

ACADEMIA DE CIENCIAS DE LA REGIÓN DE MURCIA

Consideraciones sobre la biología redox en plantas y el papel central de la mitocondria

Discurso de ingreso leído por la Académica electa
Ilma. Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela
en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión
como Académica de Número,
celebrado el día 20 de diciembre de 2011 y
Discurso de contestación del Académico de Número
Ilmo. Sr. D. Carlos García Izquierdo





ACADEMIA DE CIENCIAS
DE LA REGIÓN DE MURCIA

Consideraciones sobre la biología redox en plantas y el papel central de la mitocondria

Discurso de ingreso leído por la Académica electa

Ilma. Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela

en el acto de la Sesión Solemne de su Toma de Posesión
como Académica de Número,
celebrado el día 20 de diciembre de 2011

y

Discurso de contestación del Académico de Número
Ilmo. Sr. D. Carlos García Izquierdo

Murcia, 2011

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (arts. 270 y ss. Del Código Penal).

Con el patrocinio de la Dirección General de Universidades y Política Científica.

© Academia de Ciencias de la Región de Murcia, 2011

© Francisca Sevilla Valenzuela

I.S.B.N.: En trámite

Depósito Legal: MU 1521-2011

Imprime: Compobell S. L., Murcia

CONSIDERACIONES SOBRE LA BIOLOGÍA
REDOX EN PLANTAS Y EL PAPEL CENTRAL
DE LA MITOCONDRIA

Discurso de la Académica Electa

Ilma. Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela

Índice

	Págs.
Prólogo	1
Discurso de la Ilma. Sra. Dña. Francisca Sevilla Valenzuela	
Introducción	5
Endosimbiosis y el origen de la célula eucariota	7
De prisionero a esclavo: transferencia de genes. Consecuencias genéticas, genómicas y evolutivas	15
Coordinación de la convivencia: señalización intercompartimental	21
Origen de la red de ROS	23
La mitocondria como orgánulo centinela de la fisiología celular: Fusión y dinámica mitocondrial	26
Metabolismo redox en plantas	34
Revisando el concepto de daño	41
Señalización por ROS	42
Especificidad de la señalización por ROS	48
Señalización por péptidos mitocondriales	51
Señalización redox mitocondrial	53
Mitocondria, muerte celular y apoptosis	56
Mitocondria, ROS y envejecimiento	59
Del laboratorio al campo: perspectivas de futuro	63
Epílogo	69
Bibliografía	71
Discurso de contestación del Ilmo. Sr. D. Carlos García Izquierdo	77

....“El hombre debe resistir la tentación de cambiar la naturaleza. Lo que tenemos que hacer es salvarla y aprender de ella... Si la cuantificáramos, sus servicios equivaldrían posiblemente al producto interior bruto de todo el planeta, unos 55 billones de dólares. Ahí está incluido el aire que respiramos, el agua que bebemos, la polinización que permite las cosechas, el conocimiento infinito y acumulado de los ecosistemas...

...El paraíso está en la Tierra y apenas hemos empezado a explorarlo”.

Edgard O. Wilson

Entrevista con motivo del Premio de la Fundación BBVA en Ecología y Biología de la Conservación (año 2011).

Prólogo

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos,
no es “¡Eureka!”, sino “Es extraño...”*

Isaac Asimov

Excmo. Sr. Presidente
Ilmos. Sra. y Sres. Académicos
Queridas amigas y amigos
Señoras y señores

Debo empezar expresando públicamente mi alegría y mi sincero agradecimiento a los miembros de esta Academia de Ciencias de la Región de Murcia por su generosa acogida y por el honor que me otorgan con su elección, brindándome la oportunidad de integrarme en esta noble Institución, a la que espero no defraudar y corresponder como de mí se espera.

En un día tan especial para mí quiero rendir mi pequeño homenaje a todas las mujeres investigadoras que luchan por conseguir sus objetivos científicos en unas condiciones frecuentemente desfavorables.

Quiero concretar mi gratitud haciendo mención explícita de las personas que más directamente han tenido que ver con que hoy reciba tan inmerecido reconocimiento. Lo haré, citando en primer lugar a mis padres, consciente de que los reconocimientos que ahora recibo tienen sus raíces en los valores recibidos. Mi padre, quien con su ejemplo me supo transmitir el valor del trabajo bien hecho y del sentido de la responsabilidad y a mi madre, le agradezco la firmeza inalterable en apoyar mi formación universitaria, aunque ello significase un esfuerzo adicional por mi traslado a Granada. Junto a mis padres, mis hijos Paloma y Miguel, que son fuente constante de satisfacción y felicidad, y a mi marido, Miguel, amigo, compañero y cómplice, con quien he

compartido alegrías pero también preocupaciones y desvelos. Él ha sido y es el pilar más importante en mi aventura científica.

Quiero extender mi agradecimiento a los Académicos que avalaron esta candidatura, la Profesora Ángela Molina una amiga entrañable, a quien le agradezco su continuado apoyo en posibilitar mi incorporación a esta Academia. Al Profesor José Luis Iborra, amigo al que conozco desde mi llegada a Murcia y que me ofreció mi primera opción de trabajo, y al Profesor Carlos García, compañero y sin embargo amigo, a quien le debo no solamente que haya sido ponente de mi candidatura sino que haya tenido la generosidad de redactar el Discurso de Contestación.

Destacar también, el respaldo recibido de los Académicos al conocer mi candidatura y, más concretamente, del Prof. José María Ruiz quien me consta que ha estado apoyándome desde el principio.

He sido afortunada al contar con el Dr. Luis Alfonso del Río como director de mi tesis doctoral. En ella le expresaba mi más sincero y especial agradecimiento por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él, por su formación científica y por el interés y ayuda prestados en todo momento, influyendo de forma notable en mi formación y brindándome una gran oportunidad para hacerme un hueco en el mundo de la investigación en el metabolismo oxidativo. Esta gratitud está hoy día vigente por su continua colaboración, mantenida a lo largo de todos estos años. Luis Alfonso aparte de ser un buen amigo, sigue siendo para mí un ejemplo de compromiso, de entrega y de excelencia científica." Mi referente, mi maestro".

Señalar que durante mi vida en Murcia he tenido el privilegio de contar con un pequeño equipo de trabajo cuyo signo de identidad es el haber sabido adaptarse a las características de cada etapa y que en épocas de adversidad,

que no han faltado, ha sabido engrandecerse y mostrar un denodado empeño en alcanzar los retos que nos habíamos fijado. Después de 27 años de dedicación, entusiasmo y mucho esfuerzo hemos logrado transformar una pequeña habitación del antiguo CEBAS con escasos medios, en laboratorios dotados de moderna tecnología e infraestructura. Mi agradecimiento a todos los que han contribuido a estos logros, personificado en quien aún permanece a mi lado, la Dra. Ana Jiménez una gran amiga y compañera, sin cuya generosidad, cercanía, visión investigadora y entrega, el grupo no hubiese alcanzado su actual consideración y entidad. Junto a ella resaltar la figura de Loli la Paz, con la que he trabajado desde el año 1981, cuando llegué al CEBAS como becaria postdoctoral y que ha permanecido con nosotros responsabilizándose de los aspectos técnicos, hasta su bien merecida jubilación en este año.

También quiero dedicar mi especial recuerdo y gratitud a un magnífico amigo que fue el artífice de mi incorporación al CEBAS, me refiero al Prof. Antonio León. Resaltar su talante conciliador, su sagacidad, su capacidad para transmitir optimismo y sus acertados consejos en situaciones críticas. Mi mayor satisfacción ha sido el contar con su inestimable amistad y su interés por la evolución de mi actividad profesional.

He tenido la suerte de mantener la amistad y colaboración con mis compañeros del Zaidín, y como no, quiero expresar mi agradecimiento a los compañeros del CEBAS con quienes he compartido trabajo y avatares.

Finalmente comentar que lo cierto es, que como escribe Marco Aurelio en sus Meditaciones, “creo que debo a los dioses el haber tenido unos buenos padres, hermanos, familiares, maestros capacitados y amigos”, por lo que hoy, que es un día muy importante para mí, de nuevo expreso mi gran satisfacción y alegría.

Introducción

He elegido centrar mi discurso de investidura en una Biología relativamente reciente, “la del oxígeno y de sus especies reactivas” que en plantas, al igual que en animales y humanos, constituye un campo científico espectacularmente dinámico. En estas últimas tres décadas, ha experimentado un interés y un progreso considerables, que han llevado a importantes cambios conceptuales sobre la función celular que estas especies reactivas del oxígeno (ROS) desempeñan. Aunque el oxígeno molecular fue introducido en la atmósfera terrestre por organismos fotosintéticos primitivos con anterioridad a la aparición del hombre, éste no descubrió científicamente que esta sustancia era tan vital para su propia existencia hasta hace unos 230 años, cuando Joseph Priestle en 1774 enfocando los rayos del sol sobre óxido de mercurio, recogió el oxígeno puro o “aire deflogisticado” que se desprendía. Con una gran capacidad previsorá este investigador especuló no solamente con las posibles aplicaciones médicas del oxígeno puro, sino también con su probable toxicidad biológica. Hubo de transcurrir bastante tiempo para que Denham Harman (1956) describiera por vez primera, la asociación entre la producción de “radicales libres” en los sistemas biológicos, debida a radiaciones, con la generación de cáncer y con el envejecimiento. Sin embargo a pesar de esta descripción, no fué hasta 13 años después, con el descubrimiento por McCord y Fridovich (1969) del Duke University Medical Center de Durham (U.S.A.), de una enzima altamente especializada, a la que se denominó con el nombre de Superóxido Dismutasa (SOD), cuando la importancia a nivel celular de las especies reactivas del oxígeno, quedó firmemente establecida y su papel en el proceso de envejecimiento reconsiderado, dando lugar a la “teoría mitocondrial del envejecimiento” como un refinamiento de la teoría de Harman del envejecimiento por radicales libres. El descubrimiento de la actividad SOD llevó en palabras de A.M. Michelson a *“Una explosión intelectual y creativa*

sobre el metabolismo y la biología molecular del oxígeno que sólo podía compararse con la que surgió a raíz de la publicación en 1953 por Watson y Crick sobre la estructura en doble hélice del ADN”.

Desde entonces los conceptos sobre las funciones de las especies reactivas del oxígeno en células heterotróficas de plantas se han venido inspirando parcialmente en los obtenidos en modelos animales y otros sistemas como las levaduras y bacterias no fotosintéticas, y han llevado a la aceptación generalizada de la multifuncionalidad de las ROS. A través de la modulación redox de proteínas y de otras biomoléculas, las ROS participan en el control de muchos aspectos relacionados con la fisiología, el desarrollo vegetal, las respuestas de aclimatación y en eventos celulares suicidas.

Una aproximación holística al metabolismo del oxígeno en plantas requiere la consideración no sólo de las bases químicas y de los factores que contribuyen y controlan la producción de las especies reactivas del oxígeno, sino también de cómo las células perciben y responden a los cambios en la abundancia de estas ROS. Formadas durante la reducción del oxígeno molecular o de la oxidación del agua, las ROS se producen a través de la actividad de enzimas y reacciones de oxidación-reducción (redox) en prácticamente cada uno de los compartimentos celulares. Sin embargo la acumulación de ROS en ellos está altamente controlada por sistemas antioxidantes endógenos, que funcionan no sólo para limitar la duración de la señalización por estas especies sino que también participan en un extenso rango de vías de señalización “redox” y con otras funciones reguladoras. Más aún, cada forma o especie reactiva del oxígeno y cada antioxidante parece regular una serie concreta de genes.

Mi intención es presentar algunas reflexiones en torno a esta biología redox, con una dedicación más concreta a las dos hipótesis actuales de “daño oxidativo” frente a “señalización oxidativa”, y situar en su contexto el papel que, como sensores del estado redox celular, ejercen las mitocondrias como orgánulos centinelas de la fisiología vegetal y animal. Para ello he

considerado interesante aunque posiblemente atrevido por mi parte, porque ello supone cierta heterodoxia, el abordar inicialmente algunos aspectos de la evolución celular ya que creo que de este modo puede quedar fácilmente reflejada la importancia de las reflexiones anteriores, a la vez que permite explicar el interés que presenta el desarrollo de la investigación en Plantas. Pero, ¿por qué el estudio en plantas?

Las plantas y los humanos compartimos un ancestro común que habitó nuestro planeta hace unos tres mil millones de años. Nos parecemos a las plantas más que a las bacterias, aunque menos que a los hongos. Tras la divergencia de los linajes de la especie humana y los hongos, el antepasado de las plantas actuales incorporó como endosimbionte a una bacteria fotosintética. La fotosíntesis, la conversión de energía solar en química, ha permitido a las plantas ocupar un nicho diferente aunque compatible con el de la especie humana, ya que producen el oxígeno que respiramos. Nos aportan además alimento, materias primas y numerosos compuestos químicos. Pero, ¿cómo empezó todo esto?

Endosimbiosis y el origen de las células eucariotas

Hace unos 3700 millones de años aparecieron sobre la tierra los primeros seres vivos. Eran microorganismos unicelulares, bacterias o arqueas no nucleadas, no muy distintos de las bacterias actuales, y que gracias a su notable capacidad de evolución y adaptación, dieron origen a una amplia diversidad de especies e invadieron cuantos hábitats el planeta podía ofrecerles. La biosfera estaría repleta de procariotas si no se hubiera dado el avance extraordinario del que surgió una célula perteneciente a un tipo muy distinto, la célula eucariota, que posee un núcleo genuino. Este acontecimiento clave en la historia de la vida se produjo hace alrededor de 2000 a 1500 millones de años durante el Proterozoico temprano, y supuso el desarrollo de membranas y su compartimentación. Se han propuesto dos

hipótesis mutuamente no excluyentes para explicar el origen de las células eucariotas: la endosimbiosis y la autogénesis.

En 1967, Lynn Margulis¹ de la Universidad de Massachusetts formuló su teoría sobre el origen de las células eucariotas, teoría a la que Max Taylor especializado en protistas, profesor de la Universidad de British Columbia, bautizó como “Teoría de la endosimbiosis seriada”. Esta teoría describe que la aparición de las primeras células eucariotas es el resultado de tres incorporaciones permanentes de lo que alguna vez fueron células procariotas fisiológicamente diferentes y autónomas, dentro de una célula huésped procariota. Una de estas bacterias aportó los andamios de los microtúbulos, otra, ciertas capacidades metabólicas peculiares y la tercera (que se sumó más tarde a las otras dos), se convirtió en las actuales mitocondrias. Esa célula eucariota primigenia empezó a proliferar, y una de sus descendientes sufrió aún otra experiencia traumática: engulló a una bacteria fotosintética de la que provienen los actuales cloroplastos, mientras que la envuelta nuclear y el retículo endoplasmático podrían haber evolucionado por autogénesis. En contraste con esta teoría, la “Hipótesis Autogénica” sostiene que las mitocondrias y los cloroplastos, así como el retículo endoplasmático, se desarrollaron como consecuencia de las presiones de selección para la especialización fisiológica dentro de una antigua célula procariota. Según esta hipótesis, la membrana de la célula huésped se habría invaginado para encapsular porciones fisiológicamente diferentes de la célula ancestral. Con el transcurso del tiempo, estas regiones unidas a la membrana se convirtieron en estructuras cada vez más especializadas hasta conformar los diferentes orgánulos que definen actualmente a la célula eucariota. Sin embargo, hechos como la estructura de la membrana, el tipo de reproducción, la secuencia de ADN y la susceptibilidad a los antibióticos de los cloroplastos y las mitocondrias tienden a sustentar la hipótesis simbiogénica².

