NO· también regula el crecimiento de las hojas. Más tarde se observó que el NO· regulaba la maduración y la senescencia. Así, Leshem y col. (1998) midieron los niveles endógenos de NO· en frutas y flores de distintas especies vegetales, y en todos los casos observaron que disminuía conforme la fruta maduraba o la flor envejecía. Además, la aplicación de NO· exógeno a distintas flores y frutos retrasó la senescencia de estos órganos.

Más recientemente, en un estudio en hojas de arroz, los síntomas de senescencia inducidos por ABA y metil jasmonato (como el aumento en H₂O₂, la reducción en el contenido de glutatión reducido y ácido ascórbico o el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes) se reducían con un donador de NO· (Hung y Kao, 2003, 2004). Por el contrario, este efecto era neutralizado por un secuestrador de NO·.

También se ha demostrado que el NO \cdot interviene en algunos procesos fisiológicos propiciados por la luz (Beligni y Lamattina, 2000). Se desconocen muchos de los mecanismos a través de los cuales la luz regula el desarrollo de las plantas, salvo que algunos de ellos tienen lugar a través del fotorreceptor fitocromo, el cual actúa a través de cGMP. Como el NO \cdot parece que actúa también a través del cGMP, estos autores investigaron la posible relación del NO \cdot con varios procesos fisiológicos dependientes de la luz. Sometieron a distintas especies vegetales a condiciones de oscuridad y les administraron donadores de NO \cdot . Observaron que esta especie inducía distintos procesos dependientes de la luz como eran la germinación, la síntesis de clorofila y la inhibición de la elongación del hipocotilo. Todos estos datos apuntaban a una función reguladora del NO \cdot en la fotomorfogénesis de las plantas (Beligni y Lamattina, 2000). Sin embargo, se desconoce si el NO \cdot actúa como un inductor artificial de estos procesos, ya que fue aportado exógenamente, o si el NO \cdot endógeno interviene realmente en estos procesos.

El óxido nítrico también influye en el desarrollo de las raíces. La aplicación de compuestos donadores de NO \cdot indujeron la elongación de raíces, y este efecto se inhibió aplicando un secuestrador de NO \cdot (Gouvêa y col., 1997). Parece ser que el óxido nítrico interviene además en la organogénesis de las raíces. La aplicación de donadores de NO \cdot a plántulas de pepino a las cuales se les había eliminado las raíces primarias, originó la aparición de raíces *de novo*, mimetizando el efecto del ácido indolacético (IAA) (Pagnussat y col., 2002).

Recientemente, además, se ha demostrado la participación del NO \cdot en el proceso de formación de las raíces laterales en tomate (Correa-Aragunde y col., 2004). La longitud y densidad de las raíces laterales no están determinadas genéticamente, sino que la planta es capaz de desarrollarlas adaptándose a su medio según distintas señales (Malamy y Ryan, 2001). La aplicación de un donador de NO \cdot indujo la aparición de las raíces laterales, mientras que disminuyó el crecimiento de la raíz principal (Correa-Aragunde y col., 2004). Parece que en este efecto el NO \cdot participa probablemente en algún paso de la ruta de señalización de las auxinas.

Se cree que el NO \cdot también interviene en el proceso de germinación, ya que en ejes embrionarios de semillas de soja se ha demostrado que justo en el momento de la germinación existe un aumento en la producción de NO \cdot endógeno. Esta producción de NO \cdot se debe tanto a una actividad NOS como capacidad de la enzima NR de producir NO \cdot (Simontacchi y col., 2004).

1.6.2. Estrés biótico y abiótico

Existe un buen número de trabajos que asocian el NO \cdot con la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés tanto biótico como abiótico, lo que hace que esta especie tenga una función relevante en dichas situaciones “anómalas”.

1.6.2.1. Estrés biótico

La publicación en 1998 de dos trabajos describiendo la función del NO \cdot en los mecanismos de señalización de las plantas en la respuesta de defensa frente a patógenos provocó un cambio cualitativo en la investigación del NO \cdot en plantas (Delledonne y col., 1998; Durner y col., 1998). Ambos trabajos demuestran el papel fundamental del NO \cdot en los mecanismos de señalización durante la inducción de la respuesta hipersensible (HR, *hypersensitive response*) en plantas. La generación de la HR conlleva una explosión oxidativa, en la cual hay una gran generación de ROS, muerte celular programada y la activación de varias rutas de señalización que conducen a la expresión de distintos genes relacionados con la defensa. Todos estos procesos ocasionan una zona localizada de muerte celular, lo que limita la disponibilidad de nutrientes para el patógeno, con lo que se consigue frenar su crecimiento y expansión.

Así, el tratamiento de cultivos de células de soja con una cepa avirulenta de *Pseudomonas syringae* (capaz de generar una HR) indujo una síntesis rápida de NO \cdot que presentaba una cinética semejante a la del H₂O₂. Además, ciertos donadores de NO \cdot inducían la muerte celular así como la expresión de los genes de la PAL y la chalcona sintasa (CHS). Por el contrario, inhibidores de la NOS bloquearon la muerte celular y la expresión del gen de la PAL. Se localizó actividad NOS constitutiva en las fracciones citosólicas de las células de soja y, en hojas de *Arabidopsis*, los síntomas de la HR por *P. syringae* también se redujeron aplicando inhibidores de la NOS. Todos estos datos indicaban que probablemente el NO \cdot , cuya síntesis se inducía por el patógeno, y el H₂O₂ interaccionarían para desencadenar la HR (Delledonne y col., 1998).

Por otro lado, Durner y colaboradores (1998) inocularon hojas de tabaco con varias cepas del virus del mosaico del tabaco (TMV) y observaron una inducción de la actividad NOS que se bloqueaba por inhibidores de la NOS. Además, el NO \cdot aportado exógenamente también indujo la síntesis de SA y la expresión del gen *PR-1* (Durner y col., 1998). El SA es una molécula de señalización en los procesos de defensa, involucrada en el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (*SAR*, *systemic*

acquired resistance) (Draper, 1997). En hojas de *Arabidopsis* tratadas con $\text{NO}\cdot$ se observó igualmente un aumento del contenido en SA endógeno (Huang y col., 2004b), mientras que el tratamiento con secuestradores de $\text{NO}\cdot$ disminuyó la expresión del gen PR-1 (Durner y col., 1998) y los síntomas de la SAR (Huang y col., 2004).

Parece que existe una relación compleja entre el H_2O_2 , el $\text{NO}\cdot$ y el SA durante el desarrollo de la HR y de la SAR, en el cual se produciría el denominado ciclo oxidativo de muerte celular (*OCD cycle, oxidative cell death cycle*) (Van Camp y col., 1998; Álvarez y col., 1998; Song y Goodman, 2001), caracterizado por procesos de apoptosis asociados a un estado más prooxidante en la célula.

La acumulación de fitoalexinas es otro fenómeno que se asocia a la HR. El tratamiento de tubérculos de patata con donadores de $\text{NO}\cdot$ aumentó la acumulación de la fitoalexina risitina (*rishitin*) (Noritake y col., 1996), y dicho efecto se inhibía con un secuestrador de $\text{NO}\cdot$. Sin embargo, la acumulación de risitina inducida por un estimulador (*elicitor*) no se afectaba por el PTIO, sugiriendo que quizá el $\text{NO}\cdot$ endógeno no está implicado en la respuesta de defensa. El tratamiento de cotiledones de soja con $\text{NO}\cdot$ también aumentó la biosíntesis de fitoalexinas, que, además, se inhibía por inhibidores de la NOS (Modolo y col., 2002). Parece que el $\text{NO}\cdot$ se une al grupo hemo del citocromo P-450, y afecta a la actividad de la enzima ácido cinámico hidroxilasa, una monooxigenasa dependiente de citocromo P-450 involucrada en la biosíntesis de los fenilpropanoides (Enkhardt y Pommer, 2000).

1.6.2.2 Muerte celular programada (*Programmed cell death, PCD*) o apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es el mecanismo fisiológico más importante para la eliminación selectiva de células durante el desarrollo o después de un daño en organismos multicelulares (Cohen, 1993). Los cambios morfológicos característicos de la PCD son la contracción o la reducción de la célula, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN nuclear y la aparición de invaginaciones en la membrana celular (Kerr y col., 1972). La PCD puede dispararse por estímulos que activan distintas rutas (Israels e Israels, 1999). En mamíferos, existen varias señales pro-apoptóticas que causan la disipación del potencial eléctrico de la membrana interna de las mitocondrias, lo que favorece la formación y la apertura del poro de transición de permeabilidad (*permeability transition pore, PTP*) a través del cual las proteínas mitocondriales apoptóticas se liberan al citosol (Petit y col., 1996; Green y Reed, 1998; Loeffler y Kroemer, 2000). Algunas de estas proteínas son el citocromo *c* y el factor inductor de

apoptosis (*apoptosis-inducing factor, AIF*). El AIF se dirige al núcleo donde produce la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. El citocromo *c* activa una cascada de señalización de caspasas que, a su vez, activan a otras proteínas, como la nucleasa responsable de la fragmentación del ADN (Israels e Israels, 1999; Green y Reed, 1998).

El PTP es un complejo poliproteico que contiene proteínas de la membrana interna y de la externa, pero del que aún se desconoce su estructura completa (Green y Reed, 1998). La regulación de la apertura de este canal no selectivo está determinada por el potencial redox de la mitocondria (Zoratti y Szabò, 1995), así como por efectores endógenos, como miembros de la familia de genes *Bcl-2* (Petit y col., 1996).

El NO· induce la apoptosis en células animales disparando la formación del PTP de forma directa (Balakirev y col., 1997; Hortelano y col., 1997) y de forma indirecta inhibiendo la respiración mitocondrial (Brown, 1999). La PCD observada en la respuesta hipersensible durante las interacciones planta-patógeno presenta similitudes con la apoptosis animal, incluyendo la fragmentación del ADN (Ryerson y Heath, 1996; Gilchrist, 1998) y la actividad proteolítica de las caspasas (Lam y Pozo, 2000). Se ha demostrado que, al igual que en animales, el NO· interviene en la muerte celular programada. El tratamiento de células en suspensión de *Citrus sinensis* con donadores de NO· indujo la muerte celular con algunas similitudes a la de células animales, como la condensación y fragmentación de cromatina y pérdida del potencial eléctrico de la membrana mitocondrial (Saviani y col., 2002). Los autores demostraron además que la formación del PTP es una de las dianas moleculares del NO· para activar la PCD en plantas, ya que la ciclosporina A, un inhibidor de la formación del PTP, inhibió la PCD inducida por NO·.

Sin embargo, en células de soja, se ha demostrado que niveles elevados de NO·, en ausencia de otras especies de oxígeno reactivo, no son suficientes para iniciar la muerte celular (Delledonne y col., 2001). De hecho, en estudios llevados a cabo en células de soja, la muerte celular asociada a la HR parece estar propiciada por los niveles de NO· y H₂O₂ (Delledonne y col., 2001). En células de tabaco, sólo el aumento simultáneo de NO· y H₂O₂ induce la muerte celular con las características típicas citológicas y bioquímicas de la PCD (de Pinto y col., 2002); y en cultivos de células de *Arabidopsis* tratadas con cepas avirulentas de *P. syringae* se indujo la síntesis de NO· correlacionada con la de H₂O₂ (Clarke y col., 2000). La producción de NO· en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *P. syringae* no precedió a la HR, sino que ocurre de forma

simultánea (Zhang y col., 2003). Estos trabajos sugieren que el NO· regula la muerte celular durante la respuesta hipersensible, pero la síntesis previa de NO· no parece un requisito imprescindible para activar la PCD.

1.6.2.3. Estrés abiótico

Aunque es menor que el número de estudios realizados en estrés biótico, se ha observado que existe una modulación en la producción de NO· endógeno frente a distintos estreses abióticos. Así el NO· parece tener una función en los mecanismos de señalización molecular en la planta en dichas condiciones.

En plántulas de alfalfa sometidas a un estrés por alta temperatura, se observó un aumento de la emisión de NO· endógeno, mientras que la de etileno disminuía de una forma estoiquiométrica (Leshem y Haramaty, 1998). Igualmente, en plantas sometidas a un estrés hídrico, se observó un aumento en la emisión de NO· endógeno (Leshem y Haramaty, 1996). Sin embargo, en estudios posteriores en *Arabidopsis*, el tratamiento por sequía disminuyó los niveles de óxido nítrico (Magalhaes y col., 2000).

Una de las consecuencias del estrés hídrico es el cierre de los estomas. La aplicación de donadores de NO· en varias especies vegetales reduce la apertura estomática y por tanto la transpiración (García-Mata y Lamattina, 2001). Parece que en este proceso se necesita tanto el NO· como el H₂O₂ para inducir esta respuesta en la hoja, y que ambos interaccionen para inducir la síntesis de ABA.

En respuesta al estrés por sequía, se observó un aumento de la actividad NOS en raíces de semillas de trigo, y se inhibió la acumulación de ABA tras la adición de inhibidores de la NOS de mamíferos (Zhao y col., 2001). También se ha demostrado la inducción por ABA de la NADPH oxidasa en plantas de maíz sometidas a un estrés por sequía (Jiang y Zhang, 2002), lo que sugiere una interrelación entre el NO·, ROS y ABA en este tipo de estrés.

Por otro lado, se ha observado un aumento de la producción de NO· en plantas de alfalfa sometidas a estrés por calor (Leshem y col., 2001). En plantas de tomate, trigo y maíz, el NO· favorece la resistencia al frío (Lamattina y col., 2001). Parece que el NO· también interviene en la respuesta de la planta frente a la exposición a radiaciones ultravioletas B (UV-B).

Mediante el uso de donadores de NO· e inhibidores de la NOS, se han obtenido resultados que parecen indicar que la actividad NOS participa en la expresión del gen de la CHS inducido por la UV-B. Asimismo, El tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con

ozono indujo la actividad NOS de forma previa a la acumulación de ácido salicílico y a la muerte celular (Rao y Davis, 2001). En cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* utilizando el fluoróforo diaminofluoresceína (DAF2-DA) se ha demostrado recientemente que las altas temperaturas, el estrés hiperosmótico, la salinidad y la epiluminación con un microscopio producen una elevación rápida del NO \cdot (Gould y col., 2003).

El daño mecánico *per se* no induce la generación de NO \cdot , pero el tratamiento con donadores de esta especie inhibió tanto la generación de H $_2$ O $_2$ como la expresión de los genes específicos inducidos por herida o por ácido jasmónico (*JA*, *jasmonic acid*) (Orozco-Cárdenas, 2002). En patata, algunos donadores de NO \cdot reducen la generación de H $_2$ O $_2$ inducida por daño mecánico y la expresión del gen de la ipomoelina, inducible por JA (Jih y col., 2003). Otros resultados que respaldan la interacción del NO \cdot con la ruta de señalización del JA muestran que el daño mecánico y/o el tratamiento con JA induce la producción de NO \cdot en patata y en células epidérmicas de *A. thaliana* (Huang y col., 2004; Jih y col., 2003), y que la aplicación de NO \cdot exógeno induce todos los genes necesarios para la síntesis de JA (Huang y col., 2004). No obstante, la relación entre estas rutas permanece sin explicar. Es de resaltar que en plantas *NahG*, deficientes en SA, tratadas con NO \cdot se indujeron los genes de respuesta a JA, sugiriendo que el SA regula de forma negativa la síntesis de JA propiciada por NO \cdot .

La muerte celular como resultado del estrés mecánico también parece implicar al NO \cdot . La centrifugación de células de *Kalanchoe daigremontiana* indujo la generación de NO \cdot y la fragmentación del ADN y muerte celular (Pedroso y col., 2000). De la misma manera, el estrés mecánico producido a tejidos de *Arabidopsis* indujo la síntesis de NO \cdot a través de una actividad NOS (Garcês y col., 2001).

Sin embargo, se ha demostrado que el NO \cdot también presenta propiedades anti-apoptóticas ya que impide la muerte celular inducida por giberelinas (Beligni y col., 2002) y por sequía (García-Mata y Lamattina, 2001). Se desconoce los mecanismos a través de los cuales el NO \cdot ejerce estos efectos, pero algunos estudios indican que esta especie puede proteger a las células del daño celular causado por ROS, ya que aumenta los niveles de algunas proteínas como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión *S*-transferasa o la oxidasa alternativa (Beligni y col., 2002; Huang y col., 2002; Polverari y col., 2003). Además, al reaccionar con el O $_2^{\cdot-}$ produciendo ONOO $^-$, puede impedir los efectos citotóxicos causados por el O $_2^{\cdot-}$, protegiendo a las células frente al estrés oxidativo (Delledonne y col., 2001).

Por lo visto hasta ahora, el NO· puede tanto estimular como inhibir la PCD, como también se ha demostrado previamente en células animales. En este proceso parece que la interrelación con otros compuestos oxidantes, como las especies de oxígeno reactivo, o distintos antioxidantes, podría ser la causa de este efecto dual del NO·.

1.7. TRANSPORTE DEL NO· EN PLANTAS

Actualmente, se postula la posibilidad de que el NO· se transporta a través de la planta en forma de precursores o “aductos”, de igual manera que el etileno se transporta de las raíces a las partes aéreas en forma del precursor ACC (Jackson, 2002). En animales, el nitrito presente en la sangre circulante puede servir como fuente de NO· (Gladwin y col., 2000). En plantas, el nitrito podría ser también una fuente móvil de NO·, ya que puede servir de sustrato para la síntesis de NO· por la nitrato reductasa (Neill y col., 2003). Tanto el nitrosoglutation (GSNO) como las hemoglobinas son asimismo posibles candidatos a funcionar como transportadores de NO· (Neill y col., 2003).

Recientemente se ha demostrado que las señales oxidativas y nitrosativas se transmiten desde las raíces hasta las partes aéreas de las plantas. Así, la incubación de raíces de *Arabidopsis* con H₂O₂ o con nitroprusiato sódico (SNP, un donador de NO·) llevó a la activación de una cascada de MAP quinasas en hojas que inducen la expresión de varios genes asociados al estrés. Esta rápida inducción de las quinasas después de los estreses oxidativo y nitrosativo en raíces puede desempeñar un papel importante en el establecimiento de la tolerancia a múltiples condiciones ambientales, y a la coordinación de la respuesta en toda la planta frente a los estreses abióticos (Capone y col., 2004).

1.8. PEROXISOMAS. METABOLISMO Y FUNCIÓN

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares presentes en prácticamente todos los tipos de células eucarióticas. Son estructuras pequeñas de entre 0,1 y 2 µm de diámetro constituidas por una membrana simple que rodea a una matriz granular o fibrilar. Su metabolismo es esencialmente oxidativo, y contienen catalasa y flavin oxidasas productoras de H₂O₂ como constituyentes enzimáticos básicos. Son orgánulos no autónomos, ya que no poseen ADN intraorganular, ribosomas o sistemas de membrana internos, y todas sus proteínas se encuentran codificadas en el genoma nuclear (López-Huertas y Baker, 1999). A pesar de poseer una morfología simple, los

peroxisomas presentan una composición enzimática compleja (Tabak y col., 1999; Baker y Graham, 2002). En plantas, existen varios tipos de peroxisomas que se pueden clasificar según su función metabólica y el tejido en el cual se localizan (Huang y col., 1983; Baker y Graham, 2002):

1 - Glioxisomas, presentes en el tejido de reserva de semillas oleaginosas y en hojas senescentes. Estos orgánulos contienen las enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato para convertir los lípidos de reserva en azúcares que son utilizados para la germinación y el crecimiento de la plántula y en las etapas de senescencia en las que deja de funcionar de manera efectiva la fotosíntesis.

2 - Peroxisomas de hojas, que se encuentran en tejidos fotosintéticos y que llevan a cabo la mayoría de las reacciones de la fotorrespiración.

3 - Peroxisomas de nódulos de raíz, presentes en nódulos de algunas leguminosas tropicales, y donde tiene lugar la síntesis de alantoína, el metabolito utilizado en este tipo de plantas para el transporte de nitrógeno.

4 - Peroxisomas no especializados, localizados en muchos tejidos, que contienen las enzimas básicas peroxisomales, pero cuya función fisiológica se desconoce.

Las principales funciones descritas para los peroxisomas son el ciclo de la fotorrespiración, la β -oxidación de ácidos grasos, el ciclo del glioxilato y el metabolismo de ureidos (Huang y col., 1983; Baker y Graham, 2002). Los peroxisomas están, por lo tanto, implicados en varias rutas metabólicas celulares, y para ello establecen contactos estrechos con el resto de los compartimentos subcelulares (Corpas y col., 2001; Igamberdiev y Lea, 2002; Minorsky, 2002).

Una característica de los peroxisomas es su plasticidad metabólica, ya que su contenido enzimático puede variar dependiendo del organismo, tejido y de las condiciones medioambientales (Fahimi y Sies, 1987; Van den Bosch y col., 1992). Así, los glioxisomas de semillas oleaginosas se transforman en peroxisomas de hojas, en un proceso dependiente de la luz y que tiene lugar una vez que se han agotado los lípidos de reserva (Baker y Graham, 2002). Durante este periodo, tiene lugar un descenso progresivo de la actividad de las enzimas propias de glioxisomas, a la vez que aumentan la actividad de las enzimas de la fotorrespiración características de peroxisomas de hojas. Esta transición es reversible en condiciones de senescencia y de estrés por cadmio, es decir, los peroxisomas de hoja sufren un proceso de conversión en el cual vuelven a aparecer las enzimas de los glioxisomas (del Río y col., 1998; McCarthy y col., 2001).

Aparte de la catalasa, los peroxisomas también contienen distintas enzimas implicadas en el metabolismo de ROS, como son las superóxido dismutasas, encargadas de eliminar el O_2^- producido en estos orgánulos (del Río y col., 1983; Sandalio y col., 1987; Palma y col., 1998; Corpas y col., 1998a). Además contienen las cuatro enzimas del ciclo ascorbato-glutation, ascorbato peroxidasa, monodeshidroascorbato reductasa, deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa, que conjuntamente eliminan H_2O_2 con consumo de NADPH (Jiménez y col., 1997). Se ha descrito también la presencia en peroxisomas de tres NADP-deshidrogenasas, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la isocitrato deshidrogenasa, que proporcionarían el NADPH necesario para el funcionamiento del ciclo ascorbato-glutation (Corpas y col., 1998b; Corpas y col., 1999). Por último se ha detectado actividad proteolítica en los peroxisomas de hojas (Corpas y col., 1993; Distefano y col., 1997), que podría estar implicada en distintos procesos, como en la degradación de proteínas durante la transición metabólica de los peroxisomas, en la degradación del extremo N-amino terminal de proteínas que contienen el péptido señal de localización peroxisomal PTS2, así como en la conversión irreversible de la XDH en XOD (Palma y col., 2002).

Durante la pasada década, distintos estudios han revelado que los peroxisomas son una fuente importante de especies de oxígeno reactivo. Además de producir H_2O_2 por su metabolismo esencialmente oxidativo, los peroxisomas también producen radicales superóxido (O_2^-). Esta producción tiene lugar en la matriz peroxisomal, por la enzima xantina oxidasa, y en la membrana peroxisomal, donde estaría implicada una pequeña cadena de transporte electrónico dependiente de NAD(P)H, (Fang y col., 1987; Sandalio y col., 1988b; López-Huertas y col., 1997, 1999a; del Río y col., 1998;). En la membrana peroxisomal, se han identificado tres polipéptidos integrales de membrana capaces de generar O_2^- (López-Huertas y col., 1997, 1999a).

Se ha observado que la población de peroxisomas aumenta durante la senescencia y bajo distintas condiciones de estrés, como las producidas por xenobióticos, ozono, metales pesados y H_2O_2 (Palma y col., 1991; del Río y col., 1998, 2002; Romero-Puertas y col., 1999; López-Huertas y col., 2000). En estas situaciones, las ROS producidas por los peroxisomas podrían actuar como moléculas señal activando distintas rutas de señalización, para contribuir a una mejor comunicación entre los distintos compartimentos celulares ante estas situaciones de estrés (Corpas y col., 2001; del Río y col., 2002).

Objetivos

Con la demostración en 1987 por el grupo del Profesor Salvador Moncada de que el factor de relajación endotelial (EDRF) era en realidad una molécula gaseosa e inorgánica, el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), nació un nuevo campo de investigación tal como lo demuestran los más de sesenta mil trabajos científicos publicados hasta la fecha. Así, a lo largo de estos años, se ha demostrado la trascendencia fisiológica de esta molécula que ha superado con creces las posibles previsiones hechas por los científicos, ya que se encuentra involucrada en procesos tan diversos y esenciales en los organismos superiores como son el sistema vascular, nervioso e inmune. Y todo ello se debe en una última consecuencia a sus propiedades químicas como radical libre.

En plantas, a mediados de los años noventa aparecieron los primeros trabajos que mostraban indicios de que las células vegetales también eran capaces de producir $\text{NO}\cdot$, molécula que hasta la fecha sólo había sido considerada como contaminante atmosférico por los fisiólogos vegetales. Así que entre escepticismo y controversia fueron acogidos estos primeros resultados por la comunidad científica.

El metabolismo de especies de oxígeno reactivo en células vegetales constituye desde hace más de veinte años una de las líneas de investigación del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, y en el contexto anteriormente mencionado se inició esta Tesis Doctoral que podría ser considerada pionera por el tema a estudiar que no era otro que el de abordar desde un punto de vista multidisciplinar la fisiología y bioquímica del $\text{NO}\cdot$. Así, utilizando plantas de guisante como modelo experimental y empleando aproximaciones fisiológicas, bioquímicas, celulares y moleculares, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Determinar la producción del $\text{NO}\cdot$ durante el desarrollo postgerminativo y en determinadas situaciones de estrés medioambiental para dilucidar sus implicaciones fisiológicas.
2. Identificar la fuente enzimática del $\text{NO}\cdot$, determinar su localización celular y subcelular e intentar caracterizarla bioquímica, inmunológica y molecularmente.

Material y Métodos

3.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

El material vegetal utilizado han sido plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv Lincoln) obtenidas de semillas de la casa Royal Sluis (Enkhuizen, Holanda). Las semillas de guisante se desinfectaron en etanol al 96% (v/v) durante tres minutos, secándolas posteriormente al aire sobre papel de filtro (Rabie y col., 1980), y se germinaron en vermiculita humedecida con CaSO_4 0,5 mM, en cámara de cultivo a 25°C durante 4 días y en oscuridad. Posteriormente se trasladaron al invernadero donde se cultivaron durante 17 días tras los que se extrajeron cuidadosamente de la vermiculita y se transplantaron a botes de PVC (2,5 litros de capacidad; 4-8 plántulas por bote) que se distribuyeron según un diseño de bloques de parcelas al azar. Se utilizó un sistema de cultivo en medio hidropónico (Hewitt, 1966) con aireación controlada de la solución nutritiva en cada unidad de cultivo.

Las soluciones nutritivas se prepararon con agua desionizada (resistividad ≥ 4 M Ω) y reactivos específicos de pureza analítica. La composición de la solución nutritiva se basó en la de Hewitt (1966) modificada para un pH inicial de $5,5 \pm 0,1$ y una concentración iónica de 30 mg ión l^{-1} , siguiendo la técnica propuesta por Steiner (1961). Las concentraciones de nutrientes utilizadas fueron: macronutrientes, expresados en mM: NO_3^- , 12; H_2PO_4^- , 4,0; SO_4^{2-} , 1,5; K^+ , 5,0; Ca^{2+} , 4,5; Mg^{2+} , 1,5; y los siguientes micronutrientes, expresados en μM : Fe, 91,3; B, 46; Cu, 1,1; Zn, 2,3; Mn, 9,3 (del Río y col., 1985). Las plantas crecieron en estas soluciones nutritivas completas durante 28 días, renovando la solución nutritiva semanalmente y reponiendo cada 24 horas el volumen perdido por transpiración con agua desionizada. Las condiciones de cultivo (día/noche) de las plantas 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 horas con un PAR (Photosynthetically Active Radiation) mínimo de $420 \mu\text{E s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. ($1 \mu\text{E} = 6,022 \cdot 10^{17}$ fotones).

Para los experimentos de medida de NO^\bullet mediante quimioluminiscencia de ozono, y para el estudio de la expresión de ADNc mediante PCR semicuantitativa, las plantas de guisante se sometieron a distintos tipos de tratamientos. Las semillas de guisante se germinaron y crecieron en una cámara de cultivo. Las condiciones de cultivo (día/noche) de las plantas fueron las siguientes: temperatura, 21°C / 18°C , humedad relativa, 60% / 50%, y un fotoperiodo de 14 horas con un PAR mínimo de $190 \mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. A los 10-12 días después de la germinación, las plántulas se transplantaron a

macetas con vermiculita, colocándose unas 4-5 plántulas en cada una de ellas, y se siguieron creciendo en la cámara durante 3 días más para permitir su aclimatación. Entonces, se sometieron a los siguientes tratamientos (Tabla 3.1):

Tratamiento	Condiciones
Calor	30°C, 1 h; 35°C, 1 h; 38°C, 1h
Frío	8-9°C; 48 h
Alta intensidad lumínica	1.180 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^2$, 4 h
Luz continua	190 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^2$, 48 h
Oscuridad continua	48 h
Daño mecánico	Pinzamiento, 4 h

Tabla 3.1. Tratamientos y condiciones a las cuales se sometieron las plántulas de guisante.

usándose una lámpara GE 300W-230 V tipo PAR 56/WFL. Para evitar el aumento de temperatura, se interpuso entre la fuente luminosa y la planta una placa de Petri (19 cm de diámetro y unos 4 cm de altura) rellena de agua, la cual se cambió cada 20-30 minutos (Fig. 3.1).

D. Luz continua. Las plántulas se mantuvieron bajo una iluminación continua de 190 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-1}$ durante 48 horas.

E. Oscuridad. Las plántulas se mantuvieron en oscuridad completa, en la cámara de cultivo, durante 48 horas.

F. Daño mecánico. A las hojas de las plántulas se les practicaron dos o tres incisiones mediante pinzamiento, y se mantuvieron durante 4 horas en la cámara antes de recoger las hojas.

A. Alta temperatura. Las plántulas se expusieron de forma progresiva a distintas temperaturas hasta alcanzar la temperatura final deseada. Así, se expusieron inicialmente a 30°C durante 1 hora, a 35 °C durante 1 hora y finalmente a 38 °C durante 4 horas. Durante este tiempo las plantas estaban en oscuridad.

B. Baja temperatura. Las plántulas se mantuvieron a una temperatura de 8-9°C durante 48 horas.

C. Alta intensidad lumínica. Se irradiaron las plántulas durante 4 horas a unos 1.180 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, siendo la distancia media a la fuente luminosa de 16 cm,



Fig. 3.1. Plántulas de guisante sometidas a alta intensidad lumínica, 1.180 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Para los estudios de desarrollo postgerminativo, las plántulas de guisante se mantuvieron en condiciones óptimas de luz y temperatura. Recogiéndose las raíces, tallos y hojas de plántulas a los 3, 5, 7, 9, y 11 días a partir de que aparecía el primer par de hojas.

En esta Tesis Doctoral se emplearon también hojas de plantas que se cultivaron en condiciones diferentes a las que se mencionaron antes. Las plantas de 17 días de edad, cultivadas en vermiculita en invernadero, se transplantaron a medios conteniendo las siguientes soluciones: L-arginina 0, 1, 20, 100 y 200 mM, y aminoguanidina (AG) 40 mM. Igualmente se cultivaron plántulas a las que se les escindió la raíz. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante 24 h, y, posteriormente, se analizaron sus hojas.

Las hojas de las plántulas, una vez sometidas a los distintos tratamientos, se lavaron y se guardaron a -80°C hasta que fueron procesadas posteriormente, salvo en el caso de la medida de producción de NO^{\cdot} por quimioluminiscencia de ozono, en el cual el material vegetal fue procesado inmediatamente.

Por último, se emplearon nódulos jóvenes y senescentes de guisante (*Pisum sativum* L., cv. Phoenix). Las semillas de guisante fueron proporcionadas por la casa Südwestdeutsche Saatzucht, Rastatt, Alemania. Las plantas se germinaron y se cultivaron en vermiculita en presencia de inóculos de *Rhizobium leguminosarum*. Las plantas se regaron con solución nutritiva completa exenta de nitrógeno. Los nódulos se recogieron a las 8 y 11 semanas de edad de la planta, correspondientes a plantas jóvenes y senescentes, respectivamente. Los nódulos de las plantas jóvenes mostraban las formas ovoideas típicas, mientras que las plantas senescentes presentaban nódulos polimórficos que se caracterizaban por poseer formas multilobuladas (Fig. 3.2).

3.2. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS

Los homogenados de hojas de guisante se prepararon en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 conteniendo EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 al 0,2% (v/v), MgCl_2 1 mM, glicerol al 10% (v/v) y 1,4-ditiotreitol (DTT) 2 mM, homogeneizando la muestra con nitrógeno líquido en mortero, y utilizando una relación peso/volumen de 1:4. Posteriormente se centrifugaron a 27.000 g durante 30 minutos a 4°C . Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron para posteriores análisis.

Se prepararon igualmente homogenados de raíces, tallos, vainas, semillas, cáliz, pétalos y ovarios, empleándose el mismo tampón, proporción material vegetal/tampón

y centrifugaciones que en hojas. Los extractos de nódulos se prepararon también en estas mismas condiciones.

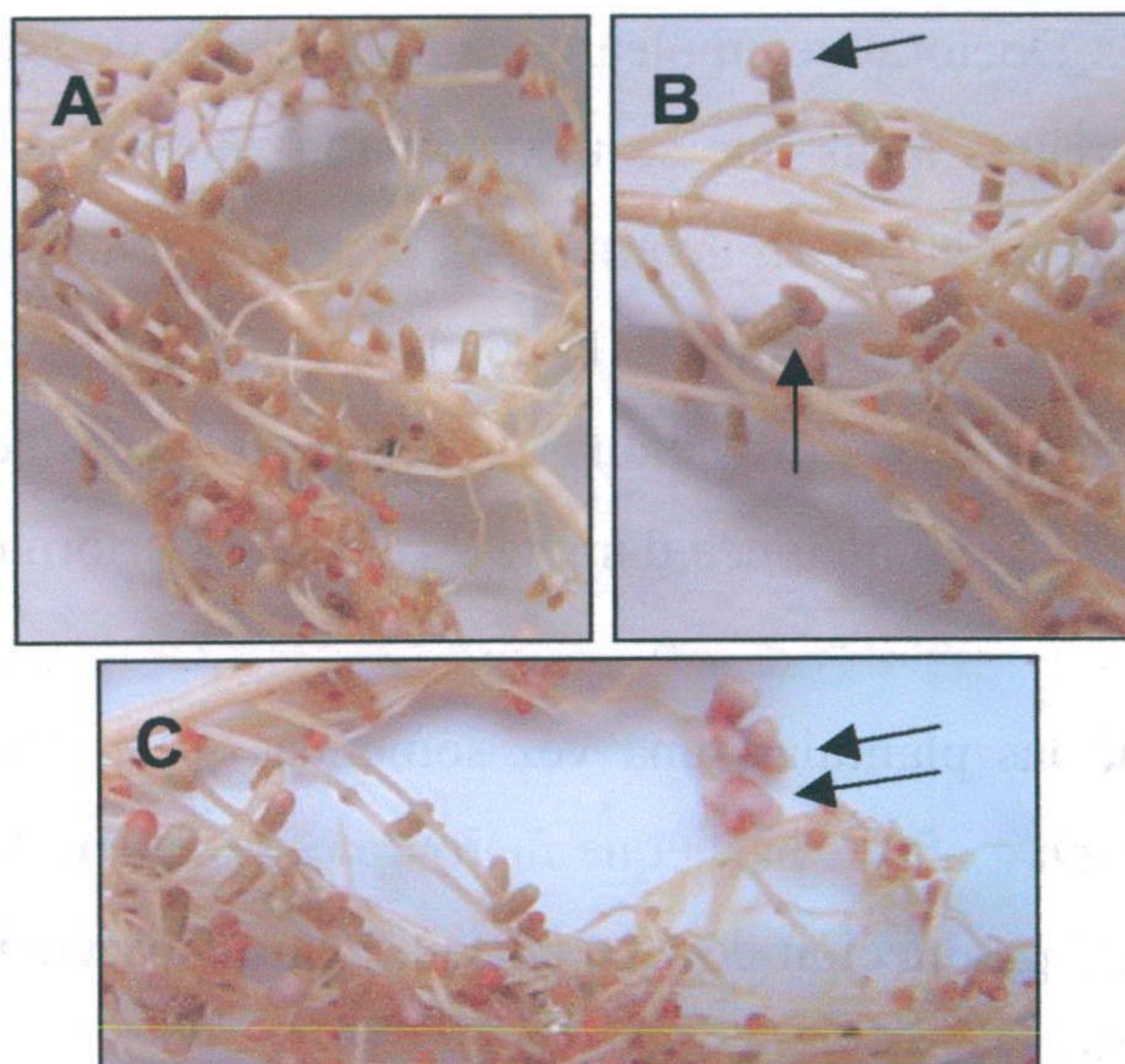


Fig. 3.2. Nódulos de plantas jóvenes (A) y senescentes (B, C) de guisante (*Pisum sativum* L., cv. Phoenix). Los nódulos multilobulados de las plantas senescentes se indican con flechas.

3.3. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PEROXISOMAS EN GRADIENTES DE SACAROSA

Todo el proceso se llevó a cabo entre 0-4°C. Se utilizó el método descrito por López-Huertas y col. (1995). El método consiste básicamente en realizar dos centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Fig. 3.3).

Se partió de 80 g de hojas de guisante que, después de lavadas, se homogeneizaron en 320 ml de un medio de extracción semicongelado compuesto por Tricina-KOH 170 mM, pH 7,5, sacarosa 1 M, EDTA-Na₂ 1 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1 mM, ASB 0,3% (p/v) y DTT 5 mM. La extracción se realizó utilizando un homogenizador Sorvall Onmimixer a velocidad máxima con tres golpes de tres segundos cada uno. El homogenado se filtró a través de dos capas de entretela, y se centrifugó a 2.600 g durante 20 minutos, con lo cual se eliminaron la mayor parte de los cloroplastos, núcleos y residuos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió cuidadosamente en un

medio similar al medio de extracción, pero con pH 7,0 y sin DTT. La suspensión se depositó con ayuda de una jeringa en la parte superior de un tubo (Quick seal, Beckman) en el cual, previamente, se había preparado un gradiente discontinuo de sacarosa compuesto por 3 ml de sacarosa al 60%, 6 ml del 57%, 9 ml del 51%, 9 ml del 47%, 6 ml del 42% y 3 ml del 35% (p/p). Las soluciones de sacarosa se prepararon a partir de una solución madre de sacarosa del 66% (p/p) preparada en EDTA-Na₂ 1 mM, pH 7,5. Los tubos, una vez sellados, se centrifugaron a 83.000 g durante 80 minutos en una ultracentrífuga Beckman usando un rotor vertical VTi50. Una vez acabada la centrifugación, los peroxisomas se situaban en la parte inferior del gradiente, en la interfase formada por las capas de 57 y 51% de sacarosa (López-Huertas y col., 1995). La banda correspondiente a la fracción de peroxisomas se extrajo perforando los tubos con una jeringa.

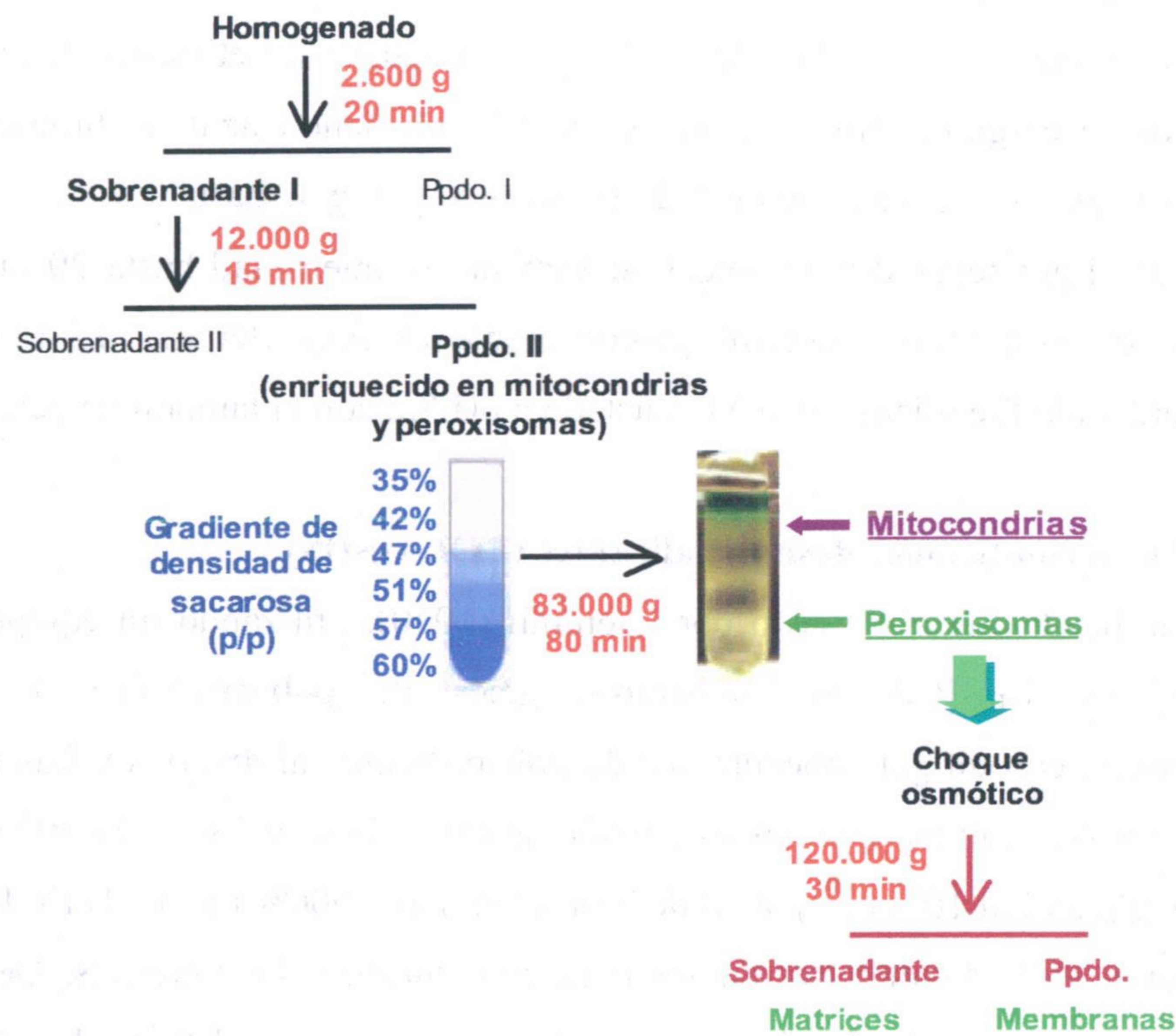


Fig. 3.3. Aislamiento y purificación de peroxisomas y mitocondrias mediante centrifugaciones diferenciales y en gradiente de densidad de sacarosa. Las matrices de las membranas peroxisomales se separaron por choque osmótico y posterior ultracentrifugación,

Para separar las matrices (fracción soluble) de las membranas, los peroxisomas se rompieron mediante choque osmótico, por dilución 1:5 en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, con EDTA-Na₂ 1 mM, con agitación a 0-4°C durante 60 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 120.000 g durante 30 minutos en un rotor Beckman 60Ti para separar el precipitado de membranas peroxisomales. Las matrices se concentraron por ultrafiltración usando membranas PM-10 de Amicon (Millipore).

3.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

3.4.1. EGPA nativa

Se utilizó un equipo Mini-Protean II, de Bio-Rad, donde se prepararon geles de 7,5 × 8 cm, y 1,5 mm de grosor. Los geles se prepararon con distintas concentraciones de poliacrilamida (5-10%, p/v) en tampón Tris-HCl 377 mM, pH 8,9. Además, se empleó un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v) preparado en el mismo tampón. Los homogenados se cargaron directamente en el gel, añadiendo azul de bromofenol al 0,006% (p/v). Se utilizó una intensidad de 10 mA por gel, hasta que las muestras penetraron en el gel separador, entonces se aumentó la intensidad hasta 20 mA, hasta que el azul de bromofenol alcanzó prácticamente el final del gel. El tampón de electrodos utilizado fue glicina 38 mM, ajustado a pH 8,2 con el tampón de geles.

