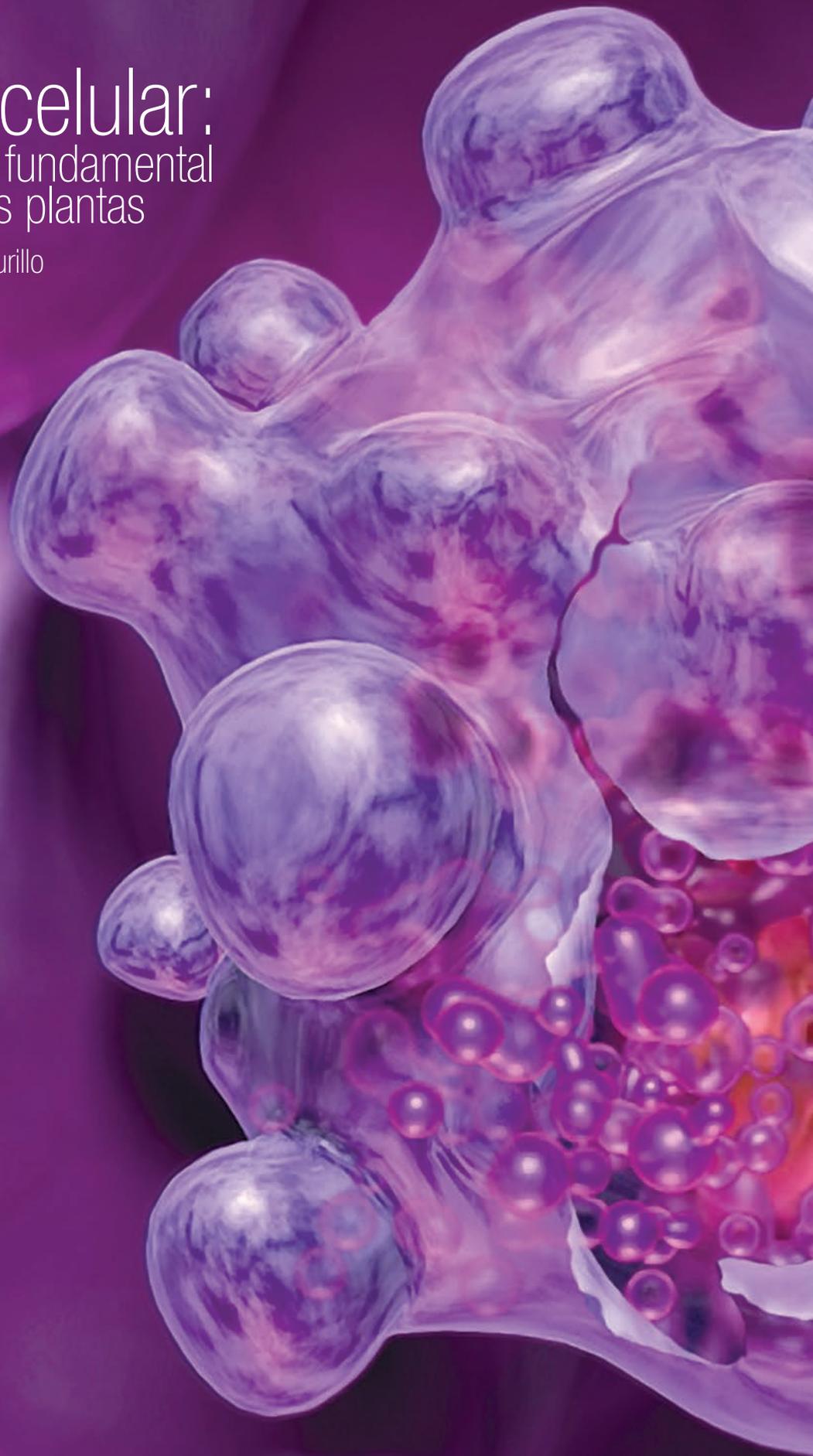