A continuación detallo algunos de los aspectos más llamativos de las tres incorporaciones simbiogénicas.

Primera incorporación: en primer lugar, una bacteria consumidora de azufre, arquea fermentadora o termoacidófila, se habría fusionado con una bacteria nadadora (espiroqueta). Juntos, se convirtieron en el “nucleo-citoplasma”, la sustancia base de los ancestros de las células animales, vegetales y fúngicas. Este temprano protista nadador que aún carecía de mitocondrias y otros orgánulos clave característicos de las actuales células eucarióticas, era un organismo anaeróbico. Envenenado por el oxígeno, vivía en arenas y lodos donde abundaba la materia orgánica, en grietas de las rocas, en charcos y estanques donde el oxígeno estaba ausente o era escaso. A las características iniciales de ambas células se le sumaría una nueva morfología más compleja y una llamativa resistencia al intercambio genético horizontal. El ADN (ácido desoxirribonucleico) quedaría confinado en un núcleo interno separado del resto de la célula por una membrana. Sin embargo, muy pocos de estos descendientes, por no decir ninguno, han conseguido sobrevivir hasta nuestros días. Con respecto a la identidad del primer hospedador, sólo se han descrito unos pocos candidatos como posibles protagonistas de tal honor: *Archaeobacteria* (sulfobacterias, halobacterias y metanobacterias), dotadas de una organización eficiente para alimentarse de bacterias, en este caso de *Eubacteria* (bacterias gram-positivas como *Escherichia coli* y cianobacterias) que posteriormente evolucionarían originando mitocondrias y cloroplastos. La hipótesis se basa en datos filogenéticos moleculares sustentada por bioquímica comparativa que muestra que las arqueobacterias termófilas poseen proteínas similares a histonas y actina.

Una teoría alternativa basada en citología comparativa, es aquella que considera que miembros de las *Archeozoa*, taxón eucariótico caracterizado por la carencia de mitocondrias, plastidios, peroxisomas y aparato de Golgi, constituyó el primer hospedador. Sin embargo esta carencia de organelas en *Archeozoa* podría responder a una pérdida de las mismas durante la evolución. Esta interpretación se apoya en la identificación en el núcleo de los

Archeozoa de genes codificantes de proteínas mitocondriales. Sin embargo, no se conoce si los genes presentes en la bacteria engullida y digerida se transfirieron al núcleo mediante un mecanismo de transferencia horizontal de genes antes de la evolución de las mitocondrias³ o si aquellos genes se transfirieron desde las mitocondrias al núcleo con anterioridad a la pérdida de las mitocondrias⁴. Para Lyn Margulis⁵ (1992) como he comentado anteriormente, el primer hospedador ya era una fusión entre dos organismos procariotas no relacionados, concretamente entre una arqueobacteria fermentadora o termoacidófila como *Thermoplasma* y una eubacteria como *Spirocheta*. Realmente a día de hoy no conocemos la identidad de este primer protista o ancestro único, sin embargo, podemos confiar en el hecho de que las arqueobacterias son eucariotas similares a los procariotas y que las Archeozoa son procariotas similares a eucariotas, y que hemos reducido la aparente brecha entre procariotas y eucariotas. También sabemos que la evolución puede ser paralela, divergente o convergente y que tanto una “graduación progresiva” como una “degradación progresiva” son procesos que pueden tener lugar.

Segunda incorporación: en esta segunda fusión, después de que evolucionara la mitosis en los protistas nadadores, éstos adquirieron otro tipo de microorganismo de vida libre, una bacteria que respiraba oxígeno, lo que condujo a células con tres componentes cada vez más grandes y más complejas capaces de engullir alimento en forma de partículas. Este nuevo endosimbionte, originariamente bacteria respiradora de vida libre, se convertiría en las actuales mitocondrias presentes en las células eucariotas de los pluricelulares, posibilitando su éxito en un medio rico en oxígeno. El triplemente complejo respirador de oxígeno apareció por primera vez sobre la tierra quizás tan pronto como hace unos 2000 millones de años, cuando el oxígeno molecular comenzó a penetrar en la atmósfera en cantidades apreciables como resultado de la aparición sobre la tierra de las cianobacterias, microorganismos fotosintéticos, que recurren a la energía de

la luz solar para extraer de las moléculas de agua el hidrógeno que necesitan en la construcción de su propio organismo, liberando como subproducto el oxígeno molecular. Los animales y hongos somos el resultado de esta segunda incorporación.

En cuanto a la identificación de las bacterias responsables, se han ido proponiendo varios candidatos. En 1975, John y Whatley propusieron a bacterias aeróbicas similares a *Paracoccus denitrificans* basándose en la similitud entre sus respectivas cadenas de transportadores electrónicos. En esta misma época Woese⁶ (1977) sugirió que las mitocondrias habían evolucionado a partir de bacterias similares a las bacterias púrpuras no sulfuradas como *Rhodospirillum rubrum* considerando la presencia en este tipo de bacterias, de invaginaciones de la membrana plasmática similares en apariencia a las crestas mitocondriales. Al igual que muchas de las bacterias púrpuras no sulfuradas, las promitocondrias originales podrían haber sido un anaerobio fotosintético. Estas bacterias son “aeróbicas facultativas” y podrían haber eliminado sus habilidades fotosintéticas en presencia de oxígeno. Su adopción como endosimbiontes podría haber facilitado su reversión a organelas respiratorias. Al igual que las mitocondrias, las bacterias púrpuras no sulfuradas contienen una adenosintrifosfatasa (ATPasa) similar a las de tipo FoF1-H⁺-ATPasa.

Se acepta que la adopción de las mitocondrias salvó una línea de células eucariotas del peligro de extinción o confirió tal ventaja selectiva: su predominio provocó la extinción casi universal de las que no las habían adquirido. Esta hipótesis que goza de una gran aceptación, explicaría de una manera muy elegante el “efecto salvador” de la adopción de las mitocondrias, que en las células actuales cumplen una función principal: llevar a cabo, gracias al oxígeno, la combustión de los metabolitos procedentes de los nutrientes para sintetizar un compuesto rico en energía, trifosfato de adenosina (ATP). La vida depende en buena medida de este proceso.

El guión anterior entraña una dificultad importante derivada de la generación a partir del oxígeno, en el interior celular, de grupos funcionales químicos tóxicos o especies reactivas del oxígeno (ROS). Entre estos “venenos celulares” se encuentran el ión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, a los que posteriormente me referiré más detalladamente. La adaptación al oxígeno tuvo lugar muy probablemente de una manera gradual y muchos de los organismos con toda probabilidad cayeron víctimas del “holocausto del oxígeno”. Los supervivientes, habrían desarrollado un sistema primitivo de protección frente a la toxicidad del oxígeno. Hubo de transcurrir un largo periodo antes de alcanzarse las finas complejidades de las mitocondrias actuales.

¿Cómo pudieron sobrevivir los anaerobios todo el tiempo que pasó antes de que surgieran los antepasados de las mitocondrias? Una de las soluciones dadas a este rompecabezas viene sugerida por la presencia en las células eucariotas de otros orgánulos consumidores de oxígeno. Se trata de los peroxisomas, con estructura y composición mucho más primitivas que la de mitocondrias, y que al igual que ellas, llevan a cabo reacciones metabólicas oxidativas. Sin embargo a diferencia de las mitocondrias no utilizan la energía de estas reacciones para sintetizar ATP, sino que la liberan en forma de calor. En el proceso, convierten el oxígeno en peróxido de hidrógeno, pero a continuación lo destruyen con la ayuda de enzimas especializadas. Están por tanto, cabalmente cualificados para defender de la toxicidad del oxígeno, al igual que las mitocondrias. ¿Por qué no desaparecieron con la llegada de las mitocondrias? Se cree que para cuando las células eucariotas adquirieron las mitocondrias algunas actividades de los peroxisomas llegaron a ser tan vitales, que la selección natural no pudo eliminar ya estos orgánulos. De cualquier manera, los datos que sustentan el origen endosimbiótico de los peroxisomas son bastante débiles en comparación con las que permiten establecer el relativo a cloroplastos y mitocondrias. A diferencia de estos dos orgánulos, los peroxisomas no contienen restos de un sistema genético

independiente. Esta ausencia de ADN podría responder a que en contraposición a lo ocurrido con las mitocondrias y cloroplastos, han perdido la mayor parte de sus genes originales o bien se han transferido al núcleo, como un hecho inevitable en un proceso endosimbiótico. En este sentido cabe decir, como algunos autores defienden que *“todo aquello que no es físicamente imposible puede ser posible, aunque no porque una decisión sea prudente significa que sea correcta”*.

Tercera incorporación: esta fusión es la que originó el Reino Vegetal. Las recientemente adquiridas células respiradoras de oxígeno fagocitarían bacterias fotosintéticas (cianobacterias) y algunas de ellas no digeridas haciéndose resistentes, pasarían a formar parte del organismo. La fusión completa prevaleció. Las ventajas selectivas que instaron la adopción de endosimbiontes fotosintéticos resultaron obvias, originando a su vez un nuevo organismo capaz de prosperar sin otros ingredientes que luz, aire, agua y unos pocos elementos minerales. Hay datos que demuestran que las células eucariotas adquirieron plastos al menos en tres momentos diferentes, dando lugar a las algas verdes, rojas y pardas. Los miembros del primero de estos grupos, antiguas algas verdes nadadoras, originaron los vegetales pluricelulares actuales.

Se han adelantado dos hipótesis generales para explicar la variedad en morfología y pigmentos de los cloroplastos presentes en los diferentes taxones de algas. Una de ellas y quizás la más aceptada, defiende que los cloroplastos han evolucionado independientemente en cada uno de los taxones principales⁷, si bien también es posible que el endosimbionte original ya contuviese todos los pigmentos y que los cloroplastos en cada taxón, evolucionara con la pérdida de determinados pigmentos. La secuenciación actual del genoma de una amplia variedad de algas es una de las estrategias que pueden permitir distinguir entre estas dos hipótesis. Mientras tanto, *Prochlorococcus marinus*, procariota que contiene ambos tipos de clorofila (clorofila a y clorofila b) además de ficobilinas, se ha nominado como uno de

los candidatos más estrechamente relacionado con las primitivas cianobacterias originarias de cloroplastos, y *Prochloron*, es otro de los candidatos, una célula procariota con clorofila a y clorofila b, pero carente de ficobilinas, relacionado con las cianobacterias que dieron lugar a los cloroplastos de las actuales algas verdes y de plantas superiores. También se ha sugerido que *Heliobacterium* es un descendiente contemporáneo de aquellas cianobacterias que originaron los cloroplastos de las algas pardas.

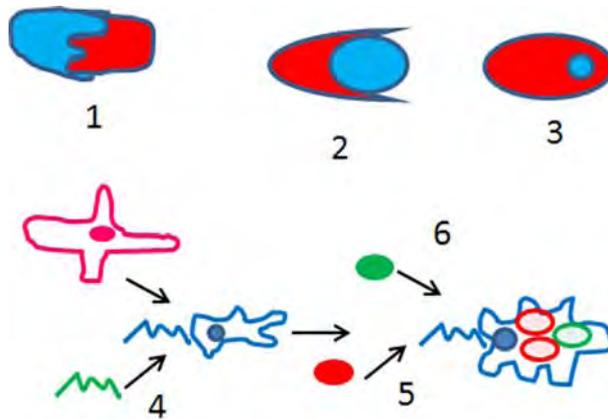


Fig. 1 Modelos quiméricos del origen de Eukarya. Arriba: 1-Fusión, 2-Simbiosis, 3- Ingestión y endosimbiosis. Abajo: Teoría de la endosimbiosis seriada: 4-Fusión de una arquea y una espiroqueta, 5- Adquisición de mitocondrias, 6: Adquisición de cloroplastos.

Independientemente de la identidad de estos ancestros, la adopción de endosimbiontes desempeñó desde luego un papel crucial en el origen de los eucariotas. Con todo, no fue ése el acontecimiento fundamental: más significativo aún para algunos investigadores, y que requirió así mismo un número mayor de innovaciones evolutivas, fue el largo y misterioso proceso que posibilitó tal incorporación: la lenta conversión, a través de más de mil millones de años, de un antepasado procariota, en un gran microorganismo fagocítico que poseía la mayoría de los atributos de las células eucariotas actuales. La ciencia levanta el velo que envuelve esta transformación capital,

sin la cuál, buena parte del mundo de los seres vivos, incluido el hombre, no hubiera existido⁸.

De prisionero a esclavo: transferencia de genes. Consecuencias genéticas, genómicas y evolutivas

La transferencia paulatina de la mayoría de genes de los endosimbiontes o protoorganelas al núcleo de la célula hospedadora, constituyó inicialmente la base que permitió la permanencia de los endosimbiontes. Esta captación de genes organulares por parte del núcleo, una forma especial de transferencia horizontal o lateral, supuso una pérdida gradual de autonomía genética de las organelas, a la vez que ha conducido no sólo al establecimiento de mitocondrias y plastos, sino también a cambios sustanciales en la composición de proteínas de otros compartimentos en las células vegetales. Inicialmente se pensó que una vez producida la transferencia, las proteínas codificadas por estos genes debían trasladarse después desde el citoplasma al endosimbionte (mitocondria y/o cloroplastos) para cumplir su función. Pese al rodeo tan complicado, este proceso no sólo aguantó los embates de la evolución, sino que también se reveló de una contundente eficacia: aquellos endosimbiontes que se reservaron copias de los genes transferidos acabaron desapareciendo. Sin embargo, actualmente se sabe también que muchos de los genes transferidos han evolucionado para codificar proteínas implicadas en funciones extraorganulares. En este sentido las copias nucleares de los genes organulares sirven como materia prima para pequeños ajustes o retoques evolutivos del genoma nuclear, que a su vez puede conducir a innovaciones evolutivas. En relación a ello, una de las preguntas inmediatas consiste en conocer en qué medida la transferencia endosimbiótica de genes ha conformado el genoma nuclear de eucariotas y específicamente de plantas.

La evaluación de la importancia de la contribución endosimbiótica a la evolución de los genes nucleares se hizo posible tras la secuenciación completa de los primeros genomas eucarióticos y procarióticos. En concreto el patrimonio o herencia de cianobacterias en los genoma de *Arabidopsis thaliana* (Figura 2) y de otros tres eucariotas fotosintéticos, se pudo discernir detalladamente mediante comparaciones genómicas, evidenciando que el 18%, es decir unos 4100 genes nucleares en *A. thaliana*, tienen su origen en los de cianobacterias y que aproximadamente la mitad de estos genes proporcionan funciones no plastidiales. En una extensión de este enfoque, la comparación de los genomas de *Arabidopsis*, de arroz, de la bacteria *Chlamydomonas reinhardtii* y el del alga roja *Cyanidioschyzon*, con los de 9 cianobacterias, 215 procariotas y 13 genomas eucariotas, confirman que aproximadamente el 14% de las proteínas examinadas en el genoma nuclear de cada uno de los cuatro eucariotas fotosintéticos son de origen cianobacteriano y como en el estudio inicial, la lista de los genes transferidos al núcleo en plantas, comprende secuencias codificantes de proteínas pertenecientes a prácticamente todas las categorías funcionales, localizadas en los diferentes compartimentos celulares. Consecuentemente, muchas de las vías metabólicas representan mosaicos evolutivos^{9,10}.