3.4.2. EGPA en condiciones desnaturizantes (EGPA-SDS)

El método utilizado fue el descrito por Laemmli (1970), utilizando un equipo "Mini-Protean II" de Bio-Rad. Se prepararon geles de poliacrilamida a distintas concentraciones, con un gel concentrador de poliacrilamida al 4% (p/v). Las muestras para electroforesis se prepararon en un tampón de carga Tris-HCl 63 mM, pH 6,8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v), azul de bromofenol al 0,006% (p/v) y DTT 10 mM, y se calentaron a 95°C durante 10 minutos para desnaturizar las muestras. Después se cargaron en los geles, a los cuales se les aplicó un voltaje de 100 V durante 15-20 minutos, y después un voltaje de 200 V durante unos 45 minutos. El tampón de electrodos usado para el cátodo fue Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v), y el tampón del ánodo de igual composición pero sin SDS.

3.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA

3.5.1. Tinción con azul Coomassie

Los geles se tiñeron 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. Después se destiñeron con metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), hasta que quedaron bandas azules sobre un fondo transparente.

3.5.2. Tinción con plata

Se utilizó la técnica descrita por Jiang y col. (1994). Después de la electroforesis, los geles se incubaron con etanol al 30% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 3 horas para fijar las proteínas. Después se lavaron con agua desionizada 3 veces durante 5 minutos cada vez, 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 de nitrato de plata al 0,1% (p/v), en oscuridad, durante 30 minutos. El revelado se efectuó en una solución de carbonato sódico 0,3 M y formaldehído al 0,02% (v/v), hasta que aparecieron las bandas de proteínas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético al 3% (v/v).

3.5.3. Tinción con el Kit ultra sensible

En algunos casos en los que se secuenciaron las bandas de proteínas, terminada la electroforesis, los geles se tiñieron con un método comercial ultrasensible “Colloidal Blue Staining Kit” (Invitrogen), que proporciona una sensibilidad 5 veces mayor a la de los métodos de tinción tradicionales basados en el colorante “Coomassie”. Los geles se incubaron en una solución de tinción compuesta por metanol al 20 %, colorante A al 20 % y colorante B al 5 %, ambos colorantes suministrados por el método comercial, durante aproximadamente 10 h. Posteriormente, el gel se lavó con agua ultrapura durante aproximadamente 7 h, para eliminar el exceso de colorante.

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

3.6.1. Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas tanto por EGPA nativa como por EGPA-SDS se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) de Millipore de 0,45 μm , utilizando un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD, de Bio-Rad. El tampón utilizado

en la transferencia fue CAPS 10 mM, pH 11,0, con metanol al 10% (v/v). La transferencia se llevó a cabo utilizando una intensidad de 1,5 mA por cm² de gel durante 2 horas, según Corpas y col. (1998).

3.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia

Para la detección de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF se utilizó un método de quimioluminiscencia (Bunkelmann y Trelease, 1996), que se basa en la oxidación del luminol por el complejo peroxidasa de rábano-anti-IgG en presencia de H₂O₂, dando lugar a un compuesto intermediario que se estabiliza por la emisión de luz (Thorpe y col., 1985). La emisión de luz se potencia con 4-yodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol (Rosell y col., 1978).

Una vez concluida la transferencia de las proteínas, las membranas se lavaron con agua destilada. Para bloquear los sitios inespecíficos de unión de las inmunoglobulinas, las membranas se incubaron en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,18 M) con leche en polvo desnatada al 1,5% (p/v), durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, a una dilución óptima, durante toda la noche a 4°C, ó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS durante 40 minutos, cambiando el tampón cada 10 minutos, tras lo cual se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, anti-IgG unida a peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron finalmente con TBS y se procedió a la detección de las proteínas por quimioluminiscencia. Para el revelado, las membranas se incubaron durante 2-4 minutos en oscuridad en 20 ml de un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM al que se le adicionaron 8 mg de luminol, 200 µl de 4-yodofenol al 0,01% (solución de 10 mg/ml en DMSO) y 3,2 µl de H₂O₂ al 30% (v/v). Las membranas se expusieron a una película autorradiográfica "Hyperfilm", de Amersham, en un cassette para autorradiografía (Kodak). El tiempo de exposición variaba, desde unos segundos hasta 20 minutos, según la intensidad lumínica obtenida.

En algunos casos, se utilizó un método de detección comercial ultra sensible ("ImmunoPure Ultra-Sensitive ABC Peroxidase Staining Kit", de Pierce), siguiéndose las instrucciones del fabricante. El método es muy semejante al descrito anteriormente, salvo que tras incubarse con el anticuerpo primario y lavar, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, se incubó con el reactivo comercial "Ultra-Sensitive ABC Staining

Reagent”, consistente en una preparación de avidina y peroxidasa biotinilada. La biotina unida al anticuerpo secundario se une a la avidina y ésta a la peroxidasa biotinilada, de manera que se produce una amplificación de la señal lumínica con respecto al método anterior (Fig. 3.4).

Para comprobar la especificidad de este método, se incubaron los peroxisomas de hojas de guisante transferidos a las membranas de PVDF en las siguientes condiciones: 1, con el anticuerpo primario y el complejo ABC (avidina-biotina conjugada); 2, con el anticuerpo secundario y el complejo ABC; 3, con el complejo ABC solamente; y 4, con ambos anticuerpos y el complejo ABC. De esta manera, se puede comprobar la presencia de bandas inespecíficas que pueden dar falsos positivos, probablemente por la existencia de proteínas biotiniladas en los peroxisomas de hojas de guisante, generadas como consecuencia de una modificación post-traducciona.

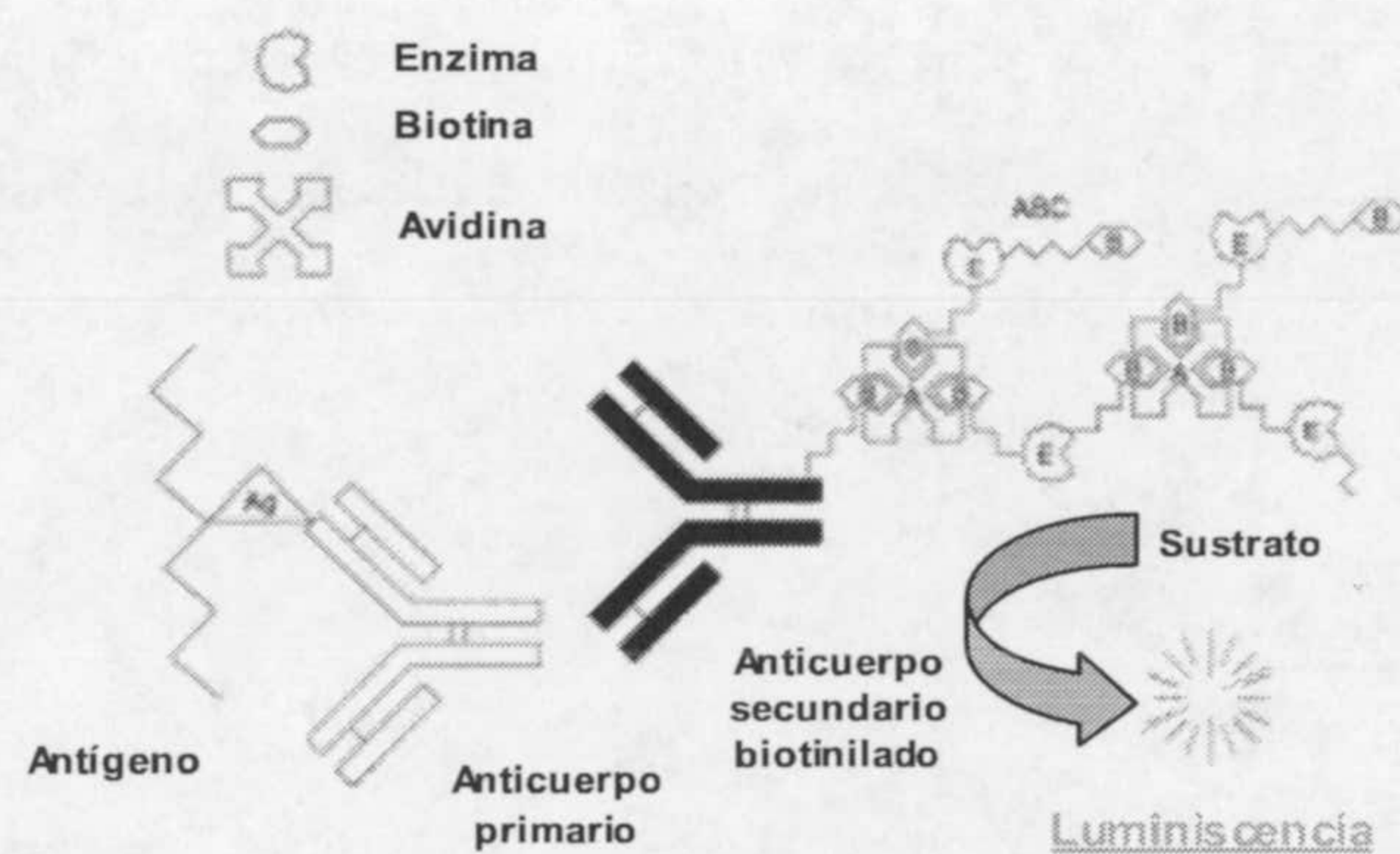


Fig. 3.4. Detección de proteínas transferidas a membranas de PVDF mediante el método quimioluminiscente de avidina-biotina.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado los siguientes anticuerpos: anticuerpo de la XOD de rata (Moriwaki y col, 1996); anticuerpo de las proteínas P y H del complejo glicina descarboxilasa de guisante (Vauclare y col., 1996); anticuerpo de la nitrato reductasa; anticuerpo frente al polipéptido de 14 aminoácidos del extremo carboxílico de la iNOS.

3.7. OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTISUERO DE LA iNOS

La síntesis del péptido y obtención del antisuero se realizó mediante los protocolos al efecto de la casa comercial Sigma-Genosys. El péptido sintetizado correspondió a los 14 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la iNOS de macrófagos de ratón

(M87039), correspondientes a los residuos 1131-1144: N-CKKGSALleepKATRL-C. Este péptido, una vez sintetizado, se conjugó por su extremo amino y mediante el agente MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) a una proteína transportadora KLH (“keyhole limpet hemacyanin”) para así conferirle mayor poder antigénico. Una vez obtenido el péptido conjugado se procedió a la inmunización de dos conejos machos de la raza Nueva Zelanda, mediante distintas inyecciones subcutáneas. La primera inyección se realizó mezclando el inmunógeno con adyuvante de Freund completo (CFA), y las restantes se realizaron con el adyuvante de Freund incompleto (IFA). El adyuvante mejora la respuesta inmune, de manera que se necesita menor cantidad de péptido para producir más anticuerpo, y además libera lentamente el antígeno, lo que permite la estimulación continua del conejo. El protocolo completo de inmunización seguido se describe en la Tabla 3.2.

Día 0	Suero preinmune, inyección (CFA)
14	Inyección (IFA)
28	Inyección (IFA)
35	Primer sangrado
42	Inyección (IFA)
49	Segundo sangrado
56	Inyección (IFA)
63	Tercer sangrado
70	Inyección (IFA)
77	Cuarto sangrado (final)

Se obtuvieron 3 ml de cada uno de los tres primeros sangrados, así como del suero preinmune, y 45 ml del sangrado final. A todos se les añadió azida sódica al 0,02% (p/v), y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Tabla 3.2. Protocolo de inmunización llevado a cabo en conejos para la obtención del antisuero frente a la iNOS de macrófagos de ratón. CFA: Adyuvante Completo de Freund (“Complete Freund’s Adjuvant”); IFA: Adyuvante Incompleto de Freund (“Incomplete Freund’s Adjuvant”)

3.7.1. Determinación del título de los antisueros

Los cuatro sangrados de los dos conejos fueron analizados para determinar su título mediante ensayos de transferencia de Western. Para ello se realizaron EGPA-SDS con 20, 10 y 5 ng de la iNOS pura de macrófagos de ratón (iNOS murine macrophage, Cayman), y posterior transferencia e inmunodetección, según se describe en el apartado

3.6, usando como anticuerpo primario los distintos sangrados obtenidos a una dilución 1:500 en tampón TBS.

Se estudió también la reactividad del anticuerpo frente a extractos de diferentes órganos de plantas de guisante, que se prepararon según se indicó anteriormente en el apartado correspondiente. Los órganos empleados fueron raíces, tallos, vainas, semillas, cáliz, pétalos, ovarios y nódulos jóvenes y senescentes.

3.7.2. Purificación del anticuerpo de la iNOS mediante inmunoafinidad

Con el objetivo de obtener la fracción de IgG para los estudios de microscopía, se realizó una purificación de la misma mediante inmunoafinidad sobre membranas de PVDF. Para ello se cargaron 2,5 µg de enzima iNOS (Cayman) en un gel preparativo de acrilamida al 7,5 %, previamente desnaturalizada en tampón de carga y calentada a 90°C durante 5 minutos. Una vez terminada la electroforesis, se procedió a la transferencia de la enzima a una membrana de PVDF tal y como se indica en el apartado correspondiente. La membrana se tiñó con Rojo Ponceau al 0,2 % (p/v), preparado en ácido tricloroacético al 3 % y ácido sulfosalicílico al 3 %, durante 5 min, y se cortó la tira de membrana correspondiente a la banda de la iNOS (130 kDa), la cual se lavó varias veces con tampón PBS (fosfato-K 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM), hasta conseguir eliminar el colorante. La membrana se bloqueó con ASB al 5 % (p/v) en PBS durante 3 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó durante 3 h a temperatura ambiente con el antisuero obtenido frente a la iNOS de macrófagos de ratón diluido 1:20 en PBS. La tira de PVDF se lavó 4 veces con PBS durante 10 min a temperatura ambiente, y otras 4 veces más con PBS conteniendo ASB al 0,1% (p/v). Para eluir el anticuerpo de la membrana, se añadieron 500 µl de una solución de glicina 0,2 M, pH 2,7, EGTA 1 mM, y se incubó durante 10 min. Se repitió la elución con otros 250 µl de la solución ácida. Para neutralizar el carácter ácido de la solución, la membrana se lavó posteriormente con 500 µl de tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, ASB 0,2% (p/v) y azida sódica al 0,02% (p/v), y se añadieron a los lavados ácidos anteriores.

3.7.3. Obtención de la fracción de IgG a partir del antisuero

Con el objetivo de obtener un mayor volumen de IgG para montar una columna de afinidad se procedió a la purificación de la misma mediante un método alternativo comercial de Bio-Rad, "Econo-Pac Serum IgG Purification Kit", siguiendo las

instrucciones según el manual del fabricante. Dicho procedimiento requiere el empleo de columnas desaladoras "Econo-Pac 10DG" y columnas de afinidad de "DEAE Affi-Gel Blue" (Econo-Pac Serum IgG Purification, Bio-Rad) . Se partió de un total de 18 ml de suero, que se centrifugaron a 16.000 g durante 10 minutos y se empleó el sobrenadante para la purificación de la IgG. En total se llevaron a cabo 6 lotes de purificación de IgG.

El eluido de la columna de afinidad se recogió en fracciones de aproximadamente 2,6 ml en las que se determinó la densidad óptica a 280 nm, así como la cantidad de proteína según el método de Bradford (1976). Además, las fracciones se analizaron por EGPA-SDS y posterior tinción de los geles con azul Coomassie. Se reunieron las fracciones que presentaron mayor cantidad de proteína, originando un volumen total de unos 160 ml, que se concentraron por ultrafiltración, usando membranas Diaflo[®] Ultrafilters, YM-10 (Millipore), hasta un volumen final de 11 ml. En este suero purificado y concentrado se analizó la cantidad de proteína y se empleó para posteriores experimentos.

3.8. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE AFINIDAD CON LA FRACCIÓN IgG DEL ANTICUERPO FRENTE A LA iNOS

Una vez obtenida la fracción de IgG del suero se procedió a la unión de la misma a un gel de agarosa para la obtención de la columna de afinidad. Se empleó un método comercial de Bio-Rad (Affi-Gel[®] Hz Immunoaffinity Kit). En este método, el gel de agarosa reacciona con los aldehídos derivados de carbohidratos oxidados de la IgG dando lugar a enlaces hidrazona, que son enlaces covalentes y estables. La IgG es una glicoproteína que contiene aproximadamente un 3% de carbohidratos localizados en la región Fc (cadena pesada) del anticuerpo. La oxidación por peryodato de dos grupos hidroxilos carbohidratos vecinos da lugar a grupos aldehídos que se unen específicamente al gel. La IgG queda unida al gel de forma orientada, con lo que se consigue una mayor capacidad de captación de antígeno por IgG acoplada al gel que si la unión se hubiera realizado a través de aminas primarias (Fig. 3.5).

La IgG purificada se preparó en tampón CP (coupling buffer), según se describe en el folleto del fabricante, mediante columnas desaladoras PD10. Para oxidar la IgG, se utilizó NaIO₄ 18 mM. La mezcla IgG- NaIO₄ se incubó durante 1 h con agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se cargaron 3 ml de la mezcla en una columna Econo-Pac 10DG (Bio-Rad) para eliminar el NaIO₄. El proceso

se repitió hasta que el total de la mezcla de IgG más peryodato fue pasada por la columna Econo-Pac 10 DG. En las fracciones obtenidas se determinó la absorbancia a 280 nm. Se unieron todas las fracciones, obteniendo un volumen total de 12 ml de suero activado.

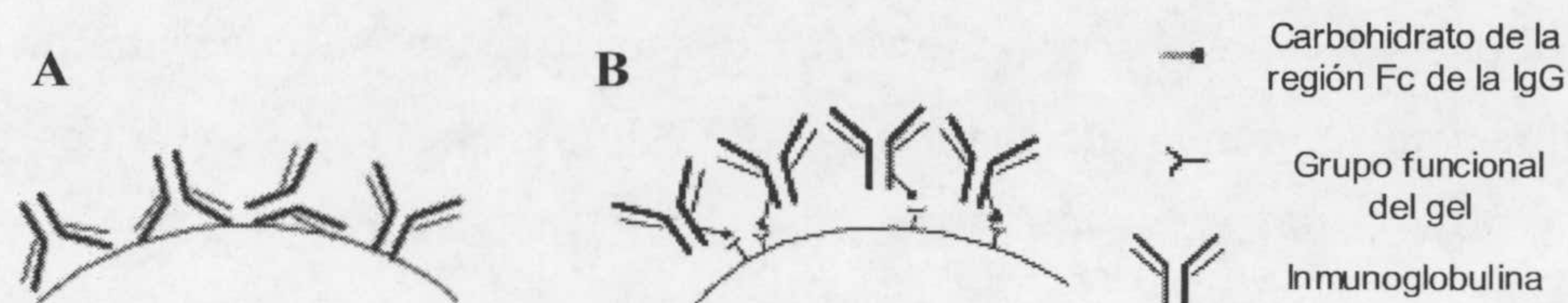


Fig. 3.5. **A)** Unión al azar de la IgG a un gel convencional para la columna de inmunoafinidad a través de aminas primarias. Este proceso origina una capacidad de unión menor de antígeno, puesto que no todos los epítopos del anticuerpo quedan expuestos. **B)** IgG acoplada al Affi-Gel Hz a través de los carbohidratos de la región Fc. Esta unión orientada permite obtener una capacidad de unión de antígeno por IgG unida mayor que la capacidad obtenida mediante la unión al azar.

Para unir la IgG oxidada al Affi-Gel Hz Hydrazide Gel, se utilizaron 2 ml de gel, el cual se lavó tres veces con CP, para eliminar el isopropanol en el que se encontraba preservado, antes de proceder a la unión de la IgG al mismo. Los 12 ml de suero se incubaron junto con los 2 ml de gel, con agitación suave y a temperatura ambiente durante 10 h. El gel se decantó y se retiró el sobrenadante con una pipeta. Posteriormente el gel se lavó con 10 ml de tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8 para arrastrar el exceso de IgG no unida al gel, y se guardó a 4°C hasta su posterior utilización.

3.9. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PEROXISOMALES INMUNORRELACIONADAS A LA INOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Una vez aisladas y concentradas las matrices de los peroxisomas de hojas de guisante resultantes de ocho gradientes de sacarosa (aproximadamente 4 ml), se incubaron con el gel de agarosa al cual se le había acoplado la fracción de IgG. La incubación se realizó a 4°C durante toda la noche en tubos de vidrio con agitación continua. La mezcla de gel y matrices de peroxisomas se introdujo en una columna de cromatografía de 1.0 × 10 cm, de Bio-Rad, y se permitió que el gel decantara. Se recogió el eluido y después la columna se lavó con 6 ml de tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M. Seguidamente se eluyó sucesivamente con 4 ml de citrato sódico 0,15 M, pH 3,0 y con 4 ml de clorhidrato de guanidina 5 M, pH 7,0, ambos sobre 8 ml de tampón fosfato-K

0,2 M, pH 7,8, para neutralizar el carácter ácido y caotrópico, respectivamente, de ambas disoluciones. Entre cada elución se realizó un lavado de la columna con 4 ml de tampón AB (Tris-ClH 0,02 M; pH 8,0, 0,028 M NaCl). Al final del proceso, la columna se lavó con 30 ml de AB, guardándose a 4°C en este tampón conteniendo azida sódica al 0,02% (p/v).

Los tres eluidos más los tres lavados intermedios se concentraron mediante ultrafiltración, utilizando membranas Diaflo[®] Ultrafilters, YM-10 (Millipore), o bien usando Macrosep[®] Centrifugal Devices (Pall[®]). Las muestras concentradas se analizaron mediante EGPA-SDS y posterior tinción con plata y transferencia de western e inmunodetección.

3.10. DEGRADACIÓN DE iNOS POR ENDOPROTEASAS PEROXISOMALES

Los peroxisomas de hojas de guisante, una vez aislados y purificados tal y como se indica en el apartado 3.3, se diluyeron 1:1 con tampón fostato-K 100 mM, pH 7,5, conteniendo Tritón X-100 al 0,2 % (v/v). Asimismo se preparó una solución 0,45 µg/µl de iNOS en el mismo tampón, con sacarosa al 26% (p/p), equivalente a la concentración de sacarosa de los preparados de peroxisomas diluidos. También se prepararon muestras de peroxisomas diluidos 1:1 con iNOS 0,45 µg/µl. Las tres preparaciones se incubaron a 37°C y se tomaron alícuotas a las 0, 16, 24, 48 y 72 h, a las que se adicionó tampón de carga de electroforesis y se calentaron a 90 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF, según el método de inmunodetección indicado anteriormente, empleándose un anticuerpo comercial frente a la iNOS (Calbiochem), usando una dilución 1/10.000. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C y para la detección del complejo antígeno-anticuerpo se empleó el método ultrasensible de avidina-biotina.

3.11. IDENTIFICACIÓN/SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS PEROXISOMALES INMUNORELACIONADAS CON LA iNOS

3.11.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Para la identificar los polipéptidos obtenidos a partir de los geles se empleo la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight*) del servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.cnb.csic.es/~proteom>), siguiendo el protocolo descrito por Yang y col.,

(2000). Los geles se fijaron con etanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 minutos. Después, se incubaron durante 30 minutos más en una solución que contenía etanol al 30% (v/v), tiosulfato de sodio al 0,2% (p/v), y acetato sódico 0,5 M. Los geles se lavaron tres veces durante 5 minutos y se incubaron en una solución de nitrato de plata al 0,25% (p/v) durante 20 minutos, en oscuridad. Tras un lavado, se revelaron utilizando una solución de carbonato sódico 0,24 M al que se le añadió formaldehído al 0,015 % (v/v), hasta que aparecieron las bandas de proteínas. La reacción se detuvo con EDTA- Na_2 40 mM, durante 10 minutos. Posteriormente el gel se lavó 3 con H_2O destilada veces durante 15 minutos.

3.11.2. Microcapillary NanoLC/MS ($\mu\text{LC}/\text{MS}$)

En otros caso, se utilizó el servicio de proteómica de la Universidad de Harvard (<http://mcb.harvard.edu/microchem>) en el cual se combinaba la técnica de HPLC en fase reversa microcapilar con la espectrometría de masas y un procedimiento de nano-electropulverización (*microcapillary reverse-phase HPLC nano-electrospray tandem mass spectrometry; $\mu\text{LC}/\text{MS}/\text{MS}$*) y llevada a cabo en un espectrómetro de masas con cuatro trampas de iones Finnigan LCQ DECA XP. Para ello las proteínas separadas por electroforesis se tiñeron con un método comercial de tinción, que utiliza el colorante azul Coomassie, según se explica en el apartado 3.5.3. Posteriormente se cortaron las bandas de interés del gel con un bisturí estéril, y se destiñeron varias veces con agua ultrapura. Después, se lavaron 2 veces con acetonitrilo al 50% (v/v), durante 2 minutos cada vez. Además de las bandas, se cortó asimismo un trozo de gel sin muestra, que se sometió al mismo proceso que las bandas, y que sirvió de control negativo.

3.11.3. Secuenciación de EDMAN

Para la secuenciación por la técnica de EDMAN, las proteínas transferidas a las membranas de PVDF se tiñeron con Coomassie Blue R al 0,2% (p/v), preparado en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v), durante 30 s. Después, se destiñó con metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 7% (v/v), hasta que aparecieron las bandas azules sobre un fondo claro. Este mismo procedimiento se empleó para la tinción de los marcadores de masa molecular en las membranas de PVDF.

3.12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.12.1. Catalasa (CAT; EC 1.11.1.6)

Se midió espectrofotométricamente según el método de Aebi (1984). El método se basa en el descenso de la absorbancia a 240 nm debido a la desaparición de H₂O₂. La determinación se llevó a cabo en tampón fosfato-K 50 mM pH 7,0 que contenía H₂O₂ 10,6 mM, a 25°C, en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició añadiendo la muestra al tampón de reacción. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción y teniendo en cuenta un coeficiente de extinción molar para el H₂O₂ de 39,58 M⁻¹ · cm⁻¹ y se expresó en μmoles de H₂O₂ · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína (del Río y col., 1977).

3.12.2. Xantina oxidasa (XOD; EC 1.1.3.22) y xantina deshidrogenasa (XDH; EC 1.2.1.27)

3.12.2.1. Actividad total

La actividad XOD se determinó espectrofotométricamente, según describe Rajagolapan (1985), midiendo la aparición de ácido úrico dependiente de O₂ a 293 nm, a 25 °C. La muestra se incubó previamente 3 min con KCN 0,1 mM para inhibir la actividad uricasa. La reacción se llevó a cabo en un tampón fosfato-K pH 7,8 conteniendo xantina 50 μM y Tritón X-100 al 0,1% (v/v) siendo el volumen final de reacción de 1,05 ml. La actividad se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el ácido úrico de 1,22 × 10⁴ M⁻¹ · cm⁻¹ (Hong y Schopfer, 1981) y se expresó en nmoles de ácido úrico · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

La actividad XDH se determinó de igual forma, pero eliminando previamente el O₂ del tampón por borboteo con N₂ durante 5 min, y en presencia de NAD⁺ 0,5 mM. En cada muestra asimismo se determinó la actividad en ausencia de xantina para determinar, si hubiera, producción endógena de ácido úrico.

3.12.2.2. Actividad isoenzimática

Se llevó a cabo según Özer y col. (1998), con algunas modificaciones. Una vez terminada la electroforesis en condiciones nativas, los geles se incubaron en tampón Tris-HCl, pH 7,6, conteniendo xantina 0,50 mM, azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,25 mM, NAD⁺ 0,50 mM y TEMED 30 mM, hasta que aparecieron las bandas de actividad de color azul en los geles, tras lo cual, se detuvo la reacción transfiriendo los geles a H₂O destilada.

3.12.3. Glicolato oxidasa (GOX; EC 1.1.3.1.)

Se midió espectrofotométricamente según el método descrito en Archer y Ting (1996), siguiendo la formación a 324 nm de glioxilato de fenilhidrazona, resultado de la reacción del glioxilato, generado por la oxidación del glicolato, con la fenilhidrazona. El medio de reacción contenía fosfato-K 45 mM, pH 8,0, EDTA 3 mM, cloruro de fenilhidrazona 10 mM y glicolato sódico 5 mM, en un volumen final de reacción de 1 ml. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de la reacción utilizando un coeficiente de extinción molar para el glioxilato de fenilhidrazona de $17,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y se expresó en μM de glioxilato de fenilhidrazona $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.12.4. Hidroxipiruvato reductasa (HPR; EC 1.1.1.29)

Se utilizó el método descrito por Schwitzguébel y Siegenthaler (1984). Para ello, se midió la oxidación a 340 nm del NADH acoplada a la reducción del hidroxipiruvato a glicerato. El medio de reacción contenía tampón fosfato-K 50 mM, pH 6,2, KCN 1 mM, NADH 0,2 mM e hidroxipiruvato 2 mM, en un volumen final de reacción de 1,1 ml. La actividad enzimática se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción, utilizando un coeficiente de extinción molar para el NADH de $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Vigil, 1983), y se expresó en μmoles de NADH $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.12.5. Actividad óxido nítrico sintasa (NOS)

Se siguió un método radiactivo basado en la detección de tritio (^3H). La actividad NOS de peroxisomas aislados se llevó a cabo siguiendo la conversión de L- ^3H arginina a L- ^3H citrulina, según se describe en Barroso y col. (1999). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 20 minutos en un tampón Hepes 40 mM, pH 7,2, conteniendo 0,2 mM CHAPS, NADPH 1mM, FAD 10 μM , FMN 10 μM , BH_4 10 μM , calmodulina 10 $\mu\text{g/ml}$ y CaCl_2 1,25 mM, con distintas cantidades de proteína peroxisomal, así como de L-arginina suplementada con L- ^3H arginina (1,0 mM Ci/ml), en un volumen final de 220 μl . La reacción se detuvo añadiendo 1,5 ml de una resina de intercambio catiónico (Dowex 50W, forma sódica, capacidad de interacción del 8%, 200-400 de pasta de gel) a 4°C , que detiene la reacción al eliminar la arginina. Después, se añadieron 5 ml de H_2O , y se dejó que la resina decantara durante 10 min. Se tomaron 3,5 ml del

sobrenadante, que se analizaron en un contador de centelleo líquido. La actividad total se obtuvo restando la actividad obtenida con la muestra sin NADPH, que representaría la formación de L-[³H]citrulina de forma no enzimática, así como la actividad de la mezcla de reacción, pero sin proteína peroxisomal. La actividad se expresó como pmoles de L-[³H]citrulina · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

3.13. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinó la concentración de proteínas según el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar y el reactivo comercial de Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad). La muestra se diluyó convenientemente con agua en un volumen de 800 µl. Posteriormente se le añadió 200 µl de reactivo, midiéndose la absorbancia a 595 nm transcurridos 5 min.

3.14. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.14.1. Preparación de las muestras

Se realizaron cortes de hojas de aproximadamente 1 mm², que se fijaron en una solución de glutaraldehído al 0,2% (v/v) y formaldehído al 4% (p/v) preparados en tampón Pipes-KOH 50 mM, pH 7,4, durante 1 hora a 4°C. Los cortes se lavaron en el tampón Pipes y se deshidrataron por incubaciones sucesivas con etanol (30, 50, 70, y 100%; v/v), en intervalos de 20 min. Las muestras se mantuvieron a -20°C a partir del 70% de etanol. Después de la deshidratación, los cortes se infiltraron gradualmente en resina LR White (LRW) preparada en series de etanol (25-100%; v/v) en intervalos de 4 h e infiltración final de 12 h. La polimerización se realizó a -20°C con luz ultravioleta.

3.14.2. Inmunolocalización subcelular de proteínas por marcaje con oro coloidal

Se llevó a cabo según el método que se describe en Sandalio y col. (1996). Se utilizaron cortes de hojas preparados en resina LRW tal y como se describe en el apartado anterior. Una vez obtenidos los cortes, se bloquearon en tampón TBSTA [Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,9% (p/v), Tween-20 0,05% (v/v), y azida sódica 0,02% (p/v), con albúmina de suero bovino 2% (p/v)] durante 2 h. Después se incubaron con el anticuerpo primario diluido convenientemente en TBST (de igual composición al TBSTA, pero sin albúmina de suero bovino), de 2 a 5 h, a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con tampón TBSTA, y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes se lavaron con TBST y H₂O

ultrapura, se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (v/v) durante 3 minutos y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

Los anticuerpos primarios utilizados en los estudios de inmunolocalización han sido los siguientes: anticuerpo de la iNOS de macrófagos de ratón (descrito en esta memoria); anticuerpo de la xantina oxidasa (XOD) de rata (Moriwaki y col, 1996); anticuerpo de las proteínas P y H del complejo glicina descarboxilasa de guisante (Vauclare y col., 1996); y anticuerpo de la nitrato reductasa. Los anticuerpos secundarios utilizados (dilución 1:50 en TBST) fueron anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón, dependiendo del anticuerpo primario utilizado, y unidos a partículas de oro coloidal de 15 nm y 20 nm de diámetro, respectivamente.

3.15. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

3.15.1. Detección de NO[•]

Para detectar NO[•] en los tejidos de las plantas de guisante, se cortaron fragmentos de tejidos de aproximadamente 25 mm², y se incubaron durante 1 h a 25°C en oscuridad con 10 µM de diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA, Calbiochem), preparado en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4. Los cortes se lavaron dos veces en el mismo tampón durante 15 min cada vez. Posteriormente, los cortes se infiltraron en una solución de acrilamida-bisacrilamida al 15% (p/v) (Peinado y col., 2000). Se cortaron secciones de 100 µm de grosor, en presencia de tampón PBS 10 mM. Las secciones se lavaron en glicerol:PBS, azida sódica al 0,05% (p/v), en una proporción 1:1 (v/v) y se montaron en el mismo medio para observarse en un microscopio láser confocal (Leica TCS SL). Se usaron filtros estándar y específicos para la fluorescencia verde del DAF-2 (excitación 495 nm, emisión 515 nm) y la autofluorescencia naranja de la clorofila (clorofila *a* y *b*, excitación 429 nm y 450 nm, respectivamente, y emisión 650 y 670 nm, respectivamente). Como control de la fluorescencia basal se utilizaron secciones incubadas sin DAF-2 o preincubadas con L-NAME 5 mM (inhibidor competitivo de la NOS), durante 1 h a 25°C.

Esta técnica es empleada frecuentemente para detectar NO[•] en animales y plantas (Nakatsubo y col., 1998; Nagano y Yoshimura, 2002). El método consiste en incubar las muestras con DAF-2 DA, que es capaz de atravesar las membranas biológicas, el cual es hidrolizado por las esterasas de la célula, dando lugar al DAF-2. A pH fisiológico, el DAF-2 no es fluorescente, pero en presencia de NO[•] y oxígeno se forma el compuesto triazol de DAF-2 (DAF-2 T), que es fluorescente (Fig. 3.6). El DAF-2 no reacciona con

las formas estables oxidadas del NO[•], como NO₂⁻ y NO₃⁻, ni con otras especies de oxígeno o de nitrógeno reactivo como O₂⁻, H₂O₂ y ONOO⁻. Otra ventaja del DAF-2 es que su longitud de onda de excitación es poco dañina para las células, lo cual ha permitido usar este fluoróforo para estudiar *in vivo* y a tiempo real la producción de NO[•] en células de plantas (Foissner y col., 2000; Pedroso y col., 2000; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill y col., 2002). El límite de detección del DAF-2T es menor de 2-5 nM y presenta una correlación linear hasta 1000 nM (Nakatsubo y col., 1998).

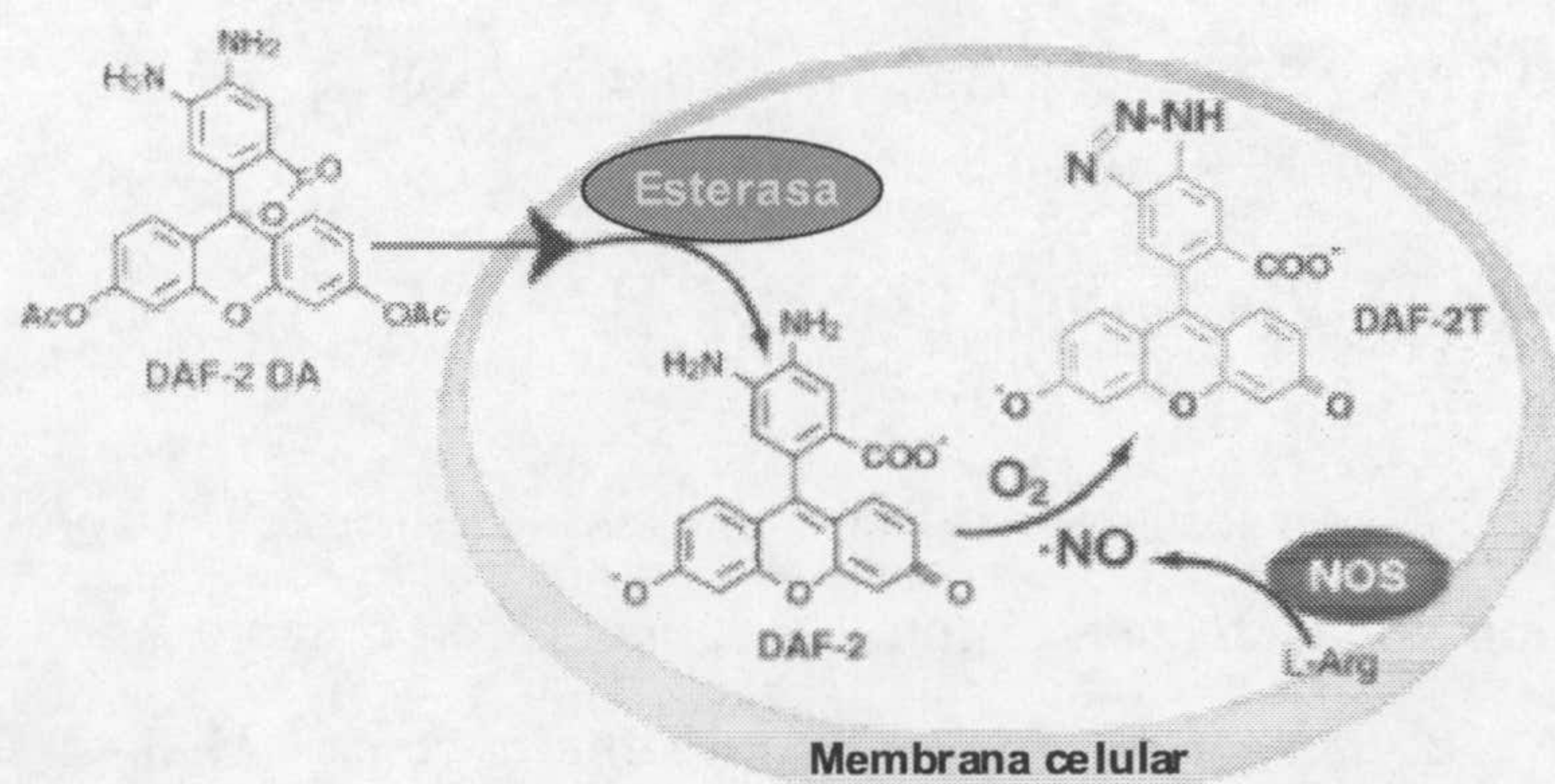


Fig. 3.6. Reacción del DAF-2 DA con el óxido nítrico en sistemas biológicos para la detección de NO mediante análisis fluorimétrico

3.15.2. Colocalización de catalasa y proteínas inmunorelacionadas con la iNOS

Las hojas de guisante se cortaron en trozos de 4-5 mm² y se fijaron en *p*-formaldehído al 4% (p/v) preparado en tampón fosfato-K 0,1 M, pH 7,4, (PB) durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron en sacarosa al 30% (p/v), preparada en PB, durante toda la noche a 4°C, para preservarlos de los tratamientos de las etapas posteriores. Se realizaron secciones de 60 μm de grosor con un criostato (2800 Frigocut E, Reichert-Jung, Viena, Austria). Los estudios de colocalización se llevaron a cabo por análisis confocal de secciones por doble tinción de inmunofluorescencia, como describe Esteban y col. (2001). Las secciones se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente con un anticuerpo frente a la iNOS de ratón (Uttenthal y col., 1998) diluido 1:2.500 en Tris-HCl 5 mM, pH 7,2, NaCl 0,9% (p/v), azida sódica 0,05% (p/v), albúmina de suero bovino 0,1% (p/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) (TBSA-BSAT). Después de varios lavados en TBSA-BSAT, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado frente a la IgG de conejo (Pierce), diluido 1:1.000 en

TBSA-BSAT, durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron de nuevo y se incubaron con estreptavidina-Cy2 (Amersham), diluída 1:1.000 en TBSA-BSAT, durante 1 y ½ h a temperatura ambiente. Este paso y todos los posteriores se llevaron a cabo en oscuridad. Después de tres lavados más, las secciones se sumergieron en una solución de anticuerpo de cabra frente a la IgG de conejo (Vector) diluida 1:200 en TBSA-BSAT, durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron 20 veces durante 15 minutos cada vez, y después de un lavado adicional durante toda la noche, se incubaron con un anticuerpo frente a la catalasa de calabaza (Yamaguchi y Nishimura, 1984) diluido 1:500 en TBSA-BSAT, durante 3 d a 4°C. Después de varios lavados, las secciones se incubaron con un anticuerpo frente a la IgG de conejo marcado con Cy3 (Amersham) diluido 1:1000 en TBSA-BSAT, durante 1 h a temperatura ambiente, y después se montaron en PBS:glicerol (1:1). Los controles negativos se realizaron reemplazando el correspondiente antisuero primario por el suero preinmune. Las secciones se analizaron con un microscopio láser confocal (Leica TCS SL).

3.16. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•])

3.16.1. Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) o resonancia de espín electrónico (RSE) es una técnica específica para radicales libres, ya que detecta la presencia de electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2000). Esta detección se realiza a través de trampa, que suele ser un compuesto que reacciona con el radical libre, originando otro compuesto radical más estable, y permitiendo, de esta manera, que se acumule en el medio en cantidad suficiente para poder ser detectado. Esta técnica ha sido utilizada para determinar la producción directa de NO[•] en sistemas biológicos (Kotake y col., 1996; Nagano y Yamaguchi, 2002). De hecho, la detección de NO[•] en cualquier material biológico mediante esta técnica se considera una clara evidencia de su presencia.

El NO[•] se detectó por EPR utilizando la trampa Fe(MGD)₂, según el método de Kotake y col. (1996) y modificado por Caro y Puntarulo (1999). El Fe(MGD)₂ reacciona con el NO[•] para formar un complejo estable, el NO-Fe(MGD)₂ (Fig. 3.7), que presenta un espectro característico de EPR. La trampa se preparó mezclando *N*-metil-D-glucamina ditiocarbamato (MGD) y FeSO₄ para originar una concentración final de 10 mM y 1 mM, respectivamente. Para la detección de NO[•], las muestras (peroxisomas de hojas recién aislados, homogenados de hojas de guisante y nNOS pura comercial), se

añadieron al medio de reacción que contenía L-arginina y todos los cofactores de la reacción de la NOS, además de la trampa $\text{Fe}(\text{MGD})_2$.