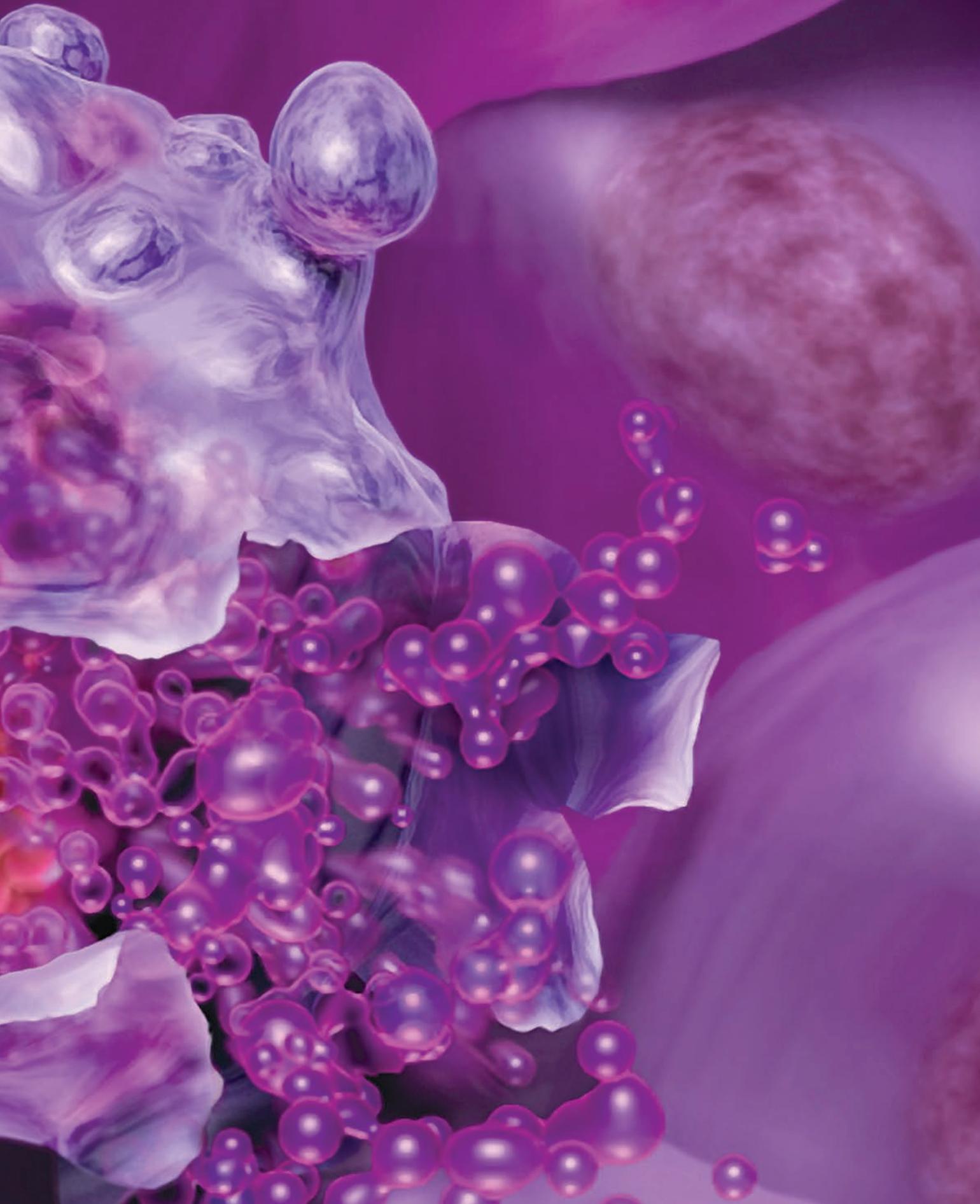