La transferencia de ADN desde mitocondrias y plastos al núcleo ha conformado significativamente el genoma de los eucariotas, siendo la transferencia desde el núcleo a plastidios extremadamente rara, sino ausente, y la transferencia de genes desde mitocondrias a plastos se ha podido confirmar recientemente en un alga verde. Un hecho interesante, es que mientras que en plantas el desplazamiento de determinados genes mitocondriales y plastidiales al núcleo ha ocurrido de forma frecuente en tiempos evolutivamente recientes, en muchos eucariotas, incluyendo animales, esta transferencia de genes funcionales es muy rara o bien ha cesado completamente. Sin embargo la transferencia de ADNs organulares al núcleo es un proceso continuo y omnipresente. Casi diariamente estas

transferencias al núcleo de ADN mitocondrial (siglas en inglés: mtDNA) y plastidial (siglas en inglés: ptDNA) dan lugar a secuencias no codificantes, denominados NUMTs en el primer caso, y NUPTs en el segundo. El análisis de estas secuencias ha permitido la reconstrucción de múltiples aspectos de los mecanismos de integración del ADN en el núcleo y han arrojado bastante luz sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre secuencias de ADN no codificante.

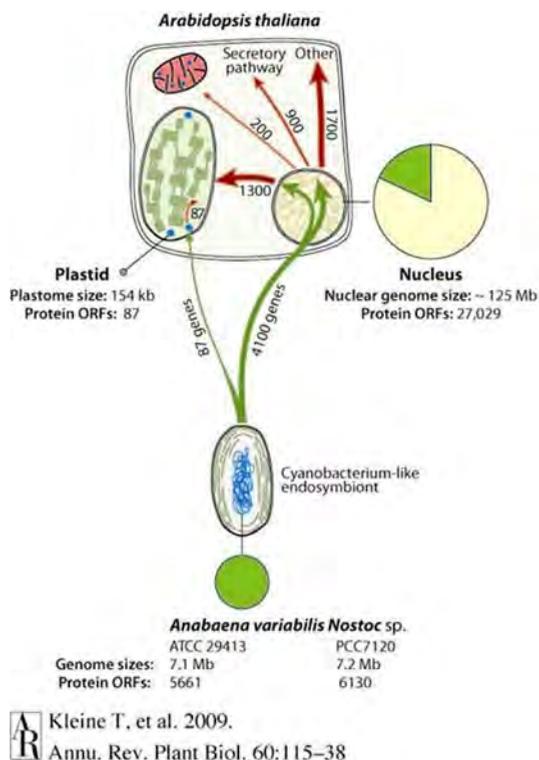


Fig. 2 Imagen de los genes de cianobacterias y el destino intracelular de sus productos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las flechas verdes indican el origen plastidial de 87 genes, y el nuclear de más de 4000 genes, mientras que las flechas rojas indican el destino celular de los productos de estos genes. El tamaño relativo de los tres genomas estudiados se representa por las áreas de los círculos; la fracción de genes nucleares de origen cianobacteriano en *Arabidopsis* está representada por el sector verde.

En cuanto a las consecuencias evolutivas, estas secuencias NUMTs y NUPTs que se habían considerado hasta hace poco tiempo como inocuas, dada la tasa extraordinariamente alta de la invasión del genoma nuclear por el ADN organular^{11,12}, se ha propuesto posteriormente que su inserción puede ser potencialmente perjudicial para los genes nucleares. Así, se ha comprobado que inserciones recientes de ADN mitocondrial modifican los patrones exón-intron de genes humanos y que algunos efectos potencialmente mutagénicos atribuidos al ADN organular, se han visto sustentados en ejemplos de una asociación entre NUMTs y la herencia de determinadas enfermedades en humanos¹³. La identificación reciente de genes conteniendo exones derivados de NUMTs/NUPTs en levadura, humanos, *Arabidopsis* y arroz, junto con el de genes que contienen antiguos NUMTs en varias especies de peces, aportan datos que permiten apoyar el punto de vista de que la transferencia de ADN de las organelas al núcleo representa un nuevo mecanismo para la remodelación de genes nucleares generando nuevos marcos abiertos de lectura ORFs, que permitirán la inserción de moléculas totalmente nuevas en proteínas pre-existentes, mejorando o suministrándoles nuevas funciones. Estos descubrimientos han llevado a plantear si la invasión del núcleo por NUMTs y NUPTs ha sido exclusivamente neutral o deletérea para la evolución génica, o bien, si los efectos beneficiosos han aumentado durante la evolución. En todo caso, es cierto que se necesitarán nuevos análisis para clarificar tanto la cantidad como la variedad de los efectos que esta transferencia de ADN organular tiene sobre la actividad de los genes nucleares.

¿Cómo se explica la salida del ADN desde las organelas al núcleo? Durante los procesos de autofagia (proceso catabólico de limpieza celular donde la célula digiere parte de si misma), fusión organular o división y estrés celular puede producirse una ruptura de las membranas organulares que puede hacer accesible el ADN organular para su incorporación ilegítima al núcleo, vía la maquinaria de importe nuclear. En plantas además, se piensa

que el escape simultáneo de ADN cloroplastídico y mitocondrial es un hecho frecuente y esta suposición se basa en la elevada incidencia de la presencia de posiciones específicas génicas (locus) complejas en el núcleo que contienen ADN mitocondrial y cloroplastídico. Este escape simultáneo probablemente se produce en condiciones que afectan a ambas organelas simultáneamente, concretamente cuando las células se encuentran estresadas o durante la degradación organular asociada a la gametogénesis. Otras condiciones que también pueden contribuir a este intercambio de ADN, podrían ser la asociación física directa del núcleo con las mitocondrias o con cloroplastos¹⁴ así como la incorporación por el núcleo de mitocondrias completas, como ocurre por ejemplo en células espermáticas de tabaco. En este sentido hay que destacar que en muchos eucariotas, incluyendo a los humanos y a varios taxones de plantas angiospermas, las organelas se heredan por vía materna, por lo que la transferencia de ADN desde las organelas al núcleo se piensa que ocurre cuando tiene lugar una degradación preferencial de las organelas durante gametogénesis masculina, en las plantas con flor durante el desarrollo del polen y en animales, cuando el ADN escapa de mitocondrias degeneradas del esperma inmediatamente después de la penetración del óvulo por la célula espermática. Esta relocalización del ADN cloroplastídico en núcleo ocurre también en tejidos somáticos aunque la frecuencia de transposición es más elevada en tejidos gametofíticos.

Sin embargo, ¿por qué algunos genes se han quedado retenidos en los genomas de plastos y mitocondrias, aparentemente resistiendo la transferencia exitosa al núcleo? Algunos genes aún residen en las organelas, bien porque sus productos no pueden reimportarse eficientemente desde el citosol o deben retenerse en las organelas para asegurar una regulación eficiente de su expresión. La primera alternativa es la que contempla que la hidrofobicidad de ciertas proteínas organulares podría interferir con su reorientación e importe eficiente al orgánulo correspondiente. Sin embargo esta explicación no se puede aplicar a todos los miembros de genes plastidiales

entre ellos a la subunidad grande de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (RbcL) y a la proteína D1 del fotosistema II, aunque sí puede aplicarse a la proteína citocromo c oxidasa (COXII) mitocondrial. La explicación alternativa se centra en que los genes retenidos en las organelas tienen algo más en común que la hidrofobicidad de sus productos y es el hecho de que estos funcionan predominantemente en la transducción de energía. Por tanto es posible que las organelas necesiten poder controlar directamente la expresión de genes de componentes de sus cadenas de transportadores electrónicos, de forma que puedan sintetizarlos a demanda con el fin de mantener el balance redox y evitar la producción de especies reactivas del oxígeno, asegurando así la producción eficiente y rápida de energía en forma de ATP (adenosina trifosfato) a través de una regulación interna de la expresión de los mismos. La mitocondria de plantas parece representar un caso extremo, ya que requiere un gran número de factores para el proceso complejo de generación de moléculas de ARN (ácido ribonucleico) maduras que puedan traducirse correctamente en proteínas mitocondriales. Estos factores incluyen a la numerosa y extensa familia de proteínas denominadas PPRs con dominio de repetición pentatricopéptido, que se repite entre 9 y 15 veces y que se unen a ARN para mediar su procesamiento. Actualmente aún se debate las razones por las que los genomas mitocondriales de plantas mantienen todos estos genes nucleares PPR para su regulación. Sin embargo se conoce la importante participación de los genes codificantes de estas proteínas influenciando procesos biológicos como la “esterilidad citoplasmática masculina”, el desarrollo de semillas, crecimiento y desarrollo de la planta, en los que las mitocondrias tienen un papel importante¹⁵. En contraste otras formas de regulación más permisivas, como las respuestas de aclimatación a estrés, que operan a más largo tiempo, implican tanto la regulación de la expresión de genes organulares como la modificación de la expresión de los productos de los genes nucleares.

Finalmente, aunque no menos importante, describir que la transferencia intercompartimental de ADN sigue teniendo lugar y continúa redefiniendo el genoma nuclear eucariota. Dada la frecuencia y el amplio espectro de inserciones nucleares de ADN organular, uno no puede seguir considerando por más tiempo a la transferencia de ADN organular al núcleo como una fuerza evolutiva que fué relevante solo en tiempos remotos cuando permitió la transferencia masiva de genes enteros al núcleo. En vez de esto, el descubrimiento de genes quiméricos con un solo exón derivados del ADN organular, nos está mostrando que la transferencia de ADN organular aún tiene un gran impacto sobre la evolución de genes nucleares y genomas, aunque en un nivel más sutil que el que fué en tiempos pasados.

Coordinación de la convivencia: Señalización intercompartimental

Como se deduce de todo lo anterior, a pesar de la similitud en la cadena respiratoria y la maquinaria fotosintética de cloroplastos con los sistemas generadores de energía presentes en sus ancestros, en los sistemas eucariotas los complejos cruciales multiproteicos son mosaicos constituidos por subunidades codificadas por el genoma organular y por el nuclear y en los que además se presentan proteínas que no tienen su contrapartida en los procariotas originales. Todo ello implica la existencia de mecanismos que coordinan la expresión de los genes en los diferentes orgánulos con el fin de asegurar un ensamblaje apropiado y un mantenimiento de la energía de los complejos. En este aspecto se han definido múltiples niveles de control nuclear de las propiedades organulares denominados como “control anterógrado” que operan para regular la expresión de genes nucleares y organulares, así como eventos post-transcripcionales. Estos mecanismos descansan en señales que surgen para comunicar el estado funcional y de desarrollo de plastos y mitocondrias al núcleo y se denominan “mecanismos

retrógrados". Dependiendo de la fuente de la señal, se han definido cuatro vías de señalización retrógrada. Una de ellas es la de biosíntesis de tetrapirroles que se describió como vía de información del estado plastidial al núcleo, aunque recientemente parecen existir datos que contradicen esta función. Junto a ella, se han considerado también la expresión de genes organulares, el estado redox organular y las especies reactivas del oxígeno (ROS) como mecanismos implicados en esta señalización¹⁶. Las funciones potencialmente perjudiciales del oxígeno son las que a su vez establecen a las ROS como los principales candidatos difusibles y mediadores reactivos en la señalización derivada del estado redox de las cadenas de transporte electrónico fotosintética y mitocondrial, actuando como mecanismos implicados en la señalización retrógrada. Además de las ROS, existen otras señales del estado de los diferentes transportadores electrónicos, como el pool de plastoquinona en cloroplastos y el de ubiquinona y la vía respiratoria alternativa (AOX) en mitocondrias, que ejercen una influencia importante sobre la función de genes. Los mecanismos de control operan a diferentes niveles de la expresión génica, esto es tanto en la transcripción como en el proceso de traducción, e implican la señalización retrógrada entre el cloroplasto y las mitocondrias al núcleo. De forma similar, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro modulan la actividad de un amplio rango de enzimas cloroplastídicas y mitocondriales. Además se han desarrollado mecanismos que actúan a nivel de coregulación de la transcripción en el núcleo para permitir la regulación positiva indirecta de la expresión génica organular cuando los niveles de proteínas abundantes organulares codificadas por el núcleo, aumentan. No sólo los complejos multiproteicos respiratorios y fotosintéticos constituyen los ejemplos de mosaicos evolutivos. Varias vías metabólicas incluyendo el ciclo de Calvin en los cloroplastos y la glicólisis en el citosol presentan enzimas de origen evolutivo diverso. Por otro lado, el análisis filogenético parece sostener un origen protobacteriano para metacaspasas y proteasas tipo HtrA¹⁷ que son componentes principales de la

maquinaria apoptótica. Otro ejemplo de origen endosimbiótico lo constituyen algunos de los componentes centrales del complejo de poro nuclear.

Llegado a este punto creo interesante recordar la previsión que en su día hizo Edmund Wilson (1925) sobre la consideración futura de la teoría endosimbiótica, al decir:

....."Por supuesto, tal teoría no es verificable, y por esta razón a muchos les parecerá que no tiene valor. Sin embargo, como hipótesis puramente especulativa, al menos para el escritor, parece ofrecer posibilidades relacionadas con la evolución primitiva de las células dignas de tener en cuenta a pesar de que no nos acerca a una concepción del origen de la vida o a la comprensión de la individualidad orgánica.

Para muchos, sin duda, tales especulaciones pueden parecer demasiado fantasiosas como para ser mencionadas en la actualidad entre los miembros de la comunidad científica; sin embargo, entra dentro de lo posible que algún día se las considere más seriamente".

Puede afirmarse que actualmente esta posibilidad se ha visto cumplida.

Origen de la red de ROS

Como he venido comentando de forma más o menos explícita a lo largo de esta charla, la evolución celular y la funcionalidad de los procesos respiratorios y fotosintéticos se encuentran íntimamente ligados a la evolución de la Biología Redox y al control celular de los niveles de ROS, respectivamente. Es fácilmente comprensible la paradoja de que la necesidad de oxígeno para la producción eficiente de energía en las mitocondrias de animales y plantas, enmascare el hecho de que realmente es un gas tóxico y mutagénico. La aparición de toneladas de oxígeno en la atmósfera terrestre hace unos 2,3 billones de años debido a la evolución de la fotosíntesis por las cianobacterias precursoras de los plastos, a la que anteriormente me he referido, constituyó el primer caso de polución atmosférica. Este evento trajo consigo al menos dos procesos evolutivamente ventajosos: por un lado condujo a la formación de la capa de ozono en la Estratosfera, imprescindible

para la protección de los organismos frente a la radiación ultravioleta (UV-C), lo que pudo haber ayudado a la colonización terrestre por parte de los organismos acuáticos. Por otro lado, la evolución oxigénica retiró el hierro en su estado de Fe^{2+} (ferroso) de los ambientes acuáticos mediante la formación de complejos insolubles de hierro en su forma férrica. La ventaja de la eliminación de los iones ferrosos fue esencial ya que constituye una vía para impedir la formación de los radicales libres hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) que pueden originarse por la reacción directa de iones ferrosos con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la denominada reacción de Fenton descrita en 1876. Esta reacción que puede ocurrir en los sistemas celulares, se encuentra muy controlada en los organismos mediante la limitación de la disponibilidad de ambos sustratos¹⁸. La vida aeróbica hubiese sido bastante complicada en un mundo inundado con Fe^{2+} .