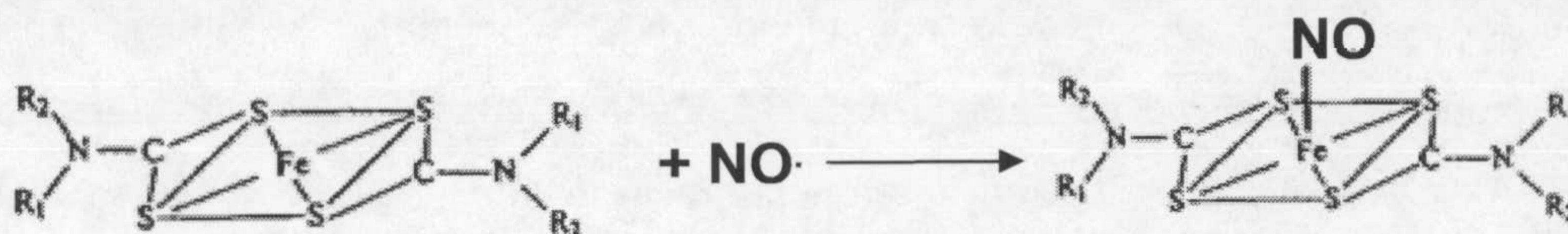


Fig. 3.7. Formación del complejo $\text{NO-Fe}(\text{MGD})_2$ para la detección de NO^\cdot en peroxisomas de hojas de guisante mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

La composición del medio de reacción fue la siguiente: HEPES 40 mM, pH 7,2, L-arginina 1 mM, NADPH 1 mM, CaCl_2 1,25 mM, FAD 10 μM , FMN 10 μM , BH_4 10 μM , calmodulina 10 $\mu\text{g/ml}$, MGD 10 mM y FeSO_4 1 mM. La reacción se incubó durante 1 h a 37°C, y después se depositaron en una célula plana de cuarzo de 2 mm de grosor y se introdujeron en la cavidad de resonancia del espectrómetro. El espectro de EPR se registró a temperatura ambiente usando un espectrómetro Bruker ESP 300 E EPR (Banda X = 9,5 a 10,0 GHz). Las condiciones de la EPR fueron las siguientes: 9,77 GHz de frecuencia, 100 mW de potencia, 50 kHz de campo de frecuencia modulada, 5,2 G de amplitud de modulación, 3410 G de campo de referencia, con un rango de barrido entre 3350 y 3470 G, y 81,92 ms como constante de tiempo.

Se utilizó nNOS (Calbiochem) como control positivo. En algunos casos, los peroxisomas se incubaron sin NADPH o en presencia de L-NAME 1 mM (inhibidor de la NOS animal). El espectro obtenido con la nNOS presentó la típica señal del complejo $\text{NO-Fe}(\text{MGD})_2$ ($g = 2,05$ y $a_N = 12,8$ G), descrito por Xia y col. (1997, 2000).

3.16.2. Fluorimetría

La segunda técnica utilizada para la detección de NO^\cdot en peroxisomas de hojas de guisante fue el análisis fluorimétrico utilizando el diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA) como fluoróforo. Se utilizaron peroxisomas recién aislados, a los cuales se les añadieron L-arginina y DAF-2 DA a una concentración final de 1 mM y 10 μM respectivamente, y se incubaron durante 2 h a 37°C en oscuridad. La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, con unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 485 y 515 nm, respectivamente (Nakatsubo y col., 1998). Se

realizaron los siguientes controles: i) sin L-arginina, ii) preincubados con aminoguanidina (inhibidor de la NOS) 2 mM, y iii) calentando previamente los peroxisomas a 95°C durante 10 min.

3.16.3. Quimioluminiscencia de ozono

Se empleó el equipo de Sievers, Nitric Oxide Analyzer (NOATM 280i) (Fig. 3.8). En esta técnica la determinación de NO[•] se basa en la medida de nitratos (NO₂⁻) y nitritos (NO₃⁻), que son los óxidos de nitrógeno estables resultantes de la reacción del NO[•] con el O₂ en medio acuoso. Los nitratos y nitritos generados de esta forma se reducen de nuevo a NO[•] en un medio ácido. Este NO[•] es arrastrado por una corriente de nitrógeno hasta una cámara donde reacciona con ozono (O₃), producido por una corriente de oxígeno ionizada, dando lugar a moléculas de NO₃⁻ inestables que emiten en la zona del infrarrojo (Braman y Hendrix, 1989). Esta emisión es detectada por un fotomultiplicador, que produce una señal eléctrica cuya intensidad es proporcional a la cantidad de NO[•] inicial de la muestra. La concentración de NO₃⁻ se determina gracias a un patrón interno de concentraciones de conocidas.

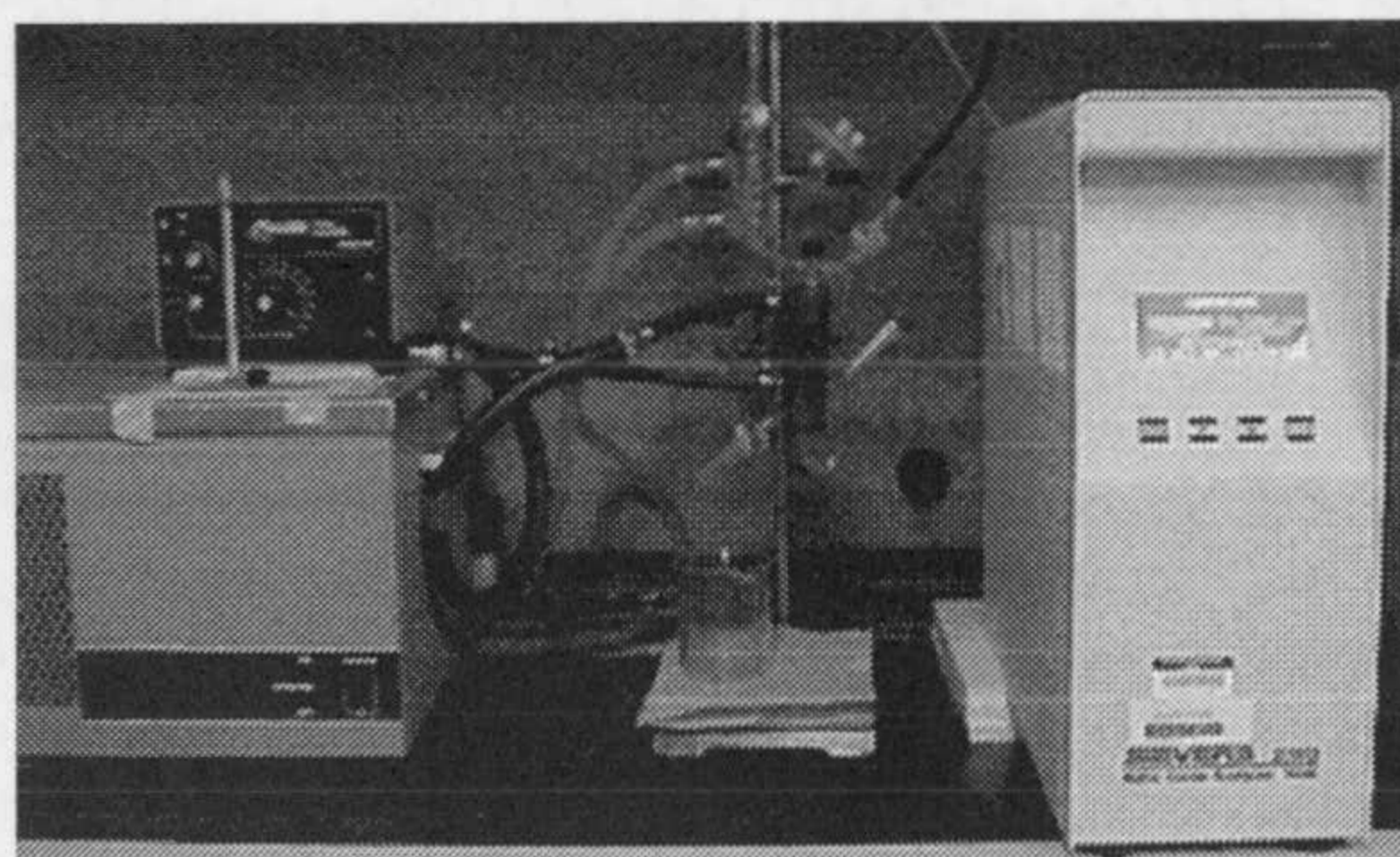


Fig. 3.8. Equipo de análisis de NO[•] por quimioluminiscencia de ozono, de Sievers, Nitric Oxide Analyzer (NOATM 280i).

Para determinar la producción de NO[•] en homogenados de guisante, los tejidos frescos se lavaron, pesaron y homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido, usando un tampón Hepes 40 mM, pH 7,2, conteniendo CHAPS 0,2 mM, FAD 10 μM, FMN 10 μM, BH₄ 10 μM, calmodulina 10 μg/ml y CaCl₂ 1,25 mM, con una relación peso:volumen de 1:4. Este homogenado se centrifugó a 36.000 g durante 20 min, a 4°C, y los sobrenadantes obtenidos se hicieron pasar por una columna NP-10 de Amersham, empleándose el tampón de homogenización. El eluido obtenido se usó para la determinación de NO[•]. En el caso de los peroxisomas aislados de los gradientes de sacarosa, los orgánulos se rompieron por choque osmótico en tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,2, Tween-20 0,05% (v/v), en una relación volumen:volumen de 1:3, durante 30

min a 4°C. Después, se centrifugaron a 120.000 g durante 30 min para eliminar las membranas.

La reacción se llevó a cabo en un tampón Hepes 40 mM, pH 7,2 al que se le añadieron los siguientes compuestos: CHAPS 0,2 mM, FAD 10 µM, FMN 10 µM, BH₄ 10 µM, calmodulina 10 µg/ml, CaCl₂ 1,25 mM y NADPH 1 mM en un volumen final de 500 µl. La reacción se inició añadiendo L-arginina 1 mM. Se tomaron alícuotas de 200 µl a tiempo cero y posteriormente a los 30 min, tras incubar la muestra a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de NaOH 0,8 N, y se precipitaron las proteínas con 100 µl de ZnSO₄ al 16% (p/v). Tras agitar vigorosamente, las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente para permitir la completa desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 16.000 g, y se inyectaron 40 µl del sobrenadante en la cámara de reacción del equipo a 90°C conteniendo cloruro de vanadio 50 mM preparado en HCl 1 M.

En algunos experimentos, las reacciones se llevaron a cabo en ausencia de L-arginina, NADPH, CaCl₂, calmodulina, BH₄, o bien muestras preincubadas en presencia de carboximetoxilamina (CM) 200 µM, aminoacetonitrilo (AAN) 0,01% (v/v) (ambos inhibidores de la proteína P del complejo glicina descarboxilasa), azida sódica 1 mM (inhibidor de la nitrato reductasa), EGTA 0,5 mM, y el anticuerpo frente a la iNOS (dilución 1:500) de ratón (Barroso y col.,1999).

La producción de NO[•] se calculó restando el valor obtenido a tiempo cero al determinado a los 30 min de reacción, y la actividad se expresó como nmoles de NO[•] · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

3.17. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ARN Y ADN PLASMÍDICO)

3.17.1. Aislamiento y cuantificación de ARN

El aislamiento de ARN total se llevó a cabo utilizando el reactivo comercial Trizol[®] (GIBCOBRL, Life Technologies), compuesto de una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las hojas de guisante se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido, pesándose el polvo obtenido y añadiendo inmediatamente el Trizol (1 ml por cada 100 mg de tejido). Después de incubarse durante 5 min a temperatura ambiente, se le añadió cloroformo (0,2 ml por ml de Trizol utilizado) y se agitó vigorosamente durante 15 s, volviéndose a incubar durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C y

se obtuvieron dos fases, una inferior, de fenol-cloroformo, y otra acuosa, superior, donde quedó el ARN. Esta fase acuosa se recuperó y se le añadió isopropanol puro (0,5 ml por cada ml de Trizol), incubándose durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se obtuvo el precipitado de ARN centrifugando a 12.000 g durante 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75% (v/v), y se centrifugó a 7.500 g durante 5 min. Finalmente, se dejó secar el precipitado durante unos minutos a temperatura ambiente, y se resuspendió en agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) al 0,1% (v/v).

La cuantificación del ARN obtenido se realizó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello, el ARN se diluyó en agua tratada con DEPC, y se realizó un barrido de absorbancia entre 200 y 300 nm para determinar, asimismo, la posible contaminación de proteínas, que absorben a 280 nm, debiendo estar la relación entre las absorbancias A_{260}/A_{280} comprendida entre 1,8 y 2. Para la cuantificación, se asumió que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN.

3.17.2. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y ligación de fragmentos de ADN en vectores de clonación

Para recuperar los fragmentos de ADN de los geles de agarosa, se utilizó el método comercial "Qiaex II" de Qiagen (Fig. 3.9). Se siguieron las instrucciones del fabricante.



Fig. 3.9. Extracción y purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa utilizando partículas QUIAEX II, del método de la casa comercial QIAGEN.

Las bandas de gel extraídas se solubilizaron a 50°C incubando con un tampón de solubilización Tris-acetato/borato, con EDTA, y con resina de sílice óptimo para la unión de ADN, lo cual ocurre a altas concentraciones salinas. Después, se centrifugó para recuperar las partículas de sílice, y se realizaron varios lavados del precipitado para eliminar los restos de agarosa y sales contaminantes. Finalmente, el ADN se eluyó con H_2O .

Tras la purificación de los fragmentos de ADN, estos se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy, de Promega, usando el siguiente protocolo: 50 ng del plásmido, 3 U de la enzima T4 DNA ligasa y tampón 1x de la enzima, en un volumen final de 10 µl de mezcla de reacción, e incubándose a temperatura ambiente durante 1 h. La cantidad de fragmento de ADN usado para la ligación se determinó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng de vector} \cdot \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{ratio molar inserto : vector} = \text{ng inserto}$$

utilizando una proporción molar inserto:vector comprendida entre 3:1 y 1:3.

3.17.3. Preparación de células competentes, transformación y aislamiento de plásmidos recombinantes

3.17.3.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

El método utilizado fue el descrito por Hanahan (1983). Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5α en 5 ml de medio LB 1x [Luria-Bertani:Triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7,0] a 37°C durante 12-15 h. Se inoculó 4 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB suplementado con MgSO₄ 10 mM. Se incubó a 37 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4-0,6, y entonces se detuvo el crecimiento del cultivo colocándolo en hielo durante 15 min. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 4.300 g, durante 10 min, a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 32 ml de una solución compuesta por RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10,2 mM, acetato potásico 30 mM y glicerol 12% (p/v), pH 5,8, preenfriada a 4°C, e incubándose en hielo durante 15 min. Se volvió a centrifugar a 4.300 g durante 10 min a 4°C, y el precipitado se resuspendió en otra solución compuesta por CAPS 100 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 12% (v/v), pH 6,8, preenfriada también a 4 °C. Se hicieron alícuotas de las bacterias y se guardaron a -80°C.

3.17.3.2. Transformación de bacterias competentes

Se usó el método descrito por Lucotte y Baneyx (1993). Las bacterias *E. coli* DH5α, mantenidas a -80°C, se descongelaron en hielo, tras lo cual se añadieron 50-100 ng de los plásmidos de interés, y se mantuvieron durante 30 min en hielo. Posteriormente, se calentaron a 42°C durante 90 s, colocándose de nuevo en hielo durante 5 min. A esta

mezcla se le adicionaron 0,5 ml de medio LB 1x y se incubó a 37°C durante 1 h, con agitación. La suspensión de bacterias se sembró en placas de Petri conteniendo un medio comercial (S-GALTM/LB Agar Blend, Sigma) compuesto por LB 1x, agar 1,2% (p/v), S-GalTM (3,4-ciclohexenoesculetina-β-D-galactopiranosido) 0,03% (p/v), citrato de amonio férrico 0,05% (p/v) e IPTG (1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0,003% (p/v), suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

3.17.3.3. Aislamiento de plásmido recombinantes

Se seleccionaron las colonias individuales crecidas en las placas a partir de las cuales se iniciaron cultivos en 3 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml), que se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 190 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6 (12-16 h), se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min para precipitar las bacterias, y se procedió a la extracción del ADN plasmídico utilizando el método comercial “Wizard Plus SV Miniprep” de Promega (Fig. 3.10).

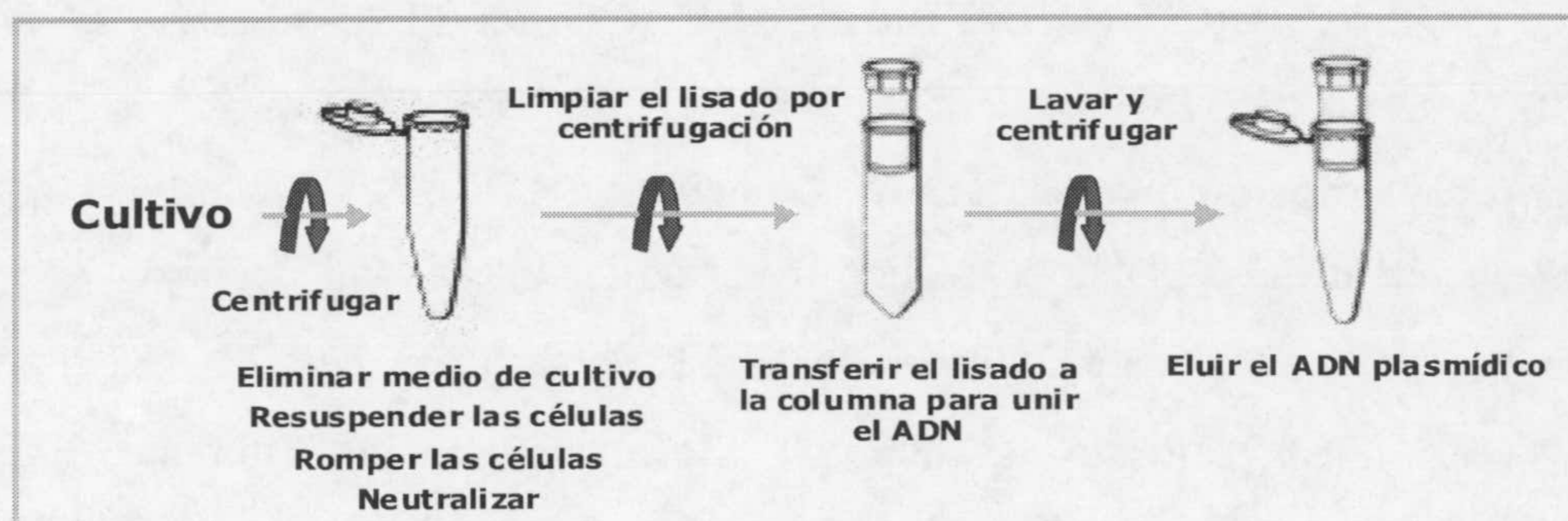


Fig. 3.10. Aislamiento de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos, según el método de la casa comercial Promega.

Todas las operaciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 250 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, RNasa A 100 µg/ml. Después, se les añadió 250 µl de solución de lisis [NaOH 0,2 M y SDS 1% (p/v)] y se incubaron durante 1-5 min. Seguidamente, se le añadió 10 µl de una solución de proteasas, incubándose durante 5 min, tras los cuales, se le añadió 350 µl de solución de neutralización (acetato potásico 0,759 M, guanidina-HCl 4,09 M y ácido acético glacial 2,12 M, pH 4,2). Esta mezcla se centrifugó a 14.000 g durante 10 min, y el sobrenadante se pasó por la columna especificada en el método comercial, de forma que

el ADN quedó fijado a la resina de la misma. Se centrifugó a 14.000 g durante 1 min, y posteriormente se le añadieron 750 μ l de una solución de lavado [acetato potásico 60 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, etanol 60% (v/v)], volviéndose de nuevo a centrifugar a 14.000 g durante 1 min. Se volvió a lavar de nuevo la columna con 250 μ l de solución de lavado, y se centrifugó durante 2 min en las mismas condiciones anteriores. Finalmente, el ADN se eluyó de la columna añadiendo 100 μ l de agua a la misma y centrifugando a 14.000 g durante 1 min.

3.17.3.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Para comprobar la presencia de los distintos insertos en el vector de clonación, se llevó a cabo la digestión de los mismos utilizando aproximadamente 1 U de las respectivas enzimas de restricción por 1 μ g de ADN plasmídico, en el tampón 1x correspondiente a cada enzima. La digestión se incubó a 37°C durante al menos 1 h, y la comprobación se realizó en geles de agarosa del 0,8-1,2% (p/v) en TBE 0,5-1x.

3.18. TRANSCRIPCIÓN INVERSA, REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR), DISEÑO Y SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

3.18.1. Transcripción inversa para la obtención de ADNc

La obtención de los ADNc se realizó a partir del ARN total de hojas de guisante obtenido según se explica en el apartado 3.17.1. Se partió de 2 μ g de ARN total, a los que se les añadió 1,6 μ g de oligo-dT. Se incubó a 70°C durante 10 min, y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: dNTPs 1,5 mM, 0,03 U/ μ l de RNasinTM (inhibidor de RNasas, Finnzymes), tampón de la enzima 1x, y 0,65 U/ μ l de transcriptasa inversa (AMV Reverse Transcriptase, Finnzymes), en un volumen final de 30 μ l. La reacción se llevó a cabo incubando sucesivamente durante 40 min a 42°C, 5 min a 98°C, y otros 10 min a 4°C. La cuantificación de los ADNc se realizó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 260 nm. Para ello, el ADN se diluyó en agua, y se realizó un barrido de absorbancia entre 200 y 300 nm para determinar la relación entre las absorbancias A_{260}/A_{280} , indicativo de la pureza del ADN cuando esta relación está entre 1,7 y 1,9. Para la cuantificación, se asumió que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g/ml de ADN.

3.18.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador PCR Express, de Hybaid. Se realizó a partir de los ADNc obtenidos por transcripción inversa, así como de los plásmidos para confirmar la clonación de los distintos fragmentos. La mezcla de reacción fue la siguiente: 25-50 ng de cDNA ó de plásmido, dNTPs 0,25 mM, tampón 1x de la enzima con MgCl₂ 1,5 mM, 0,125 U/μl de enzima ADN polimerasa (Ampli Taq Gold[®], Roche), y 0,25-0,5 μM de cada cebador, en un volumen final de 20 μl.

3.18.3. Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la obtención del ADNc de la NOS y de la xantina deshidrogenasa

Para intentar abordar la clonación de la NOS de guisante, se realizó un estudio para identificar secuencias en plantas que presentaran cierto grado de identidad con alguna de las tres regiones reconocidas por los tres anticuerpos de que disponíamos frente a la iNOS [anticuerpo frente a los 14 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal (aminácidos 1131-1144), anticuerpo frente a la región de unión del FAD (aminoácidos 772-787) y anticuerpo frente a la región de unión de NADPH (aminácidos 961-1144)], utilizando el programa BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Además, se realizó un análisis por BLAST de estas tres secuencias enfrentandolas a la base de datos de *Arabidopsis thaliana*, disponible en www.arabidopsis.org.

También se realizó un alineamiento entre distintas secuencias proteicas de iNOS para localizar zonas conservadas interespecíficamente, y diseñar oligonucleótidos degenerados a partir de esas zonas. Las secuencias utilizadas para el alineamiento fueron las iNOS de ratón, rata, humana, pony, cerdo, pollo, carpa y trucha. Se localizaron varias zonas conservadas, y los oligonucleótidos diseñados fueron los siguientes: 1FNOS: 5'-ATGGC(A,G,C,T)TG(CT)CC(AGCT)TGGAA-3'; 4RNOS: 5'-CC(G,A)AA(A,G,T)AT(G,A)TC(T,C)TC(G,A)TG-3'; FNO15'-CC(Y)GT(B)TTCCA(Y)CAGA TG-3'; y, RNO1 (R)AAGGC(R)CA(R)AA(S)TG(R) GGGTA-3' donde Y=C/T; B=C/G/T; R= A/G; C/T. Optamos por seguir la estrategia de *touch-down*, que se suele emplear cuando los cebadores son degenerados y se desconoce la temperatura de unión al ADN. Esta técnica consiste en que, en los primeros ciclos de la PCR, la temperatura de atemperamiento utilizada es la máxima de todas las calculadas para los distintos cebadores, favoreciendo que se unan a zonas de ADN de un alto grado de complementariedad. Se va disminuyendo progresivamente la temperatura dos grados en los ciclos posteriores consiguiéndose realizar un barrido de todas las posibles

Los cebadores diseñados fueron los siguientes: FXDH1, 5'-CTAATTTTCCTAG CAACACTGC-3' y RXDH1, 5'-CAATCCTGACCCATCTCC-3'

Luego de las amplificaciones específicas de los fragmentos y de la electroforesis de los productos de la PCR se obtuvo una única banda a partir de ADNc de hojas de guisante, la cual se purificó del gel de agarosa, se clonó y secuenció. Se obtuvo una secuencia de 418 pb, que compartía una alta homología con la xantina deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* en las zonas próximas a los cebadores. A partir de esta secuencia, se diseñaron una pareja de cebadores específicos para guisante, que fueron los siguientes: FXDH2_{pea}, 5'-CACCTGCCTGGTTCATAAGC-3' y RXDH2_{pea}, 5'-TTGAGCACTGCCCTCTATCC-3'.

Con estos cebadores, se obtuvo una única banda a partir de ADNc de hojas de guisante, que también se purificó del gel de agarosa, se clonó y secuenció. Se obtuvo un fragmento de 180 pares de bases que estaba contenido en el fragmento de 418 pares de bases inicialmente secuenciado. Estos cebadores fueron los utilizados para los posteriores análisis de expresión mediante PCR semicuantitativa.

3.18.4. Estudio de expresión mediante PCR semicuantitativa

Para el estudio de la expresión de los ARNm de la enzima xantina deshidrogenasa en hojas de plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos (como se indica en el apartado 1), se utilizó la técnica de PCR semicuantitativa. Esta técnica permite comparar la cantidad de un ARNm determinado entre muestras distintas, ya que si la reacción de PCR se detiene en aquella zona en la que la cantidad de ADN amplificado aún se encuentra en zona exponencial, la intensidad de las bandas amplificadas es proporcional a la cantidad inicial del ADNc en la muestra. Además es imprescindible el uso de un gen control (en nuestro caso, hemos utilizado la actina II), cuya expresión sea constitutiva y que no varíe entre las distintas situaciones, para poder normalizar la intensidad de las bandas con respecto a este control interno, y minimizar de esta forma el error experimental.

Una vez obtenidos los ADNc de las distintas plántulas, se midió su concentración y se hicieron diluciones de los mismos de forma que en todos ellos se dispusiera de la misma concentración inicial de ADNc total. Se puso a punto el número de ciclos en los cuales la cantidad de ADN amplificado por la polimerasa se encontrara en fase exponencial, que fueron de 28 para la actina y de 32 para la xantina. Para asegurarnos que todos los tubos de reacción contenían la misma cantidad de reactivos, y

así partir de las mismas condiciones en cada uno de ellos, el procedimiento experimental fue el siguiente: Se realizó una mezcla que contenía todos los reactivos menos los ADNc y los cebadores. De esta forma nos aseguramos de que en todos los tubos se partía de la misma cantidad de enzima. Seguidamente, esta mezcla se repartió en los volúmenes necesarios para dos reacciones de PCR, y entonces a cada tubo se le añadieron 60 ng del correspondiente ADNc, distribuyéndose este volumen, a su vez, en otros dos tubos. Así, se asegura que en cada tubo se parte de la misma cantidad de ADNc. Una vez repartidos, a cada tubo se le añadieron sus cebadores correspondientes, bien los de la xantina o bien los de la actina.

Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente forma: 30 ng de ADNc, dNTPs 0,25 mM, tampón de la enzima 1x con MgCl₂ 1,5 mM, 0,02 U/μl de enzima polimerasa (Ampli-Taq Gold[®], Roche) y 0,3 μM de cada cebador, en un volumen final de reacción de 20 μl. El programa de PCR utilizado se detalla en la Tabla 3.3. Los tubos

1) 95°C, 10 min	} x 28
2) 95°C, 20 seg	
61°C, 20 seg	
72°C, 45 seg	
3) 4°C, 2 min	} x 4
4) 94°C, 20 seg	
61°C, 20 seg	
72°C, 45 seg	
5) 72°C, 10 min	

correspondientes a la actina se retiraron durante la etapa número tres del programa de PCR. Los fragmentos obtenidos de cada PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8-1% en tampón TBE 0,5-1x.

Tabla 3.3. Programa de PCR utilizado en el análisis por PCR semicuantitativa de la expresión de la enzima xantina deshidrogenasa (XDH) de hojas de plantas de guisante sometidas a distintos tratamientos. Los 28 primeros ciclos se utilizaron para el gen control, actina I, y 32 en total para la xantina deshidrogenasa.

3.19. TRANSFERENCIA DE NORTHERN Y DETECCIÓN MEDIANTE SONDAS MARCADAS CON ³²P

3.19.1. Transferencia de Northern

Se utilizó el método descrito por Thomas (1980), con algunas modificaciones. Se prepararon geles al 1,5% (p/v) de agarosa en agua tratada con DEPC. Al enfriarse la solución de agarosa, se añadió formaldehído al 1,6% (p/v) y tampón MEN (Mops 20 mM, pH 7,0, acetato sódico 5 mM, EDTA 2mM). Se utilizaron 10 μg de ARN total, que se prepararon en tampón MEN, formamida 33% (v/v) y formaldehído 10% (v/v). Posteriormente, se adicionó 0,1 volúmenes de tampón de carga compuesto por glicerol

10% (v/v), EDTA 0,1 mM, pH 8,0, azul de bromofenol 0,025% (p/v) y xilenocianol 0,025% (p/v), y se mantuvo en hielo. Finalmente, las muestras se calentaron durante 10 min a 65°C justo antes de cargar en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MEN, a 30 V, durante aproximadamente 6 h.

Terminada la electroforesis, se procedió a la transferencia del ARN a una membrana de nylon (Zeta-Probe[®] Blotting Membranes, Bio-Rad), a través de un proceso de capilaridad, siguiendo básicamente las instrucciones del fabricante. El gel se equilibró en SSC 10x (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M, pH 7,0), y se colocó sobre un puente de 4 papeles de filtro (Whatman 3MM), los cuales se sumergieron por sus extremos en la solución de SSC 10x. La membrana, previamente empapada con agua destilada, se colocó sobre el gel, y encima de ella otros 2 papeles de filtro de igual tamaño que la membrana, así como una pila de papel absorbente (Fig. 3.12). La transferencia se dejó transcurrir unas 15 h, tras las cuales, la membrana se enjuagó brevemente con SSC 2x y se fijó el ARN a la membrana con una bomba de vacío durante 30 min a 80 °C. La membrana se tiñó con una solución de azul de metileno al 0,04% (p/v) preparada en acetato sódico 0,3 M, pH 5,6. Simultáneamente, el gel se tiñó con bromuro de etidio 0,025% (p/v) durante 15 min para comprobar la eficacia de la transferencia.

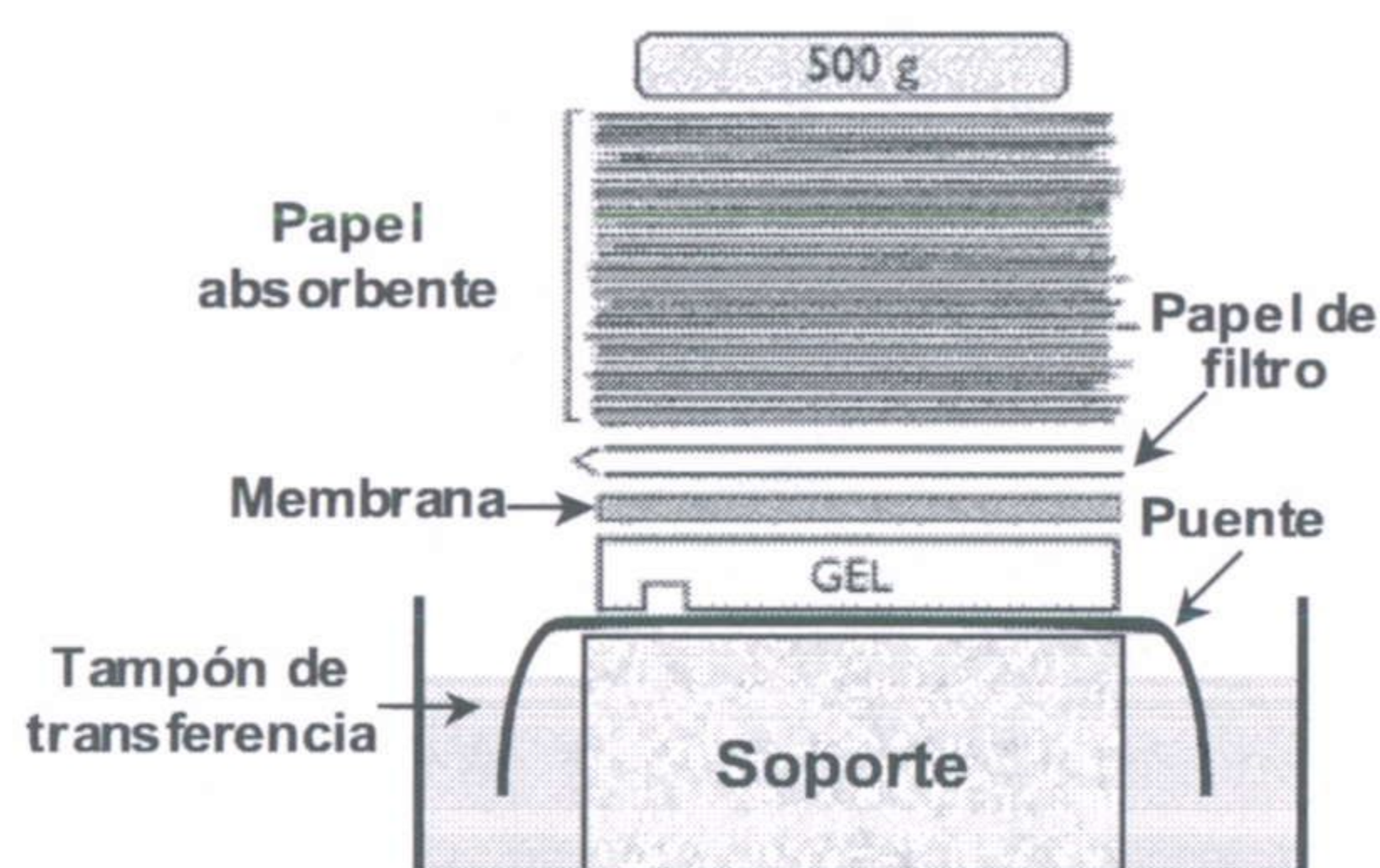


Fig. 3.12. Esquema de la transferencia de Northern.

3.19.2. Detección mediante sondas marcadas con ³²P

La sonda utilizada para la detección de ARNm fue el fragmento de 410 pb de la xantina deshidrogenasa obtenido a partir de ADNc mediante PCR con los oligos FXDH1 y RXDH1 tal y como se indica en el apartado 3.18.3. La sonda se marcó usando un método comercial: Rediprime[™] II (Amersham Biosciences). Se utilizaron 25 ng de sonda, preparada en 45 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), que se desnaturalizó a 95°C durante 5 min y posteriormente se mantuvo en hielo otros 5

min. Esta mezcla se añadió al tubo de reacción suministrado por la casa comercial (que contiene la enzima Klenow polimerasa y todos los desoxinucleótidos, excepto la citosina) junto con 5 µl de [³²P]dCTP (50 µCi, 3.000 Ci/mmol), y se incubaron durante 1 h a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 5 µl de EDTA 0,2 M. Los desoxirribonucleótidos no incorporados a la sonda se eliminaron utilizando unas columnas de filtración por gel de Boehringer (“Mini Quick Spin Columns”). La sonda, una vez marcada, se volvió a desnaturalizar a 95°C durante 5 minutos, y después se colocó en hielo hasta que se añadió al tampón de hibridación.

Para la hibridación de las membranas se siguió básicamente el protocolo sugerido por el fabricante. Primero, las membranas se prehibridaron a 65°C durante 5 minutos con 20-25 ml de la solución de hibridación [Na₂HPO₄ 0,5 M, pH 7,2, EDTA 1mM y SDS al 7%(p/v)]. Después, se sustituyó esta solución por otros 15 ml que contenía los 50 µl de sonda marcada radiactivamente. Se incubaron en el horno de hibridación a 65°C durante unas 12 h. Pasado este tiempo, se procedió a los lavados de las membranas, realizándose todos a 65°C: 2 lavados de 30 min cada uno con una solución conteniendo Na₂HPO₄ 40 mM, pH 7,2, EDTA 1 mM, y SDS 5% (p/v), seguidos de otros 2 lavados también de 30 min cada uno en una solución similar a la anterior, pero conteniendo SDS 1% (p/v). Para detectar las señales de hibridación, se usó un “Fospor-Imager” “Personal Molecular Imager FX” (Bio-Rad).

Resultados

4.1. PRODUCCIÓN DE NO \cdot EN EXTRACTOS DE PLÁNTULAS DE GUISANTE

4.1.1. Producción de NO \cdot durante el desarrollo postgerminativo de las plántulas

Para determinar el posible papel regulador del NO \cdot en los distintos órganos de plantas de guisante durante el desarrollo post-germinativo (Fig. 4.1, panel A), se midió la producción de NO \cdot a partir de L-arginina, mediante quimioluminiscencia de ozono, en extractos de raíces, tallos y hojas de plántulas de guisante durante los días posteriores a la germinación (Fig. 4.1, panel B). En raíces, se observó una disminución gradual de la producción de NO \cdot durante el crecimiento de las plántulas, mientras que, en hojas, no se produjeron variaciones significativas entre las muestras correspondientes a los días analizados. En tallos, la mayor producción de NO \cdot se detectó a los 7 y 9 días tras la germinación. En particular, los niveles de NO \cdot detectados en los tallos de 7-9 días fueron los mayores observados de los tres órganos analizados, y eran del orden de 11 veces superiores a los medidos en raíces y hojas. En todos los días analizados las hojas presentaban los niveles más bajos de producción de NO \cdot .

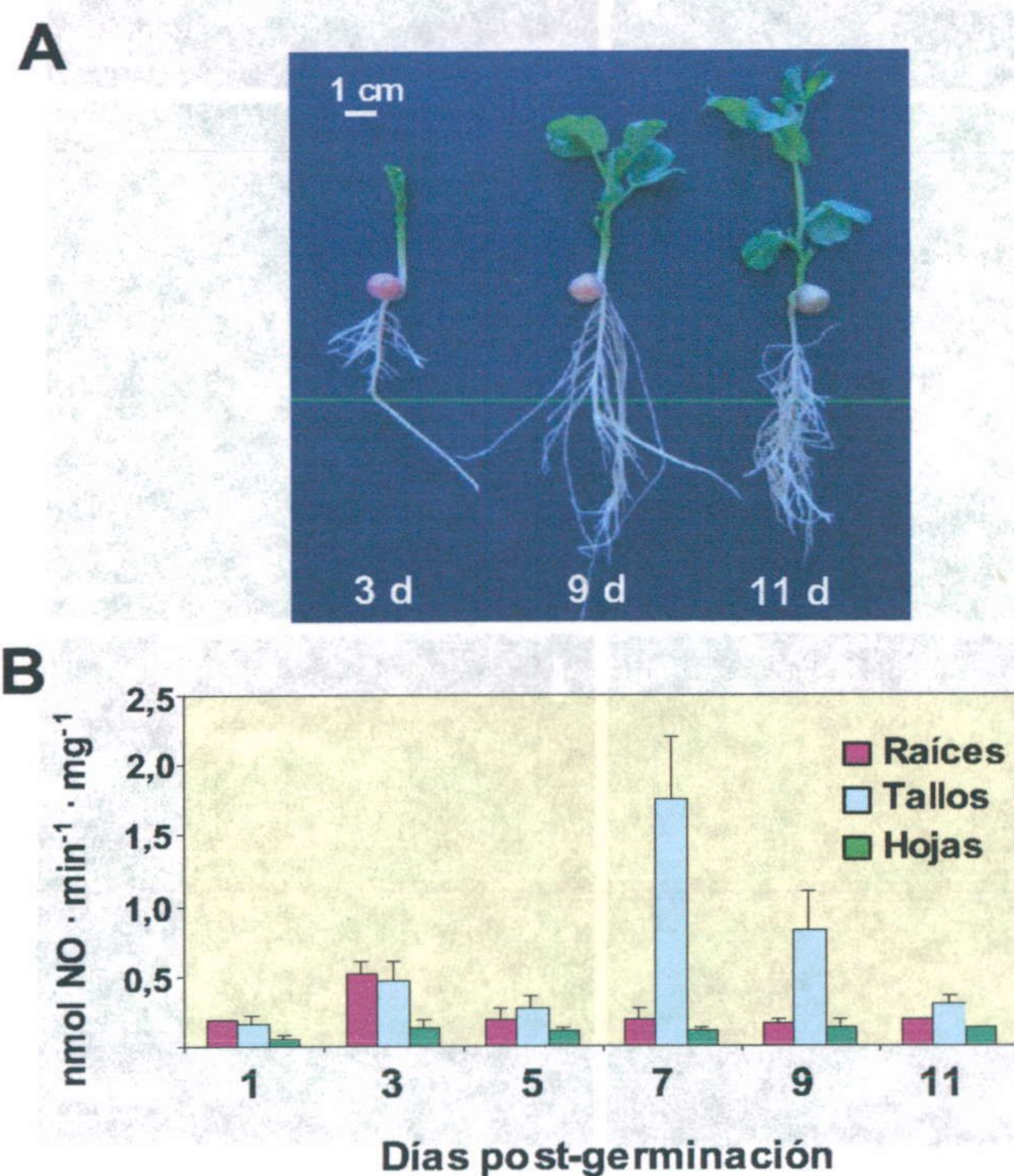


Fig. 4.1.
A. Fotos representativas de la apariencia de plántulas de guisante de 3, 9 y 11 días.
B. Análisis de la producción de NO \cdot a partir de L-arginina por quimioluminiscencia de ozono en raíces, tallos y hojas de plántulas de guisante de distinta edad. Los resultados son media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes.

Con el objetivo de obtener una mayor información sobre la localización celular del NO \cdot detectado mediante quimioluminiscencia de ozono, se hizo un estudio mediante microscopía láser confocal con el fluoróforo DAF-2 DA en secciones transversales de

los principales órganos de la planta, raíz, tallo y hoja, en plántulas de 3, 7 y 11 días (Fig. 4.2). En cortes transversales de la raíz primaria (Fig. 4.2, paneles A a C), se pudo observar un patrón radial correspondiente a la epidermis, el cortex y el tejido vascular. La fluorescencia verde correspondiente a $\text{NO}\cdot$, se observa con mayor intensidad en las células de la epidermis y el tejido vascular (xilema). En el caso de secciones transversales de tallo, se presenta la parte central del mismo (paneles D a F) en los que se observó un verde intenso en el tejido vascular, principalmente xilema, endodermo y epidermis. En cuanto a las secciones transversales de hojas (paneles G a I) se observó un aumento de la intensidad del verde en cortes de 3 a 11 días. Además, la fluorescencia verde se localizaba principalmente en epidermis y tejido vascular.