Suicidio celular: Un mecanismo fundamental en la vida de las plantas

Antoni Rueda, Walter Murillo
John J. Hurtado





Suicidio celular: un mecanismo fundamental en la vida de las plantas

Antoni Rueda

Ph. D. Profesor asistente del
Departamento de Química
de la Universidad del Tolima
earuedal@ut.edu.co

Walter Murillo

Ph. D. Profesor asociado del
Departamento de Química
de la Universidad del Tolima
wmurillo@ut.edu.co

John J. Hurtado

Ph. D. Profesor asistente del
Departamento de Química
de la Universidad de los
Andes
jj.hurtado@uniandes.edu.co

La comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas permite generar conocimiento básico para la conservación y el uso de los recursos filogenéticos, así como para la seguridad alimentaria. Un mecanismo importante en la vida de las plantas es la muerte celular programada, una especie de suicidio celular, reacción hipersensitiva parecida a la apoptosis animal. Este proceso les permite a las plantas el desarrollo de múltiples cambios durante su ciclo biológico, como también la defensa frente al ataque de patógenos y combatir el estrés.

El estrés en vegetales resulta de la presencia de un factor externo a una planta, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo y desata en la planta una respuesta que consiste en cualquier alteración estructural o funcional [1]. En este sentido, las plantas en su entorno natural responden a diversos tipos de estrés. Sus respuestas se inician por la mediación de inductores, que pueden ser bióticos o abióticos.

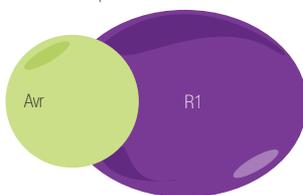
Los primeros son principalmente metabolitos de un microorganismo parásito que este secreta sobre las células del huésped, o moléculas de la misma planta que se liberan cuando esta ha sufrido algún daño.

(a) Interacción compatible



(b) Interacción incompatible

1. Resistencia por interacción directa



2. Resistencia por guardia



Figura 1. Modelos de interacción entre planta y patógeno. a) Interacción compatible que permite el desarrollo del patógeno: la proteína de avirulencia proveniente del patógeno es reconocida por una molécula blanco de la planta huésped (susceptible), lo cual permite que se desarrolle la enfermedad. b) Interacción incompatible: 1. una molécula originada en el patógeno, producida por un gen de avirulencia (gen Avr), es reconocida por las proteínas de resistencia de la planta (gen R1), lo cual da inicio a la respuesta de defensa; 2. las proteínas R2 solo actúan como factores de virulencia si estas forman un complejo constituido por el factor de avirulencia, el correspondiente blanco de virulencia y la proteína R2, de lo cual deriva la respuesta de defensa ("hipótesis de guardia o vigilancia") [5].

Los segundos pueden ser compuestos inorgánicos, radiación ultravioleta o iones pesados [2, 3].

Frente al ataque de patógenos, las plantas cuentan con un sistema inmune innato para defenderse y contrarrestar el crecimiento de estos enemigos. La mayoría de patógenos deben llegar a tejidos internos de la planta, ya sea por penetración de las hojas, ramas o raíces, o por entrada a través de heridas u otras aperturas, como estomas y lenticelas [4]. A diferencia de los mamíferos las plantas carecen de inmunidad adaptativa, y por lo tanto sus respuestas de defensa inducibles son referidas colectivamente como inmunidad innata. El sistema inmune de las plantas se caracteriza por su específica capacidad de reconocer y responder a los microorganismos.

Algunos análisis han revelado diferentes niveles de defensa de las plantas. Estas poseen un sistema de defensa pasivo conformado por compuestos tóxicos endógenos, y un mecanismo defensivo de tipo estructural o innato mediado por genes de resistencia. Del mecanismo de resistencia se han descrito dos modelos de interacción entre el huésped y el patógeno. En el primero, una molécula originada en el patógeno (inductor o elicitor), producida por un gen de avirulencia (gen Avr), es reconocida por las proteínas de resistencia de la planta (gen R de la planta), lo que da inicio a la respuesta de defensa. El otro modelo se basa en el descubrimiento de proteínas R,

tanto en variedades resistentes como susceptibles, y propone que dichas proteínas solo actúan como factores de virulencia si estas forman un complejo entre el factor de avirulencia, el correspondiente blanco de virulencia y la proteína R, lo cual deriva en la respuesta de defensa conocida como “hipótesis de guarda o vigilancia” (figura 1) [5].