¿Cómo pudieron las cianobacterias desarrollar el proceso de la fotosíntesis en un ambiente pre-antioxidante? Incluso en las plantas actuales con contenidos elevados de antioxidantes, un elevado porcentaje de la actividad fotosintética del cloroplasto se utiliza para reemplazar la proteína D1, componente del fotosistema II (PSII), modificada oxidativamente y algunas otras proteínas cloroplastídicas. ¿Acaso en estas cianobacterias estaban ya presentes algunos antioxidantes? Quizás el PSII evolucionó a partir de una forma de catalasa que contenía manganeso. Estas enzimas que actualmente contienen hierro en su molécula en vez de manganeso, catalizan la ruptura rápida del H_2O_2 . Si esta hipótesis es válida, enzimas similares a catalasa debieron estar presentes con anterioridad al incremento de oxígeno en la atmósfera, lo que lleva inmediatamente a cuestionar el origen de esta presencia, concretamente a plantear si la presencia de H_2O_2 podría haber dirigido esta evolución. Incluso a concentraciones bajas de oxígeno como las imperantes hace 3,5 billones de años (menos del 0.1%) debió existir un contenido sustancial de H_2O_2 en el agua de lluvia, generado por reacciones

fotoquímicas con las trazas de oxígeno. Ya que el Fe^{2+} estaba disponible en cantidades importantes, la química de Fenton constituía un desafío por lo que el H_2O_2 tenía que eliminarse. Una de las posibilidades sugeridas es que los precursores evolutivos del PSII emplearon el H_2O_2 como un sustrato y únicamente en una evolución posterior, la ferocidad química incrementada del H_2O_2 potenció la rotura del agua.

El incremento del oxígeno atmosférico que podría haber alcanzado el 35% en períodos como el Carbonífero tardío, llevó a la adquisición por los organismos aeróbicos de diferentes antioxidantes y enzimas eliminadoras de los derivados reactivos del mismo, las ROS, para protegerse de su toxicidad. Los animales y plantas presentes en esta época debieron poseer unas defensas antioxidantes muy aumentadas. Parafraseando a Barry Halliwell, realmente puede ser fascinante el estudiar y analizar la posibilidad de resucitarlas. Hoy en día algunas plantas que evolucionaron en este periodo, pueden resistir los efectos de elevadas concentraciones de oxígeno mucho mejor que aquellas que han evolucionado en épocas más recientes.

Desde un prisma retrospectivo, este desarrollo de antioxidantes fue una vía fructífera que permitió la permanencia y la evolución. Los organismos que tolerasen el oxígeno podrían posteriormente evolucionar para su empleo en transformaciones metabólicas catalizadas por enzimas oxidasas, oxigenasas e hidrolasas, como las Prolina y Lisina hidrolasas necesarias para la biosíntesis de colágeno. Más aún, el oxígeno molecular podría facilitar la producción eficiente de energía, implicándose íntimamente en las reacciones esenciales de intercambio energético sobre las que se sustenta la vida, permitiendo así el empleo rutinario y universal del elevado potencial electroquímico ($E_{m7} = +815\text{mV}$) del par redox $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, como un aceptor de electrones terminal de las oxidasas respiratorias, como la citocromo c oxidasa mitocondrial. Una característica de estas oxidasas, y de otras enzimas como la ascorbato oxidasa, es su capacidad de reducir el oxígeno a agua a través de una vía tetravalente que no implica la liberación de intermediarios reactivos

parcialmente reducidos. De forma similar, el sistema de ruptura del agua del PSII de la fotosíntesis conlleva la oxidación tetravalente concertada del agua sin la liberación de intermediarios reactivos. Sin embargo, en plantas al igual que en animales y humanos, muchos procesos catalizan la reducción parcial del oxígeno para producir el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ producto de la reducción univalente, el H_2O_2 de la divalente y los radicales hidroxilos $\cdot OH$ de la reducción trivalente del oxígeno (Figura 3). Por tanto, la generación de estas especies a nivel celular resulta una consecuencia del metabolismo.

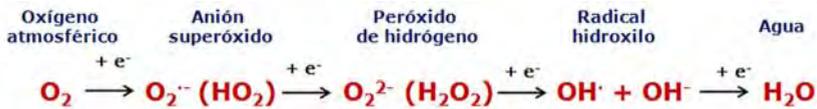


Fig. 3. Especies reactivas del oxígeno resultado de la reducción parcial del oxígeno a agua.

Actualmente, gracias a la integración de un amplio repertorio científico y tecnológico que se ha venido forjando paulatinamente por el avance en disciplinas como la paleontología, biología celular, bioquímica y biología y genética molecular, se ha conseguido establecer el papel fundamental de la mitocondria como orgánulo centinela de la fisiología celular. En estos últimos 20-30 años, la atención se ha centrado en asentar las bases de los mecanismos que gobiernan los nexos de unión entre su compleja bioquímica, su ultraestructura y su dinámica y funcionalidad.

La mitocondria como orgánulo centinela de la fisiología celular: Fusión y dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos cruciales tanto para la vida como para la muerte de las células eucariotas. El descubrimiento de las mitocondrias como orgánulos celulares no puede atribuirse a una única persona, ya que muchos

de los “*cuerpos granulares*” observados al microscopio por los citólogos en la segunda mitad del siglo XIX y a los que se les atribuyó una gran variedad de nombres, posiblemente se trataban de mitocondrias. Estos orgánulos referidos inicialmente como “citomicrosomas” por Adolf Freiherr von La Vedette en 1886, deben su denominación de “*mitocondria*” al zoólogo alemán Carl Benda y su presencia en plantas se describió por vez primera en 1904 con la denominación de “*condriosomas*”, que realmente en aquella época incluía plastidios y mitocondrias.

Nuestra comprensión sobre tan particular organela se puede dividir en dos grandes periodos, en el primero que engloba la segunda mitad del siglo XIX hasta 1980, tuvo lugar su caracterización funcional, se describen las principales rutas metabólicas que ocurren en estos orgánulos: ciclo de Krebs, síntesis de nucleótidos y fosfolípidos, oxidación de ácidos grasos, ciclo de la urea etc, destacando entre todos ellos la producción de energía o “fosforilación oxidativa” a partir de la combustión de sustratos metabólicos a través de un complicado proceso que involucra el relevo de electrones a lo largo de una serie de complejos de proteínas, conocidas como la cadena respiratoria. Este relevo indirectamente permite que otro complejo (ATP sintasa) sintetice ATP (adenosina trifosfato), la molécula que transporta la energía de las células. Las mitocondrias generan el 90% de la energía que las células necesitan para funcionar. Este proceso unido al resto de las funciones, hacen que este orgánulo sea esencial para la vida de la célula.

En el segundo periodo (1980-actualidad) se describe y analiza su genoma. Comienza con la publicación de la secuencia completa del ADN mitocondrial humano¹⁹, que como ya he comentado es reminiscencia del antiguo genoma bacteriano y la caracterización con cierto detalle de la genética mitocondrial. En humanos el genoma mitocondrial, con un patrón de herencia materna y con un tamaño de 16,6 kb, contiene los planos genéticos para la expresión de 13 proteínas mientras que en plantas como *Arabidopsis thaliana*, el genoma mitocondrial codifica 33 proteínas y presenta un tamaño de 366,9 kb, en otras

palabras, es 22 veces mayor pero codifica solo 2,5 veces más proteínas. Estas proteínas constituyen entre otras, subunidades de ATP sintasa y de otros complejos de la cadena respiratoria. Estos resultados implicaron que mutaciones en el ADN mitocondrial capaces de afectar proteínas mitocondriales o al ARN (ácido ribonucleico) podrían potencialmente alterar la capacidad de producción de energía en la mitocondria y producir enfermedades. Así, se identificaron mutaciones responsables de enfermedades humanas, una sospecha corroborada por los informes de 1988, en los que se describen las dos primeras mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt). Concretamente en el laboratorio del Dr. Wallace²⁰ (1988) en la Universidad de Emory se rastreó el origen de una forma de ceguera de adultos jóvenes (neuropatía óptica hereditaria de Leber) en varias familias con una pequeña mutación heredada en un gen mitocondrial. Casi al mismo tiempo, Ian J. Holt, Anita E. Harding y John A. Morgan-Hughes, del Instituto de Neurología de Londres, relacionaron la eliminación de segmentos relativamente grandes de la molécula de ADN mitocondrial con trastornos musculares progresivos. En humanos, la disfunción mitocondrial también se liga a una neurodegeneración, a procesos de envejecimiento y apoptosis, especie de suicidio celular controlado que elimina células no deseadas por el organismo y que es fundamental durante el desarrollo embrionario y de bloqueo obligado en el desarrollo de tumores. En plantas, aunque la tasa de mutación del genoma mitocondrial es menor que en humanos, frecuentemente hay recombinación, proceso que da lugar a genes con estructuras quiméricas. La expresión de estos genes quiméricos puede tener efectos perjudiciales sobre la respiración mitocondrial y afectar a la fertilidad, un proceso conocido como “esterilidad citoplasmática masculina” al que ya me referí. Es interesante que muchos de los genes encargados de restaurar la fertilidad, codifican proteínas de la familia PPR y la complejidad del proceso de maduración del ARN mitocondrial, anteriormente citado, podría ser un mecanismo para suprimir estas mutaciones.

En plantas la mitocondria, al igual que en animales y humanos, además de estar relacionada con cualquier proceso celular que requiera energía, está también envuelta en muchos procesos fundamentales que engloban la regulación de los niveles de calcio intracelular, la proliferación celular, el crecimiento y el desarrollo, por lo que la disfunción mitocondrial conduce también a alteraciones en estos procesos, a la senescencia y a muerte celular programada (PCD) como más adelante describiré.

Como he comentado, el avance en los últimos años en la investigación en Biología Molecular y Celular así como en el diseño de nuevas técnicas de visualización, han revelado nuevos aspectos sobre la biología de estas organelas. No es ese orgánulo que nos enseñaban en los libros de texto con forma de judía flotando en el citoplasma celular sino que forma una estructura generalmente reticular (Figura 4), dinámica, altamente interactiva y en continua fusión y fisión, que tras millones de años de cohabitación se ha imbricado hasta tal punto en la fisiología celular que participa de modo decisivo en el funcionamiento de la célula, del tejido al que pertenece y del organismo completo.

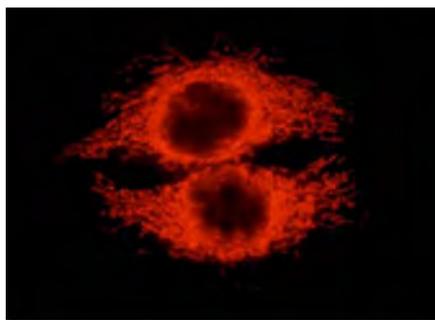


Fig. 4 Red mitocondrial en células epiteliales HeLa en cultivo. Las dos células están teñidas con MitoTracker red CMXRos y se aprecian con su retícula mitocondrial y el núcleo en el centro, como un vacío no teñido (Origen: “La mitocondria: fuente de energía y mucho más”, Miguel Fernández Moreno, SEBBM Divulgación, Feb 2011).

Ha transcurrido casi un siglo desde que Lewis y Lewis en 1914 describieran en la revista American Journal of Anatomy, tanto los cambios

continuos en la morfología mitocondrial, como en la organización del condrioma, definido como el conjunto de mitocondrias presentes en una célula. Ha sido en estos últimos 10 a 15 años en los que se ha descrito que esta dinámica está inexorablemente unida a la función mitocondrial, permitiendo adaptar las actividades mitocondriales a diferentes necesidades fisiológicas, pero a su vez haciendo que el ensamblaje funcional de las mitocondrias sea un proceso delicado y difícil. Los procesos de fusión y fisión constantes en los que participan toda una maquinaria celular muy conservada, conducen a todo un entramado reticulado de mitocondrias en las células. Este movimiento sobre el citoesqueleto de filamentos de actina y microtúbulos, asegura que los diversos tipos de mitocondrias que componen el “condrioma” contacten físicamente unas con otras, lo que permite una fusión transitoria, seguida de una división de las membranas mitocondriales. Estos procesos vienen a confirmar la heterogeneidad en el contenido de ADN (ADNmt) de los diversos tipos de mitocondrias de plantas y evidencian que la mayoría de las mitocondrias contienen una fracción del ADNmt requerido para entre todas, contener el genoma total. Se piensa que esta distribución desigual del genoma mitocondrial constituye un medio por el que este ADN puede protegerse del daño oxidativo, y asegura que las mitocondrias tengan una “necesidad de encontrarse”, interactuen unas con otras y con otros elementos celulares²¹.

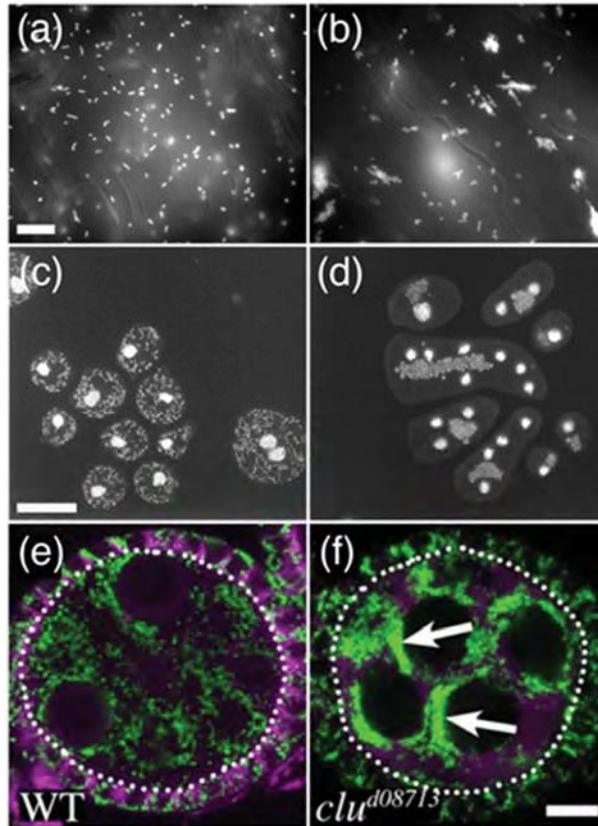
Este daño oxidativo puede ocurrir como fruto de la generación inevitable de ROS, productos finales de la fosforilación oxidativa, lo que constituye un reto adicional para la integridad mitocondrial y su funcionalidad, ya que inducen modificaciones de proteínas, peroxidación de lípidos y daños al ADN, que pueden conducir a un extensivo daño mediante la disipación del potencial de membrana e inducir muerte celular mediante la liberación al citoplasma de proteínas pro-apópticas. Por tanto es crucial la existencia de un fino control de la fosforilación oxidativa y el seguimiento de la funcionalidad de la cadena respiratoria para mantener la integridad del ADN y limitar el

daño mitocondrial. ¿Cómo pueden las mitocondrias responder a dos demandas opuestas: generar ATP y minimizar los daños causados por las ROS? Una de las posibilidades es la división de labores entre las mitocondrias, con las diferentes poblaciones ejerciendo distintas funciones: las mitocondrias con un bajo contenido en ADN podrían ser más activas desde un punto de vista bioenergético, sin un riesgo directo de daño al ADN inducido por las ROS, mientras que aquellas mitocondrias con un mayor contenido en ADN actúan como reservorios genéticos. En este escenario el mal funcionamiento resultará en un movimiento concertado de las mitocondrias hacia una localización en los microtúbulos que incrementaría la distancia entre las mitocondrias dañadas y el ADN nuclear. Este mecanismo aún no totalmente confirmado en plantas y en levadura, aunque sí en animales, supone un excelente ejemplo de la importancia que los cambios en la dinámica mitocondrial tienen en la generación de enfermedades y puede jugar un papel vital en la evaluación de las funciones mitocondriales y en dirigir la eliminación de las mitocondrias dañadas del condrioma. Sin embargo aquellas mitocondrias severamente dañadas desestabilizan la fusión y esto resulta en su fragmentación y posterior eliminación selectiva mediante un proceso de autofagia denominado mitofagia. La mitofagia previene la salida de proteínas pro-apoptóticas desde las mitocondrias dañadas al citoplasma. Consistente con la función citoprotectora de la autofagia, la apoptosis se suprime en condiciones de inducción de autofagia y se induce por inhibición de la misma.