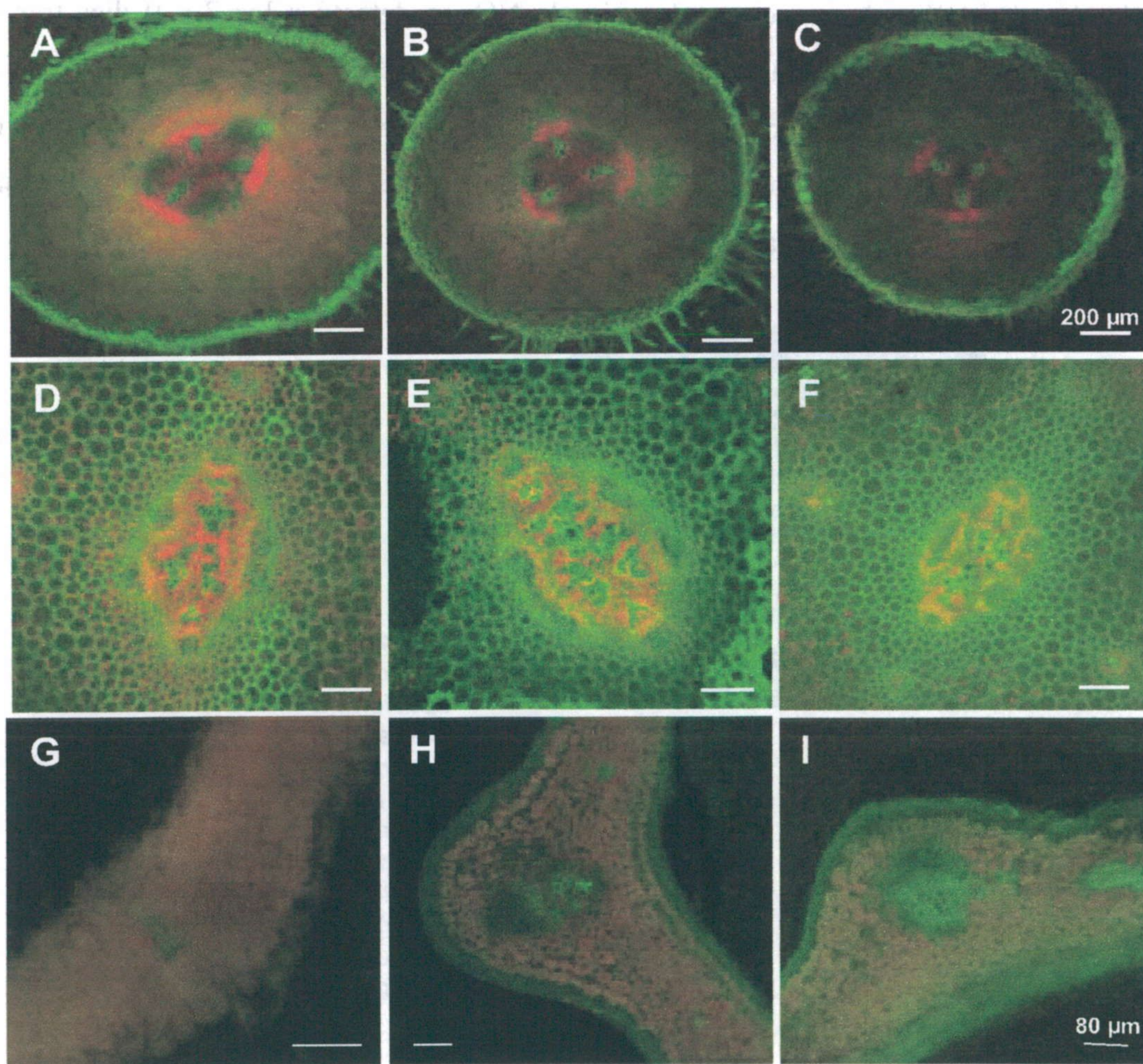


Fig. 4.2. Localización del $\text{NO}\cdot$ en secciones transversales de raíces, tallos y hojas de plántulas de guisantes de 3, 7 y 11 días después de la germinación. Paneles A a C, secciones transversales de raíces de 3, 7 y 11 días. Paneles D a F, secciones de tallos de 3, 7 y 11 días. Paneles G a I, secciones de hojas de 3, 7 y 11 días. En todos los casos las imágenes son reconstrucciones tridimensionales realizadas partir de 50 secciones tomadas y analizadas por microscopio láser confocal. La fluorescencia verde brillante corresponde a $\text{NO}\cdot$ y la de color naranja-amarillo a la autofluorescencia. Las barras de los paneles A a F son de 200 μm y la de G a I de 80 μm .

4.1.2. Producción de $\text{NO}\cdot$ en plántulas sometidas a distintos tratamientos

Plántulas de guisante, de aproximadamente 14 días, se sometieron a varios tipos de tratamientos, tal y como se indica en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. Para establecer cómo afectaban estos tratamientos al metabolismo de las plantas, se determinó en estos extractos la actividad de las enzimas de la fotorrespiración glicolato oxidasa (GOX) e hidroxipiruvato reductasa (HPR), así como de la catalasa (CAT), enzima del metabolismo de ROS. Mientras que la HPR, enzima del final de la ruta de la fotorrespiración, apenas sufría modificaciones por los tratamientos, la GOX, que actúa al principio de la ruta, aumentaba por frío y oscuridad y disminuía sobre todo por el choque de calor y por alta intensidad lumínica. Se determinó, asimismo, la producción de $\text{NO}\cdot$ a partir de L-arginina mediante quimioluminiscencia de ozono, con el fin de dilucidar el posible papel del $\text{NO}\cdot$ en la respuesta de las hojas de la planta frente a estos tratamientos. Se detectó un aumento significativo en las hojas de las plántulas sometidas a tratamiento de calor y a alta intensidad lumínica (Fig. 4.2) mientras que en las sometidas a tratamiento de frío y daño mecánico, la producción de $\text{NO}\cdot$ disminuyó considerablemente. No hubo cambios en las sometidas a tratamiento de luz y oscuridad continua.

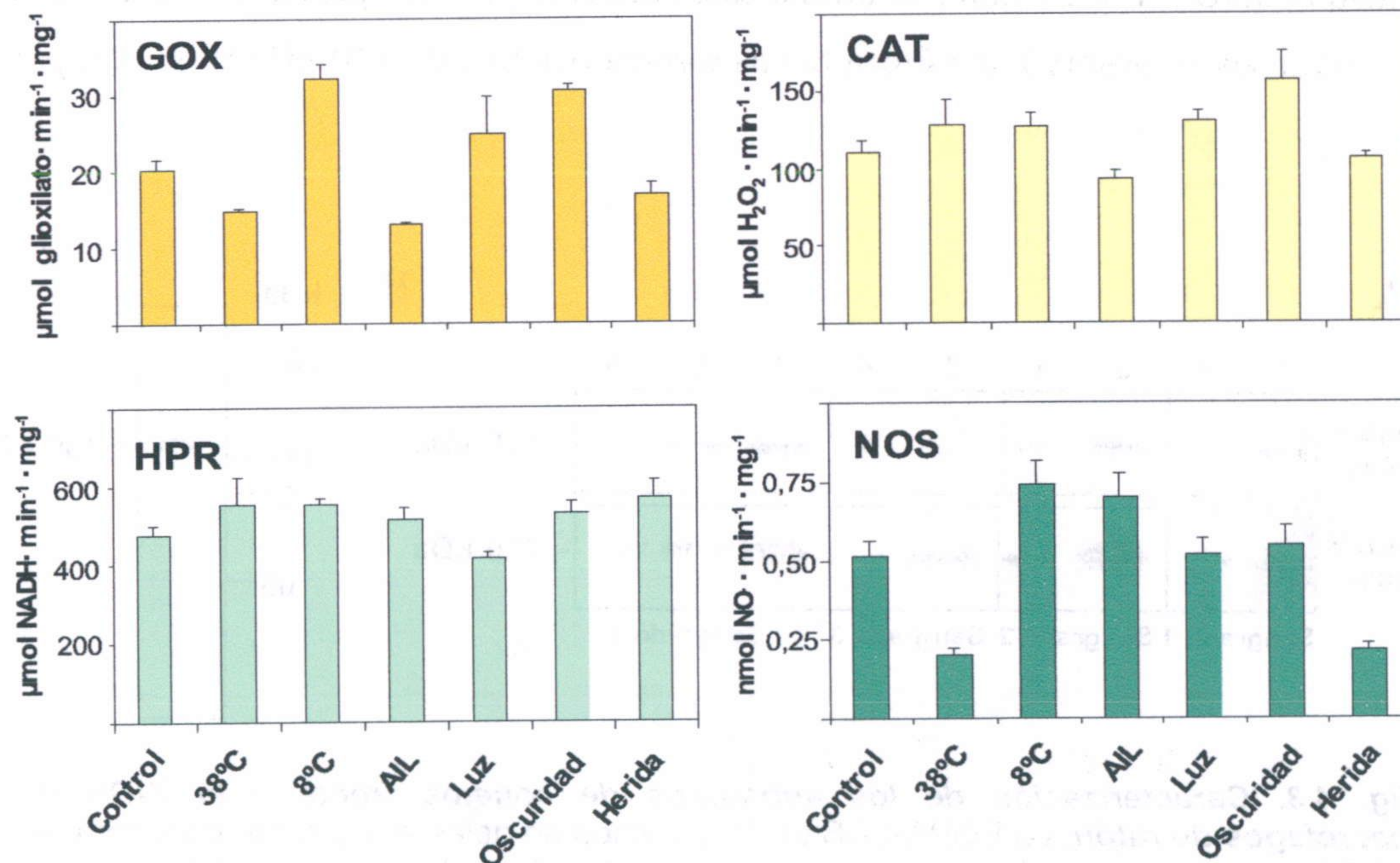


Fig. 4.2. Efecto de diferentes tratamientos sobre las actividades enzimáticas de la glicolato oxidasa (GOX), hidroxipiruvato reductasa (HPR), catalasa (CAT) y óxido nítrico sintasas (NOS) de hojas de guisante. Los tratamientos fueron los siguientes: 38°C: 38°C durante 4 horas; 8°C: 8°C durante 48 horas; AIL: alta intensidad lumínica durante 4 horas, $1180 \text{ mE s}^{-1} \text{ m}^{-2}$; Luz: luz continua durante 48 horas; Oscuridad: oscuridad continua durante 48 horas; Herida: herida a las hojas por pinzamiento y recogida de las mismas 4 horas después.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO FRENTE A LA iNOS DE MACRÓFAGOS DE RATÓN

Una vez comprobada la producción endógena de NO \cdot en los distintos tejidos de guisante, se planteó identificar el sistema enzimático generador de NO \cdot , para lo cual se optó por la posibilidad de que fuera una NOS homóloga a las ya descritas en células humanas. Para ello, se preparó un antisuero frente al péptido PT387, correspondiente a los últimos catorce aminoácidos (residuos 1131 a 1144) del extremo carboxilo terminal de la secuencia deducida de la iNOS de macrófagos de ratón (Uttenthal y col., 1998). Este antisuero nos permitiría detectar la presencia de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en los distintos tejidos de guisante por electroforesis en geles de poliacrilamida y localizar su ubicación subcelular mediante microscopía electrónica, así como purificar dichas proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Se determinó la reactividad de los cuatro sangrados obtenidos de cada uno de los conejos mediante EGPA-SDS con 20, 10 y 5 ng de la iNOS de macrófagos de ratón (Cayman), y posterior transferencia e inmunodetección (Fig. 4.3). El antisuero del conejo número 1009 mostró una reactividad ligeramente mayor que la del número 1008, ya que proporcionó una banda más intensa en la inmunodetección con la misma cantidad de iNOS. Por lo tanto, se utilizó este antisuero para los posteriores análisis. En todos los casos se observó una única banda inmunoreactiva de 130 kDa (Fig. 4.3, panel B)

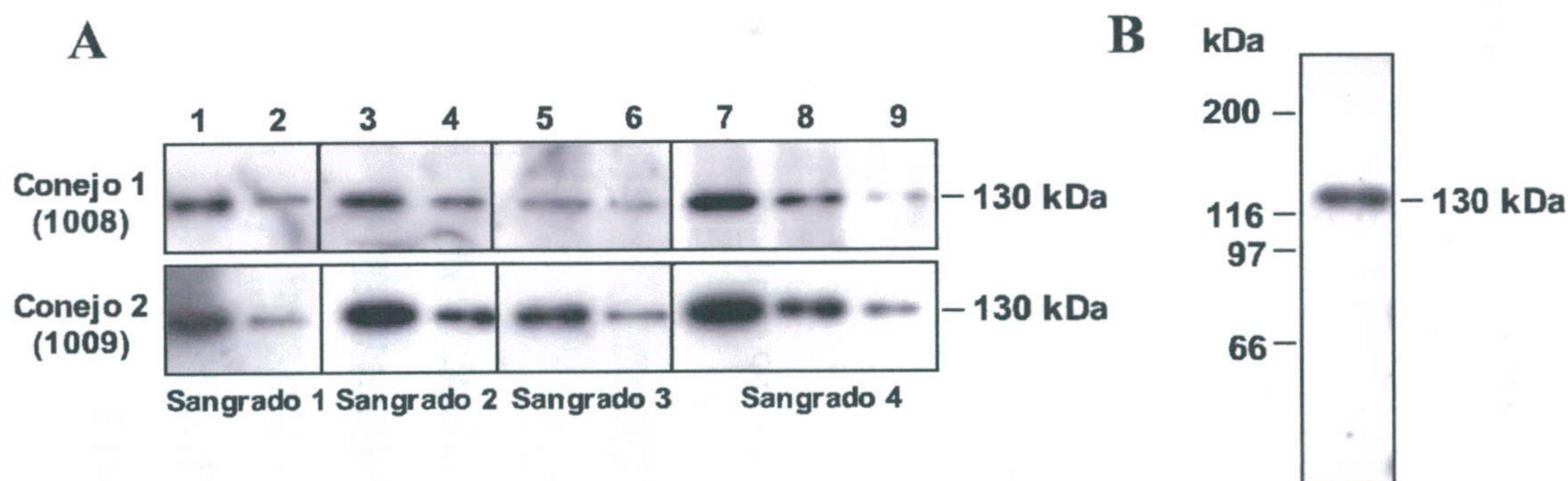


Fig. 4.3. Caracterización de los antisueros de conejos frente a la iNOS de macrófagos de ratón. La EGPA-SDS se llevó a cabo en geles al 7,5% de acrilamida. **A**, iNOS incubada con los distintos sangrados obtenidos de ambos conejos utilizando una dilución 1/500. En ambos casos se utilizó una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario (anti-IgG). Líneas 1, 3, 5, 7: 20 ng iNOS; Líneas 2, 4, 6 y 8: 10 ng; Línea 9: 5 ng. **B**, 10 ng de iNOS incubados con el sangrado nº 3 del conejo 2 (1/500), donde se muestra una única banda con un tamaño de 130 kDa, correspondiente al descrito para la subunidad de la iNOS.

4.3. CARACTERIZACIÓN DEL ANTISUERO FRENTE A DISTINTOS ÓRGANOS DE GUISANTE

Con el fin de caracterizar la inmunorreactividad del antisuero obtenido en el material de estudio en esta Memoria Doctoral, se analizaron extractos de diferentes órganos de plantas de guisante y de nódulos jóvenes y senescentes por EGPA-SDS y posterior transferencia e inmunodetección con el antisuero frente a la iNOS, indicado en el apartado anterior.

En todos los órganos, excepto en raíz, se detectaron dos bandas inmunorreactivas de aproximadamente 69 y 130 kDa (Fig. 4.4A). La banda de 69 kDa de tallos, semillas y vainas de frutos fue más abundante que la obtenida en hojas, y fue especialmente intensa en nódulos, tanto jóvenes como senescentes. La banda de 130 kDa sólo se detectó de manera clara en semillas, vainas y nódulos, y, en estas condiciones de revelado, no fue visible en raíces, tallos y hojas.

Se analizó asimismo la inmunorreactividad frente al anticuerpo de la iNOS de distintas partes de la flor de guisante (Fig 4.4B). Al igual que se observó en los órganos no reproductores, tanto en pétalos como ovarios y cáliz, se obtuvo una banda principal inmunorreactiva de 69 kDa. En ovarios, además, se hizo patente una banda de 87 minoritaria y otra de 45 kDa.

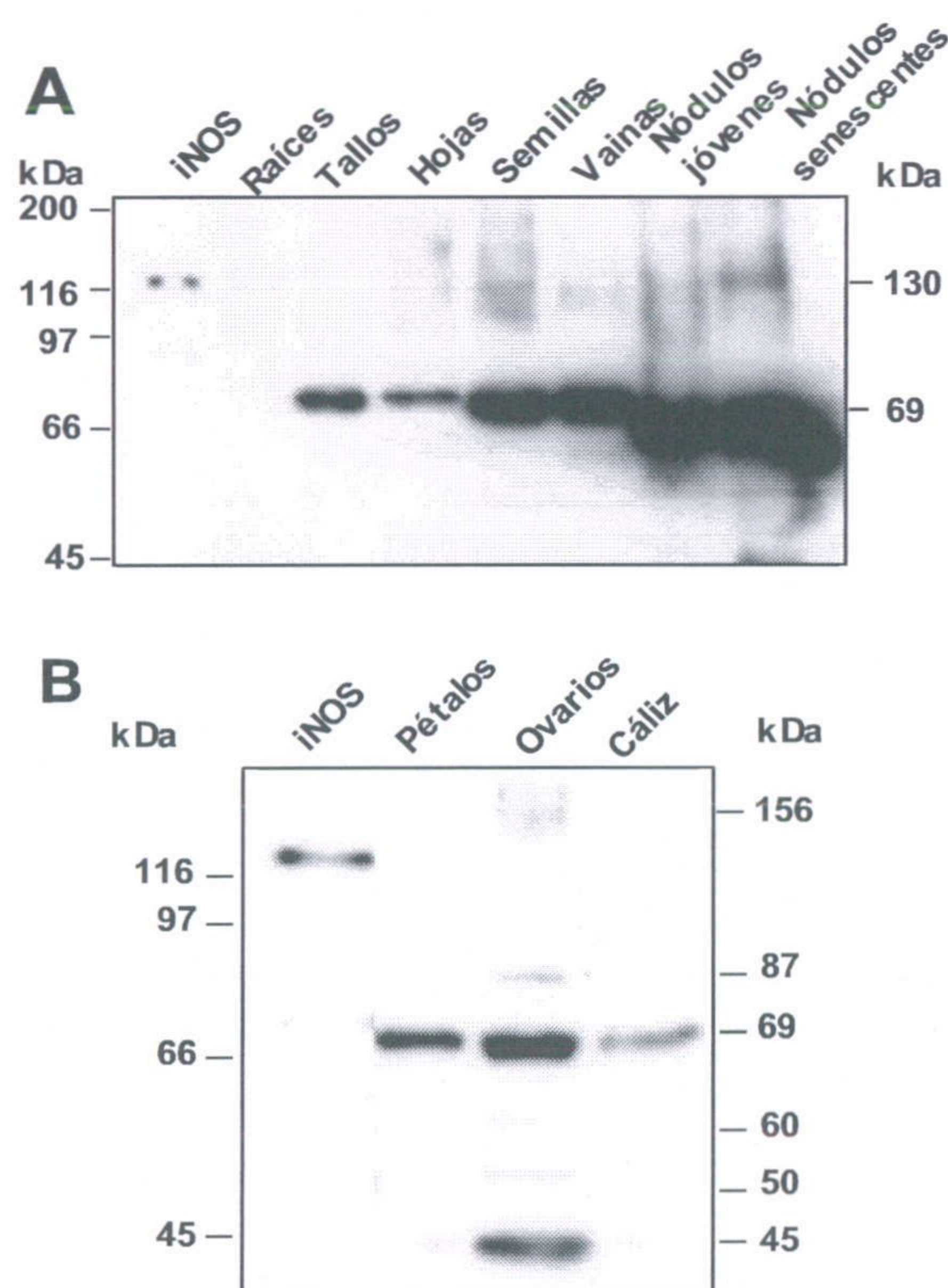


Fig. 4.4. Detección de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en distintos órganos de plantas de guisante. Los ensayos se llevaron a cabo en EGPA-SDS (7,5% de acrilamida) y posterior transferencia e inmunodetección con el antisuero frente a la iNOS (1/500). Se cargaron 50 μ l de cada uno de los homogenados y 50 ng de iNOS ("iNOS electrophoretic standard, Cayman). **A**, Homogenados de distintos órganos de guisante y de nódulos jóvenes y senescentes. **B**, Homogenados de distintas partes de la flor de guisante. A la izquierda de cada imagen se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.

4.4. PROTEÍNAS DE HOJAS INMUNORRELACIONADAS CON LA iNOS EN PLANTAS DE GUISANTE SOMETIDAS A DISTINTOS TRATAMIENTOS

Puesto que uno de nuestros objetivos en la presente Memoria Doctoral es el estudio de la participación de los peroxisomas de hojas en los mecanismos de señalización celular propiciados por NO, nos centramos en estudiar el efecto de distintos tratamientos sobre las hojas, a pesar de no ser este el órgano de la planta que presentaba mayor reactividad frente al anticuerpo. No obstante, en los estudios de transferencia de western que se describen a continuación se emplearon tiempos más largos de revelado de las membranas, lo que permitió detectar un mayor número de bandas inmunorreactivas que el observado anteriormente en las hojas.

Dado que nuestro anticuerpo se había obtenido frente a un polipéptido de la iNOS de macrófagos de ratón, consideramos la posibilidad de que en nuestro material también estuviera presente una proteína homóloga a la animal. Llevamos a cabo, por tanto, algunos ensayos inmunológicos en los que se desarrollaron condiciones aproximadas para una iNOS “típica”, como son la incubación de plantas con L-arginina, (sustrato de la NOS) y con aminoguanidina (AG; inhibidor de las NOSs animales), o la preparación de extractos en ausencia y presencia de los cofactores propios de esta actividad enzimática (FAD, FMN, BH₄ y NADPH, entre otros). Se analizaron también las hojas de plantas a las que se les escindió la raíz, y otras a las que se les infringió una herida por pinzamiento y posteriormente se incubaron con L-arginina (Fig. 4.5).

En las hojas de plantas completas se detectaron cuatro bandas de aproximadamente 112, 69, 60 y 45 kDa de masa molecular. Las bandas de 69 y 60 kDa se intensificaron en hojas de plántulas incubadas con 20 y 100 mM de L-arginina, y no se modificaron con L-arginina 1 mM. El mayor contenido de los polipéptidos de 45 y 112 se observó en las plántulas completas. Por el contrario, la banda de 60 kDa fue más abundante en las plántulas sin raíz y en las incubadas con 100 mM de L-Arginina. Este polipéptido no fue detectado en el tratamiento con aminoguanidina.

Los homogenados realizados con o sin cofactores en el tampón de homogenización mostraron el mismo patrón de bandas. En dichas muestras sólo se detectaron los polipéptidos de 112 y 69 kDa, que presentaban mayor intensidad en los homogenados con los cofactores de la NOS (Fig. 4.5).

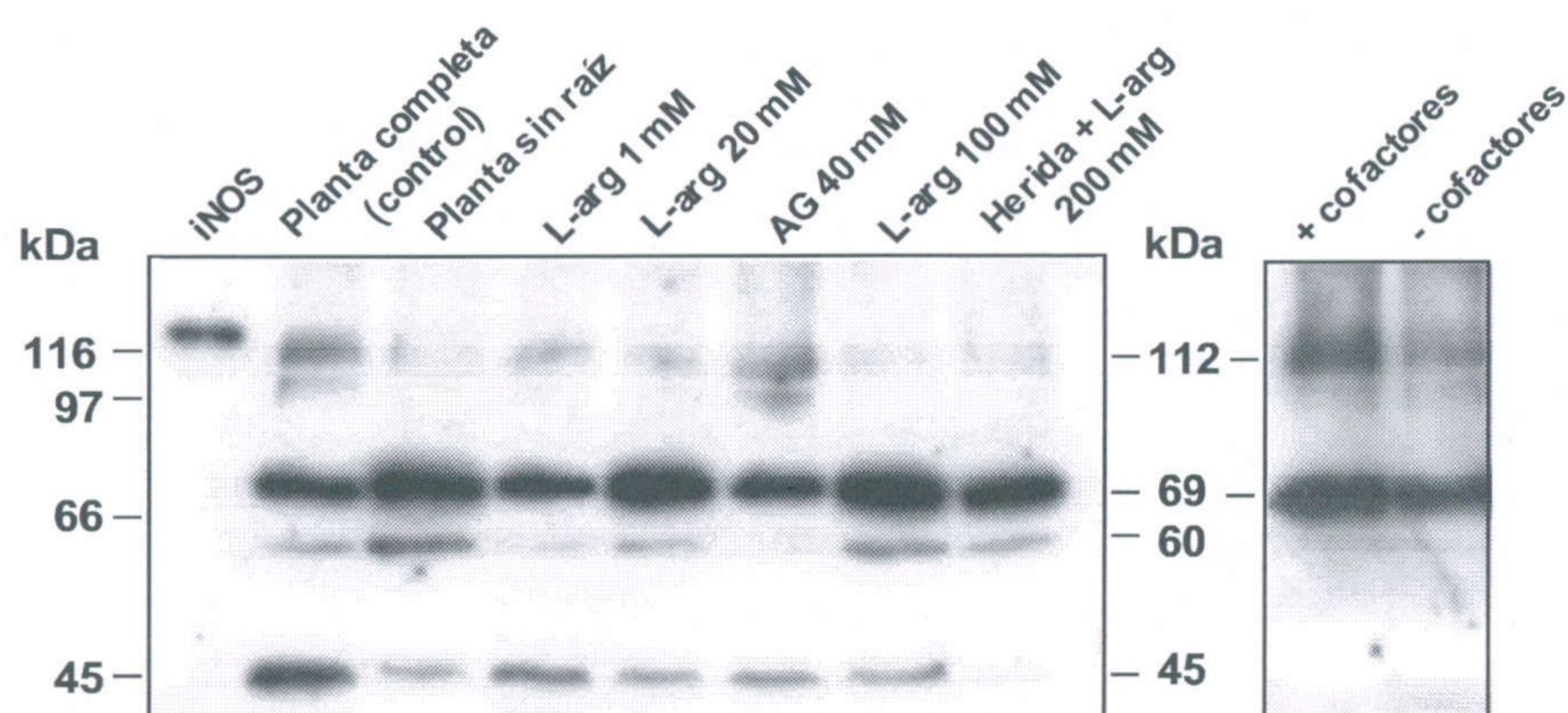
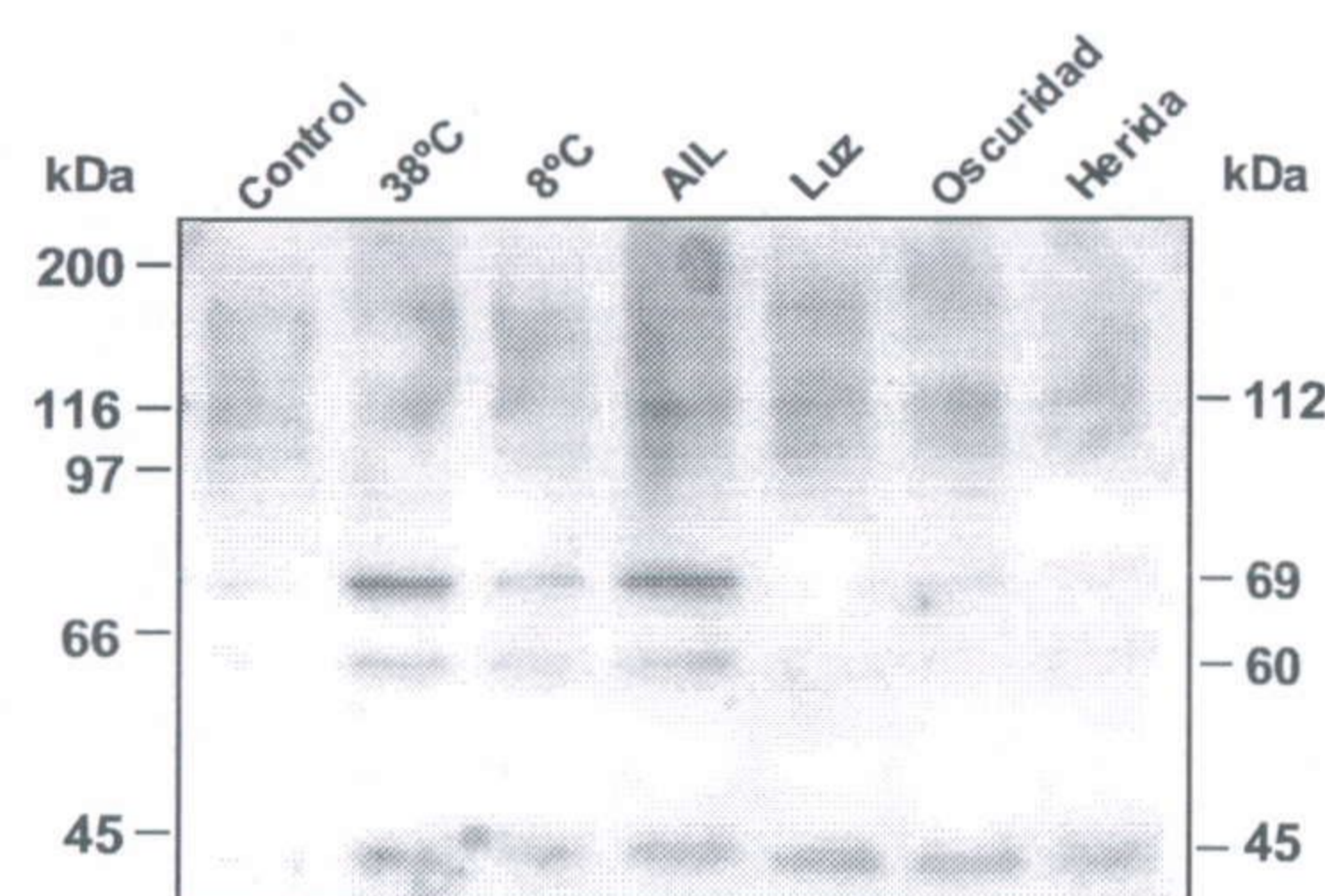


Fig. 4.5. Proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en hojas de plántulas de guisante incubadas en distintas condiciones. Las plantas completas se cultivaron durante 24 h con L-arginina 0 (control), 1, 20 y 100 mM, y con aminoguanidina (AG) 20 mM. Igualmente, se emplearon plántulas a las que se les escindió la raíz, y otras a las que se les infringió una herida mediante pinzamiento y se incubaron posteriormente con L-arg 200 mM. Se emplearon también homogenados de hojas de plantas completas obtenidos en ausencia y en presencia de los cofactores de la NOS (FAD, FMN, BH₄, NADPH). Los ensayos se llevaron a cabo en EGPA-SDS (acrilamida al 7,5%) y posterior transferencia e inmunodetección con el anticuerpo frente a la iNOS (1/500). A la izquierda se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.

También se empleó el anticuerpo en los ensayos de las hojas de guisante sometidas a los tratamientos que se indicaron en el apartado 4.2. Como en los anteriores ensayos, se observaron cuatro bandas inmunorreactivas de 112, 69, 60 y 45 kDa (Fig. 4.6). Con los tratamientos de 38°C y alta intensidad lumínica y, menor grado, con el tratamiento de 8°C, la intensidad de las bandas de 69 y 60 kDa aumentó con respecto a las hojas de la planta control. La intensidad de la banda de 45 kDa aumentó con todos los tratamientos.

Fig. 4.6. Efecto de distintos tratamientos en las proteínas de hojas de guisante inmunorrelacionadas con la iNOS. Las proteínas se separaron por EGPA-SDS en geles al 7,5% de acrilamida. Para la transferencia de western se empleó el anticuerpo frente a la iNOS (dilución 1:500). Los tratamientos a los que se sometieron las plantas fueron los siguientes: 38°C: 38°C durante 4 horas. 8°C: 8°C durante 48 horas; ALL: alta intensidad lumínica durante 4 horas, 1180 mE s⁻¹ m⁻²; Luz: luz continua durante 48 horas. Oscuridad: oscuridad continua durante 48 horas; Herida: herida a las hojas y recogida de las mismas 4 horas después. A la izquierda se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.



4.5. APROXIMACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE NOS EN ANIMALES Y DISEÑO DE CEBADORES.

El análisis de las secuencias proteicas de las tres regiones reconocidas por los tres anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio frente a la iNOS reveló que no existe similitud con ninguna proteína conocida de plantas, a pesar de utilizar un $E = 10.000$. Por defecto, el análisis por el programa BLAST usa un $E = 10$, siendo este parámetro el que determina el grado de restricción con que se realiza la búsqueda.

El análisis de estas mismas secuencias proteicas mediante BLAST con la base de datos de las secuencias proteicas de *Arabidopsis thaliana* no originó ningún resultado positivo con las secuencias del extremo C-terminal y con la zona de unión de FAD. Con la zona de unión de NADPH sí se obtuvieron varias proteínas de *A. thaliana* con cierta homología. El registro que presentó mayor homología, con un 36% de identidad y un 61% de homología, correspondió a la NADPH-ferrihemoproteína reductasa.

El alineamiento entre distintas secuencias proteicas de iNOS (ratón, rata, humana, pony, cerdo, pollo, carpa y trucha) reveló la existencia de bastantes zonas conservadas interespecíficamente a lo largo de toda la secuencia aminoacídica, sobre todo en aquellas zonas implicadas en la unión de los distintos cofactores de la enzima. Se intentó diseñar cebadores que estuviesen contenidos en estas zonas de unión de cofactores, pero sólo fue posible en el caso del cebador 4RNOS, que estaba situado en el extremo carboxilo terminal, en la zona de unión de NADPH. Utilizando estos cebadores degenerados se obtuvieron varias bandas amplificadas a partir de los distintos ADNc, pero al secuenciarlas, y comparar su secuencia mediante el programa BLAST, ninguna de ellas presentó identidad con ninguna secuencia de iNOS conocida.

4.6. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS INMUNORRELACIONADAS CON LA iNOS

Se estudió la localización subcelular de las proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en cortes de hojas de guisante utilizando el antisuero frente a la iNOS y la fracción de IgG purificada por afinidad. En ambos casos, el marcaje apareció localizado exclusivamente en cloroplastos y peroxisomas (Fig. 4.7. paneles B y C).

En estos ensayos de inmunolocalización se emplearon otros anticuerpos frente a distintas enzimas propuestas como posibles fuentes de NO en plantas. Así, recientemente, se ha descrito que la variante de la proteína P es capaz de producir NO (Guo y col., 2003). La proteína P forma parte del complejo de la glicina descarboxilasa,

en el que también se incluye la proteína H. El marcaje obtenido para ambas proteínas, P y H, se localizó única y exclusivamente en mitocondrias (Fig. 4.7, paneles E y F). También se estudió la localización subcelular de la nitrato reductasa (NR), otra de las fuentes de NO descrita en plantas, mediante un anticuerpo específico. El marcaje de oro coloidal se detectó en citosol, mitocondrias y membrana plasmática (Fig. 4.7, panel D).

Asimismo, se estudió la localización subcelular de la xantina oxidasa, utilizando un anticuerpo purificado por afinidad frente a la enzima de rata. El marcaje apareció localizado en cloroplastos y peroxisomas, de manera coincidente al obtenido con el anticuerpo de la iNOS (Fig. 4.7, panel G).

Los cortes incubados con el suero preinmune apenas dieron marcaje (Fig. 4.7, panel A), una marca por orgánulo, como máximo, lo cual confirmó la especificidad de los anticuerpo(s) usado(s) y la ausencia de artefactos durante el proceso de inmunolocalización.

Para confirmar la presencia de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en los peroxisomas de hoja, se llevaron a cabo estudios de colocalización de dichas proteínas y de catalasa mediante microscopía láser confocal. En la Fig. 4.8 (paneles A y D), se muestran cortes de las células del mesófilo espongiiforme incubadas con el anticuerpo frente a la iNOS, donde se aprecia la fluorescencia verde característica de la Cy2-estreptavidina. En la Fig. 4.8 (paneles B y E) se muestran los mismos cortes de hoja incubados con el anticuerpo frente a la catalasa, originando la fluorescencia roja propia de la Cy3-estreptavidina. La superposición de ambas imágenes originó un punteado naranja, indicando que ambos anticuerpos se localizaban en el mismo orgánulo celular (Fig. 4.8, panel C). En la foto F se muestra la observación de la estructura foliar del corte. Como controles negativos, los cortes se incubaron con cada anticuerpo de manera independiente. En la Fig. 4.8 (paneles G y H) se observa un mismo corte en el que se omitió el antisuero frente a la catalasa, de manera que el marcaje verde se debe exclusivamente al antisuero de la iNOS. En los paneles I y J se observa el marcaje rojo debido al antisuero frente a la catalasa, puesto que no se incubó con el antisuero de a la iNOS.

Fig. 4.7. (página contigua). Inmunolocalización de proteínas por microscopía electrónica de transmisión en cortes de hojas de guisante mediante incubación con distintos anticuerpos. A, Suero preinmune (dilución 1/100); B, antisuero frente a la iNOS de macrófagos de ratón (1/100); C, anticuerpo frente a la iNOS purificado por afinidad (1/20); D, anticuerpo frente a la nitrato reductasa (1/50); E, anticuerpo frente a la proteína P del complejo glicina descarboxilasa (1/250); F, anticuerpo frente a la proteína H del complejo glicina descarboxilasa (1/1000). G, anticuerpo frente a la XOD bovina, purificada por afinidad (1/500). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: GAR-15, ("Goat anti-rabbit", anticuerpo de cabra frente a la IgG de conejo, de 15 nm de tamaño de partícula de oro coloidal), para los anticuerpos de la iNOS, iNOS purificada por afinidad y proteínas P y H. GAM-20 ("Goat anti-mouse, anticuerpo de cabra frente a la IgG de ratón, de 20 nm de tamaño de partícula de oro coloidal) para el anticuerpo de la NR; C: Cloroplasto; M: Mitocondria; Pc: Pared celular; P: Peroxisoma. La barra indica 1 μ m.

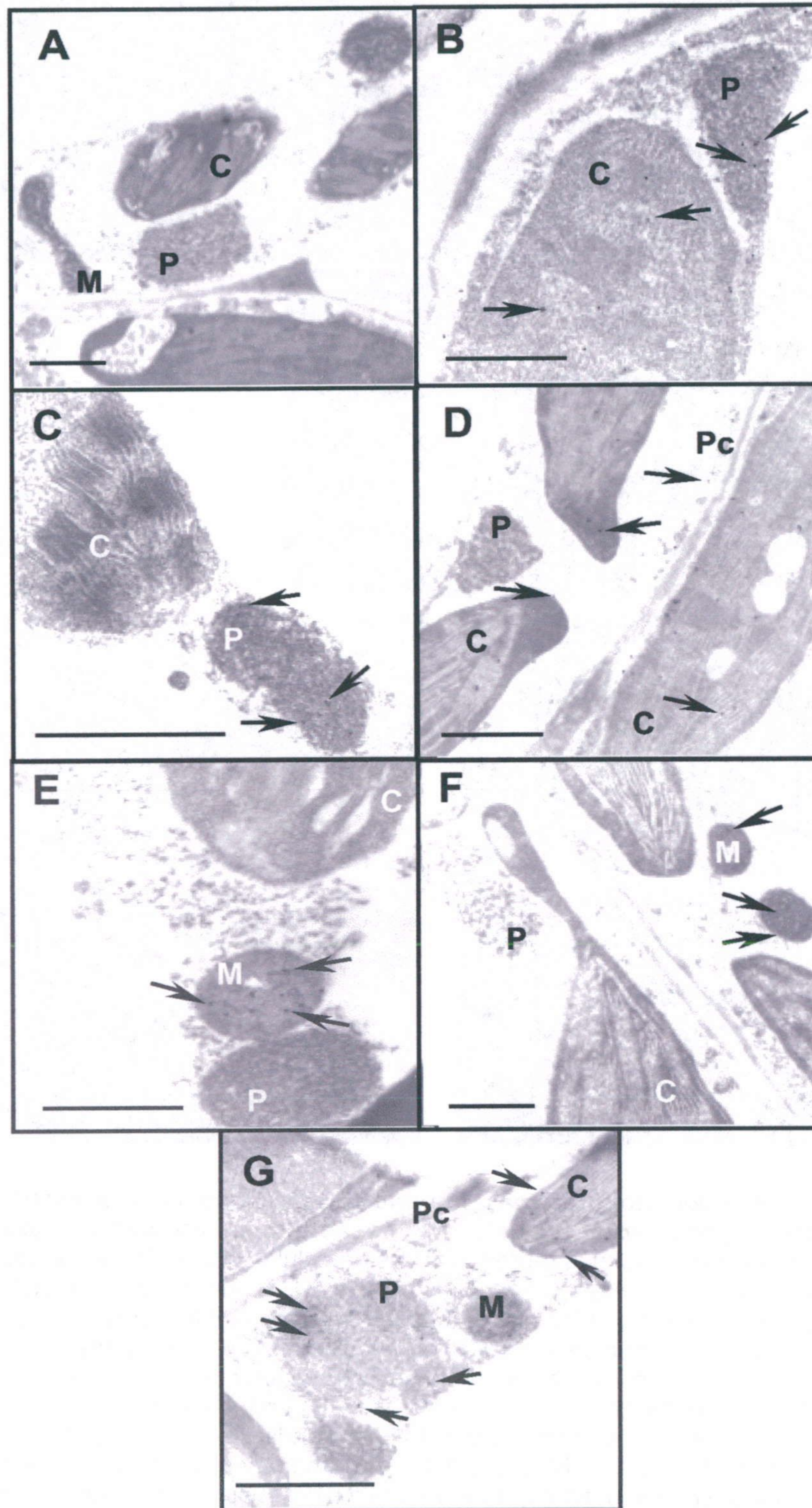


Figura 4.7.

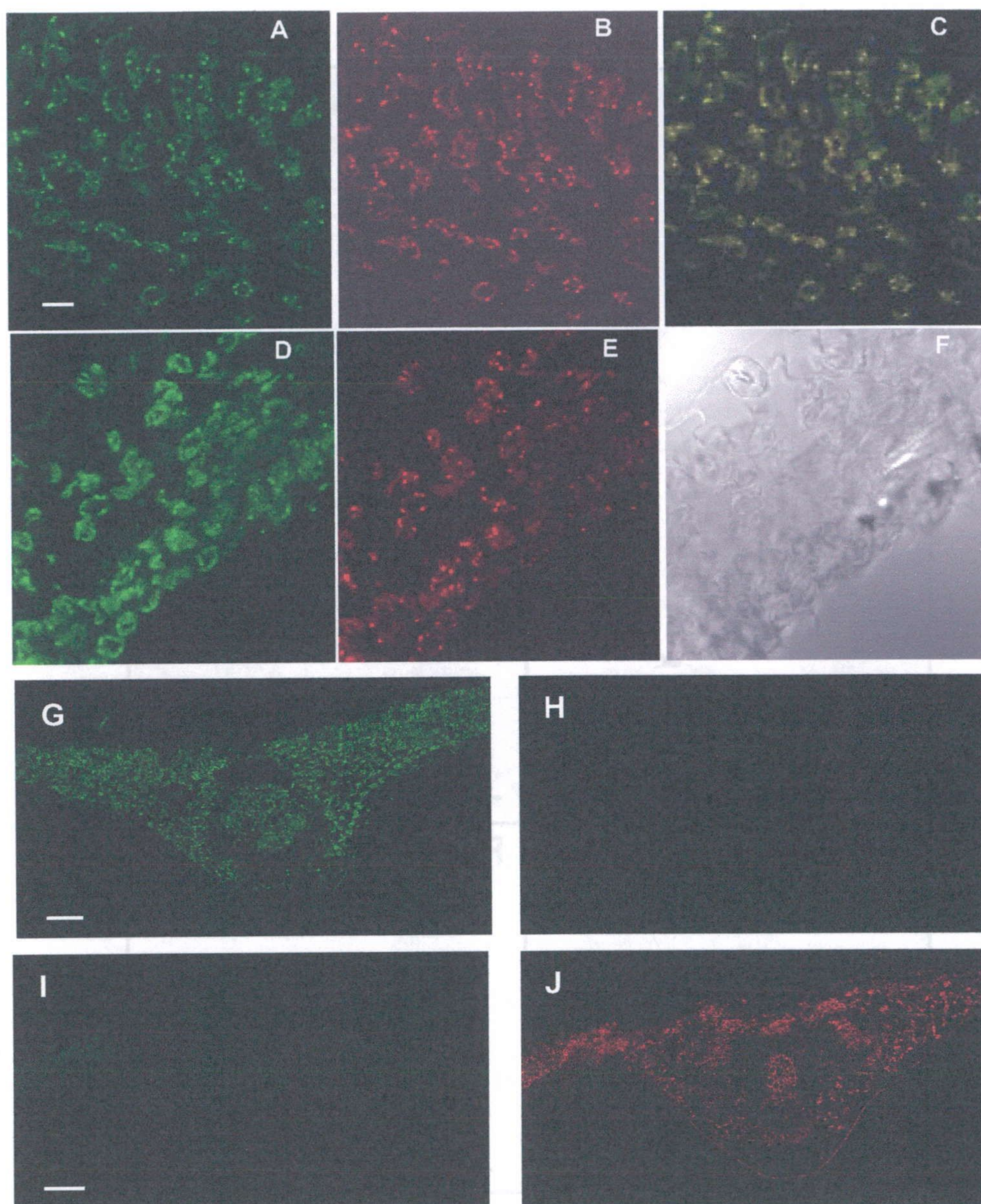


Fig.4.8. Colocalización de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS (color verde) y catalasa (color rojo) en hojas de guisante mediante microscopía láser confocal. Se muestran imágenes representativas de células del parénquima lagunar en secciones de hojas de guisante (60 μm de grosor). A y D, inmunofluorescencia debida a la Cy2-estreptavidina (verde) atribuible al antisuero frente a la iNOS (dilución $\frac{1}{2.500}$). B y E,, inmunofluorescencia debida a la Cy3-estreptavidina atribuible al antisuero frente a la catalasa (1/500). C) Colocalización de ambas inmunofluorescencias (naranja). F) Imagen de campo brillante de la misma sección. G y H) Imágenes de la misma sección de hoja omitiendo el antisuero frente a la catalasa, donde sólo se observa el marcaje debido al anticuerpo frente a la iNOS (verde). I y J) Imágenes de la misma sección de hoja donde se ha omitido el anticuerpo frente a la iNOS, observándose sólo el marcaje rojo debido al antisuero frente a la catalasa. La barra representa 10 μm en las fotos A a F, y 20 μm en las fotos G a J.