Los inductores del patógeno son reconocidos por receptores específicos de las células de la planta mediante mecanismos parecidos a los que se dan en los mamíferos [6]. Los patógenos pueden producir sustancias (efectores) que les permiten suprimir el sistema inmune del huésped, y por lo tanto, incrementar su colonización e infección. Estas sustancias modifican las proteínas del huésped y la planta no puede detectar el patógeno; como resultado, se incrementa la virulencia. Sin embargo, si los efectores son reconocidos por los genes R de la planta, esta despliega diferentes mecanismos de defensa, entre ellos la muerte celular programada.

MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS

En la actualidad se acepta que la muerte celular en las plantas se puede dar por dos vías: por la necrosis (muerte ocasionada por acción directa de compuestos tóxicos), o por una respuesta hipersensitiva de las plantas descrita como *muerte celular programada* (PCD) o *suicidio celular* (figura 2). En esta respuesta,

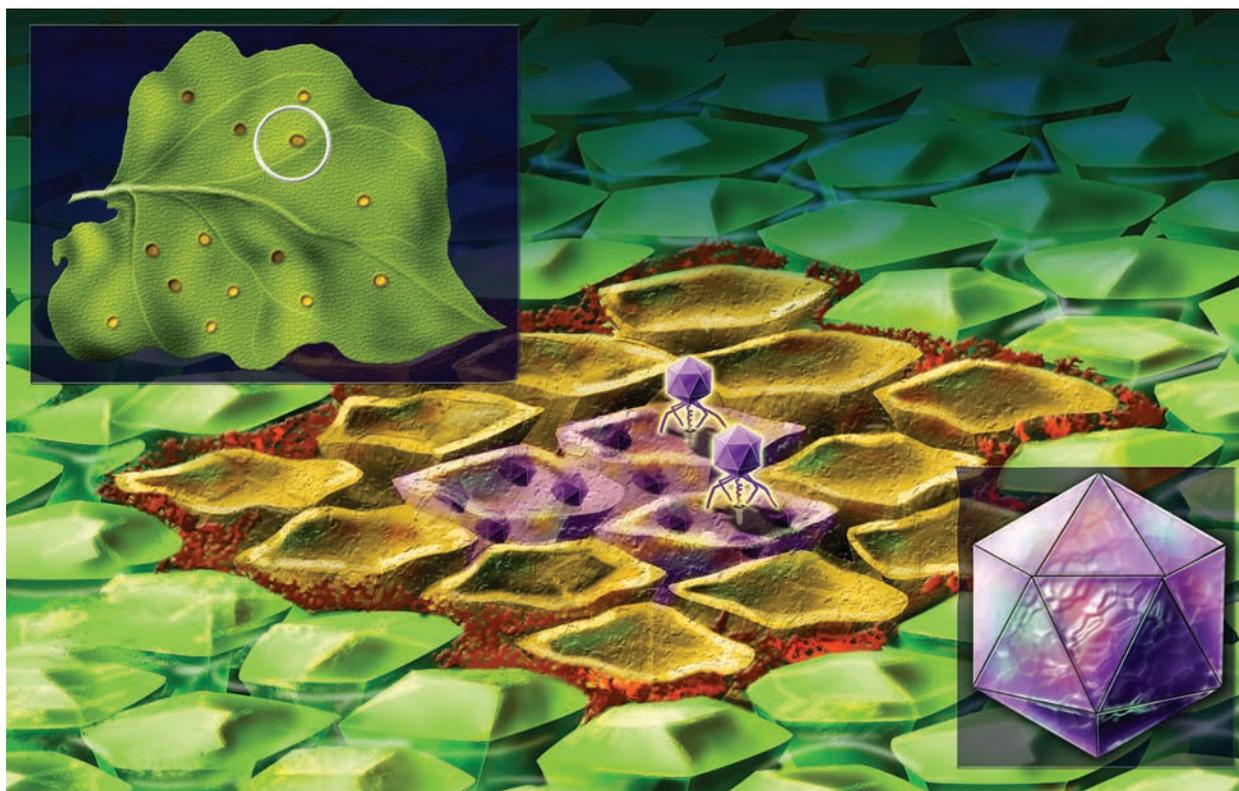


Figura 2. Respuesta hipersensitiva al patógeno viral en tabaco (TMV) y tinción de células muertas en respuesta al oomiceto *Hyaloperonospora parasitica* en *Arabidopsis*.
Fuente: Nicollet Rager Fuller, National Science Foundation; http://www.nsf.gov/news/mmg/media/images/pcd_plants_h.jpg

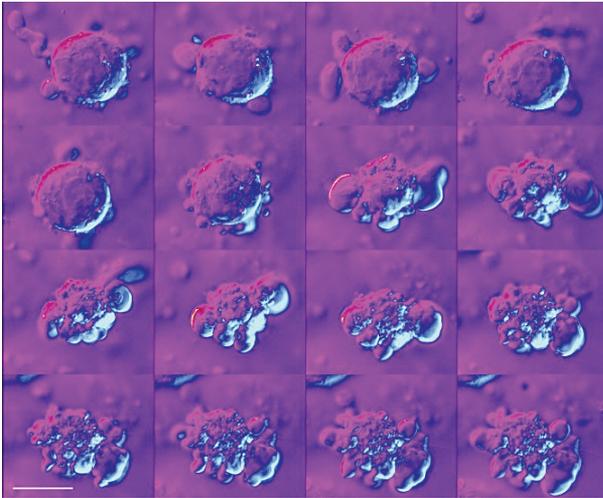


Figura 3. Secuencia de cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis.
Fuente: Paul Andrews. Wellcome Images, <https://www.flickr.com/photos/wellcomeimages/>.