Entre los componentes que regulan la dinámica mitocondrial se encuentra una proteína denominada con las siglas PINK 1 con un dominio serina/treonina quinasa, encargada de fosforilar grupos serina y/o treonina de proteínas, localizada en la membrana interna mitocondrial y la proteína Parkin, una E3 ubiquitina-ligasa, localizada en el citoplasma, que actúan en una vía común que promueve la fusión mitocondrial y protege frente a la pérdida de integridad mitocondrial en insectos como *Drosophila* y en

mamíferos. Mutaciones en los genes que codifican estas proteínas se han asociado directa o indirectamente con enfermedades neurodegenerativas en humanos, como algunos casos de Parkinson y con fenotipos mitocondriales disfuncionales en *Drosophila*, incluyendo la aparición de mitocondrias alargadas o bien hinchadas. En plantas se ha identificado la proteína FRIENDLY llamada así por homología con la proteína Clu de levadura, implicada en una vía similar a la descrita para la proteína Parkin en mamíferos y en *Drosophila*. Los mutantes en los genes que codifican a FRIENDLY y Clu presentan también alteraciones fenotípicas en sus mitocondrias, concretamente presentan grandes agrupaciones de organelas no observadas cuando estas mutaciones no se producen. Datos muy recientes parecen sustentar un papel para FRIENDLY, Clu y Parkin favoreciendo el desplazamiento mitocondrial y detectando el estado fisiológico de mitocondrias individuales para regular su movimiento a regiones de la célula donde ejercer su papel fisiológico²¹ (Figura 5).

Varios estudios han demostrado la asociación de mitocondrias con estructuras consumidoras de energía como por ejemplo el axonema espermático, flagelos, cloroplastos, retículo endoplasmático y peroxisomas. Una situación interesante y que evidencia la función de las mitocondrias como sensores de estrés y su relación con peroxisomas, es la encontrada recientemente en respuesta de plantas a la presencia de metales pesados, consistente en la formación rápida de extensiones mitocondriales o mitróxulos que derivan en la división de la mitocondria y proliferación de la población mitocondrial.



Logan DC, 2010, *Biochem Soc Trans.* 38: 789–795

Fig. 5 Organización del condrioma en células de individuos normales de *Arabidopsis*, *Dictyostelium* y *Drosophila* (a, c, e) y en mutantes (b, d, f).

Este proceso ocurre de una forma coordinada con los peroxisomas que también forman estas extensiones o peróxulos para dar lugar a nuevos peroxisomas. Ambos procesos elongación y división, están regulados por una proteína peroxina denominada PEX11 y una característica de esta situación es que se interrumpe el movimiento de los orgánulos y es dependiente de la producción de ROS, aunque se desconoce la fuente principal de estas ROS. La función de este cambio en la dinámica mitocondrial y peroxisomal no se conoce, aunque se sabe que está relacionada con la inducción de procesos de defensa celular. Interesantemente, en situaciones prolongadas de estrés, (48 horas) no tiene lugar la formación de mitróxulos o peróxulos sino un

incremento de la velocidad de movimiento de los peroxisomas y una recuperación del de las mitocondrias, estando también el cambio en la dinámica regulado por ROS. (Luisa M^a Sandalio, comunicación personal)

Metabolismo redox en plantas

Junto a los cambios en la dinámica mitocondrial, estos orgánulos al igual que el resto de los compartimentos celulares, poseen otras vías de ajustes que permiten su funcionalidad tanto en condiciones normales como cuando las células se encuentran estresadas. La existencia de estas vías descansa en el hecho de que en el aprovechamiento de la energía luminosa para impulsar el metabolismo, las plantas tuvieron que dominar el arte del “control redox” y, ya que ni la oxidación incontrolada ni la sobre-reducción son compatibles con la utilización eficiente de la energía, la supervivencia demandaba y sigue demandando controles redox del metabolismo energético y en última instancia de la expresión de genes, que son los motores esenciales, moduladores y protectores de los procesos energéticos. En este sentido y debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado toda una serie de sofisticados mecanismos que les permiten responder a los diferentes desafíos que les impone el medio ambiente.

Por otro lado, el metabolismo redox celular en humanos y plantas está ligado íntimamente. Las plantas suministran un amplio rango de antioxidantes a los humanos, algunos como el ascorbato, el glutatión y el alfa tocoferol, con reconocida importancia “in vivo” y otros a los que ésta se les supone, mientras que los humanos a su vez influyen y modifican el medioambiente y controlan las condiciones de cultivo. Las plantas especialmente los cloroplastos, son muy ricos en ascorbato, a la vez que las mitocondrias contienen la enzima terminal de la biosíntesis del ascorbato y algo más de glutatión que los cloroplastos. Una de las razones que sustentan estos contenidos es la participación de ambos antioxidantes en un ciclo de reacciones que los capacita para controlar los niveles de H₂O₂. La necesidad

de este control reside en que su eliminación es esencial por su habilidad para inactivar enzimas del ciclo de Calvin, necesarias para la fijación del CO₂ durante la fotosíntesis, y también del ciclo de Krebs, esenciales para el proceso respiratorio. Algunas otras enzimas, como la ascorbato peroxidasa (APX) característica de plantas, también es sensible al H₂O₂ e interesantemente está implicada en su destrucción a través de la participación en el denominado ciclo Ascorbato-Glutatión (ASC-GSH) o vía de Foyer-Halliwel-Asada, haciendo referencia a los nombres de los tres científicos que contribuyeron a su descubrimiento. Este ciclo consiste en una secuencia de reacciones considerada como un mecanismo crucial para el metabolismo del H₂O₂ tanto en plantas como en animales. El descubrimiento de este nueva vía se inicia con los trabajos pioneros de la Dra. Christine Foyer durante su tesis doctoral en el King Collage de Londres bajo la supervisión del Prof. Barry Halliwel en la década de los setenta, concretamente en 1976. Basándose en la hipótesis inicial de que el ascorbato y el glutatión tenían el potencial de actuar en la eliminación de ROS, demostró que estos metabolitos y que enzimas ligadas a glutatión, NADPH (nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido) y ascorbato, se encontraban presentes en preparaciones de cloroplastos aislados y junto al Prof. Halliwel, propusieron un sencillo esquema esencial para mantener el estado redox de cloroplastos y proteger a las enzimas dependientes de Tiorredoxina, proteína implicada en el control redox de otras proteínas, de su inactivación oxidativa. Este esquema (Figura 6) aún se emplea de forma generalizada²².

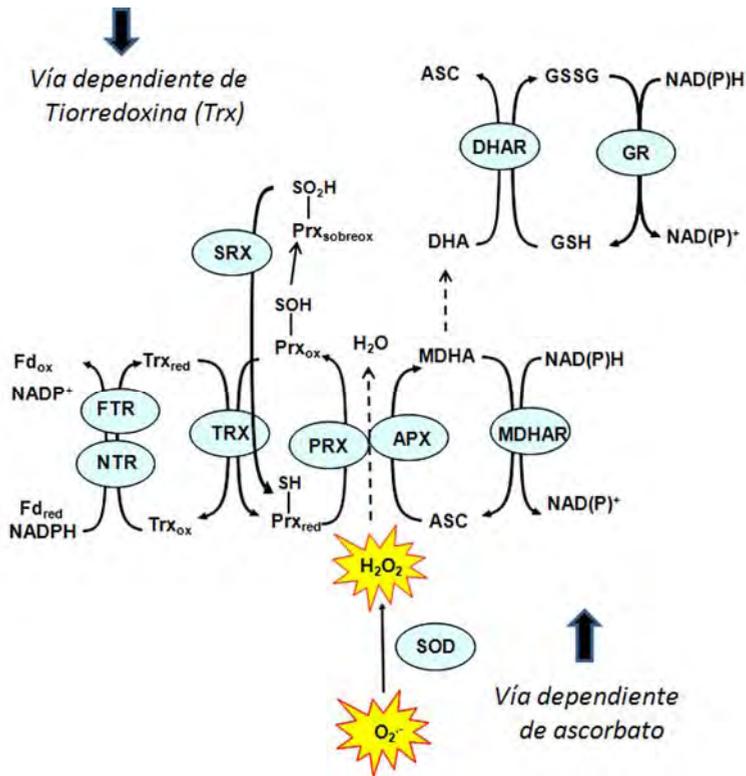


Fig. 6 El empleo del ascorbato como un reductor genera monodeshidroascorbato (MDHA) inestable, que se desproporciona rápidamente a deshidroascorbato (DHA) y ascorbato (ASC), en una reacción catalizada por la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR). El deshidroascorbato se reduce de nuevo a ascorbato en presencia de la enzima deshidroascorbato reductasa (DHAR) junto con la oxidación del glutati6n reducido (GSH) a su forma disulfuro oxidada (GSSG) que es regenerada por la enzima glutati6n reductasa (GR) empleando el poder reductor del NADPH. La regeneraci6n del ascorbato tambi6n puede realizarse a trav6s del sistema redox que incluye a la tiorredoxin reductasa (NTR)/tiorredoxina (TRX) y peroxirredoxina (PRX) que dependen del poder reductor del NADPH y de la sulfirredoxina (SRX).

En la 6poca en que este ciclo se descubri6 no se habi6n identificado a6n peroxidasas dependientes de ascorbato y de glutati6n en plantas, si bien no se tard6 mucho en la identificaci6n de la enzima ascorbato peroxidasa tanto en tilacoides como en el estroma cloroplast6dico por el grupo del Prof. Kozi6 Asada, grupo que posteriormente ampli6 los conocimientos del ciclo al demostrar la participaci6n en 6l de la forma oxidada del ascorbato, el

monodeshidroascorbato y la enzima monodeshidroascorbato reductasa, a la vez que se describió que el ascorbato también podía ser regenerado en cloroplastos a través de otros mecanismos dependientes de Tiorredoxina y de NADPH²³. Estos orgánulos carecen de catalasa, que es la enzima peroxisomal encargada de la destrucción de H₂O₂, por lo que la reducción del H₂O₂ a agua tiene lugar mediante peroxidasas dependientes de ascorbato y de tioles.

Las mitocondrias al igual que los cloroplastos carecen de catalasa por lo que consecuentemente, en estos orgánulos el H₂O₂ también necesita ser eliminado y regulado por otros mecanismos independientes. Este peróxido de hidrógeno resulta de la producción de superóxido producido durante el proceso respiratorio, por autooxidación de los componentes reducidos de la cadena respiratoria, que en plantas es similar a la de mitocondrias animales. Está compuesta de cuatro complejos principales (I-IV) y el complejo de la ATP sintetasa, sin embargo presenta componentes adicionales como la oxidasa alternativa (AOX) via respiratoria no fosforilante y las deshidrogenadas alternativas internas y externas (altDHs), que son específicas y no presentes en animales (Figura 7). Este superóxido además es reducido a peróxido de hidrógeno a través de la actividad superóxido dismutasa (Mn-SOD), presente en estos orgánulos²⁴.

Pues bien, veinte años después de la primera descripción del ciclo ASC-GSH en cloroplastos, la presencia de todos sus componentes y su funcionalidad en preparaciones purificadas de mitocondrias y peroxisomas, fue demostrada por la Dra. Ana Jiménez durante el desarrollo de su Tesis Doctoral en nuestros laboratorios en el CEBAS (CSIC) en Murcia. La identificación de este ciclo se basó en una hipótesis similar a la inicial de la Dra. Foyer, al intentar identificar nuevas vías antioxidantes mitocondriales y peroxisomales implicadas en el control y metabolismo del H₂O₂ generado en estos orgánulos como resultado de la actividad respiratoria y fotorrespiratoria, y en la membrana peroxisomal²⁵. En esta época las evidencias sobre

sistemas encargados de la eliminación del H_2O_2 mitocondrial y peroxisomal se reducían a la descripción en mitocondrias de la actividad monodeshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa y no existían referencias sobre la presencia en estos orgánulos de ascorbato ni de un sistema capaz de llevar a cabo su regeneración, ni la del antioxidante glutatión.

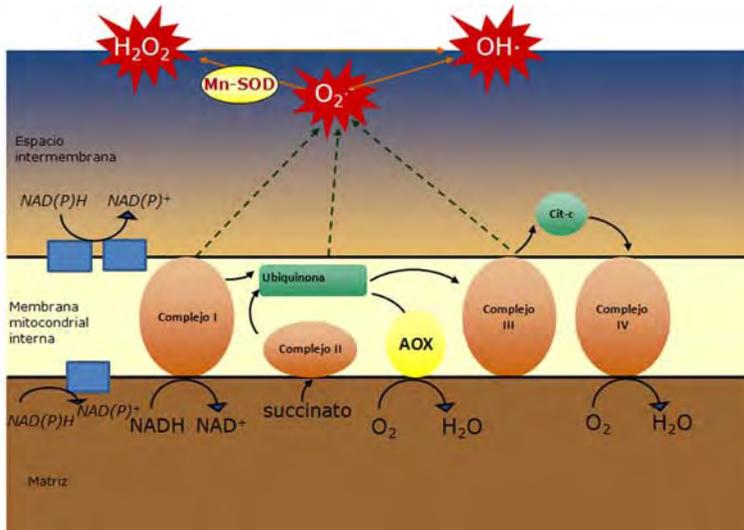


Fig. 7 Producción de especies reactivas del oxígeno en mitocondrias vegetales.

Esta situación se extendía a los peroxisomas, orgánulos en los que la abundante presencia de catalasa parecía excluir la coexistencia en ellos de algún otro mecanismo adicional de eliminación del peróxido de hidrógeno, si bien resultados previos del grupo del Dr. Nishimura en Japón habían puesto de manifiesto la presencia en la membrana de peroxisomas y glioxisomas (un tipo especializado de peroxisomas) de una nueva isoenzima de ascorbato peroxidasa²⁶. Los componentes de este ciclo también se encuentran presentes en el citoplasma así como en animales, siendo interesante resaltar que es uno de los pocos ejemplos de una vía que se describe inicialmente en plantas y que posteriormente se demuestra su importancia en el metabolismo oxidativo también en animales.