4.7. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE PEROXISOMAS DE HOJAS INMUNORRELACIONADAS CON LA iNOS

Una vez confirmada la presencia en peroxisomas de proteínas que mostraban reactividad cruzada con el anticuerpo frente a la iNOS, se intentó identificar su naturaleza. Los peroxisomas purificados en gradientes de densidad fueron sometidos a EGPA-SDS y posterior transferencia de las proteínas a membranas de PVDF e inmunodetección utilizando el método ultrasensible de avidina-biotina conjugada (ABC). En este estudio, además del antisuero que reconoce los catorce últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la iNOS, se emplearon anticuerpos frente a las regiones de unión de FAD y NADPH (BD Biosciences) en las proteínas dependientes de estos cofactores.

En los peroxisomas aislados en gradientes de sacarosa se detectó una única banda de 80 kDa que mostraba reactividad cruzada con los tres anticuerpos utilizados (Fig. 4.9, panel A). No obstante, en los peroxisomas purificados en gradientes de densidad de Percoll se detectaron varias bandas, siendo el patrón obtenido con los anticuerpos frente a la región de unión de FAD y NADPH muy semejante al observado con el antisuero frente a la iNOS (Fig. 4.9, panel B). La abundancia de cada polipéptido variaba dependiendo del anticuerpo empleado. La masa molecular de los polipéptidos detectados con los tres anticuerpos fue de 116, 80, 64, 52 y 48 kDa. Hay que indicar que

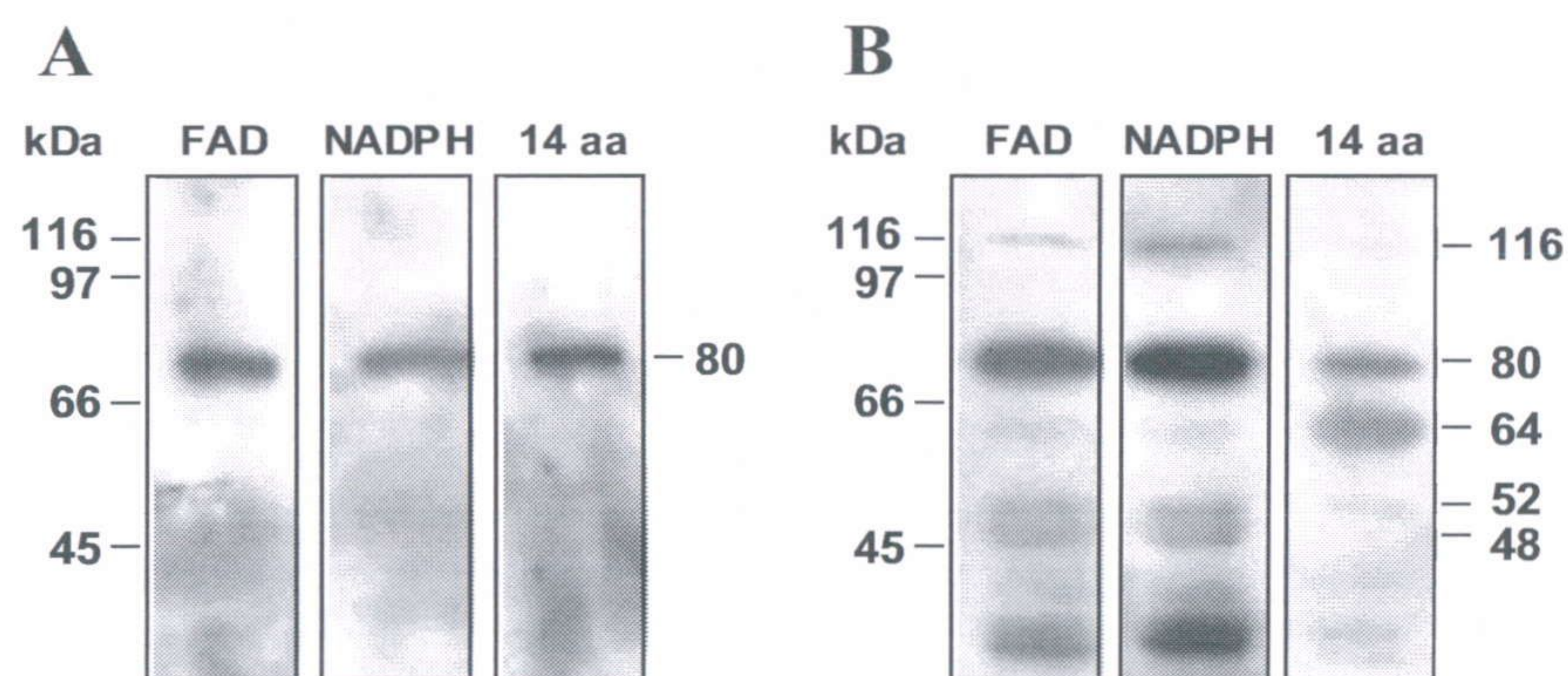


Fig. 4.9. Transferencia e inmunodetección de proteínas de peroxisomas de hojas de guisante inmunorelacionadas con la iNOS de macrófagos de ratón. Las muestras se analizaron mediante EGPA-SDS (acrilamida 7,5%) y posterior transferencia e inmunodetección. A, peroxisomas aislados en gradientes de densidad de sacarosa (5 μ g de proteína total). B, peroxisomas aislados en gradiente de Percoll (50 μ g de proteína total). FAD: anticuerpo frente a la región de unión de FAD de la iNOS; NADPH: anticuerpo frente a la región de unión de NADPH de la iNOS; 14aa: anticuerpo frente a los últimos 14 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la iNOS. A la izquierda de cada imagen se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.

Resultados

el método de purificación de peroxisomas con Percoll permite obtener concentraciones de proteínas de 8-10 veces superiores que las determinadas en los orgánulos purificados en gradientes de sacarosa.

Puesto que en plantas existen proteínas biotiniladas que pueden reaccionar de forma inespecífica con el complejo ABC del método empleado, se comprobó la fiabilidad de los resultados obtenidos. Para ello, las membranas de PVDF a las que se transfirieron las proteínas de los peroxisomas aislados en gradiente de sacarosa se incubaron de la siguiente manera: A) con el anticuerpo primario y el complejo ABC; B) con el anticuerpo secundario y el complejo ABC; C) sólo con el complejo ABC; y D) con ambos anticuerpos y el complejo ABC. Como se observa en la Fig 4.10, en todos los casos se detectó una banda de unos 80 kDa, con lo que se deduce que este polipéptido no reconoce de manera específica por nuestro anticuerpo. Probablemente se trata de una proteína peroxisomal biotinilada, resultado de una modificación post-traducciona. Por el contrario, sólo se observó el resto de bandas cuando se siguió el procedimiento completo de incubación con los anticuerpos primarios y secundarios y con el complejo ABC.

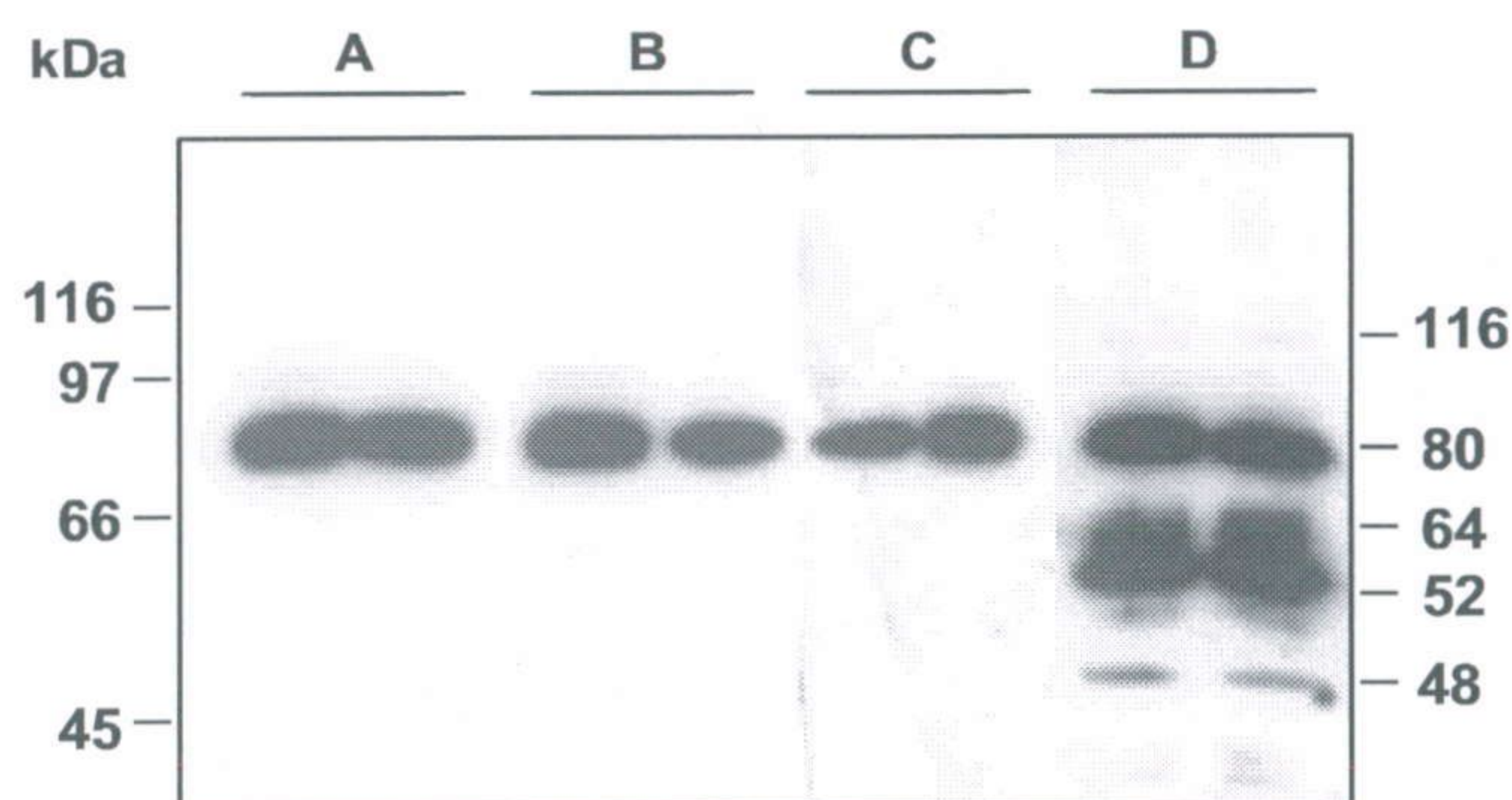


Fig. 4.10. Comprobación de la inmunoespecificidad del método ultrasensible quimioluminiscente de avidina-biotina conjugada (ABC). Las muestras se analizaron mediante EGPA-SDS (acrilamida 7,5%) y posterior transferencia e inmunodetección utilizando una dilución 1/500 del anticuerpo frente a la iNOS. Se cargaron 50 ml de peroxisomas aislados en gradiente de sacarosa en cada carril. A, peroxisomas incubados con el anticuerpo primario y el complejo ABC. B, peroxisomas incubados con el anticuerpo secundario y el complejo ABC. C, peroxisomas incubados con el complejo ABC. D, peroxisomas incubados con el anticuerpo primario, secundario y el complejo ABC. A la izquierda se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.

Se ensayó también la susceptibilidad de una NOS comercial frente a las endoproteasas de peroxisomas cuya presencia en estos orgánulos había sido descrita anteriormente (Distefano y col., 1997). Los datos obtenidos indican que esta enzima

es bastante estable en las condiciones utilizadas, ya que tan sólo a las 72 horas después del inicio de la incubación se apreció una disminución en la cantidad de enzima comercial (Fig. 4.11).

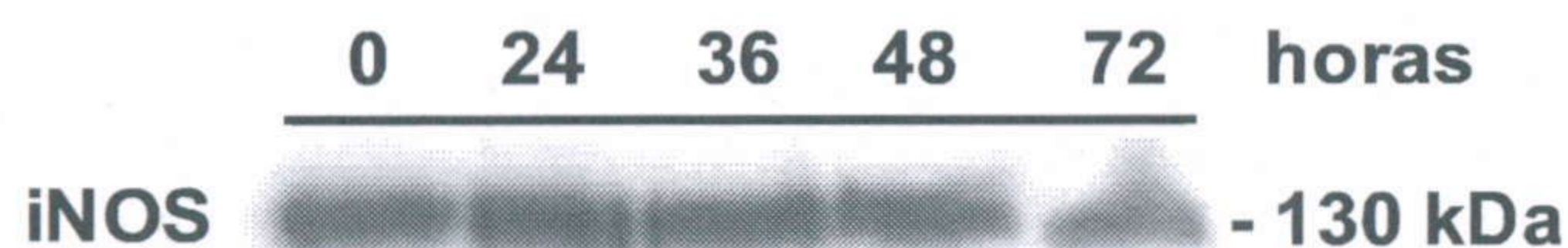


Fig. 4.11. Degradación de iNOS comercial aportada exógenamente por endoproteasas peroxisomales. Se incubaron 10 ng de proteína comercial con peroxisomas diluidos (1:1) durante distintos tiempos.

4.8. ACTIVIDAD NOS EN PEROXISOMAS DE HOJAS

Una vez confirmada la presencia de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en peroxisomas de hojas de guisante, tanto por transferencia de western como por microscopía electrónica y confocal, se determinó la actividad óxido nítrico sintasa en estos orgánulos midiendo la aparición de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.12. La producción de L-[³H]-citrulina aumentó linealmente con la cantidad de proteína en la mezcla de reacción (panel A). Además, la cantidad de L-[³H]-citrulina formada dependió del tiempo de incubación de la muestra, alcanzándose el máximo después de 30 minutos y permaneciendo estable durante los siguientes 30 minutos (Fig. 4.12, panel B).

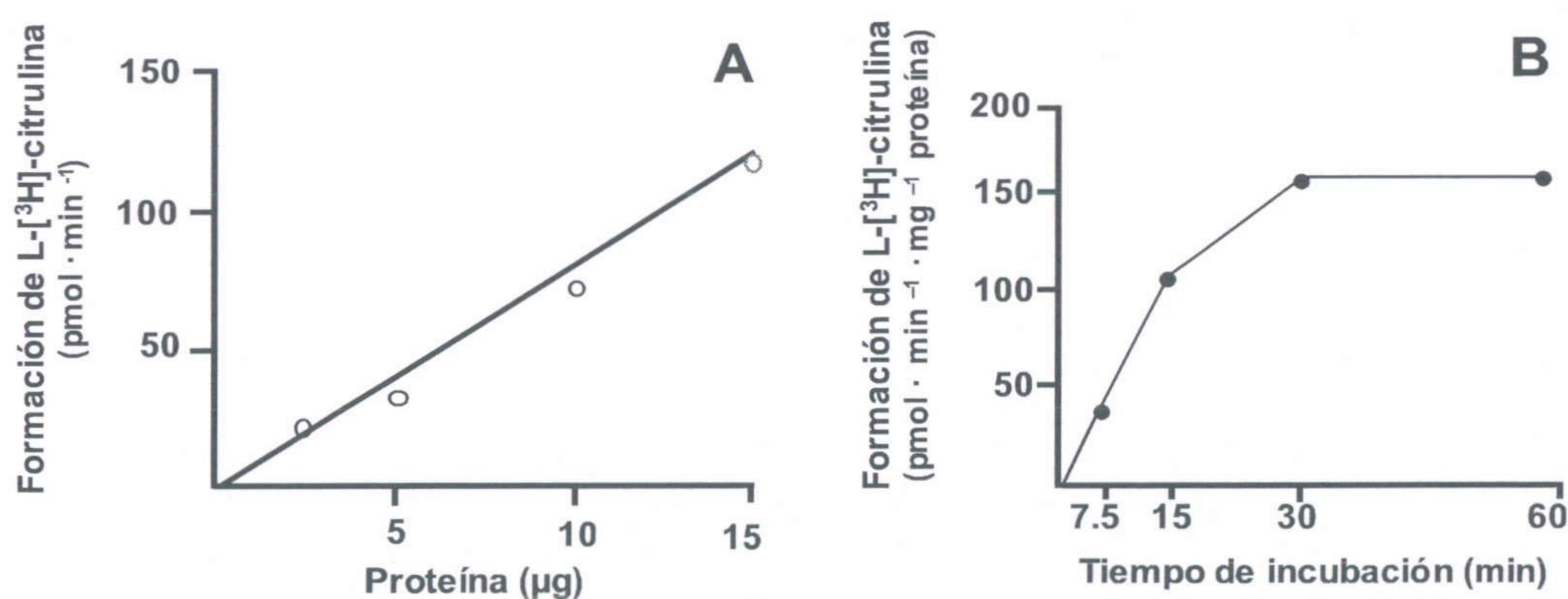


Fig. 4.12. Formación de L-[³H]-citrulina a partir de L-[³H]-arginina en peroxisomas de hojas de guisante dependiente de la cantidad de proteína y del tiempo de incubación. A, se añadieron cantidades crecientes de proteína peroxisomal a la mezcla de reacción. La actividad NOS se ensayó con una concentración de L-arginina 1mM. B, se añadió la muestra a la mezcla de reacción estándar y la actividad NOS se determinó a distintos tiempos de incubación reflejados en la gráfica.

4.9. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE PEROXISOMAS INMUNORRELACIONADAS CON LA iNOS

Los resultados descritos hasta ahora apuntaban a que en peroxisomas de hojas se encuentran presentes proteínas que muestran cierta similitud inmunológica con la iNOS. Dada la potencialidad de nuestro anticuerpo para reconocer dichas proteínas, se decidió purificar las mismas mediante una columna de afinidad. En la Fig. 4.13 se muestra el esquema seguido para la preparación de esta columna de afinidad, en la que se empleó la fracción IgG del suero para unirla al gel de hidracida. Como material de partida en estos ensayos se emplearon matrices de peroxisomas de hojas de guisante concentradas.

Las matrices se incubaron con el gel activado con la fracción IgG y, posteriormente, la columna se lavó y se obtuvieron los eluidos tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y métodos. Estos eluidos se analizaron por EGPA-SDS, y posterior tinción con plata y transferencia e inmunodetección con el antisuero frente a la iNOS.

En el lavado con tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, posterior a la incubación, aparecieron varias bandas en los geles teñidos con plata, entre ellas, una banda débil de 130 kDa (Fig. 4.14, panel A). Sin embargo, al analizar esta fracción por transferencia e inmunodetección, no apareció ninguna banda inmunoreactiva (Fig. 4.14, panel B). El patrón de polipéptidos del eluido con citrato sódico 0,15 M, pH 3,0 consistió en dos bandas de 66 y 52 kDa. El análisis por transferencia de western de esta fracción dio lugar a tres bandas inmunoreactivas. El tamaño de dos de ellas coincidía con el determinado en los geles teñidos con plata, y además se obtuvo una banda adicional de 130 kDa no detectada en los geles. El eluido con clorhidrato de guanidina 5 M, pH 7,0, presentó un perfil similar al del citrato sódico en el gel teñido con plata. Sin embargo, en la inmunodetección sólo se apreció claramente la banda de 52 kDa (Fig. 4.14, panel B).

Se extrajeron las bandas de 130, 66 y 52 kDa de los geles de acrilamida teñidos con plata y se analizaron/secuenciaron por la técnica de MALDI-TOF. La banda de 66 kDa del eluido resultó ser albúmina, proveniente, probablemente, del antisuero. La banda de 52 kDa originó un perfil cromatográfico que en principio no era significativamente parecido a ninguna proteína depositada en las bases de datos del MALDI-TOF, y lo mismo ocurría con la banda de 130 kDa.

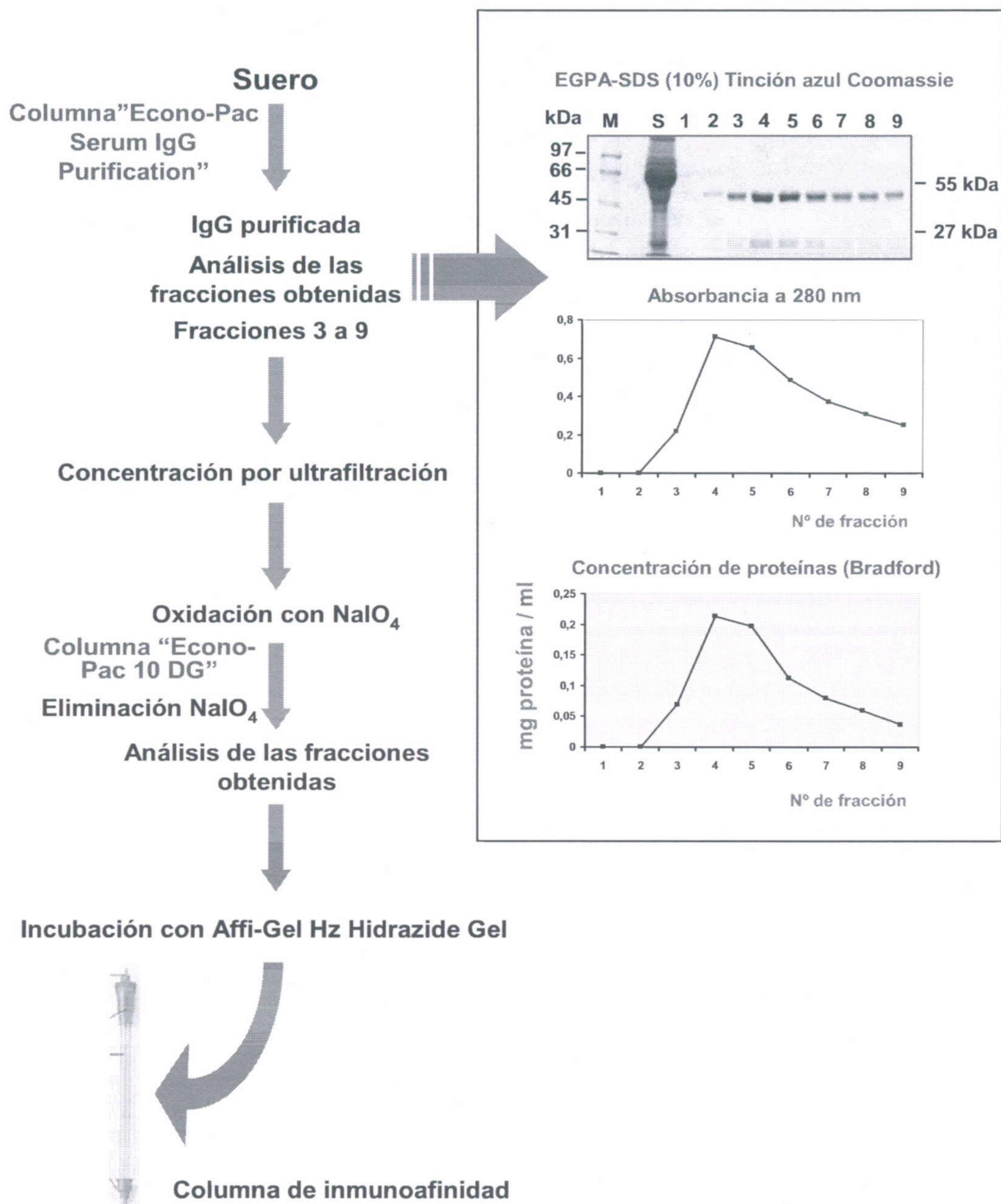


Fig. 4.13. Preparación de la columna de afinidad de la iNOS. La IgG se purificó, a partir del suero, con un *Econo-Pac Serum IgG Purification Kit* de Bio-Rad. La pureza y concentración de la IgG se comprobó por EGPA-SDS en geles al 12% de acrilamida, y por el método de Bradford, respectivamente. En los geles de acrilamida se detectaron claramente las cadenas pesada (55 kDa) y ligera (24 kDa) de la IgG. La IgG purificada se oxidó con NaIO_4 , previo a su unión al gel de hidracida.

Para disponer de mayor cantidad de los polipéptidos de 130 y 52 kDa y poder enfrentar sus secuencias con las bases de datos disponibles, se llevó a cabo una EGPA-SDS en un sistema Protean II (Bio-Rad) que permite cargar mayor cantidad de muestra por pocillo. Nuevamente, las bandas correspondientes a los polipéptidos,

teñidos ahora con un método especial (Colloidal Blue Stainig Kit; ver Material y métodos), se secuenciaron por la técnica de “microcapillary reverse-phase HPLC nano-electrospray tandem mass spectrometry” (μ LC/MS/MS). En ambas bandas predominó como proteína mayoritaria la cadena pesada de la IgG de *Oryctolagus cuniculus*, además de distintas proteínas de la leche, como caseína y lactoglobulina.

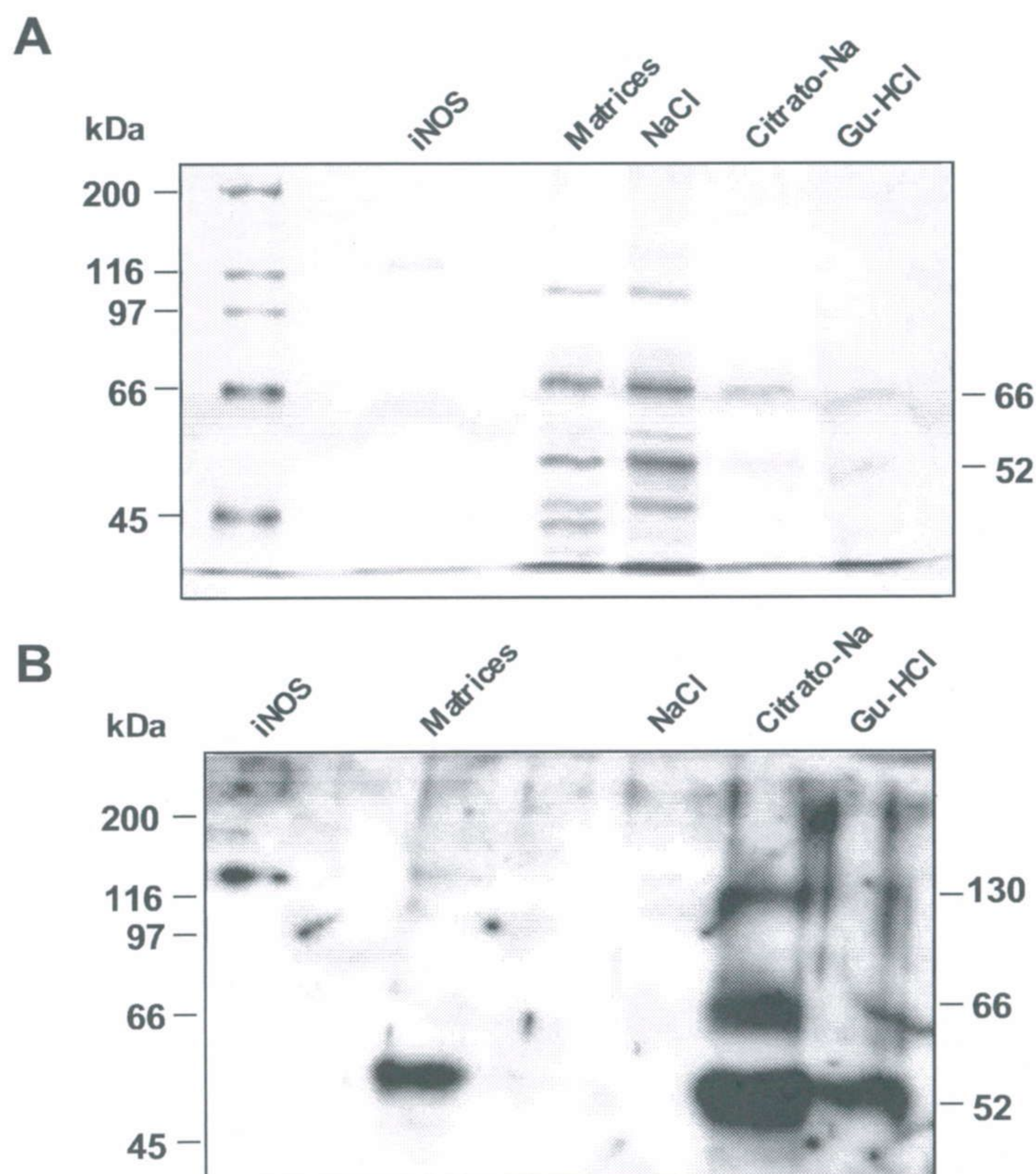


Fig. 4.14. Cromatografía de afinidad de las matrices peroxisomales. Los eluidos de la columna se analizaron mediante EGPA-SDS en geles de acrilamida al 7,5%. A, tinción del gel con plata. B, transferencia e inmunodetección con el anticuerpo frente a la iNOS (dilución 1/500). iNOS, *iNOS electrophoretic standard* (Cayman); Matrices, matrices concentradas de peroxisomas de hojas de guisant; NaCl, lavado con tampón fosfato-K 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M; Citrato-Na, eluido con citrato sódico 0,15 M, pH 3,0; Gu-HCl, eluido con clorhidrato de guanidina 5 M, pH 7,0. Se cargaron 50 μ l de cada una de las muestras, y 50 ng y 3 μ g de iNOS para la transferencia de western y la tinción de plata, respectivamente. A la izquierda se muestran los marcadores de masa molecular, y a la derecha, el tamaño de las bandas detectadas en las muestras analizadas.

Se desarrolló otra estrategia alternativa para conocer la identidad y naturaleza de las proteínas de peroxisomas inmunorrelacionadas con la iNOS. Se procedió, así, al análisis inmunológico de los orgánulos con anticuerpos frente a una metaloproteína de peroxisomas con capacidad de unión de los cofactores propios de la iNOS, como es la

xantina oxidorreductasa, que en organismos animales es capaz de generar $\text{NO}\cdot$. En la Fig. 4.15, paneles A y B se muestran los resultados de este experimento. Como puede comprobarse, en peroxisomas los anticuerpos de la iNOS y la XOD reconocían una banda de aproximadamente 56 kDa y de 59 kDa, respectivamente.

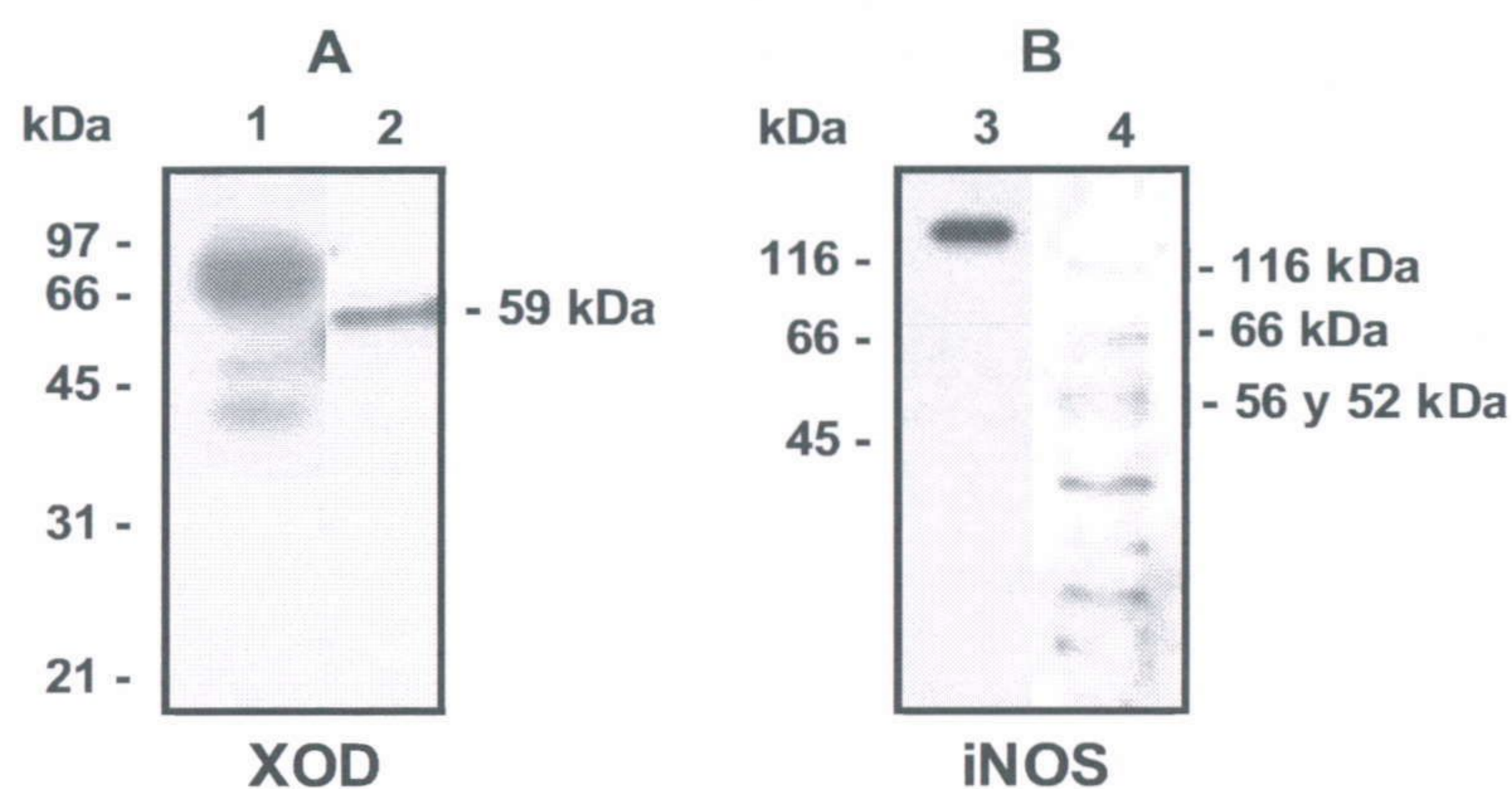


Fig. 4.15. Análisis de la inmunorreactividad de peroxisomas frente a los anticuerpos de Xantina oxidasa y de iNOS. Los peroxisomas se analizaron mediante EGPA-SDS y posterior transferencia e inmunodetección. A, anticuerpo frente a la xantina oxidasa (1/500). 1, XOD pura de leche de vaca. 2, peroxisomas completos de hojas de guisante. B, anticuerpo frente a la iNOS. 3, 50 ng de iNOS de macrófagos de ratón; 2, peroxisomas completos de hojas de guisante. Los marcadores de peso molecular se sitúan a la izquierda, y a la derecha el peso molecular de las principales bandas inmunorreactivas.

4.10. PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE $\text{NO}\cdot$ EN PEROXISOMAS DE HOJAS DE GUISANTE

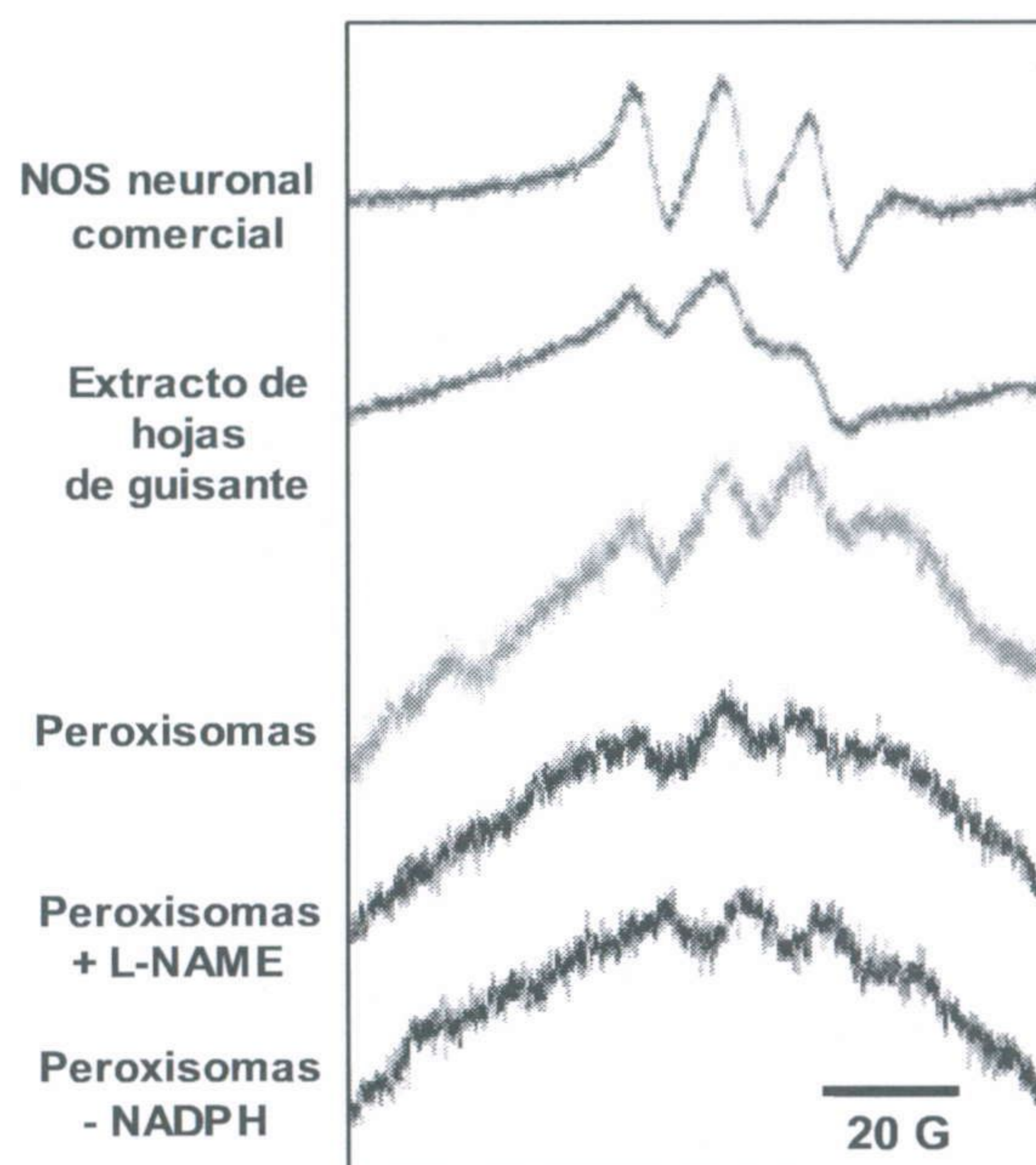
Se analizó la producción de $\text{NO}\cdot$ en los peroxisomas aislados en gradiente de sacarosa mediante distintas técnicas que incluían resonancia paramagnética electrónica (EPR), fluorimetría y quimioluminiscencia de ozono.

4.10.1. Resonancia paramagnética electrónica (EPR) o resonancia de spin electrónico (ESR).

Esta técnica se basa en el empleo de un compuesto, el $\text{Fe}(\text{MGD})_2$, que actúa como trampa específica para el $\text{NO}\cdot$. El análisis del espectro generado por la NOS pura (15 μg) comercial presentó la señal característica del complejo formado entre el $\text{NO}\cdot$ y el $\text{Fe}(\text{MGD})_2$ de tres picos, con los parámetros de $g = 2.05$ y de una constante de acoplamiento de $a_N = 12.8 \text{ G}$ (Fig. 4.16). Por esta técnica, tanto en homogenados de hojas de guisante como en peroxisomas de hojas se detectó la producción de $\text{NO}\cdot$, puesto que se obtenía un espectro similar al de la NOS pura. En los ensayos con

peroxisomas, cuando se eliminó el NADPH de la mezcla de reacción, se produjo una disminución considerable de la señal obtenida, así como cuando se añadió 1 mM L-NAME, inhibidor específico de la NOS animal .

Fig. 4.16. Detección de NO[•] en hojas de guisante y en peroxisomas de hojas mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR). Por esta técnica se detecta el espectro del complejo formado por NO[•] y Fe(MGD)₂. Para la detección de NO, se añadieron las muestras a la mezcla de reacción conteniendo el sustrato y todos los cofactores de la reacción de la NOS, además de la trampa de spin Fe(MGD)₂. Los ensayos se realizaron también en presencia de L-NAME 1 mM (inhibidor de la NOS), y en ausencia NADPH. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C. y posteriormente se analizaron por EPR. Se utilizó nNOS pura de Calbiochem® como control positivo, y 270 µg de proteína peroxisomal en cada experimento.



4.10.2. Fluorimetría

La segunda técnica utilizada para la detección de NO[•] en peroxisomas de hojas de guisante fue el análisis fluorimétrico, empleando DAF-2 DA como fluoróforo. La fluorescencia relativa detectada debida al DAF-2 T, producto de la reacción del NO[•] con el DAF-2 DA, aumentó proporcionalmente con la cantidad de proteínas peroxisomales en la mezcla de reacción (Fig. 4.17, panel A). Además, la fluorescencia relativa fue prácticamente nula al incubar la mezcla con aminoguanidina (AG) 2 mM, inhibidor de NOS, y disminuyó en torno al 35% cuando se eliminó la L-arginina de la mezcla de reacción o se desnaturizó la muestra calentándola previamente durante 5 minutos a 95 °C (Fig. 4.17, panel B). Por tanto, se puede concluir que, al menos, el 65% del NO[•] detectado por el análisis espectrofluorimétrico tenía origen enzimático.