las células que rodean el sitio del ataque de un agente patógeno mueren, y así impiden una mayor invasión de patógenos [7].

Aunque la respuesta hipersensitiva se ha documentado como un mecanismo de defensa, solo en los últimos veinte años se han aportado evidencias que demuestran que el proceso de muerte celular programada en las plantas presenta un sorprendente parecido con un mecanismo de suicidio celular en animales, conocido como *apoptosis* [8].

En la apoptosis se produce la muerte de la célula mediante una serie de eventos bioquímicos que se desarrollan de manera secuencial y ordenada, y que se codifica en el genoma [9]. En los últimos años se ha reunido evidencia que establece un paralelo entre la reacción hipersensitiva en las plantas y la apoptosis animal.

En los animales, la apoptosis se lleva a cabo mediante una secuencia de pasos que incluyen la condensación de la cromatina, escisión del ADN internucleosomal, formación de cuerpos apoptóticos y, finalmente, la inmersión y degradación en los lisosomas fagocíticos de las células adyacentes (figura 3) [4].

Estos eventos bioquímicos dan cuenta de la similitud entre los procesos de apoptosis de plantas y animales, con excepción del paso final de la apoptosis animal, es decir, la producción de cuerpos apoptóticos cuando se ha fragmentado toda la célula, cuerpos que posteriormente son fagocitados por los macrófagos del sistema inmune del animal [10].

Las moléculas responsables de la destrucción celular se denominan *caspasas* [12-14]. En las células animales las caspasas están inactivas en ausencia de inducción de muerte celular, y