Actualmente junto con este ciclo ASC-GSH, análisis proteómicos y moleculares han permitido a varios grupos identificar casi simultáneamente la coexistencia en mitocondrias de proteínas reguladas por cambios dinámicos en su potencial redox, a través de la modulación de su actividad por una “tiorredoxina específica de mitocondrias” (Trx01) que actúa en el metabolismo del H_2O_2 , en coordinación con otra proteína recientemente descrita en plantas, una sulfirredoxina mitocondrial (Srx). Esta actuación la desempeñan, entre otras vías, a través de la actividad peroxirredoxina (Prx), que es un tipo característico de pequeñas peroxidasas que al igual que las dos proteínas anteriores, Trx y Srx, también tiene grupos de cisteína conservados. La peroxirredoxina mitocondrial denominada Prx IIF, está implicada en la eliminación del H_2O_2 , peróxidos lipídicos y peroxinitrito, reparando daños oxidativos en esta organela. La regeneración de la forma sobreoxidada de esta proteína a su forma reducida activa depende, entre otros mecanismos, de la energía mitocondrial (ATP) y de la actuación coordinada de la tiorredoxina y de la sulfirredoxina²⁷. El poder reductor para la actividad de todos estos sistemas redox deriva del NADPH mitocondrial. Evolutivamente se piensa que la sulfirredoxina puede haber derivado de una proteína de unión al ADN (DNA-binding protein) involucrada en la partición cromosómica bacteriana, denominada ParB. Este hecho es interesante ya que los procariontes actuales carecen de Srx; se piensa que esto es debido al papel de la Srx en la restauración de la actividad de la peroxirredoxina sobreoxidada, que curiosamente en procariontes no es sensible a la inactivación oxidativa. Por ello se sugiere que la inactivación de la Prx y su posterior reactivación por la Srx es un proceso que se ha seleccionado a lo largo de la evolución²⁸. El empleo a niveles elevados de los componentes de estos sistemas podría afectar al estado redox mitocondrial y celular^{29,30}. A día de hoy sin embargo, no se tienen evidencias concluyentes sobre los factores fisiológicos y medioambientales que determinan la función extra-cloroplastídica de las tiorredoxinas y del resto de los sistemas redox mencionados, si bien en

células fotosintéticas estas funciones podrán estar influenciadas por procesos cloroplastídicos y de origen apoplástico. Se tienen conocimientos de que al menos la Trxo1 y PrxIIIF mitocondriales, se encuentran implicadas en la respuesta de plantas como *Arabidopsis* y guisante, frente al estrés salino y toxicidad por cadmio. Mutantes de *Arabidopsis* carentes de Prx IIF ven reducido el crecimiento radicular en estas condiciones de estrés y presentan cambios importantes en la abundancia de transcritos codificados en núcleo y en mitocondrias, relacionados con ROS, lo que sugiere un papel para estas proteínas redox en la defensa antioxidante y en la señalización redox (señalización reductora) en plantas³¹.

Paralelamente se describió que una de las Trx citosólicas (tipo Trx *h5*) está envuelta en la respuesta frente a enfermedades, a través de su implicación en la función de los factores de transcripción denominados con las siglas NPR1/TGA (**n**onexpressor of **p**athogenesis-related **p**roteins1; **TGACG** motif binding) que muestran sensibilidad redox y que actúan regulando la expresión de genes relacionados con la respuesta frente a patógenos (PR)³². Estos genes al inducirse permiten a las plantas adquirir resistencia frente a determinados invasores como bacterias y oomicetos. El mecanismo es interesante ya que presenta bastante similitud con el que ocurre en mamíferos, concretamente para la proteína Keap1 (**K**elch-like **E**CH associated **p**rotein **1**) citosólica de unión al factor de transcripción Nrf2 (**N**uclear Erytroid **2**-related **f**actor), implicado en la protección frente al estrés oxidativo. Esta unión inactiva al factor Nrf2 ya que dirige su degradación permanente por el proteosoma³³ y por lo tanto anula su actividad transcripcional. La fosforilación de Keap1 o su regulación redox por la oxidación de los residuos de cisteína presentes en su estructura, disminuye su afinidad por Nrf2, permitiendo su liberación y traslocación al núcleo donde puede unirse una secuencia específica del ADN conocida como ARE (**A**ntioxidant **R**esponse **E**lement) presente en los promotores de genes de enzimas antioxidantes, aumentando su expresión. Se ha sugerido que el

sistema Nrf2-keap1 contribuye a la protección frente a varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras.

Revisando el concepto de “daño”

El acúmulo de datos relacionados con posibles procesos de participación de las ROS y de los sistemas antioxidantes, llevó a la necesidad de revisar y cambiar algunos de los “axiomas” que en las primeras décadas surgieron sobre sus funciones celulares.

En la década de los 70, la investigación sobre la biología redox y las especies reactivas del oxígeno presentaba un cuadro bastante simple: las ROS eran compuestos tóxicos y reactivos y los antioxidantes eran los encargados de controlar sus concentraciones y eliminarlos a través de un simple circuito de regulación por retroalimentación. Este modelo puede aplicarse solo a procariontas y otros organismos unicelulares pero su validez es limitada para organismos complejos como plantas y humanos en los que estudios posteriores consideraban a la homeostasis redox celular y a las ROS como “un integrador” de la información entre el metabolismo y las condiciones ambientales. Las ROS juegan un papel central en procesos como crecimiento, desarrollo, respuesta a estrés y señalización como inicialmente comenté y sus efectos se encuentran controlados a múltiples niveles, incluyendo tasas de producción, eliminación y localización. La identificación en plantas de sistemas enzimáticos específicos e importantes en la generación de ROS, concretamente las NADPH oxidasas respiratorias de membrana, similares a las presentes en macrófagos en animales, junto con la capacidad del H₂O₂ como modulador de la expresión de genes, a través de componentes de rutas de señalización como la cascada de quinasas, han permitido avances importantes en el esclarecimiento de la función señalizadora de las ROS. A estos hechos se une el papel central que las vías de señalización de quinasas activadas por ROS tienen en la señalización hormonal y en el desarrollo. Todo ello ha llevado a definir que en plantas, al

igual que en sistemas animales, el H_2O_2 es una importante molécula señalizadora. Quizás e incluso más interesante es el cambio conceptual relativo a la función señalizadora del Oxígeno Singulete ($^1\text{O}_2$) considerado hasta fechas muy recientes como una de las especies de oxígeno de mayor reactividad, y por tanto una molécula de elevado potencial tóxico. Recientemente se ha demostrado que la muerte celular en respuesta al oxígeno singulete se encuentra en gran medida bajo control genético. De forma similar, la muerte celular derivada del H_2O_2 en plantas deficientes en catalasa, no responde simplemente a la intensidad del estrés oxidativo que esta deficiencia enzimática produce, sino que también está controlada por la longitud del día. Estos y otras evidencias experimentales no recogidas aquí, han llevado a un cambio de paradigma en el que las ROS consideradas durante bastantes años como “moléculas dañinas” a las que hay que eliminar, por sus efectos sobre la muerte celular al producir oxidaciones indiscriminadas, actualmente también se consideran como moléculas que ejercen sus efectos a través de vías específicas de señalización. Todo ello lleva a la importancia de distinguir las implicaciones de los términos “daño oxidativo” y “señalización por ROS”. Estas distinciones son específicas e inevitables. Mientras que el término de daño oxidativo es ampliamente inespecífico y engloba la acumulación de oxidaciones irreparables de ácidos nucleicos y proteínas, la señalización oxidativa sería reversible y con circuitos reguladores.

Señalización por ROS

Al considerar la evolución de las ROS como importantes moléculas señalizadoras debemos asumir dos aspectos importantes. Por un lado que la capacidad de las células para lidiar con las ROS debió preceder a su empleo como moléculas señalizadoras y por otro lado, que tal empleo debe conllevar numerosas ventajas.

Con respecto al primer aspecto, junto a la hipótesis ya descrita sobre la aparición de enzimas similares a catalasa¹⁸ en los primeros estadios evolutivos, son también interesantes los datos obtenidos recientemente a partir del análisis evolutivo de la red de genes relacionados con ROS en vegetales, mediante el empleo de una plataforma genómica comparativa realizada entre especies de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, plantas vasculares sin semillas, algas verdes y hongos como representantes de distintos estadios evolutivos. Este análisis revela que con la excepción de catalasa, todos los genomas de las plantas verdes codifican a miembros de cada una de las familias de enzimas secuestradoras de ROS analizadas que incluyen: superóxido dismutasas, las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión, catalasas, glutatión peroxidasa, ferritina, oxidasa alternativa y peroxirredoxina. Por el contrario, en los genomas de algas, se produce una ausencia total de genes codificantes de NADPH oxidasa, enzima generadora de ROS y una de las vías mejor caracterizadas en la respuesta de plantas al estrés biótico y abiótico. Estos datos parecen indicar que la adquisición por las plantas de los genes codificadores de NADPH oxidasas tuvo lugar solamente a partir de los musgos. La expansión tan potente de esta familia de genes en las plantas vasculares podría estar asociada a la necesidad de una red más compleja de señalización para coordinar el crecimiento multicelular, la complejidad metabólica y las repuestas a condiciones de estrés. Todo ello indica que al menos por lo que respecta a la familia de las NADPH oxidasas, la adquisición de los mecanismos secuestradores de ROS precedió a la de aquellos encargados de su generación. Las plantas inicialmente aprendieron a lidiar y controlar los niveles de ROS y solo posteriormente fueron capaces de utilizar estas ROS como moléculas señalizadoras.

Con respecto a las características que reúnen las ROS para llevarnos a asumir su utilidad en señalización, una de ellas se refiere a la capacidad celular para generar y destruir rápida y simultáneamente diferentes formas de ROS, permitiendo así un cambio rápido y dinámico en sus niveles,

simplemente inclinando la balanza entre las tasas de su producción y secuestro, generando de esta forma una señal.

Otra ventaja reside en la existencia de un control estricto sobre la localización subcelular de las señales de ROS. Si consideramos la importante capacidad celular para eliminar ó tamponar los niveles de ROS en todos sus compartimentos, los aumentos locales en la producción de ROS pueden estar limitados en una organela en particular o en una localización concreta de una membrana determinada, por lo que el control espacial de la acumulación de ROS es muy específico.

Adicionalmente, las ROS pueden emplearse como una señal rápida con capacidad para autopropagarse a través de toda la planta. En muchos sistemas biológicos la explosión o el incremento de ROS en respuesta a estímulos diferentes y determinados, ocurre a menudo como una acumulación mono o bifásica. El empleo de avanzados sistemas de análisis de imagen, ha revelado que el incremento inicial de ROS podría disparar una cascada de comunicación célula a célula que resulta en la formación de una “ola” de ROS que se propaga a través de los diferentes tejidos y de esta forma transmite la señal a larga distancia. Así, el concepto temporal de una explosión de ROS en unas células seleccionadas en respuesta a diferentes estímulos, actualmente se podría modificar por un concepto espacio-temporal de una ola de ROS. Por lo tanto, podemos imaginar la señalización por ROS como un proceso dinámico que se produce dentro de las células entre los diferentes orgánulos, así como entre las células, a largas distancias.

Ya que las plantas tienen una gran capacidad para secuestrar ROS, este nuevo aspecto de la señalización por ROS a larga distancia, sólo se explica a través de una continua producción de ROS en las células individuales a lo largo de la trayectoria de la señal de ROS. Este punto de vista mecanicista implica que la “ola” de ROS se auto-propaga. Recientemente se ha demostrado que una ola de ROS provocada por diferentes estímulos, puede quedar bloqueada por la aplicación local de la enzima catalasa o de un

inhibidor de la enzima respiratoria NADPH oxidasa, a una distancia de aproximadamente 5-8 cm del lugar de inicio de la señal. Más aún esta señal requiere la presencia del gen *RbohD* codificante de la NADPH oxidasa y se expande a través de la planta en dos direcciones hacia arriba y abajo del lugar de inicio³⁴. Estos hechos demuestran de forma clara la naturaleza autopropagadora de la ola de ROS. El inicio de la ola en una célula específica tiene que estar asociado con una señal a larga distancia que hace que las células localizadas a lo largo de la trayectoria activen la generación de ROS a través de sus mecanismos endógenos. Un ejemplo lo constituye la activación de señales sistémicas por la aplicación local de una elevada intensidad luminosa. Se ha demostrado que estas señales están acompañadas de señales eléctricas a través de la membrana plasmática que son dependientes de la longitud de onda de la luz aplicada. Los pelos radiculares, las células guarda en estomas, las interacciones polen-estigma y las células que interaccionan con ciertos patógenos, pesticidas, y con salinidad, constituyen actualmente ejemplos de cambios localizados en los niveles de ROS y /o en sus oscilaciones. Es posible que este tipo de señal sistémica de ROS funcione también en la respuesta de otros organismos a diferentes estímulos externos, como cabría esperar de una vía de señalización evolutivamente conservada. En este sentido, recientemente se han publicado una serie de trabajos bastante interesantes describiendo la naturaleza dinámica de la comunicación mitocondria-mitocondria en células de músculo cardíaco. En células cardíacas se ha encontrado a las mitocondrias organizadas formando una rejilla y la comunicación entre ellas se produce a través de olas de inducción y liberación de ROS³⁵. Este mecanismo podría ser similar a los que propagan a larga distancia la señal de ROS en plantas, que acabo de describir. Un ejemplo de similitud entre modelos animales y plantas es el observado en las olas de ROS producidas en respuesta a heridas en el pez Zebra y en *Arabidopsis*^{34,36}.

Otra de las características de las ROS es que pueden estar integradas con diferentes vías de señalización, como protein-quinasas (MAPK), señalización por Ca^{2+} , redes hormonales, redes metabólicas celulares y respuestas celulares redox. En algunos casos la acumulación de ROS precede a la activación de la señalización a través de estas redes, mientras que en otros ejemplos, la acumulación de ROS es el resultado directo de la señalización a través de estas redes. Un buen ejemplo clásico de vías activadas por ROS lo constituyen las cascadas de protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que presentan complejas interacciones entre ellas y entre otras vías de señalización como las hormonales. Otra particularidad es que un incremento en ROS inevitablemente conduce a un aumento en otra importante molécula señalizadora, el óxido nítrico (NO) y *viceversa* y la razón ROS/NO en un determinado compartimento celular, puede ser más importante que solo el acúmulo de ROS. Ambos interaccionan y participan modulando la expresión de genes y el destino celular.