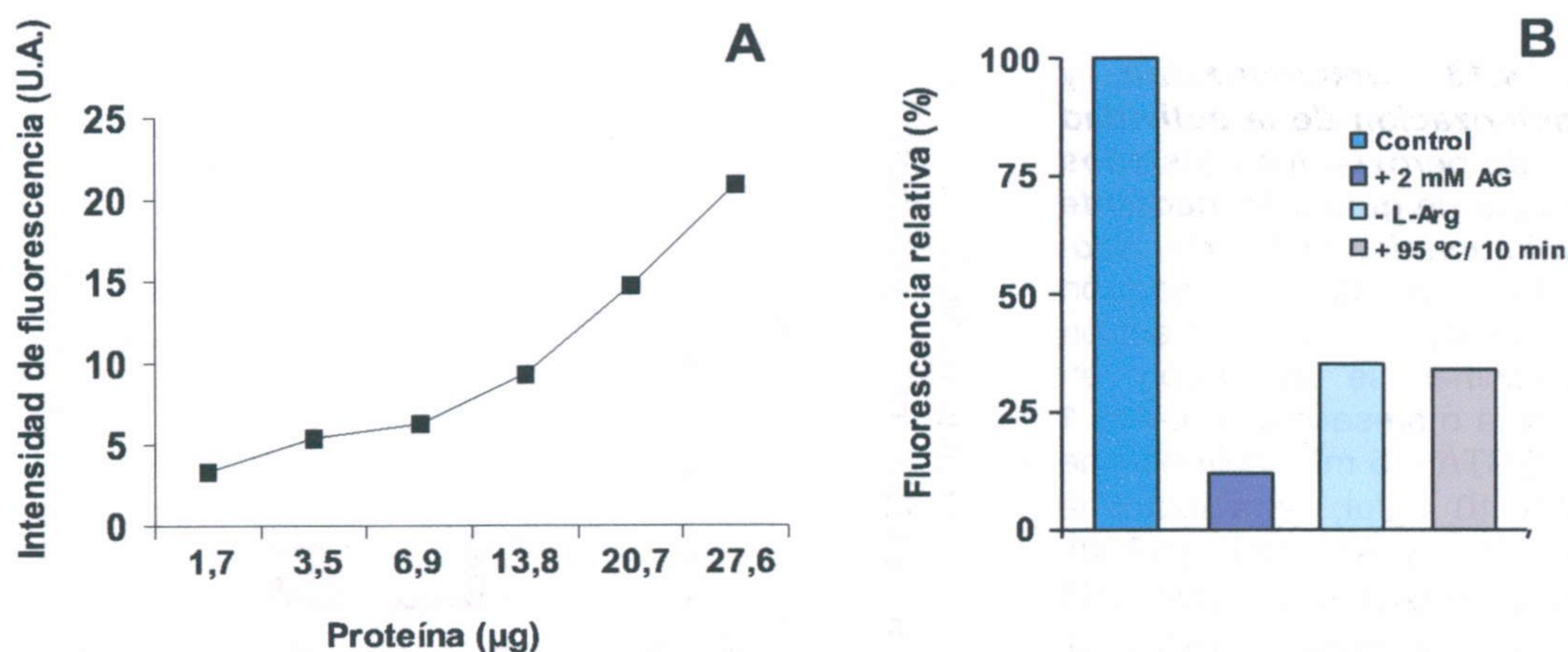
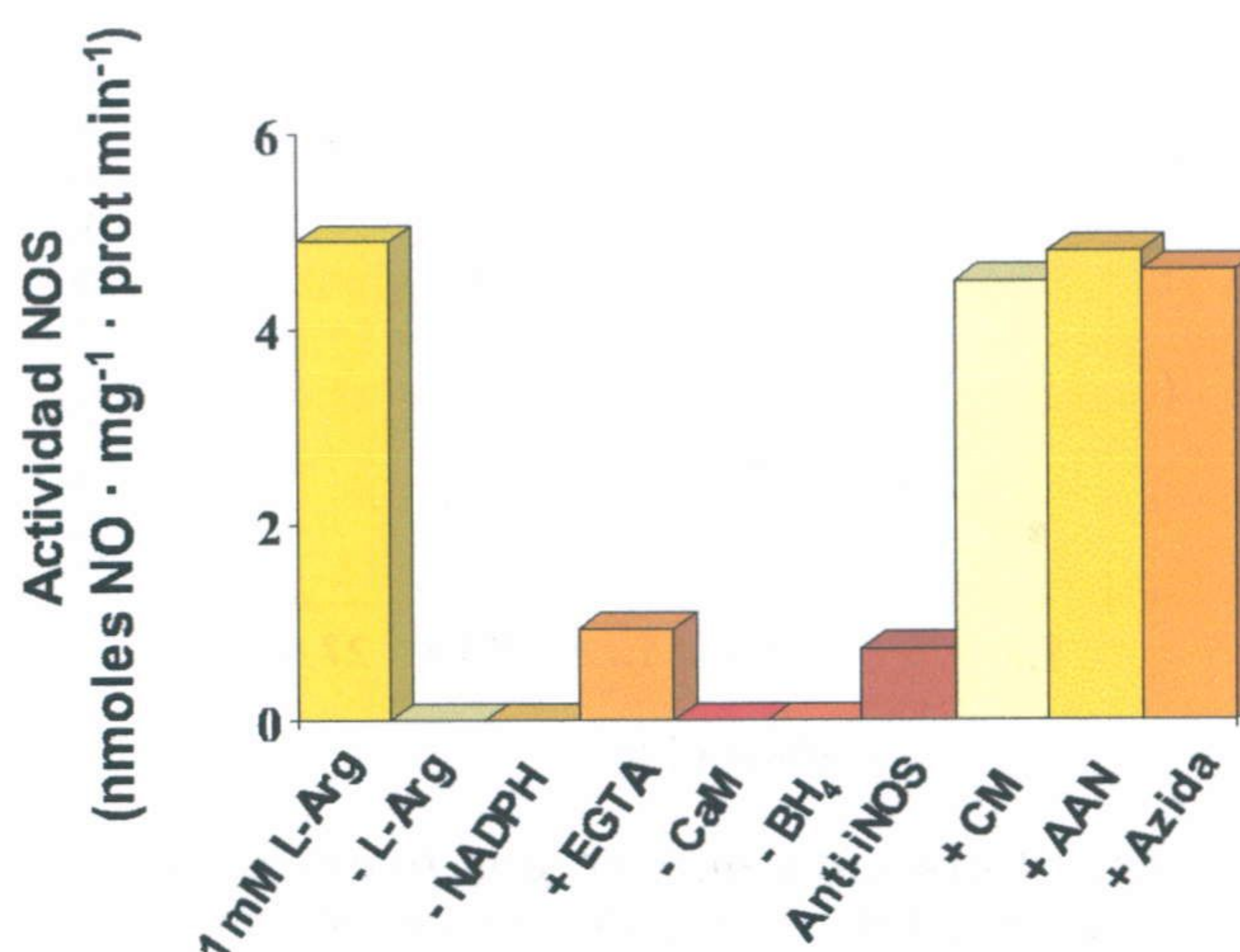


Fig. 4.17. Detección de NO por fluorimetría con DAF-2 DA en peroxisomas de hojas de guisante. Los peroxisomas recién aislados se añadieron a las mezclas de reacción y se midió la fluorescencia emitida. Los valores mostrados son medias de tres experimentos independientes. A, se añadieron distintas cantidades de proteína peroxisomal a la mezcla de reacción. La intensidad de fluorescencia producida se expresa en unidades arbitrarias (U.A.). B, efecto sobre la generación de NO \cdot en peroxisomas incubados en distintas condiciones: 2 mM de aminoguanidina (AG); en ausencia de sustrato L-arginina (L-Arg); calentando las muestras a 95°C durante 10 minutos. La cantidad de proteína peroxisomal en cada reacción fue de 12 µg, y la fluorescencia se expresa como porcentaje sobre el control (Fluorescencia relativa).

4.10.3. Quimioluminiscencia de ozono

La tercera técnica utilizada para confirmar la producción de NO \cdot endógeno en peroxisomas, así como para caracterizar dicha actividad, fue la quimioluminiscencia de ozono. La producción de NO \cdot se cuantifica al medir la concentración de nitratos y nitritos en la muestra a tiempo cero y transcurridos treinta minutos. La tasa de producción de NO \cdot a partir de L-arginina en peroxisomas de hojas de guisante resultó ser de 5,4 nmoles de NO \cdot \cdot mg $^{-1}$ proteína \cdot min $^{-1}$ (Fig. 4.18). Cuando se eliminaron los sustratos de la reacción, L-arginina y NADPH, así como los cofactores calmodulina (CaM) y tetrahydropterina (BH $_4$), no se detectó actividad. Asimismo, la actividad disminuyó considerablemente cuando se añadió al medio EGTA (quelante de Ca $^{2+}$, necesario para la funcionalidad de las NOS animales constitutivas, nNOS y eNOS) y el anticuerpo frente a la iNOS de macrófagos de ratón. La actividad no se vio modificada cuando se añadieron a la mezcla de reacción los inhibidores de la subunidad P de la glicina descarboxilasa, carboximetoxilamina (CM) y aminoacetonitrilo (AAN), o azida sódica, inhibidor de la nitrato reductasa.

Fig. 4.18. Determinación y caracterización de la actividad NOS de peroxisomas aislados de hojas de guisante mediante quimioluminiscencia de ozono. Las mezclas de reacción conteniendo la fracción peroxisomal se incubaron en ausencia o presencia de L-Arg 1 mM, EGTA 0,5 mM, calmodulina (CaM) 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, tetrahiptopterina (BH_4) 10 μM , Anti-iNOS (1/200), carboximetoxilamina (CM) 200 μM , aminoacetonitrilo (AAN) al 0,01% (v/v) y azida sódica (Azida) 1 mM. Se representa la media de, al menos, tres experimentos independientes.



4.11. XANTINA OXIDORREDUCTASA (XOR) DE HOJAS DE GUIANTE

En una evaluación de los resultados presentados hasta ahora se puede atribuir al sistema enzimático de la xantina oxidoreductasa la categoría de posible candidata como fuente generadora de $\text{NO}\cdot$, tanto en homogenados de hojas de guisante como en los peroxisomas de hoja. De hecho, se ha descrito la localización subcelular de este sistema en peroxisomas de hojas de guisante (Sandalio y col., 1988; Corpas y col., 1997; Corpas et al., 2004), y además en animales se ha comprobado que es capaz de producir $\text{NO}\cdot$ *in vitro* en condiciones de baja tensión de oxígeno (Harrison, 2002). Por tanto, decidimos estudiar la regulación de la XOR en las hojas de las plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos, analizando su actividad y cantidad de proteína, así como los niveles del mRNA correspondiente. Esto nos permitiría establecer una correlación, en caso de que la hubiera, entre la regulación de la XOR y la producción de $\text{NO}\cdot$ en las hojas sometidas a los tratamientos ya definidos anteriormente.

4.11.1 Actividad y niveles de proteína xantina oxidoreductasa en extractos de plántulas de guisante.

Se analizó la actividad xantina oxidoreductasa en las hojas de las plántulas sometidas a distintos tipos de tratamientos por espectrofotometría y por EGPA nativa. En el método espectrofotométrico se analizó tanto la actividad deshidrogenasa (XDH) como la oxidasa (XOD) de la XOR. La actividad XOD apenas mostraba cambios significativos con los distintos tratamientos (Fig. 4.19, panel A). Por el contrario, la actividad XDH se incrementó notablemente en el tratamiento de alta intensidad lumínica, y de manera más

amortiguada con la herida. No obstante, estas modificaciones no se correspondieron con la actividad XDH detectada en geles de actividad, ni con los niveles proteicos obtenidos en la transferencia de western de los geles nativos (Fig. 4.19, paneles B y C, respectivamente).

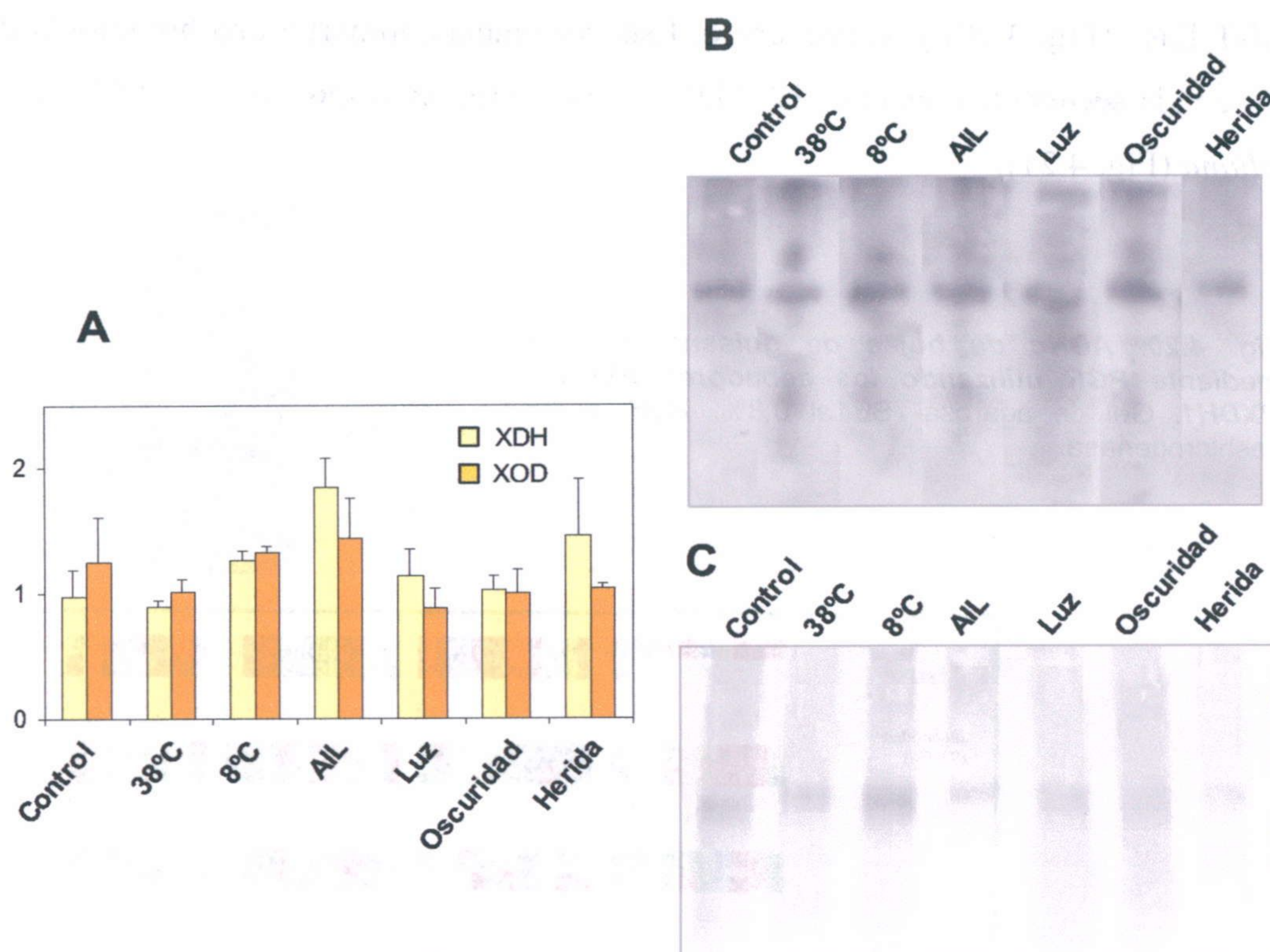


Fig. 4.19. Xantina oxidoreductasa de hojas de plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos. A, actividad XOR total expresada mediante la actividad deshidrogenasa (XDH) y oxidasa (XOD). B, EGPA nativa (acrilamida 7,5%) y posterior tinción del gel para actividad XDH. C, transferencia de western de geles nativos empleándose el anticuerpo frente a la XOD de rata (dilución 1/250). Las plántulas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 38°C, 38°C durante 4 horas; 8°C, 8°C durante 48 horas; AIL, alta intensidad lumínica durante 4 horas, 1180 mE s⁻¹ m⁻²; Luz, luz continua durante 48 horas; Oscuridad, oscuridad continua durante 48 horas; Herida, herida a las hojas y recogida de las mismas 4 horas después.

4.11.2 Expresión de la XDH en plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos.

Se analizaron los niveles de ARNm de la XOR de hojas de plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos por RT-PCR semicuantitativa y transferencia de Northern.

Se diseñaron cebadores para la XDH, mediante alineamiento de distintas secuencias proteicas de XDH depositadas en las bases de datos. Se seleccionó una pareja de cebadores (FXDH1 y RXDH1) en base a las zonas interespecíficas conservadas y a la secuencia de la enzima de *Arabidopsis thaliana*. Con estos cebadores, se obtuvo un fragmento de 418 pares de bases, que se clonó en el vector pGEM-T Easy (Fig. 4.20) y se secuenció. Esta secuencia compartía una homología del 72,5 % con la secuencia conocida del ADNc de la xantina deshidrogenasa 1 (XDH1) de *A. thaliana* (Fig. 4.21).

Fig. 4.20. ADNc de hojas de guisante obtenido mediante PCR utilizando los cebadores FXDH1 y RXDH1. Gel de agarosa-TBE al 0,8%. XDH, xantina deshidrogenasa.

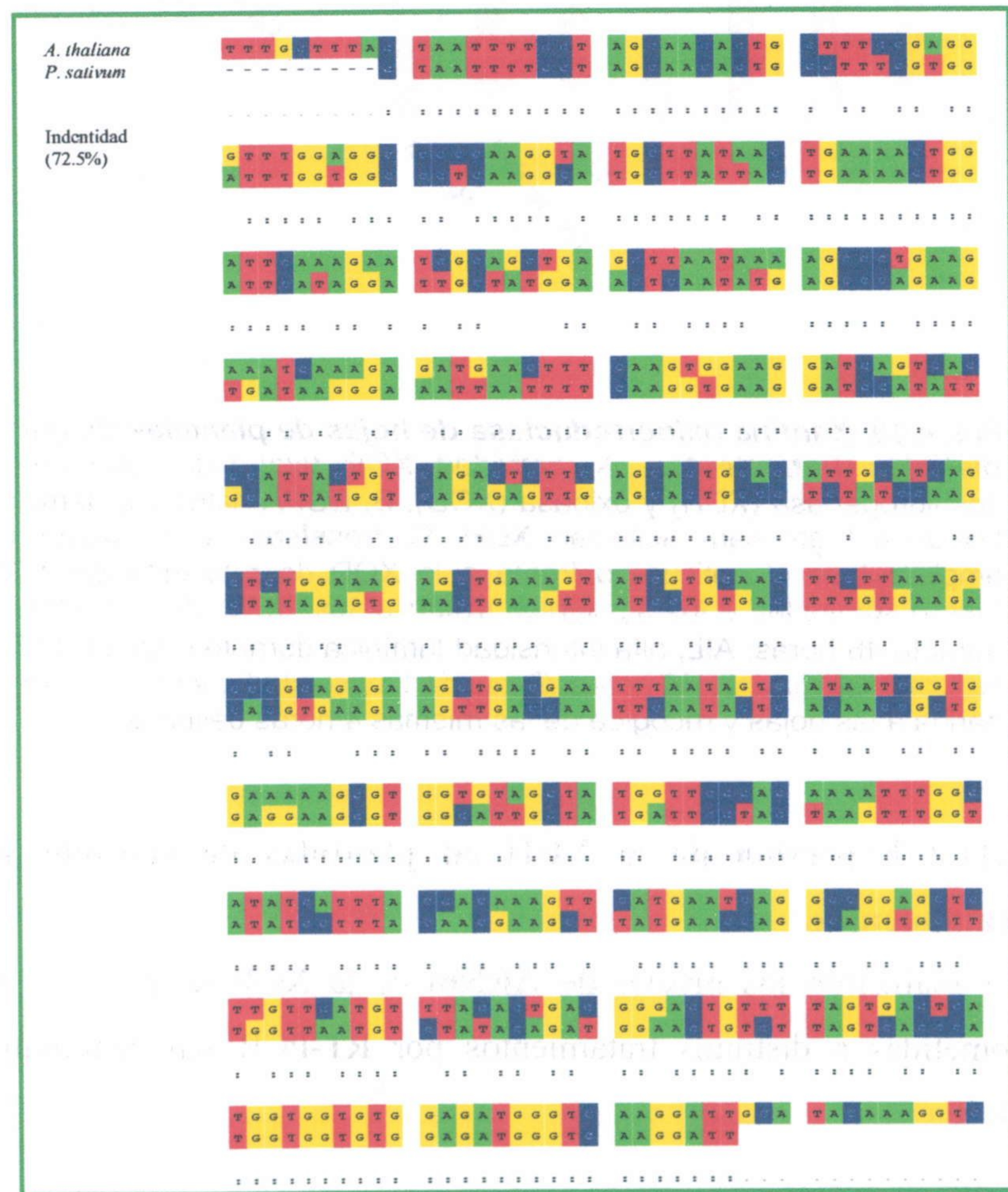
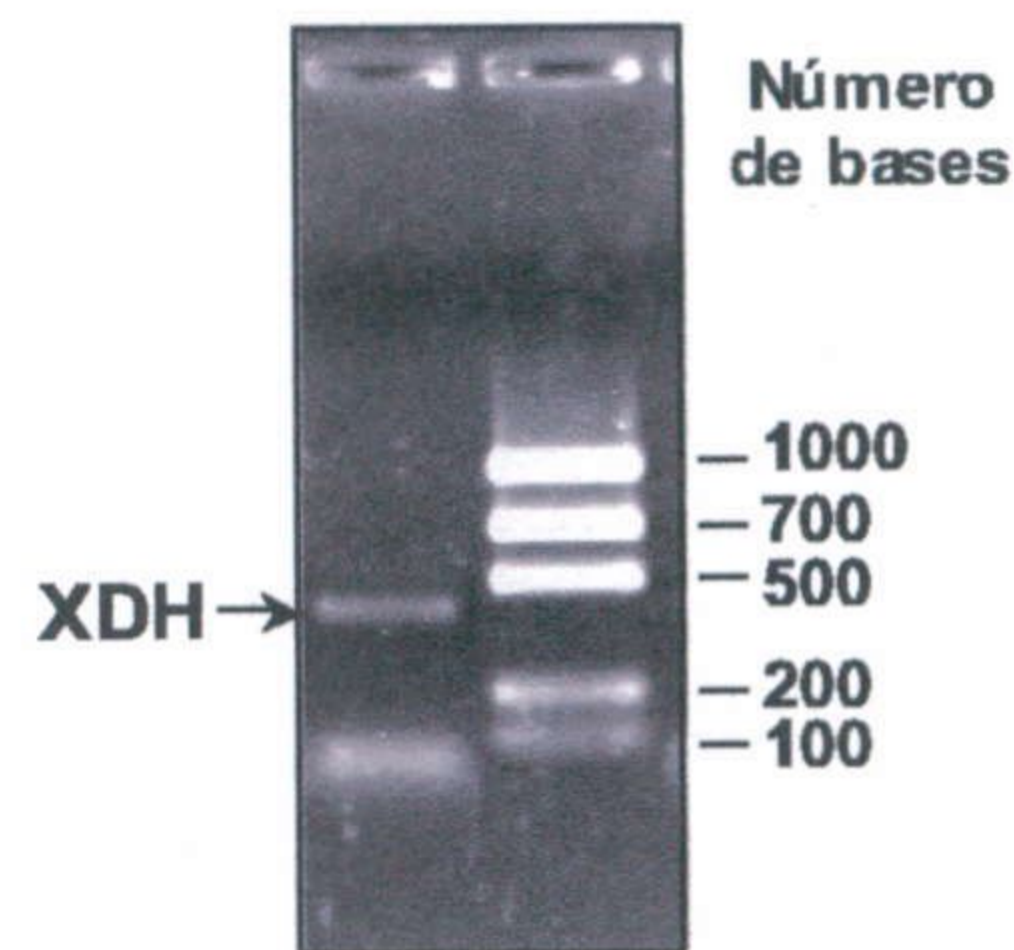
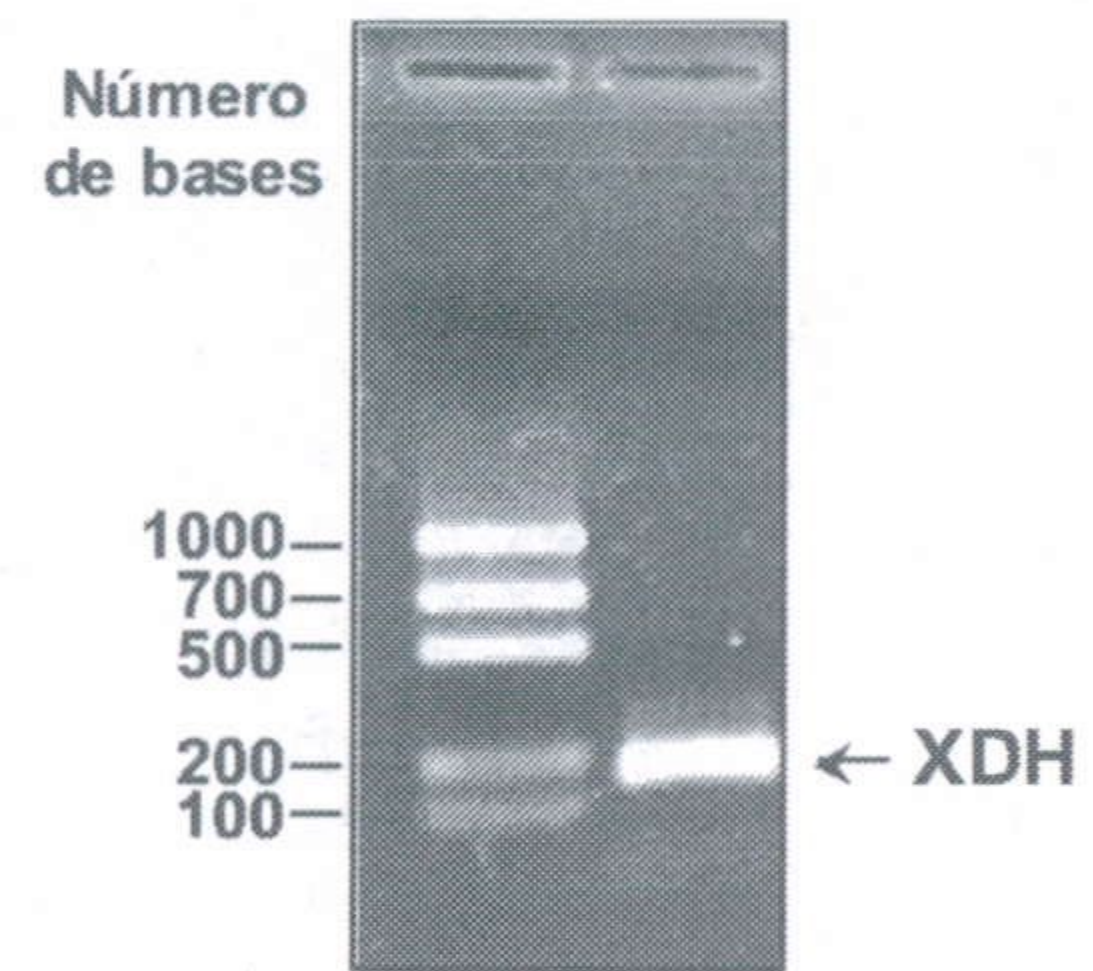


Fig. 4.21. Alineamiento entre la secuencia de 418 pares de bases de XDH de guisante clonada con los oligos FXDH1 y RXDH1 y la secuencia de ARNm de la enzima XDH1 de *Arabidopsis thaliana* (AY171562, 4282 pares de bases).

Una vez obtenida esta secuencia, se diseñaron cebadores específicos para la xantina deshidrogenasa de guisante, utilizando el programa OMIGA 2.0. Con estos cebadores, FXDH_{pea}2 y RXDH_{pea}2, se consiguió un fragmento de 180 pares de bases (Fig. 4.22) que se secuenció, y se comprobó que estaba contenido en el fragmento de 418 pares de bases obtenido previamente.

Fig. 4.22. ADNc de hojas de guisante obtenido mediante PCR utilizando los cebadores FXDH_{pea}2 y RXDH_{pea}2. Gel de agarosa-TBE al 0,8%. XDH, xantina deshidrogenasa.



Se establecieron las condiciones más apropiadas para los análisis de RT-PCR semicuantitativa, empleando como control interno la actina II que se expresa de manera constitutiva. En este diseño ha de considerarse que la cantidad de ADN amplificado se encuentre en fase exponencial, tanto para la XDH como para la actina II. En nuestro caso, el número de ciclos para la XDH fue de 28, y de 32 para la actina II (Fig. 4.23). En estas condiciones se analizó la expresión de la xantina deshidrogenasa de hojas de guisante sometidas a distintos tratamientos.

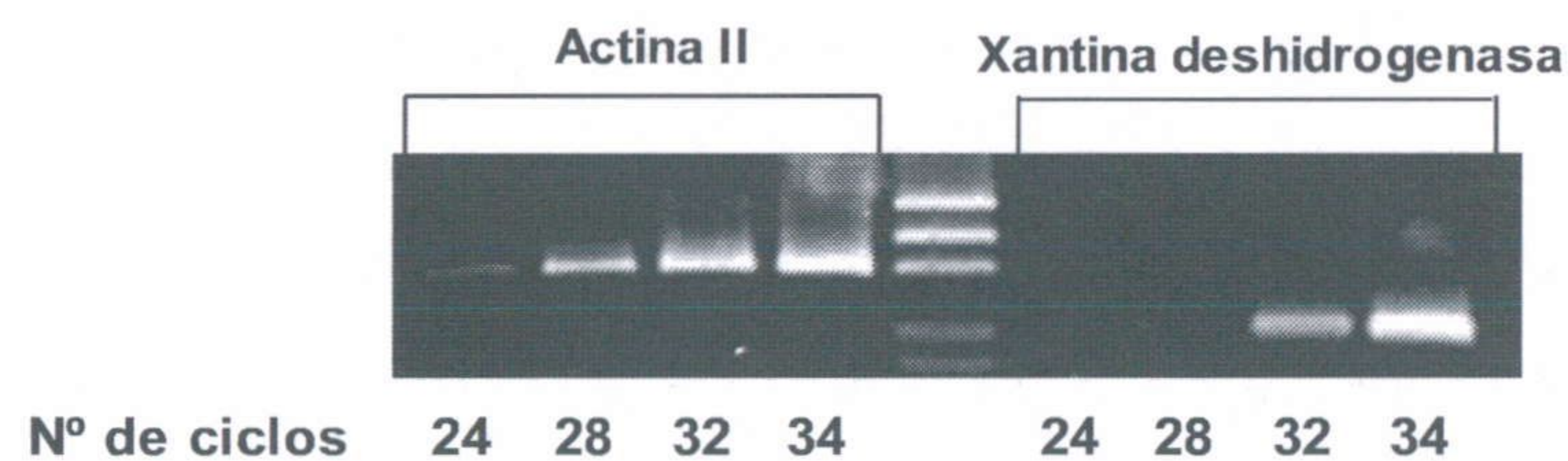


Fig. 4.23. Ensayo de PCR de actina II y xantina deshidrogenasa de hojas de guisante. En estos ensayos se determinó el número de ciclos para el estudio de expresión de XDH mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Gel de agarosa-TBE al 0,8%.

En el análisis por RT-PCR semicuantitativa, se observó un aumento significativo de los niveles de ARNm en plantas sometidas a 8°C y a oscuridad continua durante 48 horas (Fig. 4.24). Sin embargo, en las hojas de las plántulas que estuvieron en luz continua durante 48 horas, se produjo una disminución en los niveles de ARNm. En el resto de los tratamientos, no se detectaron variaciones significativas con respecto a las plántulas control.

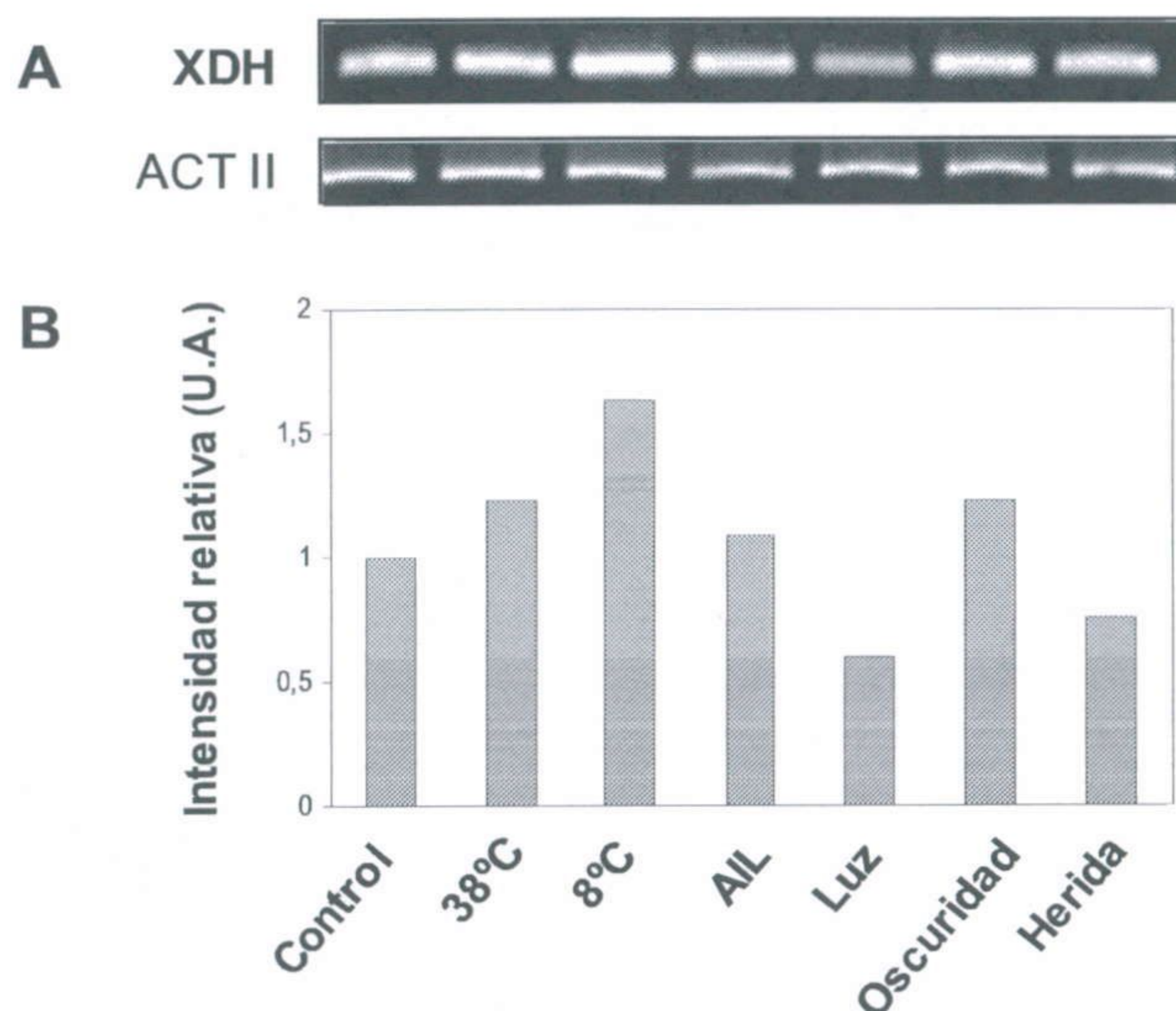


Fig. 4.24. RT-PCR semicuantitativa de la XDH de hojas de guisantes sometidas a distintos tratamientos. Se representa los datos representativos de, al menos, tres experimentos independientes. A, análisis mediante electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0,8% y posterior tinción con bromuro de etidio. B, intensidad relativa de las bandas en el gel de agarosa con respecto a la intensidad de la banda de las hojas control. Las plántulas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 38°C, 38°C durante 4 horas; 8°C, 8°C durante 48 horas; AIL, alta intensidad lumínica durante 4 horas, 1.180 mE s⁻¹ m⁻²; Luz, luz continua durante 48 horas. Oscuridad, oscuridad continua durante 48 horas; Herida, herida a las hojas y recogida de las mismas 4 horas después. XDH, xantina deshidrogenasa; ACT II, actina II.

Asimismo, se analizaron los niveles de ARNm de las hojas de las plántulas sometidas a distintos tratamientos mediante transferencia de Northern y utilizando como sonda el fragmento de 418 pares de bases obtenido a partir de ADNc con los cebadores FXDH1 y RXDH1. De nuevo, se detectó un aumento claro en los niveles de ARNm en las hojas tratadas a 8°C durante 48 horas así como en las hojas a las que se les produjo una herida y, en menor medida, en las sometidas a oscuridad continua durante 48 horas (Fig. 4.25). Los niveles de ARNm-XDH en las hojas tratadas con alta intensidad lumínica y luz continua disminuyeron con respecto a los niveles en las hojas control. Finalmente, en el tratamiento con calor (38°C) no se detectaron cambios significativos.

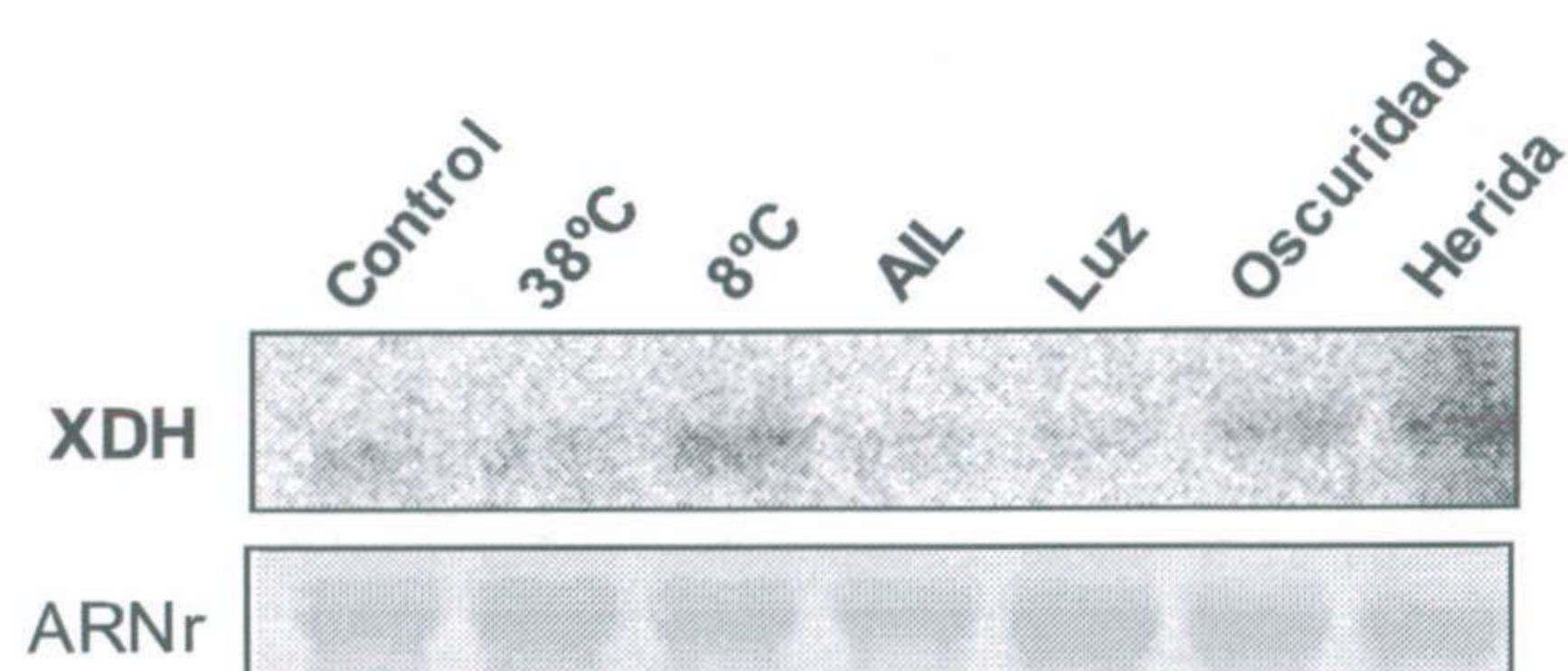


Fig. 4.25. Transferencia de Northern de la XDH de hojas de guisantes sometidos a distintos tratamientos. Se utilizó el ARNr como control de carga. Las plántulas fueron sometidas a los siguientes tratamientos: 38°C, 38°C durante 4 horas. 8°C: 8°C durante 48 horas; AIL, alta intensidad lumínica durante 4 horas, 1180 mE s⁻¹ m⁻²; Luz, luz continua durante 48 horas. Oscuridad, oscuridad continua durante 48 horas; Herida, herida a las hojas y recogida de las mismas 4 horas después.

Por otro lado, se estudió la expresión de la XDH en plantas de guisante sometidas a estrés por cadmio y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). Anteriormente se había probado en nuestro laboratorio que concentraciones de Cd 50 μM (Sandalio et al. 2003) y 22,6 mM de 2,4-D (McCarthy y col., 2002) afectaban de manera significativa la actividad XOD de las hojas. Como se observa en la Fig. 4.26, en hojas tratadas con cadmio 50 μM y con 2,4-D 22,4 μM se produjo una disminución de los niveles de ARNm de la XDH en torno al 54 % y al 16%, respectivamente.

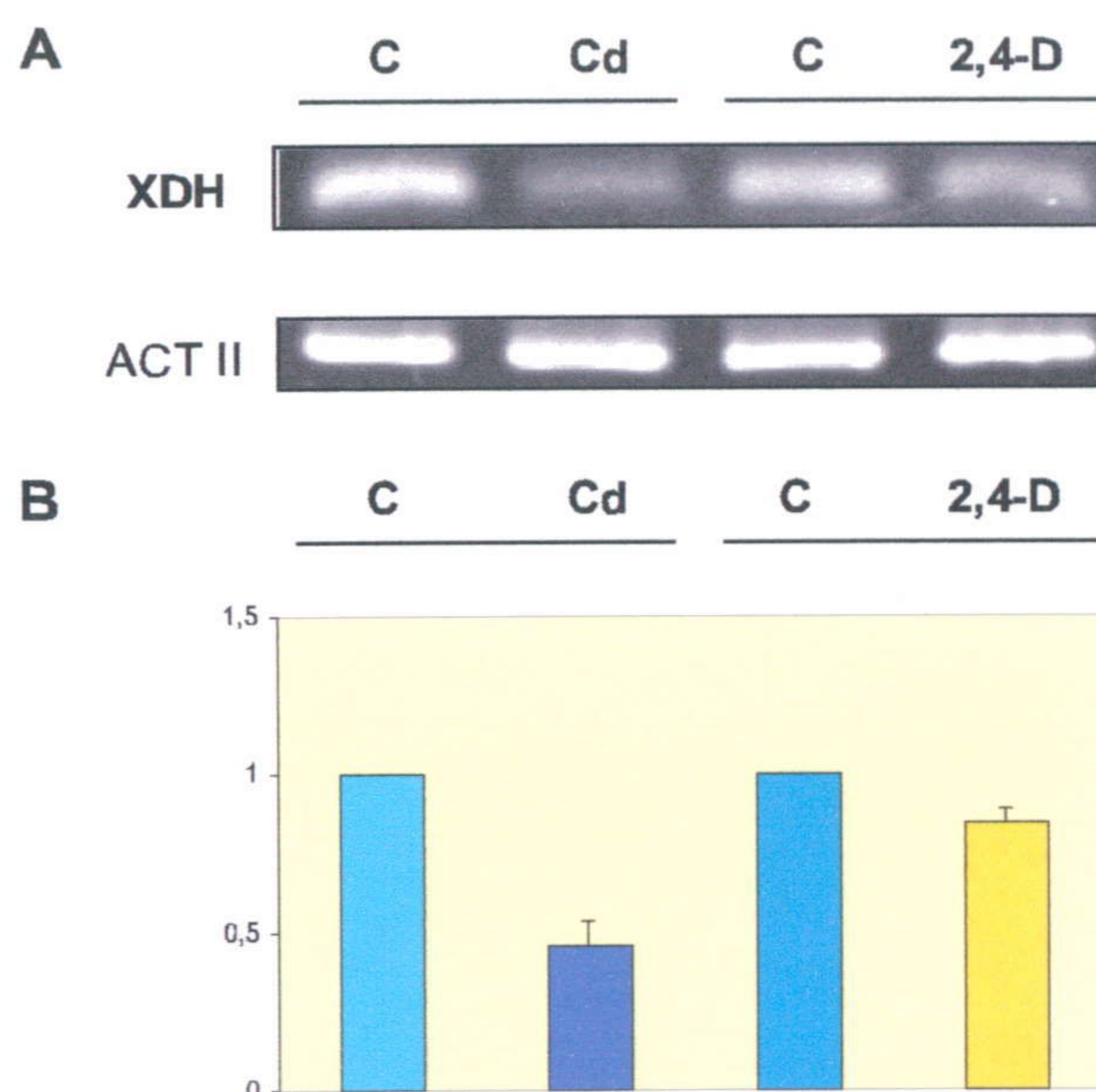


Fig. 4.26. RT-PCR semicuantitativa de la XDH de hojas de guisantes tratados con CdCl_2 50 mM y 2,4-D 22,6 mM. Se representa un experimento representativo de cinco independientes. A, análisis mediante electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0,8% y posterior tinción con bromuro de etidio. B, intensidad relativa de las bandas en el gel de agarosa con respecto a la intensidad de las bandas controles. XDH, xantina deshidrogenasa; ACT II, actina II.