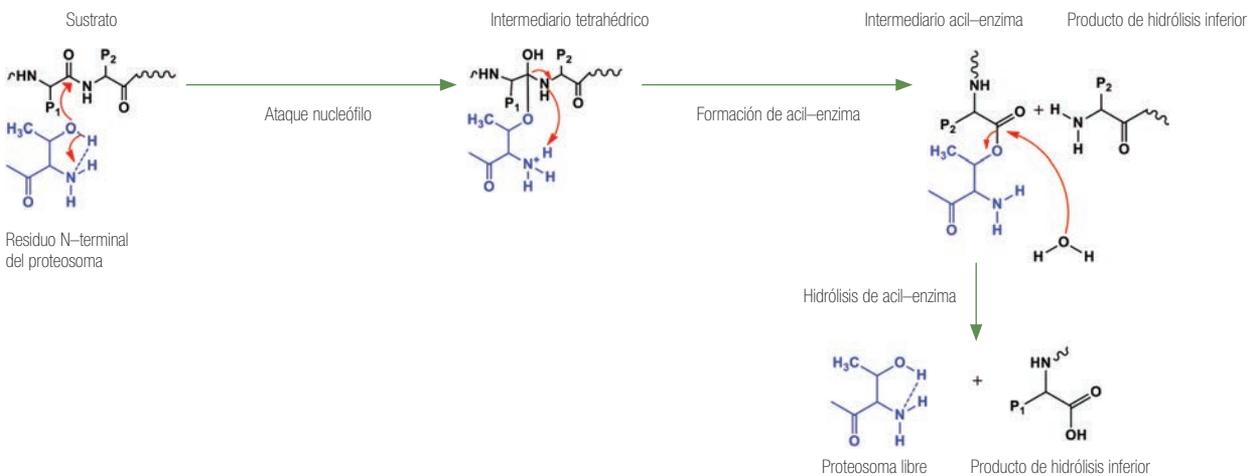


Figura 4. Modelo catalítico general para una proteasa.
Fuente [18]

solo después de un determinado estímulo, una primera caspasa es activada, lo que marca el punto de partida para que otros miembros de esta familia de enzimas actúen. Se pueden separar las caspasas en dos grupos: *caspasas iniciadoras* y *caspasas efectoras*; las primeras promueven la división de las últimas. Las caspasas efectoras se encargan de degradar sustratos claves para la morfología celular. La existencia de caspasas en las plantas es evidenciada por diversos estudios; principalmente se han usado inhibidores para demostrar que sin la presencia de estas enzimas se bloquea la muerte celular [15]. Este tipo de ensayos consiste básicamente en observar la respuesta de células frente a inductores e inhibidores de caspasas, con el fin de determinar si la inhibición interrumpe el desarrollo de apoptosis [16, 17].

OTRAS EVIDENCIAS DEL DESARROLLO DE APOPTOSIS EN PLANTAS

Además de los estudios sobre las caspasas, desde mediados de la década de los noventa se ha acumulado otras evidencias que confirman el desarrollo de apoptosis en las plantas, (tabla 1). Se han reconocido diversos marcadores de apoptosis que se pueden identificar mediante distintas metodologías. Una de las más utilizadas es la determinación por electroforesis de la degradación aleatoria del ADN que se observa como un manchón particular. Este resultado se encuentra dentro de un patrón de bandas características de un proceso apoptótico [8]. Otros eventos bioquímicos y citológicos que se pueden apreciar son la pérdida de asimetría de la membrana celular, la condensación de la cromatina y la detección del fraccionamiento de ADN [19, 20]. Estos métodos de evaluación de apoptosis se pueden utilizar de manera similar tanto en animales como en plantas [9].

Tabla 1. Algunos estudios realizados sobre apoptosis en diversas especies vegetales

Especie	Variable	Metodología
<i>Vigna unguiculata</i>	Desdoblamiento del ADN nuclear	Reacción túnel [20]
Tabaco	Muerte celular inducida por TMV	Péptidos inhibidores específicos de caspasa Ac-YVAD-CMK y AC-DEVD-CHO [18]
<i>Nicotiana glauca</i>	Pérdida de asimetría de la membrana celular	Suspensiones celulares inducidas con camptotecina. Citometría de flujo [21]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fragmentación del ADN	Protoplastos inducidos con UV-C-reacción túnel [22]
Avena	Fragmentación celular, colapso nuclear	Células en suspensión inducidas con la toxina victorina [16]
Tabaco	Estado del poro de transición mitocondrial	Inducción de protoplastos con NaCl. Análisis por citometría de flujo [23]
Tomate	Transducción de señales, muerte celular, ROS	Suspensiones celulares inducidas con AIC3- inhibidores de caspasas, antioxidantes, inhibidores PLS [24]