El desarrollo a un nivel detallado y específico de las interacciones entre las diferentes vías de señalización constituiría el contenido de varias interesantes charlas y un nuevo desafío para mí por la complejidad y la amplitud que presenta la intrincada red de controles recíprocos que se producen entre ellas. En este contexto solo comentar que la relación entre las ROS y la señalización hormonal revela bastante gráficamente la implicación de estas especies reactivas en casi todas las redes de señalización. En este caso la elevada integración de ambas vías permite a las plantas regular los procesos de desarrollo así como las respuestas adaptativas a condiciones de estrés. Sirva de ejemplo las conexiones entre el incremento de ROS y el acúmulo de ácido salicílico (SA) hormona implicada al igual que las ROS en las respuestas de defensa frente a patógenos y de muerte celular, y el hecho interesante en el que la suspensión de la biosíntesis de SA previene la respuesta de defensa inducida por las ROS y la muerte celular, sin afectar el estado redox general. Se conocen las interacciones entre ROS, óxido nítrico

(NO) y Etileno, la hormona de la maduración en frutos climatéricos, durante los procesos de respuesta a estrés y durante el desarrollo, así como el entre ROS y el ácido abscísico (ABA) en el cierre estomático y la tolerancia a estrés abiótico, como el riego con aguas con elevado contenido en sales o el déficit hídrico. La señalización por Giberelinas (GA), hormonas de elongación, se encuentra ligada también a las ROS, mediante la estimulación de la destrucción de las proteínas nucleares DELLA (llamadas así por contener esa secuencia de aminoácidos), represoras del crecimiento, que a su vez regulan los niveles de transcritos de enzimas antioxidantes. Además, se han descrito interferencias de las ROS en el metabolismo de las auxinas, implicadas en la elongación celular, que conducen a cambios morfológicos que ayudan a evitar los efectos perjudiciales cuando existe un estrés ambiental, y estas interferencias afectan la homeostasis de auxinas a niveles diferentes. A su vez las auxinas también son capaces de inducir una generación programada y específica de ROS o de regular los niveles de antioxidantes. Por otro lado, se ha descrito la capacidad de dos de los componentes claves de la regulación redox: la tiorredoxina dependiente de NADP y el glutatión, para alterar tanto el transporte como el metabolismo de auxinas³⁷. Todo ello pone de manifiesto la complejidad de estos procesos y lo que es más importante, lo que aún queda por determinar en investigaciones futuras en este tema, aspectos que deberían abarcar la identificación de puntos de convergencia adicionales entre las ROS y las vías de señalización hormonal.

Otra de las características fundamentales de la señalización por ROS es su acoplamiento directo con el metabolismo primario. Casi cualquier cambio en la homeostasis celular podría conducir a un cambio en los niveles estacionarios de ROS en un compartimento determinado. De este modo, condiciones fisiológicas o ambientales que favorezcan un determinado proceso, como la fotorrespiración en plantas en situaciones de sequía, salinidad, elevadas temperaturas etc... favorecerían una producción incrementada de ROS en peroxisomas. Es relativamente fácil imaginar cómo

un estrecho vínculo entre el metabolismo y los niveles de ROS podría hacer que estas últimas sirvieran para registrar los cambios en el metabolismo celular y orquestar un mecanismo de respuesta. En este contexto, la acumulación de ROS puede por ejemplo, causar una inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en mitocondrias y regular positivamente la vía glicolítica y la vía oxidativa de las pentosas fosfato. En mitocondrias, la señalización por ROS está acoplada al estado redox del pool de la ubiquinona y de la oxidasa alternativa (AOX) a la que posteriormente me referiré, y juega un importante papel en la respuesta de las plantas a condiciones de estrés ambiental, intentando optimizar la actividad respiratoria.

Es posible que este acoplamiento representase una ventaja evolutiva inicial que condujo al empleo posterior y futuro de las ROS para la señalización y el control de muchos de los procesos biológicos. Para ello se ha sugerido la siguiente explicación: ya que los diferentes organismos generan ROS a niveles distintos y podrían perder o activar el transporte de determinadas ROS como el H_2O_2 en su entorno, es posible que otra de las ventajas de las ROS como moléculas señalizadoras en los primeros estadios de la evolución, fuera el detectar la comunicación entre los diferentes organismos. De este modo, la necesidad inicial de detectar y controlar el metabolismo así como el medio ambiente y/o a otros organismos u otras células, a través de las distintas fuentes de ROS, pudo haber contribuido a la evolución de estas ROS como moléculas señalizadoras.

Especificidad de la señalización por ROS

El proceso de la señalización por ROS junto a su enorme complejidad como he esbozado, lleva implícito un aspecto importante que actualmente constituye el principal punto de debate. Concretamente la atención se centra en cómo se adquiere la especificidad de la señalización. Como un ejemplo ilustrativo, hay que considerar que como he indicado, condiciones de

crecimiento con elevada radiación, déficit hídrico, temperaturas extremas, o salinidad, provocan un aumento en los contenidos de ROS en orgánulos como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. ¿Cómo pueden estos incrementos actuar como señales específicas para “disparar” una respuesta apropiada que permita la aclimatación a tales condiciones de estrés ambiental? Más aún, la señal por ROS puede generarse en un grupo específico de células en la planta, como ocurre en respuesta a patógenos, o por heridas o por un estrés ambiental localizado, con influencia directa bien en tejido foliar o en células de raíz, y esta señal debe transferirse a todo el conjunto de la planta. La explicación a estos interrogantes aún no se tiene.

Se han dado diversas posibilidades. Se sugiere el empleo de las ROS como la señal general que prepara o activa toda una red de señales en la célula que a su vez funcionarían junto con las ROS en conferir la especificidad. Estas otras señales podrían ser pequeños péptidos, hormonas, lípidos y fragmentos de pared celular, entre otras. Una posibilidad diferente es que la señal por ROS lleve implícito un mensaje decodificador que con bastante probabilidad puedan ser señales de calcio que tengan oscilaciones específicas dentro de localizaciones celulares definidas. Las características específicas de la señal (amplitud, frecuencia y/o localización) se detectarían y se decodificarían por mecanismos especializados que dispararían la expresión de genes específicos de respuesta al estrés desencadenante³⁸. Una tercera opción, es que cada compartimento celular o cada célula tuviese su propio grupo de receptores para decodificar señales de ROS generadas en su interior, que posteriormente se transfieran a otras redes de señales, como por ejemplo las de calcio o a través de la fosforilación de proteínas.

Como generalmente ocurre en los distintos sistemas biológicos, es muy probable que la respuesta esté en el funcionamiento a nivel celular, de una combinación de los diferentes mecanismos descritos y con alta probabilidad, de algunos otros aún no sugeridos. Lo que sí que parece claro es que la señalización por ROS no puede evaluarse como una única red, sino como

una vía de señalización integrada que funciona junto a todo un entramado de redes de señales distintas, como ya he descrito con anterioridad. Realmente un avance importante en esta área va a necesitar el poder definir de forma precisa los diferentes “sub redes” de señales que operan a nivel celular y el establecer si realmente estas pueden estar interconectadas guardando una cierta jerarquía. En este sentido se está haciendo un esfuerzo considerable en tratar de establecer la estrecha interacción que posiblemente existe entre la señalización por ROS, la red redox celular y los diferentes pools de antioxidantes en las diferentes células o en los distintos compartimentos celulares.

Hay un ejemplo interesante recogido por varios grupos de investigación, que ilustra claramente la alta especificidad en la señalización por ROS, y que consiste en el análisis de unos mutantes dobles deficientes en APX1 (ascorbato peroxidasa citosólica) y CAT 2 (catalasa peroxisomal) de plantas de *Arabidopsis*, y de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Se encontró que la falta combinada de ambas actividades produce una señal única y característica a nivel celular, que pone en marcha una respuesta nueva de aclimatación. Esta respuesta incluye la activación de mecanismos de reparación del ADN, el control del ciclo celular y mecanismos que evitan la muerte celular programada. Esta respuesta no se produjo en las plantas mutantes que carecían solo de una de las dos enzimas, bien plantas *apx1* bien plantas *cat2*, lo que pone claramente de manifiesto la necesidad de una señal específica de ROS para su activación, una señal que solo se produce en el mutante doble.

Otros ejemplos de especificidad lo constituyen la transducción de señales mitocondriales a través del empleo de péptidos mitocondriales y las derivadas de la interacción con la respuesta redox denominada de forma genérica “señalización reductora”.

Señalización por péptidos mitocondriales

En mitocondrias, como ya he comentado, la producción de ROS tiene lugar como resultado del proceso respiratorio^{39,40}. Considerando diferentes estimaciones, la tasa de evolución de ROS en mitocondrias parece estar comprendida en rangos entre 0.2 a 30 nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína^{41,42} lo que supone una producción “in situ” inferior a la descrita en cloroplastos o peroxisomas durante la actividad fotosintética y fotorrespiratoria. A pesar de este hecho, las mitocondrias son los orgánulos celulares con una mayor concentración de proteínas oxidadas entre otras vías, por un mecanismo que conduce a su “carbonilación”, a través de la oxidación catalizada por metales de determinados aminoácidos: prolina, histidina, arginina, lisina y treonina. Este proceso conduce a su irreversible inactivación. El empleo de una plataforma proteómica a gran escala sobre las consecuencias de la oxidación de proteínas en el metabolismo mitocondrial de plantas de arroz, sugiere que este proceso se centra en una población discreta de proteínas y no ocurre de forma aleatoria, a pesar de la naturaleza no enzimática del mismo. Algunas de ellas son componentes del sistema de transporte de electrones (complejos I y III) implicados en la generación de ROS y algunas matriciales como manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD), varias enzimas del ciclo de Krebs, las cuatro enzimas implicadas en la descarboxilación de la glicina, proteínas redox, proteínas de choque térmico (“heat shock proteins”) y porina, entre otras⁴³. La función mitocondrial depende de la integridad de la maquinaria proteica de esta organela, lo que hace de los sistemas encargados del control de calidad de las proteínas mitocondriales (**Quality Control**: siglas QC), una de las estrategias primordiales en la regulación de la actividad respiratoria y actualmente se describe que también de la señalización retrógrada.

El proceso de degradación de proteínas en péptidos representa un antiguo mecanismo general de limpieza proteica en vertebrados y también suministra una memoria inmunológica y una historia antigénica. Esta respuesta

adaptativa permite distinguir lo “propio” de lo “extraño”, mediante la presentación de pequeños péptidos como antígenos en la superficie celular. Mientras que se ha venido aceptando de forma generalizada que el “peptidoma” deriva únicamente de las proteínas degradadas en el citoplasma por el proteosoma y múltiples peptidasas, los péptidos derivados de proteínas codificadas en mitocondrias también se han podido detectar en la superficie celular⁴⁴. El origen mitocondrial de los péptidos y su participación o función en la señalización durante el estrés se ha revelado en una publicación reciente de Haynes y col⁴⁵ (2010). En ella empleando metodología de ARN de interferencia en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se demuestra que la familia de transportadores ABC, (**A**TP **B**inding **C**assete) de la membrana interna mitocondrial, que libera péptidos a través de la membrana mitocondrial al citoplasma, también regula la denominada “respuesta a proteínas desplegadas” (**u**nfolded **p**rotein **r**esponse: UPRmt) y la expresión de chaperonas mitocondriales, encargadas de regular el recambio de proteínas. Todo ello sugiere un mecanismo por el que las proteínas mitocondriales dañadas inician una señal mitocondrial de estrés que resulta en una respuesta nuclear de protección (señalización retrógrada), que a su vez aumenta la homeostasis mitocondrial de proteínas o “proteostasis”. Este trabajo por tanto establece que los péptidos generados por proteasas dependientes de ATP, tipo ClpXP de matriz, salen desde la matriz al citoplasma a través de un transportador tipo ABC denominado HAF-1, y esto se utiliza en las células eucarióticas para la regulación de vías de respuesta al estrés encargadas de restaurar el balance celular, a través de la interacción de estos péptidos con un factor de transcripción. La identificación del transportador HAF-1 homólogo al identificado previamente en levadura, denominado Mdl1, que en ella se encarga de la salida de péptidos mitocondriales, fue un punto clave para el establecimiento de esta hipótesis e interesantemente, un transportador bastante relacionado (At1g10680) también se ha encontrado recientemente en plantas de *Arabidopsis*. Las

mitocondrias vegetales, al igual que las de levadura, contienen en la matriz proteasas dependientes de ATP y otras asociadas a ambas membranas, interna y externa. Los péptidos detectados en el espacio intermembrana derivados de ambos tipos de proteasas y transportados allí, en el caso de los matriciales, por acción de un transportador similar a Mdl1 de levadura, se piensa que pueden cruzar la membrana externa mitocondrial a través de porinas. En sistemas animales a esta señalización por péptidos se le atribuyen ciertas ventajas, al posibilitar una respuesta rápida y económica a cambios fisiológicos. Se ha descrito la participación de muchas proteínas y péptidos en desarrollo, y en la regulación de procesos fisiológicos que incluyen la presentación de antígeno y la señalización endocrina y de insulina. En plantas de forma similar se argumenta que los péptidos derivados de la ruptura proteolítica de proteínas modificadas oxidativamente, cumplen el requisito de especificidad requerido para su actuación como moléculas señalizadoras y para regular la expresión de genes específicos de la fuente de origen, contribuyendo de este modo a la señalización retrógrada por ROS durante el estrés oxidativo⁴⁶.

Señalización redox mitocondrial

La importancia de una función integradora de la respiración mitocondrial en la respuesta de plantas al estrés abiótico y oxidativo, se propuso en trabajos pioneros de la década de los ochenta, en la que se estableció que las ROS generadas en abundancia en respuesta a condiciones ambientales de estrés posiblemente por perturbaciones en la cadena de transporte electrónico, participan en la respuesta de las plantas al estrés ambiental que las originó, como bajas temperaturas, estrés salino o deficiencias nutricionales^{31,40,41}. Esta implicación lleva a asumir la capacidad de las plantas para distinguir la señalización por ROS mitocondriales de aquellas otras ROS producidas en diferentes compartimentos, y la existencia de mecanismos envueltos en una

detección local de las mismas. Este hecho no excluye que en estas situaciones, toda una serie de componentes mitocondriales alterados por la acción de estas ROS puedan participar en el proceso de señalización retrógrada, entre ellos péptidos (que acabo de referir), proteínas, lípidos, y estado de sistemas redox etc...En este último caso, el proceso de regulación redox de proteínas a través del sistema tiorredoxina (Trx01) dependiente de NADPH ya citado, también tiene un fuerte impacto en la funcionalidad de la respiración y en la especificidad de la señalización durante el estrés, debido al número relativamente amplio aunque específico, de proteínas mitocondriales que pueden unirse a la Trx01. Estas proteínas incluyen componentes del complejo V de síntesis y degradación de ATP, la peroxirredoxina (PrxIIIF) de regulación del H₂O₂, el factor de elongación Tu, implicado en el proceso de síntesis de proteínas, componentes del complejo de la glicina descarboxilasa, implicada en el proceso fotorrespiratorio y finalmente e interesantemente, la vía respiratoria oxidasa alternativa (AOX). La regulación redox podría actuar conjuntamente o no a la regulación metabólica por ácidos orgánicos descrita para esta vía respiratoria. El papel exacto que la proteína AOX desempeña en la respuesta a estrés aún no se ha establecido, sin embargo se acepta de forma generalizada que está relacionado con su habilidad para disminuir los niveles de ROS mitocondriales, lo que va a permitir dos cosas: por un lado modular el daño oxidativo y por otro un mantenimiento y regulación de las vías de señalización. Realmente, la inducción de la AOX se emplea como modelo de señalización retrógrada mitocondrial. Su inactivación lleva a una amplia reorganización del transcriptoma, que resulta en cambios en la expresión de más de 5000 genes en la célula, incluso en condiciones de crecimiento normales. Por ello, la activación reductora de la AOX sugiere la importancia de la regulación redox mitocondrial en la respuesta al estrés ambiental³¹ así como una conexión entre esta regulación y la señalización retrógrada “mitocondrias–núcleo” a través de la AOX. En ambos compartimentos esta regulación implica un estado de reducción incrementado

del pool de tiorredoxinas preexistentes, mediado en mitocondrias, a través del poder reductor en forma de NADPH, generado por la enzima isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP, y la actividad de la tiorredoxina reductasa (NTR). Este proceso, posiblemente contribuye a la regulación de vías metabólicas matriciales, a través de un sofisticado mecanismo de regulación de retroalimentación, en el que la abundancia y la actividad de la AOX están gobernadas por el estado celular de compuestos carbonados. Además en mitocondrias, las deshidrogenasas alternativas dependientes de NADPH (altND) pueden tener una cierta importancia influenciando el estado redox del NADP citosólico a través de su oxidación.