Discusión

En esta Memoria doctoral se ha estudiado la producción de NO[•] endógeno de distintos tejidos de plantas de guisante durante el desarrollo postgerminativo, así como de hojas de plantas sometidas a distintas situaciones de estrés. A nivel subcelular, se ha caracterizado la actividad NOS de peroxisomas de hojas de guisante. Para realizar este trabajo se han utilizado aproximaciones bioquímicas, inmunológicas y moleculares.

Producción endógena de NO[•] durante el desarrollo postgerminativo

Aunque se conoce que el NO[•] participa en los procesos de crecimiento y desarrollo en plantas, no existen trabajos que aborden de una forma global el papel del NO[•] en los distintos tejidos de las plantas durante los primeros días de desarrollo. Además, la mayoría de estos trabajos se han realizado utilizando donadores de NO[•], y no midiendo la producción endógena de esta especie, a diferencia de la investigación que hemos abordado en esta Tesis Doctoral. Así, en estudios realizados administrando NO[•] exógeno, se ha demostrado que el óxido nítrico induce la elongación de las raíces (Gouvêa y col., 1997) y la aparición de raíces adventicias y laterales a través de mecanismos que involucrarían al ácido indolacético (IAA) (Pagnussat y col., 2002; Correa-Aragunde y col., 2004). Estos últimos autores midieron además la producción de NO[•] endógeno en raíces de 3 días, y observaron que esta especie se producía en los primeros estadios del desarrollo del primordio, dando lugar, posteriormente, a la aparición de una raíz lateral. De la misma manera, se ha observado que el NO[•] es un potente agente que detiene la dormancia y estimula la germinación de semillas y granos (Bethke y col., 2004). Recientemente se ha publicado un trabajo donde se mide la producción de NO[•] endógeno de ejes embrionarios de semillas de soja recién germinadas mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico (Simontacchi y col., 2004). Parece que existe un aumento importante en la producción de NO[•] endógeno justo en el momento de germinación de la planta, y que esta producción se debe tanto a actividad NOS como a la nitrato reductasa.

En raíces, nuestros datos muestran que durante los primeros días del desarrollo de la plántula, se observó un aumento de la producción de NO[•], dependiente de arginina,

al tercer día de crecimiento. En base a los estudios referidos anteriormente, quizá el NO \cdot sea decisivo en los primeros estadios del desarrollo de las raíces principal y laterales de plantas de guisante. El NO \cdot , generado a los tres días podría actuar a corto plazo, favoreciendo el crecimiento de las raíces y manteniéndolo durante varios días más, lo que explicaría el mayor tamaño de la raíz a los 9 días. De forma contraria, la bajada en la producción de NO \cdot a partir del 5 $^{\circ}$ día justificaría el menor tamaño de las raíces en las plántulas de 11 días.

El NO \cdot interviene de alguna manera en la biosíntesis de clorofila. Se ha demostrado que el NO \cdot favorece la desetiación de los cotiledones (Beligni y Lamattina, 2000), en un proceso dependiente de la luz. La administración de donadores de NO a hojas de plantas de patata infectadas con *Phytophthora infestans* revierte la pérdida de clorofila provocada por el hongo (Lazalt y col., 1997). Además, se ha comprobado que la administración de NO \cdot exógeno a bajas concentraciones induce la expansión de las hojas (Leshem y Haramaty, 1996). En guisante, en las condiciones de germinación favorables empleadas en nuestro diseño experimental, la desetiación podría tener lugar a partir del tercer día, momento en que se observa la mayor producción de NO endógeno. En dichas condiciones, el NO \cdot posiblemente también intervenga en el proceso de síntesis de clorofila a medio plazo, y por eso observamos una producción menor pero mantenida de NO \cdot durante los siguientes días analizados. Una producción de NO \cdot discreta y mantenida puede ser importante durante las primeras etapas del desarrollo de las hojas, favoreciendo el crecimiento de las mismas.

En nuestro caso, hemos observado que, a lo largo de todos los días analizados, la mayor producción de NO \cdot tiene lugar en tallos, existiendo un pico de producción de NO \cdot a los 7 y 9 días post-germinación. Se ha demostrado que NO \cdot aportado exógenamente inhibe la elongación del hipocotilo en plantas de *Arabidopsis* y de lechuga (Beligni y Lamattina, 2000), un proceso también regulado por la luz. En nuestras condiciones experimentales, observamos una elongación importante del hipocotilo hasta el 9 $^{\circ}$ día, y un crecimiento más moderado a partir de esa edad. Los bajos niveles de NO \cdot en los primeros días podrían estar relacionados con un crecimiento paralelo, mientras que los altos niveles de óxido nítrico detectados a partir del 7 $^{\circ}$ día podrían reducir la tasa de crecimiento que había experimentado el hipocotilo anteriormente. No obstante, y dado que influyen otros factores en el crecimiento tanto de la raíz como del hipocotilo, sería necesario un estudio más profundo para poder

asociar de manera fidedigna la tasa de producción de NO[•] con los parámetros de crecimiento en la etapa de la post-germinación.

Los datos obtenidos por análisis mediante microscopía confocal, utilizando el fluoróforo DAF-2 DA, corroboraron, por lo general, los resultados obtenidos mediante quimioluminiscencia de ozono. Así, se observó una mayor producción de NO[•] en la raíz principal de 3 días con respecto a las de 7 y 11 días, así como en los tallos de 7 días. En cuanto a la localización de los lugares de producción de óxido nítrico, el análisis de los cortes transversales obtenidos de raíz primaria, tallo y hojas, reveló que esta especie se producía principalmente en la epidermis y en el tejido vascular. La producción de NO[•] en células epidérmicas de hojas, y más concretamente, en los estomas, ya ha sido demostrada previamente (Foissner y col., 2000; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill y col., 2002c), así como en el tejido vascular y epidérmico de hojas de guisante (Gould y col., 2003; Corpas y col., 2004b). En raíces, se ha detectado actividad NADPH diaforasa en células del floema y del parénquima de *Lupinus albus* (Cueto y col., 1996), y actividad NOS en extractos de ápices de raíces de maíz (Ribeiro y col., 1999). Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún trabajo que haya estudiado la producción de NO en tallos, y, por tanto, nuestros datos constituyen la primera referencia a este respecto.

La presencia de NO[•] en el tejido vascular de todos los órganos de la planta durante estas primeras etapas del desarrollo, así como la propiedad de esta especie de actuar como molécula señal, puede apoyar la teoría de que este tipo de tejido, además de ser un sistema de transporte, interviene en los mecanismos de integración y comunicación entre los distintos órganos de la planta, como ya se apuntó anteriormente (Thompson and Schulz, 1999; Ruiz-Medrano et al., 2001). El reciente descubrimiento de que las señales oxidativas y nitrosativas en raíces pueden inducir cambios en la actividad y expresión de quinasas de las hojas (Capone y col., 2004) puede ser un buen ejemplo de esta teoría. Así, el NO[•] generado en el sistema vascular podría actuar integrando y regulando los distintos procesos fisiológicos que ocurren en los distintos órganos de la planta durante las primeras etapas del desarrollo postgerminativo.

Producción endógena de NO[•] en situaciones de estrés

En las hojas de las plántulas de guisante sometidas a distintos tratamientos se midieron las actividades de dos enzimas de la fotorrespiración, la glicolato oxidasa (GOX) y la hidroxipiruvato reductasa (HPR), así como de la enzima antioxidante catalasa (CAT),

para establecer cómo afectaban estos tratamientos al metabolismo de las plantas. La actividad de la GOX, primera enzima de la fotorrespiración, aumentó con los tratamientos de frío y oscuridad, y disminuyó con el choque de calor y con la alta intensidad lumínica, mientras que la HPR, enzima del final de la ruta, apenas sufrió cambios con los distintos tratamientos. El aumento de la actividad GOX en las hojas sometidas a los tratamientos de frío y oscuridad produciría un aumento en los niveles de H_2O_2 en el peroxisoma, el cual podría ser descompuesto por la catalasa en condiciones de oscuridad en las que la actividad CAT aumentó. No obstante, en las hojas sometidas al tratamiento de frío la actividad CAT no varió con respecto al control, por lo que este tratamiento podría propiciar un aumento de la concentración de H_2O_2 en los peroxisomas, y quizá actuar como molécula señal en otros lugares celulares (Corpas y col., 2001). Este aumento de la actividad GOX por el tratamiento de baja temperatura concuerda con trabajos que describen una mayor concentración de H_2O_2 intracelular en plantas sometidas a este tipo de estrés (Okuda y col., 1991; Kingston-Smith y col., 1999).

Se conoce que los estreses ambientales producen un aumento de especies de oxígeno reactivo (ROS) en las plantas. Estas especies aumentan considerablemente en respuesta a varios estreses como son la alta temperatura, estrés hídrico, salinidad, radiación ultravioleta, daño mecánico, temperaturas extremas, metales pesados, ozono, herbicidas y patógenos (Foyer y col., 1994; Alscher y col., 1997). Por el contrario, se conoce bastante menos acerca de la función de las especies de nitrógeno reactivo (RNS) en la respuesta de las plantas frente a distintos tipos de estrés. En base a ello, consideramos de gran interés el estudio de la producción de NO endógeno en hojas de plantas de guisante sometidas a distintos tratamientos.

Parece que la temperatura puede modular la producción de NO \cdot endógeno en las plantas de guisante, puesto que se detectó un descenso de la actividad NOS en las hojas de las plantas sometidas a tratamiento de calor y un aumento considerable en las sometidas a baja temperatura. En plántulas de alfalfa sometidas a un estrés corto de alta temperatura se ha observado un aumento en la emisión de NO \cdot (Leshem y col., 1998). En cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* se ha demostrado recientemente que altas temperaturas producen una elevación rápida de la concentración de NO \cdot (Gould y col., 2003). Sin embargo, en plantas de tomate, trigo y maíz, el óxido nítrico favorece la resistencia al frío (Lamattina y col., 2001). La diferente respuesta de las distintas

especies vegetales frente a temperaturas extremas podría deberse a la duración del estrés y/o a la propia especie.

En las hojas de las plántulas de guisante sometidas a un estrés por alta intensidad lumínica, detectamos un aumento en la producción de NO[•] endógeno. Estos datos concuerdan con los obtenidos en un estudio en el que se utilizaron plantas completas de varias especies expuestas a una irradiación elevada, donde se observó un aumento en la emisión de NO[•] (Wildt y col., 1997). Sin embargo, en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum*, utilizando el fluoróforo DAF-2 DA, se comprobó que el estrés por luz no causaba cambios en la concentración de NO[•] intracelular (Gould y col., 2003), aunque el tiempo de exposición y la intensidad de la luz suministrada fueron diferentes a las utilizadas en nuestras condiciones experimentales.

En nuestro diseño experimental, la alteración del ritmo circadiano de la planta no parece influir en la producción de NO endógeno. Los tratamientos con luz y oscuridad continuas durante 48 horas no causaron cambios en la actividad NOS de hojas de guisante. Por el contrario, se ha observado que la luz inhibe la producción de NO[•] en hojas de girasol y en cultivos celulares de algas verdes (Mallick y col., 2000; Rockel y col. 2002; Sakihama y col., 2002).

En las plántulas sometidas a daño mecánico observamos una disminución en la producción de NO[•]. Hay trabajos que presentan resultados contradictorios en cuanto a la producción de óxido nítrico en relación al daño mecánico. Lo que sí parece demostrado es que el NO[•] interviene como modulador en la respuesta a este estrés. Así, en tomate, el daño mecánico *per se* no indujo la producción de NO[•], pero la aplicación de esta especie de manera exógena disminuyó la producción de H₂O₂ y la expresión de los genes de defensa que se inducen por herida durante la patogénesis (Orozco-Cárdenas y Ryan, 2002). El daño mecánico en hojas de tabaco tampoco causó cambios aparentes en la concentración de NO[•] intracelular (Gould y col., 2003). Sin embargo, el estrés mecánico en *Kalanchoë daigremontiana* y *Taxus brevifolia* indujo la síntesis de NO[•] a través de una actividad NOS (Pedroso y col., 2000). También se observó un aumento de NO[•] en *Arabidopsis thaliana* tras un estrés mecánico (Garcês y col., 2001), aunque recientemente se ha observado una “explosión” de NO[•] en células epidérmicas de las hojas de esta especie en los 10 minutos posteriores al daño mecánico (Huang y col., 2004). La inducción de la síntesis de NO[•] podría ser una respuesta inmediata de la planta tras un daño mecánico, al igual que ocurre con las especies de oxígeno reactivo (ROS)

(Kessler y Baldwin, 2002), y actuaría regulando las rutas de señalización del ácido salicílico y jasmónico (Huang y col., 2004).

Sistemas de generación de NO \cdot en hojas de guisante

Para abordar este objetivo se plantearon varias aproximaciones: molecular, mediante el análisis de secuencias de NOS de animales; inmunológica, mediante el empleo de anticuerpos que reconocen a la NOS animal; y bioquímica, por determinación de actividad NOS.

Desde que se identificó a las NOSs como las enzimas responsables de la síntesis de NO en animales (Moncada y col., 1991; Nathan y Xie, 1994) muchos grupos han tratado de encontrar su enzima homóloga en plantas. Los primeros datos apuntaban a la existencia en plantas de una enzima similar a las NOS animales, a la luz de los datos obtenidos de actividad NOS dependiente de L-arginina en distintas especies vegetales (Cueto y col., 1996; Ninneman y Maier, 1996). Asimismo, en ensayos de transferencia de western en los que habían empleado distintos anticuerpos frente a las NOSs se habían detectado bandas inmunorreactivas cuyos tamaños coincidían, en algunos casos, con los descritos para las NOS de animales (Kuo y col., 1995; Sen y Cheema, 1995; Ribeiro y col., 1999).

Sin embargo, a pesar del esfuerzo de muchos grupos por intentar clonar o purificar dicha enzima similar a las NOSs, hasta la fecha no se ha conseguido. El análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* revela que no existe ninguna proteína con semejanza a ninguna NOS conocida. Por eso, muchos grupos empezaron a pensar que quizá en plantas, la enzima responsable de la síntesis de NO \cdot sería otra enzima completamente distinta a las NOSs de animales. De hecho, las dos enzimas identificadas recientemente en plantas capaces de sintetizar NO \cdot , la variante de la proteína P del complejo GDC (Chandock y col., 2003) y la AtNOS1 de *Arabidopsis thaliana* (Guo y col., 2003), no presentan ningún grado de identidad con las NOSs de animales.

En nuestro caso, intentamos clonar, a partir de ADNc de hojas de guisante, una enzima similar a la iNOS de animales utilizando parejas de cebadores degeneradas, diseñadas en base a secuencias muy conservadas entre distintas iNOS animales. Para llevar a cabo los ensayos de PCR, optamos por una estrategia *Touch-down*, que se realiza especialmente en los casos donde las parejas de cebadores utilizadas son degeneradas, ya que se aumenta la probabilidad de que dichos cebadores encuentren una

región de unión al ADN. Aún así, no conseguimos clonar en guisante ningún ADNc cuya proteína guarde similitud con ninguna NOS animal, lo cual quizá confirma que, al igual que en *Arabidopsis thaliana*, en guisante no existe ninguna proteína similar a la proteína animal.

Los ensayos inmunológicos vinieron a confirmar la ausencia de identidades entre las NOSs animales y las proteína productoras de NO[•] en plantas. El análisis por transferencia de western de la iNOS de macrófagos de ratón en el que se emplearon los antisueros obtenidos frente al péptido PT387, correspondiente a los últimos catorce aminoácidos (residuos 1131 a 1144) del extremo carboxilo terminal de la secuencia deducida de la iNOS de macrófagos de ratón (Uttenthal y col., 1998) reveló la existencia de una única banda de 130 kDa. Los antisueros obtenidos fueron, por lo tanto, específicos para la detección inmunológica de la iNOS.

El análisis de la inmunorreactividad de los anticuerpos frente a la iNOS en extractos de plantas de guisante mostró un patrón de bandas que era común en todos los órganos, excepto en raíz, aunque algo diferente al obtenido en macrófagos de ratón, ya que, aparte del polipéptido de 130 kDa, se detectó otro de 69 kDa. La banda de 130 kDa sólo se detectó de manera clara en semillas, vainas y nódulos y, en estas condiciones, de revelado, no fue visible en raíces, tallos y hojas. En estudios realizados por otros autores con anticuerpos se ha obtenido también cierta variabilidad de masas moleculares. Así, El análisis de extractos de hojas jóvenes y raíces de maíz con anticuerpos frente a la iNOS y la nNOS reveló la existencia de una banda inmunorrelacionada de 160 kDa (Ribeiro y col., 1999), así como de otras minoritarias de 103-109 y 51 kDa, que los autores postulan que son debidas a un proceso de degradación de la proteína, al igual que se ha descrito previamente que les ocurre a las NOS (Springall y col., 1992). En cualquier caso, en estudios de identificación de proteínas de maíz mediante una aproximación proteómica en la que se han empleado anticuerpos comerciales frente a la NOS de mamíferos, tampoco se ha logrado identificar ninguna proteína que comparta alguna similitud con ellas en plantas (Butt y col. 2003).

La presencia de la banda de 69 kDa, especialmente intensa, en nódulos, tanto jóvenes como senescentes, y su ausencia en raíces parece indicar que este polipéptido podría ser fundamental en la asociación de la planta con microorganismos edáficos. No obstante, en las condiciones actuales aún no podemos precisar si dicho polipéptido es producto del genoma de la planta o de la bacteria. No obstante, considerando el patrón observado en los órganos aéreos de la planta, es muy probable que el polipéptido de los

Discusión

nódulos sea producto del genoma de guisante, y que se induzca en las raíces en situaciones “anómalas”. En cualquier caso, la presencia de este polipéptido en los nódulos nos induce a pensar que posiblemente esté asociado a la respuesta hipersensible en situaciones de patogenicidad y, por tanto, podría estar implicado en los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, esto es una hipótesis que aún no hemos confirmado.

Con el fin de caracterizar la posible naturaleza de los polipéptidos que reaccionaban con el anticuerpo de la iNOS, se llevaron a cabo ensayos con plantas cultivadas en distintas condiciones y en la transferencia de western se emplearon tiempos más largos de revelado. En los homogenados de dichos experimentos se obtuvieron bandas inmunorreactivas de 112, 69, 60 y 45 kDa de masa molecular. El polipéptido de 60 kDa, aparte de una relación inmunológica, podría tener alguna similitud funcional con la NOS, ya que se intensifica en las hojas de plántulas incubadas con L-arginina, y se inhibe con el tratamiento con aminoguanidina, un inhibidor conocido de las NOSs animales. La mayor intensidad de los polipéptidos de 112 y 69 kDa en los homogenados de hojas realizados con los cofactores de la NOS en el tampón de homogenización puede indicar que quizá dichas proteínas podrían tener alguna relación con las NOSs, al igual que se indicó anteriormente para el polipéptido de 60 kDa. Además, este polipéptido junto con el de 69 kDa mostraban un comportamiento parecido a la actividad NOS medida en los extractos de plantas de guisante sometidas al frío y a alta intensidad lumínica. Ambos polipéptidos eran más abundantes y la actividad NOS aumentaba en dichas condiciones frente a las plantas control. Por el contrario, no se observó esa correspondencia entre la actividad NOS y la transferencia de western en condiciones de alta temperatura.

La ausencia de datos a nivel molecular e inmunológico contrasta con los resultados bioquímicos que apuntan a la existencia inequívoca de una actividad NOS en las hojas de guisante. Mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y microscopía láser confocal utilizando el fluoróforo DAF-2 DA se ha demostrado que las hojas de guisante son capaces de producir NO[•] endógeno. Además, mediante quimioluminiscencia de ozono, se ha podido determinar que la actividad NOS de hojas de guisante es de unos 0.5 nmol NO[•] · min⁻¹ · mg⁻¹ proteína.

La capacidad de las hojas de producir NO[•] ha sido demostrada en distintas especies vegetales. Los primeros trabajos sobre la emisión de NO[•] por plantas y su efecto sobre el crecimiento se realizaron en los años 70 (Anderson y Mansfield, 1979;

Klepper, 1979). Sin embargo, no fue hasta los años 90 cuando se descubrió que el NO[•] en plantas actúa como una molécula señal, mediadora de procesos fisiológicos tan importantes como el crecimiento y la senescencia (Leshem y Haramaty, 1996). Desde entonces, numerosos trabajos han apuntado la capacidad de las hojas de plantas de producir NO[•] a través de una actividad NOS. En células epidérmicas de hojas de *Nicotiana tabacum* se ha demostrado la producción de óxido nítrico sensible a inhibidores de NOS (Foissner y col., 2000). Se ha descrito también la presencia de una actividad NOS dependiente de L-arginina en hojas maduras de *Nicotiana tabacum* (Durner y col., 1998), en hojas jóvenes de *Zea mays* (Ribeiro y col., 1999) y en cotiledones de *Glycine max* (Modolo y col., 2002).

Proteínas de peroxisomas inmunorelacionadas con la NOS animal

Los estudios de localización inmunocitoquímica mostraron a los peroxisomas como un compartimento que podía ser fundamental en la bioquímica del NO[•] en las hojas. Se decidió, por tanto, investigar la producción de NO[•] así como los sistemas generadores de dicha especie en estos orgánulos,

El análisis por transferencia de western de los peroxisomas aislados utilizando anticuerpos frente a distintas metaloproteínas (APX, CAT, MDHAR, G6PDH; resultados no mostrados) y frente a la iNOS reveló la ausencia de correspondencia entre los respectivos patrones de bandas polipeptídicas, excepto cuando se empleó un anticuerpo frente a la XOD de rata. En este último caso se obtuvo una banda de 59 kDa, próxima en tamaño a la de 60 kDa reconocida por los anticuerpos de la iNOS en nuestros peroxisomas. Se han descrito otros casos en los que se han detectado polipéptidos similares de la XOD al observado por nosotros en los peroxisomas de hojas de guisante (Nishino 1994; Distefano et al 1999), así como en estudios de transferencia e inmunodetección de la XDH purificada de semillas de guisante (Sauer y col., 2002). Es probable que esta banda sea producto de degradación de la XOR a consecuencia del proceso de purificación, ya que la enzima nativa es un homodímero de alrededor de 300 kDa de peso molecular.

Se podría pensar también que la banda 60 kDa es producto de degradación proteolítica de otra de mayor tamaño, próxima a los 130 kDa característica de la iNOS. No obstante, los ensayos de degradación de la NOS comercial incubada con los peroxisomas de hojas de guisante no hacen pensar que en nuestros resultados haya influido tal mecanismo. Es de resaltar en este caso que el patrón de degradación de la

Discusión

NOS por parte de las proteasas peroxisomales es muy similar al observado en ensayos de proteólisis de la XOD tanto exógena como del propio orgánulo (Distefano y col., 1999; Corpas y col., 2004c).

Por otro lado, nuestros resultados de inmunolocalización por microscopía electrónica y confocal confirmaron la presencia en peroxisomas de hojas de guisante de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS. En animales, a nivel subcelular, se ha descrito la presencia de actividad NOS en la membrana de mitocondrias aisladas de hígado de rata (Tatoyan y Giulivi, 1998) y, mediante inmunolocalización por microscopía electrónica y láser confocal, se ha localizado en peroxisomas de hepatocitos y de células de Kupffer de rata (Stolz y col., 2002). En plantas, hasta ahora, tan sólo se han localizado proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS en el núcleo de células pertenecientes a la zona de elongación de ápices de raíces de maíz (Ribeiro y col., 1999).

También se ha estudiado la localización subcelular de la variante P del complejo glicina descarboxilasa (GDC) que recientemente se ha demostrado que es capaz de producir NO^{\cdot} (Chandok y col., 2003). El complejo GDC ya había sido ubicado en mitocondrias (Husic y col., 1987) y, efectivamente, nuestros resultados mostraron que el marcaje con oro coloidal obtenido con los anticuerpos frente a las proteínas P y H del complejo GDC apareció localizado exclusivamente en las mitocondrias de hojas de guisante. Esto unido a la ausencia de actividad NOS, dependiente de arginina en las mitocondrias (Barroso y col. 1999) indicaría que la variante de la proteína P no es el sistema generador de óxido nítrico en las hojas de guisante.

Chandock y col. (2003) discuten la posibilidad de que la variante de la proteína P no esté localizada en mitocondrias, ya que existen secuencias necesarias para la síntesis de NO^{\cdot} y la unión de CaM en el péptido de transición, que es, en teoría, eliminado cuando la proteína se inserta en la mitocondria. Aunque pudiera ocurrir que, en este caso, el péptido de transición no fuera eliminado, como se ha descrito que ocurre para un factor de transcripción presente en mitocondrias de levadura (Biswas y Getz, 2002).

La NR, descrita también como enzima capaz de producir NO^{\cdot} en plantas, se localizó en citosol, mitocondrias y membrana plasmática (Rockel y col., 2002). Esta enzima ha sido muy estudiada, ya que cataliza el primer paso de la asimilación del nitrógeno, siendo en muchos casos la reacción limitante en dicho proceso. Se conoce las características estructurales y funcionales, así como la regulación por distintos estímulos

medioambientales de la NR (Campbell, 1999; Kaiser y col., 1999). Sin embargo, aún se desconoce su localización subcelular precisa, aunque se ha descrito la existencia de una nitrato reductasa unida a membrana plasmática en *Chlorella* (Stöhr y col., 1995a,b). En la membrana plasmática de raíces de tabaco se ha descrito la presencia de una nitrito:NO reductasa (Ni-NOR) capaz de producir NO[•] (Stöhr y col., 2001), pero es una enzima distinta a la nitrato reductasa unida a membrana (NR-PMP).

Por último, en los estudios de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo frente a la XOD de rata, el marcaje con oro coloidal apareció localizado en cloroplastos y peroxisomas, de manera coincidente al obtenido con el anticuerpo de la iNOS. En animales, la localización subcelular de la XOR ha sido muy controvertida, habiéndose detectado en el citosol y en el exterior de la membrana plasmática (Rouquette y col., 1997), así como en peroxisomas (Angermuller y col., 1987; Dikov y col., 1988). En plantas, sin embargo, no existen trabajos sobre la localización subcelular de la XOR.

La XOR podría ser una enzima candidata a producir NO[•] en nuestro sistema vegetal. En animales se ha descrito recientemente que es capaz de producir NO[•] en condiciones de baja tensión de oxígeno y utilizando nitrato como sustrato (Harrison, 2002). En plantas, se conoce la presencia de actividad xantina oxidorreductasa principalmente en su forma deshidrogenasa (XDH), desde los años 70, y se ha detectado en numerosas especies vegetales (Sauer y col., 2002). Se ha demostrado la presencia de esta actividad en peroxisomas de hojas de guisante (Sandalio y col., 1988; Corpas y col., 1997; Corpas et al., 2004c), aunque, en plantas, se conoce poco acerca de la regulación de esta enzima. Por ello, nos planteamos estudiar su regulación en las plantas sometidas a los distintos tratamientos ya descritos anteriormente, e intentamos correlacionarla con la actividad NOS en dichas condiciones.

El análisis de los resultados de actividad XOR de las hojas de plántulas sometidas a distintos tipos de tratamientos no coincidió en su mayoría con los cambios en la producción de NO[•] detectados en estas plántulas. Los únicos datos coincidentes aparecieron en el caso del tratamiento con frío, donde aumentó tanto la expresión, como la cantidad de proteína y la actividad en geles de la XOR, y también aumentaron los niveles de actividad NOS. Hay que tener en cuenta que en las hojas se determinó el NO[•] total, y que en esta producción pueden estar participando varias enzimas distintas, cuya regulación o modificación por estos tratamientos no tiene por qué ser idéntica.

Una de las posibles explicaciones para la no coincidencia de los datos de actividad, proteína y expresión de la XOR en los distintos tratamientos es que en el caso

de la PCR semicuantitativa y del Northern, estamos detectando la cantidad de ARNm de una de las isoformas de la XDH, y es probable que en guisante existan más isoformas, al igual que se ha descrito recientemente en *Arabidopsis thaliana* (Hesberg y col., 2004). Por otro lado, puede ocurrir que cada isoenzima presente una regulación distinta frente a los distintos tratamientos realizados. Finalmente, otra posible explicación es que en los casos en los que disminuye la expresión, la enzima se encuentre regulada a nivel post-transcripcional.

En las hojas de las plantas tratadas con cadmio y 2,4-D se produjo una disminución de los niveles de expresión de la XDH en torno al 54% y al 16%, respectivamente. Por el contrario, se ha comprobado que dichos tratamientos aumentan la actividad XOR de peroxisomas de hojas de guisante (Romero-Puertas y col., 1999; McCarthy, 2004), por lo que en dichas condiciones de estrés abiótico parece que existen también una regulación post-transcripcional. En cualquier caso, los resultados presentados hasta ahora sobre el comportamiento del sistema de la XOR y de la actividad NOS en las diferentes condiciones ensayadas no hacen pensar que la XOR sea responsable del NO[•] generado en los hojas de guisante, aunque tampoco permiten descartar esa posibilidad.

Lo que sí está claro es la existencia de actividad NOS de naturaleza enzimática y dependiente de arginina en los peroxisomas de hojas de guisante, ya que, como hemos comprobado, detectamos un aumento lineal de la producción de L-[³H]-citrulina proporcional a la cantidad de proteína peroxisomal en la mezcla de reacción. Además, la cantidad de L-[³H]-citrulina formada dependió del tiempo de incubación de la muestra. Esta técnica ha sido reconocida como apropiada para la detección de actividad NOS en plantas y, de hecho, se empleó en los primeros trabajos que demostraron dicha actividad en plantas (Cueto y col., 1996; Ninnemann y Maier, 1996) y, posteriormente, se ha utilizado para detectarla en tabaco (Durner y col., 1998), en maíz (Ribeiro y col., 1999) y en cotiledones de soja (Modolo y col., 2002).

Producción de NO[•] en peroxisomas

Una vez demostrada la existencia de proteínas inmunorrelacionadas con la iNOS y la producción de NO[•] en hojas de guisante, nos propusimos comprobar si los peroxisomas son capaces de producir esta especie como metabolito endógeno, dado que estos orgánulos son también una fuente importante de ROS (del Río y col., 2003). Aunque se ha descrito la producción de NO[•] en el citosol y el núcleo de células de raíces (Ribeiro y

col., 1999) y en el cloroplasto, el núcleo y el citosol de células de tabaco (Gould y col., 2003), hasta la fecha no existe ningún trabajo sobre la producción de NO[•] en ningún orgánulo celular aislado de células vegetales.

Se ha demostrado que la espectroscopía de EPR para determinar la formación directa de NO[•], utilizando la trampa Fe(MGD)₂, es un método muy preciso y específico, y se considera una evidencia inequívoca de su presencia en el sistema biológico analizado (Kotake et al., 1996; Xia et al., 2000; Nagano and Yoshimura, 2002).

En peroxisomas aislados de hojas de guisante hemos detectado la producción de NO[•] mediante esta técnica, ya que se obtuvo un espectro similar al de la NOS pura (nNOS) utilizada como control positivo (Xia y Zweier, 1997). Además, esta producción podría ser dependiente de algún compuesto que muestra actividad NOS, ya que la señal detectada se inhibió por L-NAME, un inhibidor de NOS animales, y también disminuyó considerablemente cuando se eliminó de la mezcla de reacción el NADPH (sustrato de las NOS).

En plantas, utilizando esta misma técnica, se ha demostrado la producción de NO en homogenados de ejes embrionarios de soja (Caro y Puntarulo, 1999), en explantos de pepino (Pagnussat y col., 2002), en cultivos de células de maíz (Dordas y col., 2004), en *Arabidopsis* (Huang y col., 2004) y en semillas de *Sorghum bicolor* (Simontacchi y col., 2004).

La débil señal detectada en los peroxisomas podría deberse a varias razones. La producción enzimática de NO[•] en peroxisomas puede que no sea muy elevada, tal y como se ha descrito en animales para las NOSs constitutivas (Joshi y col., 1999). Otra posibilidad puede ser la afinidad del NO[•] por el hierro de proteínas que contienen el grupo hemo (Sharma et al., 1987; Kanner et al., 1992). La catalasa, enzima mayoritaria de peroxisomas, es una hemoproteína, y puede unir NO[•], e incluso catalizar su rotura en presencia de H₂O₂ (Brown et al., 1995), por lo que la señal detectada no reflejaría el NO[•] total formado realmente en los peroxisomas. Además, tanto las matrices como las membranas de los peroxisomas presentan sistemas que generan O₂^{•-} dependientes de NADP(H) (del Río et al., 1989; López-Huertas et al., 1999). El aducto NO-Fe(MGD)₂ es capaz de reaccionar con los radicales O₂^{•-} y formar especies que no generan señal en el EPR (Nagano and Yoshimura, 2002).

Asimismo, se detectó la presencia de NO[•] en peroxisomas aislados de hojas de guisante mediante análisis fluorimétrico, empleando DAF-2 DA como fluoróforo. Utilizando esta técnica, se ha detectado la producción de NO[•] en distintos sistemas

animales y vegetales (Nakatsubo y col., 1998; Nagano, 1999; Nagano y Yoshimura, 2002). Además, en células vegetales, el análisis con el fluoróforo DAF-2 DA se ha utilizado para obtener imágenes de la producción de NO \cdot a tiempo real (Foissner y col., 2000; Pedroso y col., 2000; García-Mata y Lamattina, 2002; Neill y col., 2002c).

El aumento de la fluorescencia relativa debida al DAF-2 T, producto de la reacción del NO \cdot con el DAF-2 DA, se correlaciona de forma positiva con el aumento de la cantidad de proteínas peroxisomales en la mezcla de reacción, lo cual nos indica que el óxido nítrico tiene probablemente un origen enzimático. Además este NO \cdot podría ser originado por una actividad de tipo NOS, ya que la fluorescencia se inhibió incubando la muestra con aminoguanidina (AG), inhibidor genérico de NOS animales, y también disminuyó cuando se eliminó la L-arginina de la mezcla de reacción o se desnaturalizó previamente la muestra.

Mediante la técnica de detección de NO \cdot por quimioluminiscencia de ozono se confirmó la presencia de actividad NOS en peroxisomas de hojas de guisante, y se caracterizaron sus requerimientos mínimos. La actividad NOS de peroxisomas requiere L-arginina y NADPH como sustratos de la reacción, al igual que las NOS de animales. Además, esta actividad necesita como cofactores calcio (Ca $^{2+}$), calmodulina (CaM) y tetrahydropterina (BH $_4$), al igual que las NOS constitutivas de animales (nNOS y eNOS), en contraposición a la iNOS, cuya actividad es independiente de Ca $^{2+}$ y de CaM.

La velocidad máxima de producción de NO \cdot a partir de L-arginina en peroxisomas de hojas de guisante resultó ser de 5,4 nmoles de NO \cdot \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ proteína. Esta actividad específica es muy similar a la obtenida para la proteína AtNOS1 de *Arabidopsis* (Guo y col., 2003), aunque esta última no depende de los cofactores BH $_4$, FAD y FMN. La actividad específica de la variante de la proteína P del complejo GDC es de unos 20-47 μ moles de NO \cdot \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ proteína (Chandock y col., 2003), bastante mayor con respecto a la obtenida en los peroxisomas, y requiere como cofactores BH $_4$, FAD, Ca $^{2+}$ y CaM. Se utilizaron, además, distintos inhibidores específicos, tanto de la AtNOS1 como de la proteína P, en la técnica de quimioluminiscencia de ozono, y se comprobó que la actividad NOS detectada en peroxisomas no era debida a una contaminación en el proceso de purificación de los peroxisomas, ya que la actividad no se vió afectada por dichos inhibidores. Por tanto, el sistema enzimático generador de NO \cdot de los peroxisomas de hojas de guisante no es ninguno de estos sistemas caracterizados hasta ahora en plantas.

Función de los peroxisomas en la señalización por NO•

La detección de NO• mediante estas dos técnicas demuestra de forma inequívoca la capacidad de los peroxisomas de hojas de guisante de sintetizar NO•, y que esta síntesis tiene lugar, probablemente, a través de una actividad NOS dependiente de L-arginina y de NADPH. El NADPH sería suministrado por las NADP-deshidrogenasas presentes en la matriz peroxisomal (Corpas y col., 1998b, 1999). Según se muestra en la Figura 5.1. el óxido nítrico producido por la reacción enzimática de la NOS puede reaccionar con radicales O₂⁻ generados en la matriz por la xantina oxidasa (XOD) para formar peroxinitrito, y éste regularía la conversión de XDH en XOD (del Río y col., 2003). Además, bajo algunas circunstancias, como en ausencia de L-arginina y en presencia de altas concentraciones de lipoproteínas o de algunos xenobióticos, las NOSs son capaces de producir O₂⁻ (Pou y col., 1992; Darley-Usmar y col., 1992; Vasquez-Vivar y col., 1997; Xia y col., 1998) y, por lo tanto, son capaces de producir ellas mismas el anión peroxinitrito.

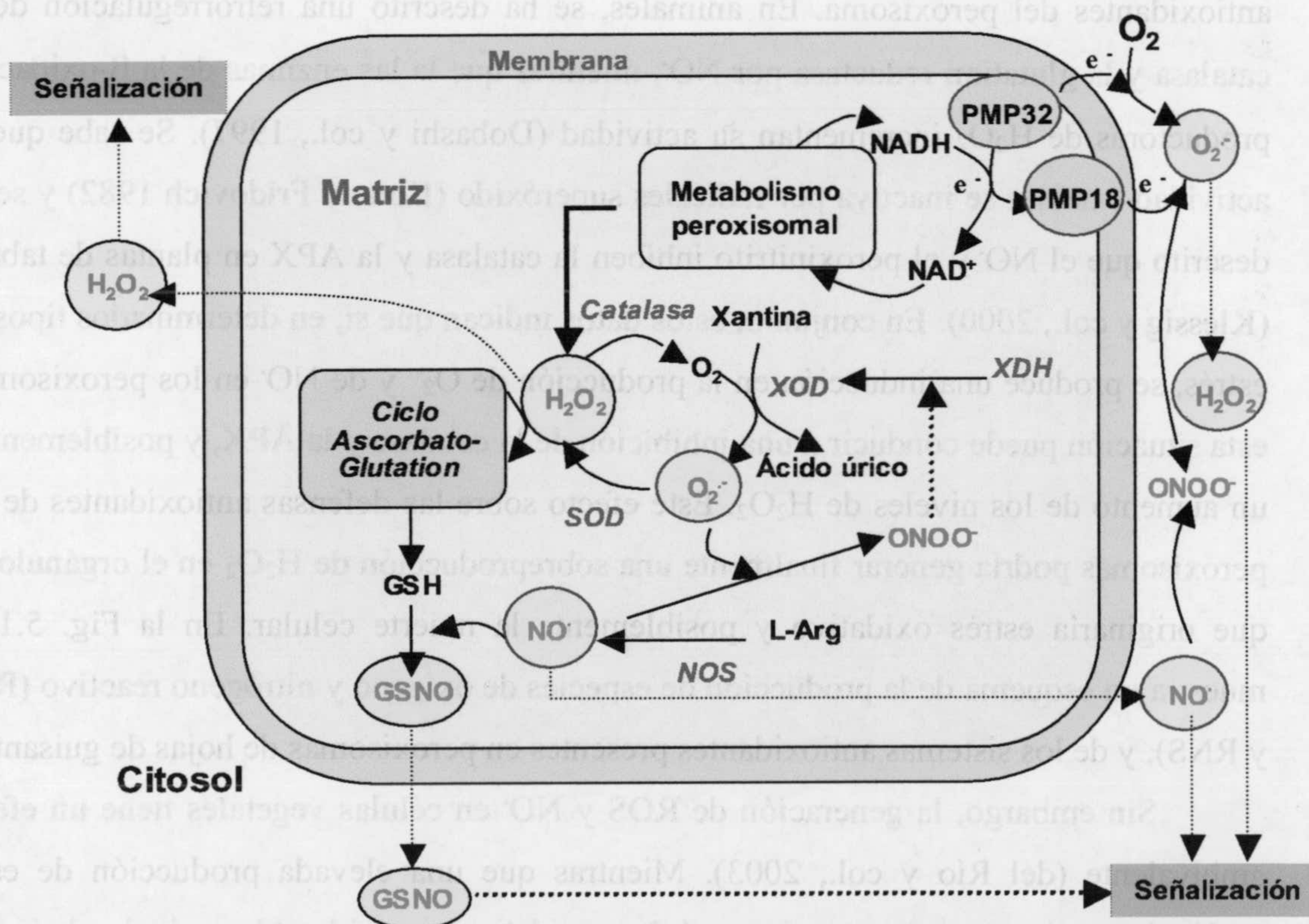


Fig. 5. 1 Producción de ROS y RNS en peroxisomas de hojas de guisante. PMP: proteína de membrana peroxisómica; GSH: glutatión; GSNO: nitrosoglutatión; NOS: óxido nítrico sintasa; XDH: xantina deshidrogenasa; XOD: xantina oxidasa

Por otro lado, el NO^\bullet , en presencia de O_2 puede reaccionar con glutathion reducido (GSH), también presente en los peroxisomas (Jiménez y col., 1998), para formar *S*-nitrosoglutation (GSNO), otra especie de nitrógeno reactivo (Halliwell y Gutteridge 2000). Además, el GSNO se podría formar también por la reacción de GSH con peroxinitrito (Halliwell y Gutteridge 2000). En sistemas animales, se ha descrito que el GSNO actúa como un transportador inter e intracelular de NO^\bullet , mientras que en plantas el GSNO es un potente inductor de los genes de defensa (Durner et al., 1998). Según han propuesto Klessig y colaboradores (2000), el GSNO podría funcionar como una molécula señal a larga distancia transportando NO^\bullet unido al glutathion por toda la planta. En este mecanismo, los peroxisomas de hojas participarían mediante la producción endógena de GSNO que podría difundir al citosol.

Por otro lado, el NO^\bullet puede difundir a través de la membrana peroxisomal hacia el citosol, donde reaccionaría con los radicales superóxido producidos en la cara citosólica de la membrana, generándose directamente el peroxinitrito en el citosol. Sin embargo, no se puede descartar que tenga lugar una modulación por NO^\bullet de las enzimas antioxidantes del peroxisoma. En animales, se ha descrito una retroregulación de la catalasa y la glutathion reductasa por NO^\bullet , mientras que las enzimas de la β -oxidación productoras de H_2O_2 incrementan su actividad (Dobashi y col., 1997). Se sabe que la actividad catalasa se inactiva por radicales superóxido (Kono y Fridovich 1982) y se ha descrito que el NO^\bullet y el peroxinitrito inhiben la catalasa y la APX en plantas de tabaco (Klessig y col., 2000). En conjunto, estos datos indican que si, en determinados tipos de estrés, se produce una inducción en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y de NO^\bullet en los peroxisomas, esta situación puede conducir a una inhibición de la catalasa y la APX, y posiblemente a un aumento de los niveles de H_2O_2 . Este efecto sobre las defensas antioxidantes de los peroxisomas podría generar finalmente una sobreproducción de H_2O_2 en el orgánulo, lo que originaría estrés oxidativo y posiblemente la muerte celular. En la Fig. 5.1 se muestra un esquema de la producción de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS), y de los sistemas antioxidantes presentes en peroxisomas de hojas de guisante.