PAPEL DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LAS PLANTAS

Diversos procesos fisiológicos de las plantas son regulados por muerte celular programada. Dichos procesos tienen que ver con mecanismos propios de diferentes estados de la planta, como, por ejemplo, la muerte de células aleurónicas durante la germi-

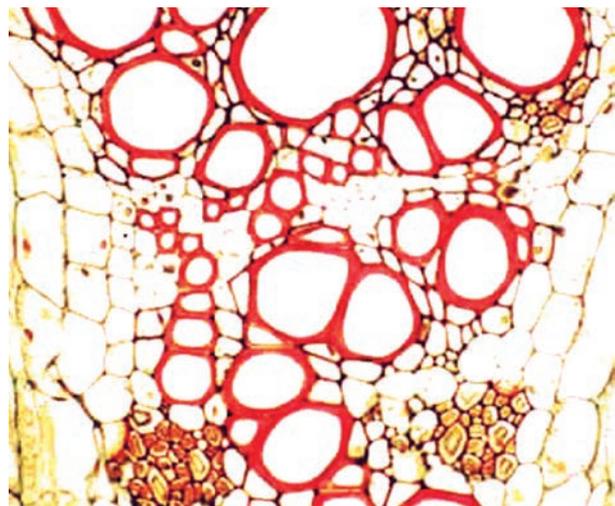
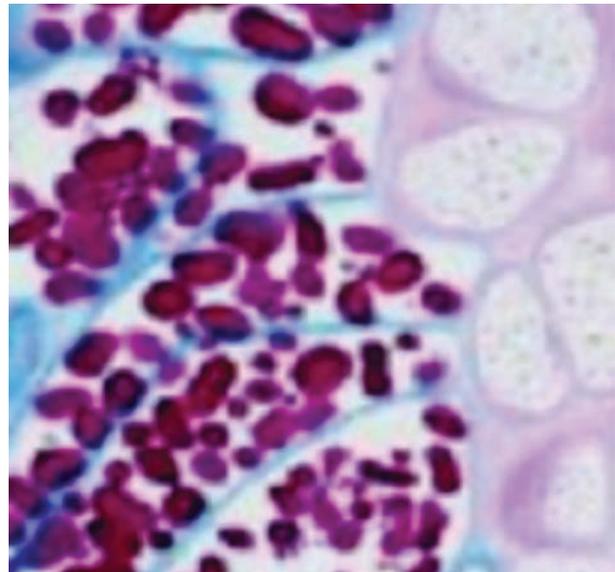


Figura 5. a) Micrografía del grano que muestra aleurona de las células del endospermo diferenciadas terminalmente llenas de almidón; b) células de xilema diferenciadas; c) senescencia de la hoja de arce. Fuente: [4]

nación (figura 5a); procesos de diferenciación del xilema (figura 5b); la reproducción y el desarrollo floral; diferenciación sexual de plantas hermafroditas en angiospermas [25] y durante el desarrollo de procesos de senescencia (figura 5c), la cual comienza con disminución de la rapidez fotosintética, caracterizada por una participación muy activa de las vacuolas y procesos de autofagia [26].

MUERTE CELULAR PROGRAMADA COMO RESPUESTA DE DEFENSA

La adaptación de las plantas a situaciones ambientales de estrés muestra otras formas de muerte celular programada. Por ejemplo, durante periodos de ausencia de oxígeno, algunos tipos de plantas sobreviven al estimular la formación del aerénquima, un tejido poroso cuya función es facilitar el transporte del oxígeno del vástago a las células de la raíz. La formación del aerénquima implica la muerte ordenada de células normales, que da lugar a la formación de cavidades que facilitan el intercambio gaseoso, mientras se reduce el número de células que requieren oxígeno.

Parece que las semejanzas entre la apoptosis en animales y la muerte celular programada en plantas tienen que ver con aspectos evolutivos comunes. Aunque existen diferencias, como, por ejemplo, la falta de formación de cuerpos apoptóticos, lo cual puede explicarse porque son funcionalmente irrelevantes debido a la ausencia de fagocitosis. Adicionalmente, algunos autores proponen que la ruta de muerte celular en las plantas podría involucrar procesos de autólisis [8].

La PCD es un mecanismo normal que se encuentra vinculado estrechamente a muchos aspectos de la fisiología de las plantas, y aunque todavía faltan muchos aspectos por comprender, existe consenso en que el estudio del desarrollo de PCD contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas, y en este sentido se contará con una herramienta de fitomejoramiento e investigación dirigida a la obtención de variedades con tolerancia a plagas o enfermedades, así como a estrés por variabilidad ambiental. ●

REFERENCIAS

- [1] Azcón-Bieto J, Talón, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid: McGraw-Hill; 2003.
- [2] Zhaao T, Davis L, Verpoortec R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2005; 23(4): 283-333.
- [3] Hahn MG. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology* 1996; 34: 387-412
- [4] Hofius D, Tsitsigiannis D, Jones J, Mundy J. Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology* 2007; 17(2): 166-187.
- [5] Álvarez M, Espinosa F. Jasmonatos y salicilatos: fitohormonas clave en las reacciones de defensa de las plantas y de comunicación en el ecosistema. En *La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis*. Madrid: Thomson; 2004.
- [6] Jones D, Takemoto D. Plant innate immunity direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* 2004; 16(1): 48-62.
- [7] Agrios G. *Fitopatología*. México: Limusa; 1998.
- [8] Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P. Plant programmed cell death: a common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 2000; 38(9): 647-655.
- [9] Karp G. Señalización celular y transducción de señales: comunicación entre células. En *Biología celular y molecular*. México: Mc Graw Hill; 2006.
- [10] Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods from morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2003; 38(3): 275-340.
- [11] García JL. Ciencias de Joseleg; <http://cienciasdejoseleg.blogspot.com/2013/04/apoptosis-la-mitocondria-y-el-suicidio.html>.
- [12] Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1387(1-2): 17-31.
- [13] Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005; 21: 35-56.
- [14] Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* 1999; 68: 383-424.
- [15] Al van der Hoorn R, Jones J. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 2004; 7(4): 400-407.
- [16] Kusaka K, Tada Y, Shigemi T, Sakamoto M, Nakayashiki H, Tosa Y et al. Coordinate involvement of cysteine protease and nuclease in the executive phase of plant apoptosis. *FEBS Letters* 2004; 578(3): 363-367.
- [17] Del Pozo O, Lam E. Caspase and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* 1998; 8(20): 1129-1132.
- [18] Kisselev A, Goldberg A. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & Biology* 2001; 8(8): 739-758.
- [19] O'Brien I, Reutelingsperger C, Holdaway K. Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 1997; 29(1): 28-33.
- [20] Ryerson D, Heath M. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatment. *The Plant Cell* 1996; 8(8): 393-402.
- [21] O'Brien IEW, Baguley BC, Murray BG, Morris BAM, Ferguson IB. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *The Plant Journal* 1998; 13(6): 803-814.
- [22] Danon A, Gallois P. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 1998; 437(1-2): 131-136.
- [23] Lin J, Wang Y, Wang G. Salt stress-induced programmed cell death in tobacco protoplasts is mediated by reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition pore status. *Journal of Plant Physiology* 2006; 163(7): 731-739.
- [24] Yakimova E, Kapchina-Toteva V, Woltering E. Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology* 2006; 164(6): 702-708.
- [25] Young TE, Gallie DR. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* 2000; 44(3): 283-301.
- [26] Munné-Bosch S, Alegre L. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 2004; 31(3): 203-216.