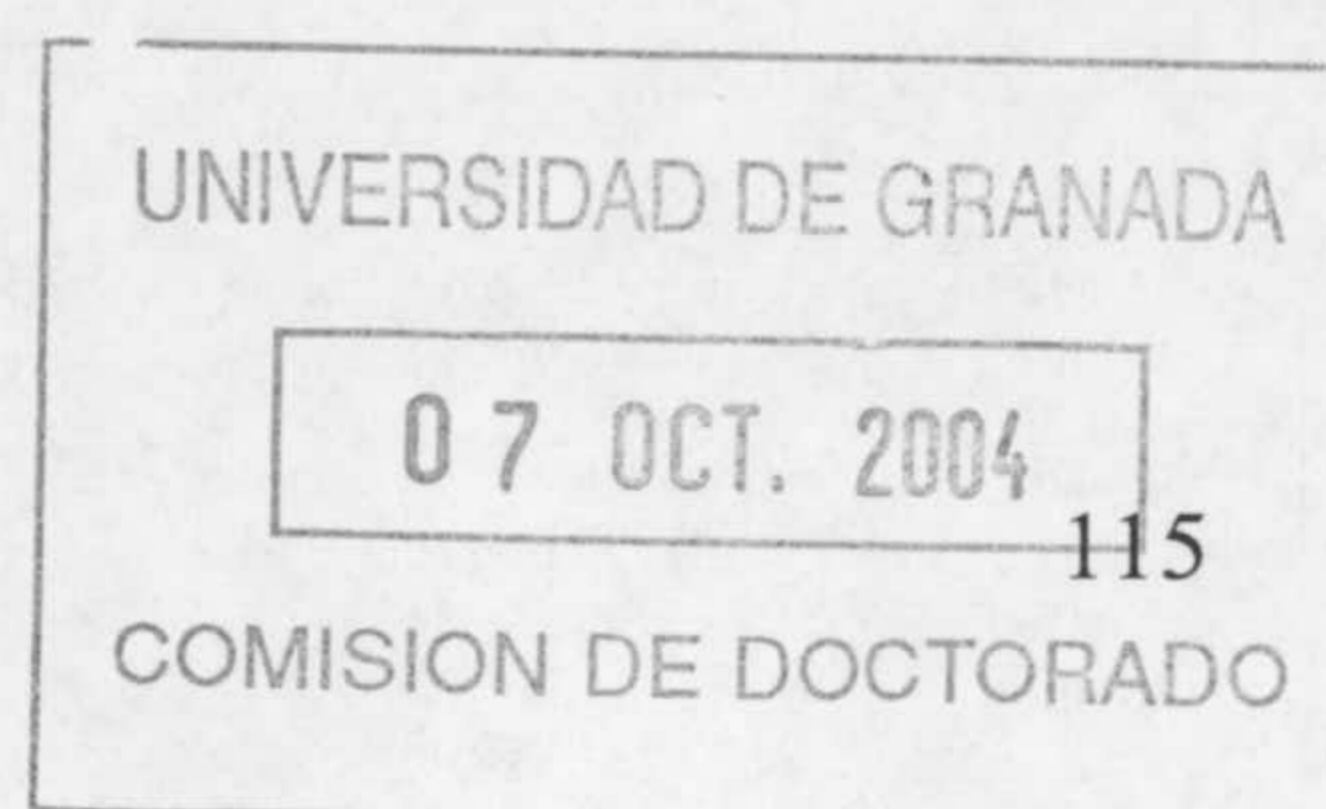
Sin embargo, la generación de ROS y NO^\bullet en células vegetales tiene un efecto ambivalente (del Río y col., 2003). Mientras que una elevada producción de estas moléculas activas pueden ocasionar daños oxidativos considerables, niveles bajos de NO^\bullet y de ROS, como H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$, participarían como moléculas de señalización en muchos procesos fisiológicos. De hecho, el peróxido de hidrógeno ha sido descrito como una señal de transducción en interacciones planta-patógeno, respuesta a heridas,

cierre estomático, estrés osmótico, y estrés por exceso de luz (del Río y col., 2002). En todos esos casos, se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno actúa como una molécula señal que propicia la inducción de genes que codifican diferentes protectores celulares. Además del H_2O_2 , el $NO\cdot$ y el $O_2\cdot^-$ son mediadores clave de la muerte celular programada ("PCD") en plantas inducida por patógenos, y parecen funcionar como parte de las rutas de transducción de señales que conducen a la inducción de las respuestas de defensa frente a patógenos y muerte celular (Bolwell, 1999; Klessig y col. 2000; Delledonne y col., 2001).

Por tanto, han de considerarse a los peroxisomas como compartimentos celulares con capacidad para generar y liberar al citosol importantes moléculas de señalización como los radicales $O_2\cdot^-$, H_2O_2 , $NO\cdot$, y posiblemente GSNO, las cuales pueden contribuir a una comunicación más integrada entre los distintos compartimentos celulares y los diferentes tejidos (Corpas y col., 2001). Esta función de los peroxisomas en la producción de señales es aún más importante desde un punto de vista fisiológico, si consideramos que la producción de estos orgánulos oxidativos puede proliferar en plantas durante la senescencia y en diferentes situaciones de estrés (del Río y col., 2002).

Conclusiones

1. Se ha detectado la producción de óxido nítrico (NO^{\cdot}) en distintos órganos de plantas de guisante (*Pisum sativum* L.). Esta especie de nitrógeno reactivo parece ejercer un papel importante en los primeros estadios de desarrollo de la raíz y de la hoja, así como en situaciones de estrés abiótico generadas por temperaturas extremas y alta intensidad lumínica. Por otro lado, los resultados presentados en esta Memoria Doctoral son la primera referencia sobre la detección de NO^{\cdot} en tallos de una planta superior. Esto confiere a éste órgano una posible función en los mecanismos de transducción de señales moleculares entre la raíz y las hojas.
2. Nuestros datos demuestran que el NO^{\cdot} se sintetiza de forma endógena en los peroxisomas de hojas. Este NO^{\cdot} es generado enzimáticamente por una proteína que presenta actividad óxido nítrico sintasa (NOS) dependiente de L-arginina, y que requiere NADPH, calcio, calmodulina y tetrahydropterina como cofactores. La enzima presenta características bioquímicas semejantes a las eNOS y nNOS de mamíferos, aunque también muestra ciertas similitudes inmunológicas con la iNOS de células animales.
3. La presencia de NO^{\cdot} como metabolito endógeno de los peroxisomas de hojas indica que estos orgánulos tienen la capacidad de liberar al citosol distintas moléculas señal (NO^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2). Ello puede contribuir a una mejor comunicación entre los distintos compartimentos celulares y entre tejidos, especialmente en aquellas situaciones donde las distintas especies de oxígeno y nitrógeno reactivo ejercen una función principal, como es en la respuesta de la planta frente a distintos estreses bióticos y abióticos.



Bibliografía

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**: 121-126
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol Plant* **100**: 224-233
- Álvarez ME, Pennel RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784
- Anderson L, Mansfield TA (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environ Pollut* **20**: 113-121
- Angermuller S, Bruder G, Volkl A, Wesch H, Fahimi HD (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur J Cell Biol* **45**: 137-144
- Appleby CA (1992) The origin and functions of haemoglobin in plants. *Sci Prog* **76**: 365-398
- Archer EK, Ting BL (1996) A virescent plastid mutation in tobacco decreases peroxisome enzyme activities in seedlings. *J Plant Physiol* **149**: 520-526
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas RV (1998) Plant hemoglobins. *Plant Physiol* **118**: 1121-1126
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Sarath G, Moran JF, Lohrman J, Olson JS, Klucas RV (1997) Rice hemoglobins: gene cloning, analysis and oxygen-binding kinetics of a recombinant protein synthesized in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* **115**: 1259-1266
- Baker A, Graham I (2002) *Plant Peroxisomes. Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G (1997) Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem* **246**: 710-718
- Bal-Price A, Brown GC (2000) Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* **75**: 1455-1464
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* **274**: 36729-36733
- Beck K-F, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Meßmer UK, Mühl H, Pfeilschifter J (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* **202**: 645-653
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1620-1624
- Beckman JS, Koppenol W (1996) NO[•], O₂^{•-} and ONOO⁻: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424

Bibliografía

- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* **129**: 1642-1650
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci* **6**: 508-509
- Beltrán B, Mathur A, Duchén MR, Erusalimsky JD, Moncada S (2000) The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14602-14607
- Berleth T, Sachs T (2001) Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 57-62
- Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER (1996) Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *E. coli* glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1776-1780
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-341
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004) Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**: 847-855
- Biswas TK y Getz GS (2002) Import of yeast mitochondrial transcription factor (Mtf1 p) via a nonconventional pathway. *J Biol Chem* **277**: 45704-45714
- Blakely LM, Blakely RM, Colowit PM, Elliot DS (1988) Experimental studies on lateral root formation in radish seedlings roots. Analysis of the dose-response to exogenous auxin. *Plant Physiol* **87**: 414-419
- Bogdan, C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* **11**: 66-75
- Bolwell GP (1999) Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Henry Y, Mansuny D (1992b) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^w-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 880-886
- Boucher JL, Genet A, Vadon S, Delaforge M, Mansuny D (1992a) Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N^w-hydroxy-L-arginine by heme proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 1158-1164
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua N-H (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome transduction. *Cell* **77**: 73-81
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

- Braman RS, Hendrix SA (1989) Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* **61**: 2715-2718
- Bray, RC. Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. En: Boyer, PD, eds. *The enzymes*. New York: Academic Press; 1975:299-419.
- Brown EG, Newton RP (1992) Analytical procedures for cyclic nucleotides and their associated enzymes in plant tissue. *Phytochem Anal* **3**: 1-13
- Brown GC (1995) Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* **232**: 188-191
- Brown GC (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 351-369
- Bruggink GT, Wolting HG, Dassen JHA, Bus VGM (1988) *New Phytol* **110**: 185-191
- Brunelli L, Yermilov V, Beckman JA (2001) Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* **30**: 709-714
- Bunkelmann R, Trelease RN (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* **110**: 589-598
- Butt YKC, Lum JHK, Lo SCL (2003) Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. *Planta* **216**: 762-771
- Campbell WH (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 277-303
- Capone R, Tiwari BS, Levine A (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **42**: 425-428
- Caro A, Puntarulo S (1999) Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res* **31**: S205-S212
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao R, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham NS, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennet MJ (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843-852
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennet MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci* **8**: 165-171
- Chandok MR, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, Klessig DF (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**: 469-482
- Cherel I, Marion-Poll A, Meyer C, Rouze P (1986) Immunological comparisons of nitrate reductase of different plant species using monoclonal antibodies. *Plant Physiol* **81**: 376-378
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Mol Plant Microbe Interac* **13**: 1380-1384

Bibliografía

- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J* **24**: 667-677
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, Lippok B, Smith RK Jr, Bent AF (2000) The *Arabidopsis* dnd 1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9323-9328
- Cohen JJ (1993) Apoptosis. *Immunol Today* **14**: 126-130
- Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Persp* **102**: 460-462
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA. (1993) Evidence for the presence of proteolytic activity in peroxisomes. *Eur J Cell Biol* **61**(1):81-5
- Corpas FJ, de la Colina C, Sánchez-Rasero F, del Río LA (1997) A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines. *J Plant Physiol* **151**:246-250
- Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. Characterization and activity regulation during natural senescence. *Plant Physiol* **121**: 921-928
- 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. *Biochem J* **330**: 777-784
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 145-150
- Corpas FJ, Barroso JB, Esteban FJ, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Carreras A, Quirós M, León AM, Palma JM, Sandalio LM, del Río LA (2002) Peroxisomes as a source of nitric oxide in plant cells. *Free Radic Biol Med* **33** (S1): 187
- Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA (2004a) Enzymatic sources of nitric oxide in plant cells – beyond one protein – one function. *New Phytol* **162**: 243-251
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM, del Río LA (2004b) Cellular and subcellular localization on endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* **136**: 1-12
- Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, del Río (2004c) Xanthine oxidoreductase from plant peroxisomes: Biochemical and immunological characterization. *Free Rad Biol Med* **36**: S136-S136 Suppl. 1 2004
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**: 900-905

- Cueto M, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S, Golvano MP (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* **398**: 159-164
- Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Harper JF. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol* **132(4)**: 1840-1848.
- Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res* **17**: 9-20
- Datta DB, Triplett EW, Newcomb EH (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4700-4702
- Dean JV, Harper JE (1988) The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiol* **88**: 389-395
- Delledone M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 13454-13459
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16314-16318
- Dikov A, Alexandrov I, Russinova A, Boyadjieva-Michailova A (1988) Ultracytochemical detection of enzymes by reduction of potassium ferricyanide. 1. A method for detection of xanthine oxidase. *Acta Histochem* **83**: 107-115
- Distefano S, Palma JM, Gómez M, del Río LA (1997) Characterization of endopeptidases from plant peroxisomes. *Biochem J* **327**: 399-405
- Distefano S, Palma JM, McCarthy I, del Río LA (1999) Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta* **209**: 308-313
- Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I (1997) Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C₆ glial cells. *J Neurochem* **68**: 1896-1903
- Domachowske JB (1997) The role of nitric oxide in the regulation of cellular iron metabolism. *Biochem Mol Med* **60**: 1-7
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manach N, Rivoal J, Hill RD (2003a) Expression of a stress-induced haemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* **35**: 763-770
- Dordas C, Hasinoff BB, Rivoal J, Hill RD (2004) Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* **219**: 66-72
- Dordas C, Rivoal J, Hill RD (2003b) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot* **91**: 173-178

Bibliografía

- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* **4**: 167-176
- Draper J (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci* **2**: 163-165
- Duff SMG, Wittenberg JB, Hill RD (1997) Expression, purification, and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin: optical spectra and reactions with gaseous ligands. *J Biol Chem* **272**: 16746-16752
- Duff SMG, Guy PA, Nie X, Durnin DC, Hill RD (1998) Haemoglobin expression in germinating barley. *Seed Sci Res* **8**: 431-436
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10328-10333
- Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-374
- Enkhardt U, Pommer U (2000) Influence of nitric oxide and nitrite on the activity of cinnamic acid-4-hydroxylase of *Zea Mays* *in vitro*. *J Appl Bot* **74**: 151-154
- Esteban FJ, Jiménez A, Fernández AP, Delmoral ML, Sánchez-López AM, Hernández R, Garrosa M, Pedrosa JA, Rodrigo J, Peinado MA (2001) Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the guinea-pig liver: distribution and colocalization with neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide. *Liver* **21**: 374-379
- Fahimi HD, Sies H (1987) *Peroxisomes in Biology and Medicine*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- Fang TK, Donalson RP, Vigil EL (1987) Electron transport in purified glyoxysomes membranes from castor bean endosperm. *Planta* **172**: 1-13
- Ferrer MA, Ros Barceló A (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ* **22**: 891-897
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817-824
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KH (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **92**: 696-717
- Francescutti D y col (1996) Peroxynitrite modification of glutathione reductase: modeling studies and kinetic evidence suggest the modification of tyrosines at the GSSG binding site. *Protein Eng* **9**: 189
- Frederiks WM, Vreeling-Sindelarova H, Straatsburg IH (1999) Localization of xanthine oxidase activity at the luminal surface of sinusoidal endothelial cells in rat liver. En: Wisse E, Knook DL, de Zanger R, Fraser R, eds. *Cells of the hepatic sinusoid*, vol. 7. Leiden: Kupfer Cell Foundation; 123-124
- Garcês H, Durzan D, Pedroso MC (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **87**: 567-574

- García-Mata C, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-1204
- García-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* **128**: 790-792
- García-Mata C, Lamattina L (2003a) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure-is nitrate reductase one of the missing links?. *Trends Plant Sci* **8**: 20-26
- García-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003b) Nitric oxide regulated K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11116-11121
- Gardner PR, Fridovich I (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem* **266**: 19328-19333
- Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Dou Y, Li T, Olson JS, Zhu H, Riggs AF (2000) Nitric-oxide dioxygenase activity and function for flavohemoglobins. Sensivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition. *J Biol Chem* **275**: 31581-31587
- Gardner PR, Martin LA, Hall D, Gardner AM (2001) Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. *Free Radical Biol Med* **31**: 191-204
- Gaston B (1999) Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 385-400
- Ghafourifar P, Richter C (1997) Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* **418**: 291-296
- Giba Z (1998) The effect of NO-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seed. *Plant Growth Regul* **26**: 175-181
- Gilchrist DG (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 393-414
- Glaab J, Kaiser WM (1993) Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. *Planta* **191**: 173-179
- Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R (2000a) Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* **275**: 7757-7763
- Godber BLJ, Doel JJ, Durgan J, Eisenthal R, Harrison R (2000b) A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett* **475**: 93-96
- Goldstein S, Czapski G (1995) The reaction of NO^{\cdot} with $O_2^{\cdot-}$ and HO_2^{\cdot} : A pulse radiolysis study. *Free Radic Biol Med* **19**: 505-510
- Gould KS, Lamotte O, Klinger A, Pugin A, Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* **26**: 1851-1862
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães, Martins IS (1997) NO-releasing substances that induces growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Reg* **21**: 183-187
- Gow AJ y col (1996) Effect of $ONOO^-$ induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett* **385**: 63-

Bibliografía

- Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S (1993) Peroxynitrite modification of LDL leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* **330**: 181-185
- Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* **548**(Suppl.): 47-63
- Green DR y Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312
- Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* **320**: 454-456
- Guo F-G, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-103
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **5**: 557-580
- Harper JE (1981) Evolution of nitrogen oxide(s) during *in vivo* nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiol* **68**: 1488-1493
- Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Rad Biol Med* **33**: 774-797
- Hausladen A, Stamler J (1998) Nitric oxide in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10345-10347
- Henry YA, Ducastel B, Guissani A (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. En: Henry YA, Guissani A, Ducastel B (Eds), *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology*. Landes Co Biomed Publ, Austin, USA, pp 15-46
- Herouart D, Baudouin E, Frendo P, Harrison J, Santos R, Jamet A, Van de Sype G, Touai D, Puppo A (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis?. *Plant Physiol Biochem* **40**: 619-624
- Hesberg C, Hansch R, Mendel RR, Bittner F (2004) Tandem orientation of duplicated xanthine deshydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem* **279**: 13547-13554
- Hewitt EJ (1966) Sand and water culture Methods used in the study of plant nutrition. Technical Communication No. 22 (revised 2nd Edition), 237-315. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. Farnham Royal. Bucks. England
- Hill AC, Bennett JH (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos Environ* **4**: 341-348
- Hill RD (1998) What are hemoglobins doing in plants? *Can J Bot* **76**: 707-712
- 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

- Horemans N, Foyer CH, Asard H (2000) Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends Plant Sci* **5**: 263-267
- Hortelano S, Dallaporta B, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Marzo I, Boscá L y Kroemer G (1997) Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **410**: 373-377
- Huang AHC, Trelease RN, Moore TSJr (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-358260-1
- Huang J, Sommers EM, Kim-Shapiro DB, King SB (2002) Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J Am Chem Soc* **124**: 3473-3480
- Huang J, Kim-Shapiro DB, King B (2004) Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *J Med Chem* **47**: 3495-3501
- Huang S, Kerschbaum HH, Engel E, Hermann A (1997) Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J Neurochem* **69**: 2516-2528
- Huang X, Rad UV, Durner J (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**: 914-923
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946
- Hughes MN (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochem Biophys Acta* **1411**: 263-272
- Hung KT y Kao CH (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J Plant Physiol* **160**: 871-879
- Hung KT, Kao CH (2004) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate induced senescence of rice leaves. *J Plant Physiol* **161**: 43-52
- Hunt PW, Klok EJ, Trevaskis B, Watts RA, Ellis MH, Peacock WJ, Dennis ES (2002) Increased level of hemoglobin 1 enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 17197-17202
- Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewelyn DJ, Burnell J, Dennis ES, Peacock WJ (2001) Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* **47**: 677-692
- Husic DW, Husic HD, Tolbert NE (1987) The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle. *Crit Rev Plant Sci* **5**: 45-100
- Ichikawa M, Nishino T, Nishino T, Ichikawa A (1992) Subcellular localization of xanthine oxidase in rat hepatocytes. High resolution immunoelectron microscopy study combined with biochemical analysis. *J Histochem Cytochem* **40**: 1097-1103
- Igamberdiev AU, Lea PJ (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochem* **60**: 651-674

Bibliografía

- Igamberdiev AV, Seregelyes C, Manac'h N, Hill RD (2004) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* **219**: 95-102
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9265-9269
- Ignarro LJ (2000) Nitric oxide. Biology and Pathobiology. Academic Press.
- Israels LG, Israels ED (1999) Apoptosis. *Stem Cells* **17**: 306-313
- Jarasch E-D, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW (1981) Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. *Cell* **25**: 67-82
- Jeffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 417-440
- 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 M, Zhang J (2002) Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Planta* **215**: 1022-1030
- Jih PJ, Chen YC, Jen ST (2003) Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide expression of the ipomoelin gene from sweet potato. *Plant Physiol* **132**: 381-389
- 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
- Jiménez A, Hernández JA, Pastori GM, del Río LA, Sevilla F (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol* **118**: 1327-1335
- Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR Jr (1999) Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* **27**: 1357-1366
- Kaiser WM, Weiner H, Huber SC (1999) Nitrate reductase in higher plants: a case of study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol Plant* **105**: 385-390
- Kanner J, Harel S, Granit R (1992) Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids* **27**: 46-49
- Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B (1996) Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* **271**: 6000-6009
- Kerr JFR, Willie AH y Currie AR (1972) *Br J Cancer* **26**: 239-257

- Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 299-328
- Kim YM, Talamian RV, Billiar TR (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**: 31138-31148
- Kim YM, Chung HT, Kim SS, Han JA, Yoo YM, Kim KM, Lee GH, Yun HY, Green A, Li J, Simmons RL, Billiar TR (1999) Nitric oxide protects PC12 cells from serum deprivation-induced apoptosis by cGMP-dependent inhibition of caspase signaling. *J Neurosci* **19**: 6740-6747
- Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem* **275**: 10954-10961
- Klausner RD, Rouault TA, Harford JB (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**: 19-28
- Klepper LA (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos Environ* **13**: 537-542
- Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou J, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8849-8855
- Knowles RG, Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298**: 249-258
- Kohler C, Merkle T, Neuhaus G (1999) Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 97-104
- Kohler C, Neuhaus G (2000) Characterisation of calmodulin binding to cyclic nucleotide-gated ion channels from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **4710**: 133-136
- Kohler C, Merkle T, Roby D, Neuhaus G (2001) Developmentally regulated expression of a cyclic nucleotide-gated ion channel from *Arabidopsis* indicates its involvement in programmed cell death. *Planta* **213**: 327-332
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* **257**: 5751-5754
- Koshland Jr. DE (1992) The Molecule of the Year. *Science* **258**: 1861.
- Kotake Y, Tanigawa T, Tanigawa M, Ueno Y, Allen DR, Lai C-S (1996) Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. *Biochem Biophys Acta* **1289**: 362-368
- Kumar D, Klessig DF (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 347-351
- Kuo WN, Ku TW, Jones DL, Jn-Baptiste J (1995) Nitric oxide synthase immunoreactivity in Baker's yeast, lobster and wheat germ. *Biochem Arch* **11**: 73-78

Bibliografía

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lam E y Pozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 417-428
- Lamattina L, Beligni MV, García-Mata C, Laxalt AM (2001) *Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds*. US Patent. US 6242384 B1
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 109-136
- Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide species. *J Biol Chem* **271**: 19705-19709
- Lazalt AM, Beligni MV, Lamattina L (1997) Nitric oxide preserve the levels of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Eur J Plant Pathol* **103**: 643-651
- Leng Q, Mercier RW, Yao W, Berkowitz GA (1999) Cloning and first functional characterisation of a plant cyclic nucleotide-gated cation channel. *Plant Physiol* **121**: 753-761
- Lepoivre M, Flaman JM, Bobe P, Lemaire G, Henry Y (1994) Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by NO. *J Biol Chem* **269**: 21891-21897
- Leshem YY, Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J Plant Physiol* **148**: 258-263
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV (1998) Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* **36**: 825-833
- Leshem YY (2000) *Nitric Oxide in Plants: Occurrence, Function and Use*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Leshem YY (2001) *Nitric oxide in plants*. London, UK. Kluwer Academic Publishers.
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp Bot* **51**: 1471-1473
- Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL (2001) Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase catalyzed nitrite reduction. *J Biol Chem* **276**: 24482-24489
- Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-S, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* **364**: 626-629
- Lira-Ruan V, Sarath G, Klucas RV, Arredondo-Peter R (2001) Synthesis of hemoglobins in rice (*Oryza sativa* var. Jackson) plants growing in normal and stress conditions. *Plant Sci* **161**: 279-287

- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490-494
- Lloyd-Jones DM, Bloch KD (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* **47**: 365-375
- Loeffler M, Kroemer G (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**: 19-26
- López-Huertas E, Sandalio LM, del Río LA (1995) Integral membrane polypeptides of pea leaf peroxisomes: characterization and response to plant stress. *Plant Physiol Biochem* **33**: 295-302
- López-Huertas E, Sandalio LM, Gómez M, del Río LA (1997) Superoxide radical generation in peroxisomal membranes: evidence for the participation of the 18-kDa integral membrane polypeptide. *Free Rad Res* **26**: 497-506
- López-Huertas E, Baker A (1999) Peroxisome biogenesis. En: *Transport of molecules across microbial membranes*. Cambridge UK, pp 204-238. Cambridge University Press
- 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
- López-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J* **19**: 6770-6777
- Lucotte G, Baneyx F (1993) *Introduction to Molecular Cloning Techniques*. VCH Publishers, Inc. New York
- 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
- Magalhaes JR, Monte DC, Durzan D (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Biol Plants* **6**: 117-127
- Malamy JE, Ryan KS (2001) Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 899-909
- Mallick N, Mohn FH, Rai L, Soeder CJ (2000) Impact of physiological stresses on nitric oxide formation by green alga, *Scenedesmus obliquus*. *J Microbiol Biotech* **10**: 300-306
- Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**: 651-654
- Mansuy D, Boucher JL (2002) Oxidation of N-hydroxyguanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metab Rev* **34**: 593-606
- Massey V, Harris CM (1997) Milk xanthine dehydrogenase: the first one hundred years. *Biochem Soc Trans* **25**: 750-755
- Mathieu C, Moreau S, Frenedo P, Puppo A, Davies MJ (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic Biol Med* **24**: 1242-1249

Bibliografía

- Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K (1995) Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem* **270**: 17355-17360
- Mayer B, Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* **22**: 477-481
- McCarthy I, Gómez M, Palma JM, del Río LA (2000) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induces oxidative stress and senescence in pea leaf peroxisomes. Vth Conference on *Oxygen, free radicals and oxidative stress in plants*. (Niza, Francia). Póster.
- 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
- McCarthy I (2004) Estudio del estrés oxidativo inducido por el 2,4-D en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y en peroxisomas de hojas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312**: 159-163
- McRobbie EAC (2000) ABA activates multiple Ca^{2+} fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K^+ (Rb^+) release. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12361-12368
- Millar AH, Day DA (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* **398**: 155-158
- Millar AH, Day DA (1997) Alternative solutions to radical problems. *Trends Plant Sci* **2**: 289-290
- Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett* **427**: 225-228
- Minorsky PV (2002) Peroxisomes: organelles of diverse function. *Plant Physiol* **130**: 517-518
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol* **130**: 1288-1297
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**: 109-142
- Moncada S (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6702-6706
- Moncada S, Higgs EA (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to NO. *FASEB J* **9**: 1319-1330
- Moriwaki Y, Yamamoto T, Yamaguchi K, Takahashi S, Higashino K (1996) Immunohistochemical localization of aldehyde and xanthine oxidase in rat tissues using polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol* **105**: 71-79

- Moro MA, Darley-USmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Murgia I, Delledonne M, Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J* **30**: 521-528
- Murray J, Macartney D, Thatcher GRJ (2001) Catalysis of NO production by a molybdoenzyme model. *Org Lett* **3**: 3635-3638
- Nagano T (1999) Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* **14**: 283-290
- Nagano T, Yoshimura T (2002) Bioimaging of nitric oxide. *Chem Rev* **102**: 1235-1269
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins. *FEBS Lett* **427**: 263-266
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M (1991) Does O_2^- underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10045-10048
- Nathan C, Xie Q-W (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* **78**: 915-918
- Navarre DA, Wendehenne D, Durner J, Noad R, Klessig DF (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* **122**: 573-582
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002a) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* **53**: 1237-1242
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2002b) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 388-395
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002c) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* **128**: 13-16
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* **159**: 11-35
- Neuburger M, Bourguignon J, Douce R (1986) Isolation of a large complex from the matrix of pea leaf mitochondria involved in the rapid transformation of glycine into serine. *FEBS Lett* **207**: 18-22
- Newton RP, Roef L, Witters E, Van Onckelen H (1999) Cyclic nucleotides in higher plants: the enduring paradox. *New Phytol* **143**: 427-455
- Nie XZ y Hill RD (1997) Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol* **114**: 835-840
- Ninnemann H, Maier J (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants, and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol* **64**: 393-398
- Nishino T (1994) The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem* **116**: 1-6
- Noritake T, Kawakita K, Doke N (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol* **37**: 113-116

Bibliografía

- Oliver DJ, Neuburger M, Bourguignon J, Douce R (1990) Interaction between the component enzymes of the glycine decarboxylase multi-enzyme complex. *Plant Physiol* **94**: 833-839
- Orozco-Cardenas ML, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130**: 487-493
- Özer N, Muftüoğlu M, Ögüs IH (1998) A simple and sensitive method for the activity staining of xanthine oxidase. *J Biochem Biophys Methods* **36**: 95-100
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* **129**: 954-956
- Palma JM, Garrido M, Rodriguez-Garcia MI, del Río LA (1991) Peroxisome proliferation and oxidative stress mediated by activated oxygen species in plant peroxisomes. *Arch Biochem Biophys* **287**:68-74
- Palma JM, Pastori G, Bueno P, Distefano S, del Río LA (1998) Peroxisomal manganese superoxide dismutase: Purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiol Plant* **104**: 720-726
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, del Río LA (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem* **40**: 521-530
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526
- Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* **548**(Suppl.): 87-99
- Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 385-400
- Pedroso MC, Magalhaes JR, Durzan D (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J Exp Bot* **51**: 1027-1036.
- Peinado MA, Torres MI, Thompson RP, Esteban FJ (2000) Immunolocalization of the HNK-1 epitope in the autonomic innervation to the liver and upper digestive tract of the developing rat embryo. *Histochem J* **32**: 439-446
- Penson SP, Schunrunk RC, Fath A, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (1996) cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* **8**: 2325-2333
- Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B y Kroemer G (1996) Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* **396**: 7-13
- Pfieber S, Janistyn B, Jessner G, Pichorner H, Ebermann R (1994) Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. *Phytochem* **36**: 259-262
- Pfieber S, Janistyn B, Soja G, Koesling D, Mayer B, Ebermann R (1995) Detection of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in higher plants. *J Endothelial Cell Res* **3**: Abstr 66

- Pharmawati M, Gehring CA, Irving HR (1998) An immunoaffinity purified natriuretic peptide analogue modulates cGMP levels in the *Zea mays* root stele. *Plant Sci* **137**: 107-115
- de Pinto M, Tommasi F, De Gara L (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130**: 698-708
- Polverari A, Molesini B, Pezzotti M, Buonauro R, Marte M, Delledonne M (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1094-1105
- Pou S, Surichamorn W, Bredt DA, Snyder SH, Rosen GM (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **267**: 24173-24176
- Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem J* **322**: 167-173
- Rabie RK, Arima Y, Kumazawa K (1980) Uptake and distribution of combined nitrogen and its incorporation into sedes of nodulates soybean plants as revealed by 15-N studies. *Soil Sci Plant Nutr* **26**: 426-436
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**: 4244-4250
- Radi R, Denicola A, Álvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H (2000). The biological chemistry of peroxynitrite. En: Ignarro, L., Ed. *Nitric oxide*. San Diego, CA: Academic Press; 57-82
- Rajagopalan KV (1985) Purification of bovine milk xanthine oxidase. En: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (RA Greenwald ed), pp 21-23. CRC Press, Boca Raton, FL
- Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**: 682-690
- Reed KC, Mann DA (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* **13**: 7207-7221
- Reggiani R (1997) Alteration of levels of cyclic nucleotides in response to anaerobiosis in rice seedlings. *Plant Cell Physiol* **38**: 740-742
- Reyes-Harde M, Potter BV, Galione A, Stanton PK (1999) Induction of hippocampal LTD requires nitric oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *J Neurophysiol* **82**: 1569-1576
- Ribeiro Jr EA, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* **445**: 283-286
- del Río LA, Gómez M, Leal A, López Gorgé A (1977) A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**: 409-415
- 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

Bibliografía

- del Río LA, Sandalio LM, Yáñez J, Gómez M (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dismutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese. *J Inorg Biochem* **24**: 25-34
- del Río LA, Fernández VM, Rupérez FL, Sandalio LM, Palma JM (1989) NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiol* **89**: 728-731
- del Río LA, 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 (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* **53**: 1255-1272
- del Río LA, Corpas FJ, León AM, Barroso JB, Carreras A, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M (2003a) Peroxisomal nitric oxide synthase: an enzymatic activity in search of an elusive protein. *Free Radical Res* **37** (S2)
- del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Barroso JB (2003b) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* **55**: 71-81
- del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochem* **65**: 783-792
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* **53**: 103-110
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Radic Res* **31**: S235-241
- Ros Barceló A (1997) Lignification in plant cell walls. *Int Rev Cytol* **176**: 87-132
- Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño MA (2002) In situ characterization of a NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol Plant* **114**: 33-40
- Rossel DF, White EH (1978) *Methods Enzymol* **57**: 409
- Rouquette M, Page S, Bryant R, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, Whish WJD, Harrison R, Tosh D (1998) Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett* **426**: 397-401
- Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA (1995) Inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and LDL oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipids. *Arch Biochem Biophys* **324**: 15-25
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (2001) The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 202-209
- Ryerson DE y Heath MC (1996) Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* **8**: 393-402

- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organism. *Plant Cell Physiol* **43**: 290-297
- Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, Nishida H, Fujita T (1997) Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver. *Biochem Biophys Res Commun* **230**: 476-479
- Sandalio LM, Palma JM, del Río LA (1987) Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Sci* **51**: 1-8
- Sandalio LM, del Río LA (1988a) Intraorganellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxisomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol* **88**: 1215-1218
- Sandalio LM, Fernández VM, Rupérez FL, del Río LA (1988b) Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* **87**: 1-4
- Sandalio LM, López-Huertas E, Bueno P, del Río LA (1997) Immunocytochemical localization of copper,zinc superoxide dismutase in peroxisomes from watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) cotyledons. *Free Rad Res* **26**: 187-194
- Sauer P, Frébortová J, Sebela M, Galuszka P, Jacobsen S, Pec P, Frébort I (2002) Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol Biochem* **40**: 393-400
- Saviani EE, Orsi CH, Oliveira JFP, Pinto-Maglio CAF, Salgado I (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett* **510**: 136-140
- Schmidt HHHW, Walter U (1994) NO at work. *Cell* **78**: 919-925
- Schwitzguébel JP, Siegenthaler PA (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiol* **88**: 30-36
- Sen S, Cheema IR (1995) Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. *Biochem Arch* **11**: 221-227
- Seregélyes C, Barna B, Hennig J, Konopka D, Pasternak TP, Lukacs N, Fehér A, Horvath GV, Dudits D (2003a) Phytooglobins can interfere with nitric oxide functions during plant growth and pathogenic responses: a transgenic approach. *Plant Sci* **165**: 541-550
- Seregélyes C, Dudits D (2003b) Phytooglobins and nitric oxide: new partners in an old signalling system in plants. *Acta Biol Hung* **54**: 11-25
- Seregélyes C, Igamberdiev AU, Maassen A, Hennig J, Dudits D, Hill RD (2004) NO-degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to PR-1a gene expression in Mhb1-overproducing tobacco plants. *FEBS Lett* **571**: 61-66
- Sharma VS, Traylor TG, Gardiner R, Mizukami H (1987) Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochem* **26**: 3837-3842
- Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7212-7217

Bibliografía

- Simmons HA, Reiter S, Nishino T. Hereditary xanthinuria. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, vol. II, 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1995:1781-1798
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S (2004) Nitric oxide generation during early germination of Sorghum seeds. *Plant Sci* **167**: 839-847
- Song F, Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interac* **12**: 1458-1462
- Sowa A, Duff SMG, Guy PA, Hill RD (1998) Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10317-10321
- Squadrito GL, Pryor WA (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Rad Biol Med* **25**: 392-403
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898-1902
- Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**: 931-936
- Steiner AA (1961) A universal Method for preparing nutrient solution of a certain desired composition. *Plant Soil* **15**: 134-154
- Stöhr C, Schuler F, Tischner R (1995a) Glycosyl-phosphatidylinositol anchored proteins exist in the plasma membrane of *Chlorella saccharophila* (Krüger) Nadson. Plasma-membrane-bound nitrate reductase as an example. *Planta* **196**: 284-287
- Stöhr C, Glogau U, Mätschke M, Tischner R (1995b) Evidence for the involvement of plasma-membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue-light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila*. *Planta* **197**: 613-618
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835-841
- Stöhr C, Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplasmic space. *J Exp Bot* **53**: 2293-2303
- Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim Y-M, Simmons RL, Watkins SC (2002) Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology* **36**: 81-93
- Stuehr DJ (1999) Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 217-230
- Tabak HF, Braakman I, Distel B (1999) Peroxisomes: simple in function but complex in maintenance. *Trends Cell Biol* **9**: 447-453
- Takahashi S, Yamasaki H (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* **512**: 145-148

- Tatoyan, A and Giuvili, C (1998) Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 11044-11048
- Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD (1994) A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* **24**: 853-862
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Thomas PS (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:5201-5205
- Thompson GA, Schulz A (1999) Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci* **4**: 354-360
- Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in the luminiscent-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* **31**: 1335
- Trevaskis B, Watts RA, Andersson C, Llewellyn D, Hargrove MS, Olson JS, Dennis ES, Peacock WJ (1997) Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: The evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12230-12234
- Trewavas AJ, Rodrigues C, Rato C, Malho R (2002) Cyclic nucleotides: the current dilemma!. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 425-429
- Trinchant JC; Rigauld J (1994) Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1385-1388
- Uttenthal LO, Alonso D, Fernández AP, Campbell RO, Moro MA, Leza JC, Lizasoain I, Esteban FJ, Barroso JB, Valderrama R, Pedrosa JA, Peinado MA, Serrano J, Richart A, Bentura ML, Santacana M, Martinez-Murillo R, Rodrigo J (1998) Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat. *Microsc Res Tech* **43**: 75-88
- Van Camp W, Inze D, Montagu MV (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in plant disease resistance. *Trends Plant Sci* **3**: 330-334
- Van des Bosch H, Schutgens RBH, Wanders RJA, Tager JM (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* **61**: 157-197
- Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 703-734
- Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard Jr. KA, Kalyanaraman B (1997) Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* **36**: 11293-11297
- Vauclare P, Diallo N, Bourguignon J, Macherel D, Douce R (1996) Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiol* **112**: 1523-1530
- Vickers S, Schiller HJ, Hildreth JE, Bulkley GB (1998) Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of endothelial cell plasma membrane. *Surgery* **124**: 551-560

Bibliografía

- Vigil EL (1983) Microbodies. En: *Isolation of membranes and organelles from plant cells*. (Hall JL, Moore AL, eds), pp 211-236. Academic Press, London
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* **53**: 1227-1236
- Wagner AM, Krab K (1995) The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiol Plant* **95**: 318-325
- Walker JL, Oliver DJ (1986) Glycine decarboxylase multienzyme complex: purification and partial characterization from pea leaf mitochondria. *J Biol Chem* **261**: 7745-7750
- Weber RE, Vinogradov SN (2001) Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* **81**: 569-628
- Weitzberg E, Lundberg JON (1998) Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric oxide* **2**: 1-7
- Wellburn AR (1990) *New Phytol* **115**: 395-429
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177-183
- Wennmalm A y col (1993) Metabolism and excretion of NO in humans. *Circul Res* **73**: 1121-
- Wildt J, Kley D, Rockel A, Segschneider HJ (1997) Emission of NO from higher plant species. *J Geophys Res* **102**: 5919-5927
- Willmott N y col (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose pathway. *J Biol Chem* **271**: 3699-3705
- Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**: 1-4
- Wu Y, Kuzma J, Marechal E, Graeff R, Lee HC, Foster R, Chua N-H (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* **278**: 2126-2130
- Xia Y, Zweier JL (1997) Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12705-12710
- Xia Y, Cardounel AJ, Vanin AF, Zweier JL (2000) Electron paramagnetic resonance spectroscopy with n-methyl-d-glucamine dithiocarbamate iron complexes distinguishes nitric oxide and nitroxyl anion in a redox-dependent manner: applications in identifying nitrogen monoxide products from nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* **29**: 793-797
- Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL (1998) Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* **273**: 22635-22639
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* **279**: 234-237
- Yamaguchi J, Nishimura M (1984) Purification of glyoxysomal catalase and immunochemical comparison of glyoxysomal and leaf peroxisomal catalase in germinating pumpkin cotyledons. *Plant Physiol* **262**: 261-267

- Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *J Gen Plant Pathol* **69**: 218-229
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci* **4**: 128-129
- Yamasaki H, Sakihama Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* **468**: 89-92
- Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakihama Y (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide Biol Chem* **5**: 261-270
- Yang JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ (2000) *Electrophoresis* **21**: 3666-3672
- Yermilov V, Yoshie Y, Rubio J, Ohsima H (1996) Effects of CO₂/HCO₃⁻ on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by ONOO⁻. *FEBS Lett* **399**: 67-70
- Yoshida T, Kikuchi G (1971) Significance of the glycine cleavage system in glycine and serine catabolism in avian liver. *Arch Biochem Biophys* **145**: 658-668
- Zhang C, Czymbek KJ, Shapiro AD (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 962-972
- Zhang H, Forde BG (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6529-6534
- Zhang Z, Naughton D, Winyard PG, Benjamin N, Blake DR, Symons MCR (1998) Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **249**: 767-772
- Zhao Z, Chen G, Zhang C (2001) Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedling. *Aust J Plant Physiol* **28**: 1050-1061
- Zoratti M y Szabò I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**: 139-176
- Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, Lo Shiavo F, Terzi M (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett* **515**: 75-78

Abreviaturas

ABA: ácido abscísico
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADPRc: riboADP cíclico
AMP: monofosfato de adenosina
cAMP monofosfato de adenosina cíclico
AOX: oxidasa alternativa
ARN: ácido ribonucleico
ATP: trifosfato de adenosina
BH₄: tetrahidrobiopterina
CaM: calmodulina
Caps: ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico
CAT: catalasa
DAF2-DA: diacetato de diaminofluoresceína
CHS: chalcona sintasa
DEPC: dietilpirocarbonato
DTT: 1,4-ditiotreitol
EDTA-Na₂: sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético
EGPA: electroforesis en gel de poliacrilamida
FAD: flavín adenosina dinucleótido
FMN: flavín mononucleótido
GCs: guanilato ciclasa soluble
GDC: glicina descarboxilasa
GMPc: monofosfato de guanosina
GOX: glicolato oxidasa
GSH: glutation reducido
GSNO: S-nitrosoglutation
GTP: trifosfato de guanosina
Hepes: ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HPR: hidroxipiruvato reductasa
HR: respuesta hipersensible
IAA: ácido indolacético
ICDH: isocitrato deshidrogenasa
IRGA: analizador de gases en el infrarrojo
L-arg: L-arginina
LB: medio de Luria-Bertani
L-NAME: N-nitro L-arginina metil éster

Abreviaturas

MAPK: quinasa de la proteína activada por mitógenos
NAD(P)/NAD(P)H: 2-fosfonucleótico de nicotinamida y adenina oxidado/reducido
Ni-NOR: nitrito NO-reductasa
NOS: óxido nítrico sintasa
NR: nitrato reductasa
PAL: fenilalanina amonioliasa
PAR: radiación disponible para fotosíntesis
PCD: muerte celular programada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDE: fosfodiesterasa
PKC: proteinquinasa C
PMPs: proteínas integrales de membranas de peroxisomas
PR: proteína de resistencia
PTIO: 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
PTP: poro de transición de permeabilidad
PVDF: difluoruro de polivinilo
RNS: especies de nitrógeno reactivo (*reactive nitrogen species*)
ROS: especies de oxígeno reactivo (*reactive oxygen species*)
RYR: canales de calcio sensibles a rianodina
SA: ácido salicílico
SAR: respuesta sistémica adquirida
SDS: lauril sulfato sódico
SIPK: quinasa inducida por SA
SOD (CuZn-/Fe-/Mn-): (cuprozinc-/ferro-/manganeso-) superóxido dismutasa
TBE/TE: tampón Tris de baja concentración salina
TBS: tampón Tris salino
TEMED: N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina
Tris: tris-hidroximetilaminometano
UV: luz ultravioleta
WIPK: quinasa inducida por herida
XDH: xantina deshidrogenasa
XOD: xantina oxidasa
XOR: xantina oxidorreductasa