Junto a ellas, otra de las vías adicionales que dotan de flexibilidad metabólica a las mitocondrias vegetales, lo que como he descrito anteriormente es importante para la supervivencia de la planta, es la presencia en estos orgánulos de la enzima terminal de la biosíntesis del ascorbato⁴⁷. Esta enzima denominada L-galactono-1.4-lactona deshidrogenasa (GLDH) está acoplada a la vía citocrómica respiratoria. En condiciones de inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como puede ocurrir en condiciones de estrés oxidativo, la síntesis de ascorbato puede acoplarse como un donador alternativo de electrones para la cadena respiratoria permitiéndole así su funcionalidad. Se ha encontrado que la GLDH se localiza sobre un sub complejo del complejo I mitocondrial, que es un componente crucial de la regulación redox y de la respuesta al estrés en las células fotosintéticas. Esta enzima no modifica su actividad en el proceso oxidativo de la maduración de frutos, en el que se ha sugerido una contribución de la mitocondria en el incremento de los niveles de ascorbato que se produce en otros orgánulos celulares del fruto maduro incluyendo cromoplastos^{48,49}, lo que lleva a pensar en la importancia del mantenimiento de un nivel de síntesis de ascorbato que permita la salida del antioxidante desde la mitocondria a estas otras localizaciones. Esta respuesta es diferente a la encontrada en el proceso de senescencia foliar, en la que los niveles de

ascorbato mitocondriales y foliares disminuyen y se asocian con una senescencia prematura y una susceptibilidad aumentada a la muerte celular programada (PCD)^{39,50}. En contraposición con la ruta de biosíntesis, las reacciones de degradación del ascorbato solo se han descrito en el compartimento extracelular (apoplasto).

Actualmente no hay una evidencia consistente sobre la síntesis del antioxidante glutatión en mitocondrias a pesar de que algunos datos recientes de inmunolocalización han puesto de manifiesto unas concentraciones elevadas de este antioxidante en ellas^{51,52}. Aún no se ha podido caracterizar la presencia en mitocondrias de un sistema de transporte de glutatión desde el citoplasma, sin embargo es interesante el hecho de la presencia en plantas de proteínas similares a los transportadores Bcl-2 (**B cell lymphoma 2**) que en mitocondrias animales regulan el transporte de glutatión y de esta forma influyen el reservorio de este antioxidante en ellas, lo que es esencial por su participación en numerosos procesos, entre ellos el proceso de apoptosis en células animales⁵³. En plantas, la senescencia foliar inducida se acompaña de una importante reducción en los niveles de glutatión mitocondriales mientras que sus niveles se incrementan en peroxisomas, sugiriendo su participación en las vías de señalización de este proceso^{39,54}. Pero, en la vida y la muerte, ¿qué lado es el de las ROS?

Mitocondria, muerte celular y apoptosis

El papel de las ROS en el proceso de muerte celular programada (PCD) o apoptosis en animales ha sido objeto de una atención bastante considerable en los últimos años, ya que conduce a la muerte de las células eucariotas. En humanos diariamente casi unos 70 billones de células adultas sufren apoptosis, lo que es crítico para un desarrollo normal de los organismos multicelulares, por ejemplo, en el desarrollo de los embriones y de los órganos vitales así como en la homeostasis celular general como ya comenté. En plantas, se ha descrito la regulación del proceso de PCD ligado también al

desarrollo, concretamente durante la formación de elementos traqueales, en el desarrollo de las semillas, en la germinación y en la senescencia. La erradicación controlada de células puede estar inducida por toxinas (por ejemplo a través de daños químicos) o por una disrupción física de las mismas, aunque actualmente se ha reconocido que este proceso de PCD también se encuentra bajo un estricto control celular y está mediado por un complejo sistema de redes de señalización, en las que las reacciones de generación de energía en las mitocondrias (y en cloroplastos en plantas) son los reguladores centrales, como ya describí anteriormente. Las respuestas de las mitocondrias de plantas y de animales a señales de PCD son similares e incluyen la inducción de la permeabilización de la membrana mitocondrial, que junto con otras alteraciones, son coincidentes con incrementos en la producción mitocondrial de ROS. En animales esto en parte se encuentra bajo el control de la familia de proteínas Bcl-2 a las que me acabo de referir, que contiene miembros con funciones tanto pro-apoptóticas (ejemplo Bax) implicados en la disrupción de la membrana mitocondrial, como anti-apoptóticas (ejemplo Bcl) que la protegen. Además, en mitocondrias animales y de plantas, el espacio intermembrana contiene moléculas activas en procesos redox que potencialmente constituyen moléculas citotóxicas, como el citocromo c, que durante la permeabilización de la membrana se libera de la mitocondria y media en el proceso actuando como un efector de PCD.

Ademas, en animales se conoce que las diferentes vías que conducen a PCD pueden ser dependientes o no de cisteín-proteasas tipo caspasas, mientras que en plantas, el proceso de PCD implica la activación de una serie de diferentes proteasas (cisteína y aspártico proteasas). Por ejemplo la proteasa metacaspasas 8⁵⁵ se ha identificado como un nuevo ejecutor de PCD inducida por estrés oxidativo causado por la luz ultravioleta. Todo ello finalmente conduce a cambios bien reconocibles en la morfología celular asociados con la PCD, que incluyen perturbaciones en la membrana

plasmática, condensación y fragmentación de la cromatina en el núcleo y a una compactación de las organelas en el citoplasma y del volumen celular⁵⁶.

En animales, una flavoproteína denominada "factor de inducción de apoptosis" (AIF), que se libera de las mitocondrias, inicia unas vías independientes de caspasas que resultan en la muerte celular. Esta proteína AIF fue la primera flavoproteína de la que se demostró su participación en la apoptosis animal, pero aún no se ha encontrado en las plantas. Esta familia de proteínas AIFs presenta una conformación similar a la de la enzima glutatión reductasa y como ella, dependen también del poder reductor del NADPH. Se liberan de las mitocondrias en respuesta a señales implicadas en muerte celular que se producen como resultado de situaciones determinadas. Estas señales a su vez están probablemente mediadas por una enzima nuclear denominada PARP-1 (**P**oly [**A**D**P**-ribose] **p**olymerasa **1**), que se activa cuando el ADN se encuentra dañado⁵⁷. Para inducir la apoptosis, una vez en el citoplasma, AIF entra en el núcleo y se une al ADN, esto produce una condensación de la cromatina y un reclutamiento de nucleasas que fragmentan el ADN. Por otro lado una segunda flavoproteína denominada AIF-M2 que participa en la apoptosis en humanos, se localiza en el citoplasma donde produce radicales $O_2^{\cdot -}$ empleando NADPH como reductor. AIF-M2 puede unirse también al ADN pero en este caso no al NADPH. De esta forma, la producción de ROS dependiente de NADPH cuando AIF-M2 no está unida al ADN se considera que es importante para señalar la viabilidad celular. Su inhibición por la presencia de ADN extraño o por la salida del propio al citoplasma, se reconoce como una señal de que la muerte celular debería progresar.

En plantas, proteínas como AIF o similares podrían por tanto actuar como generadoras de radicales superóxido que son necesarios para señalar la supervivencia celular. En este sentido, se ha descrito la proteína denominada LSD1 (una demetilasa específica de lisina) como regulador negativo de la PCD y se ha descrito como un "eje" para la regulación de los mediadores

transcripcionales de respuestas a varias fuentes de estrés oxidativo. Su ausencia en los mutantes de *Arabidopsis* denominados *lds1*, conduce a un fenotipo de muerte celular inducido por la luz, que se asocia a una acumulación intensa de ROS. La proteína LSD1 se une al factor de transcripción conocido como AtbZIP10 (proteína dedo de zinc) que se mueve entre el núcleo y el citoplasma. Este factor en las plantas mutantes *lds1*, carentes de la proteína, actúa como un mediador incontrolado de PCD. La interacción entre la proteína y el factor de transcripción AtbZIP10 previene el desplazamiento de este último al núcleo y de este modo se suprime la muerte celular programada. Al mismo tiempo la interacción de la proteína LSD1 con este factor de transcripción y posiblemente con otros, puede influenciar también la capacidad celular de secuestrar el H₂O₂^{58,59}.

Mitocondria, ROS y envejecimiento

Otro de los procesos en el que las ROS y mitocondrias se encuentran implicados es en el proceso de envejecimiento. Actualmente podemos encontrar toda una plétora de trabajos que sugieren de forma generalizada que el envejecimiento es una consecuencia de la acumulación de daños oxidativos, en particular de daños al ADN mitocondrial. Esta teoría del “envejecimiento a través de los radicales libres mitocondriales” (mFRTA), que cité al inicio de la charla, propone lo que se conoce como “ciclo viciado” por el que las ROS promueven mutaciones en el ADN mitocondrial que a su vez conducen a un incremento posterior en la producción de ROS al desestabilizar la cadena de transporte de electrones. Este ciclo en sí asume una naturaleza autocatalítica del daño que implicaría una acumulación exponencial de moléculas dañadas, que a su vez permitiera explicar un incremento exponencial en el riesgo de muerte, que es lo que define al proceso de envejecimiento. Mientras que hay certeza de que varios tipos de daño verdaderamente se acumulan con la edad, sin embargo aún no se ha establecido cómo puede la acumulación y el tipo de daño y de molécula

dañada, determinar el incremento exponencial del riesgo de muerte en función del tiempo transcurrido, es decir la velocidad del envejecimiento.

Un ejemplo interesante en el que este ciclo se cuestiona, al menos en nematodos, es el descrito muy recientemente en *Caenorhabditis elegans*, concretamente en mutantes deficientes en una o en las dos SODs presentes en sus mitocondrias, una Cu,Zn-SOD y una Mn-SOD encargadas de eliminar los radicales superóxido. Este nematodo de pequeño tamaño (1 mm) transparente y hermafrodita se ha convertido en un pequeño héroe para la investigación científica gracias a un argumento irrefutable: fue el primer organismo pluricelular cuyo genoma completo fue secuenciado, en 1998. La consolidación de su prestigio y lanzamiento a la fama le llegó en 2002, cuando el Nobel de Medicina fué concedido a Sidney Brenner, John E. Sulston y Robert Horvitz por sus descubrimientos en torno a la muerte celular programada.

Este gusano ha permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos de enfermedades degenerativas, del suicidio celular o apoptosis al que me he referido y sobre el envejecimiento. Pues bien en relación al estudio que nos ocupa, sorprendentemente, en contraste con las observaciones en levadura, moscas y ratones, incluso el doble mutante de este gusano, carente de ambas SODs, no mostraba reducción en su longevidad. Estos resultados se han interpretado como una evidencia crítica de la teoría del envejecimiento por radicales libres mitocondriales, porque ésta asume que estos mutantes deben soportar un daño oxidativo significativamente elevado en sus mitocondrias. Cuando se utilizó toda una serie de nematodos no mutados aunque envejecidos, se observó claramente un incremento del daño oxidativo dependiente de la edad, sin embargo no se pudo comprobar una amplificación autocatalítica del daño como propone la teoría del “ciclo viciado”. Más aún en la comparación entre los nematodos mutantes y los animales normales, los niveles de daño oxidativo del ADN mitocondrial no tenían diferencias significativas, incluso la pérdida total de ambas SODs no

aumentaba significativamente el daño al ADN en relación con el de los mutantes simples. ¿Cómo es posible que la pérdida de la actividad SOD mitocondrial no produjese un estrés oxidativo mayor? Una respuesta podría estar en el tamaño menor que presentan los mutantes, en un desarrollo ralentizado y en que tienen menos descendientes. Sin embargo sigue sin ser obvio por qué la falta de unos genes antioxidantes determinados produce estos efectos físicos en vez de incrementar la mortalidad y reducir la longevidad. Posiblemente estos efectos responden a la reducción de casi un 50% en la energía metabólica de los mutantes, a un aumento de mecanismos desacopladores que reducen la generación de ROS en mitocondrias y a una disminución del potencial de membrana y/o de la actividad de transporte de electrones (ETC).

Todo ello no significa necesariamente que las ROS mitocondriales no sean importantes para el envejecimiento en *C. elegans*. El modelo sugiere que la respuesta se encuentra en “el mantenimiento de mecanismos conservados de regulación mitocondrial que permitan unos niveles muy bajos de superóxido, en un umbral, (sub nM), aunque esto conlleve como efectos secundarios alterar los niveles energéticos y en última instancia el estado físico”. En este escenario las ROS aparecen como elementos importantes para determinar la supervivencia, y la función principal de las SODs mitocondriales no es la de limitar el daño oxidativo sino la de mantener la función mitocondrial modulando la producción de energía, más que el daño mediado por las ROS, evitando su acúmulo progresivo. Todo ello hace que cualquier ciclo viciado sea difícil de prever y, a que una vez que los niveles de ROS no puedan mantenerse por debajo de un umbral por más tiempo en los animales viejos, el metabolismo energético se colapsará hasta un punto en el que sea inconsistente con una función tisular y con la supervivencia del organismo.

Finalmente, la noción de que la modulación de la función mitocondrial via superóxido, disminuyendo la disponibilidad de energía metabólica, está estrechamente ligada a una extensión de la longevidad en estos nematodos,

nos hace preguntarnos por la naturaleza del mecanismo subyacente. El elucidar el posible papel de la mitocondria y del ADN mitocondrial en este contexto constituye sin lugar a dudas un reto fascinante.

Este ejemplo guarda similitud con ciertos casos descritos en plantas, como en mutantes de *Arabidopsis thaliana* en las que la expresión del gen codificante de Mn-SOD mitocondrial se suprimió parcialmente mediante la tecnología antisentido. Antes de continuar, describir que esta planta de la familia de las Brassicáceas puede considerarse la estrella hómologo vegetal a *C. elegans*. A pesar de no ser más que una mala hierba, sin interés económico, es con diferencia la fanerógama más estudiada. Se convirtió en el año 2000 en la primera planta y el tercer organismo pluricelular cuyo genoma había sido secuenciado íntegramente y sólo en 2010 se publicaron más de 6000 artículos sobre *Arabidopsis*. En los mutantes de Mn-SOD, se producía una alteración específica de la homeostasis redox mitocondrial, que sin embargo no se acompañaba de un cambio sustancial en la oxidación de proteínas mitocondriales o de una inhibición de los complejos mitocondriales respiratorios, a pesar de la inhibición de enzimas específicos del ciclo TCA. Estas plantas también tenían el crecimiento reducido y curiosamente un incremento en la capacidad antioxidante celular, debido a aumentos en otras superóxido dismutasas y en peroxidasas dependientes de ascorbato y glutatión. Todo ello indicaba la existencia de una señalización retrógrada como resultado de los cambios en el estado redox mitocondrial, reflejando la capacidad de las mitocondrias para integrar la respuesta celular, consistente en este caso en disparar una sobre-compensación de la falta de una enzima antioxidante (Mn-SOD) con la inducción de genes antioxidantes codificadores de otras enzimas con la misma y con distinta actividad, necesaria para mantener el equilibrio redox general y la supervivencia. En este caso se describió que el menor crecimiento de las plantas defectivas en Mn-SOD podía ser el resultado de la interacción entre vías de señalización redox y

señalización por hormonas que gobiernan la inhibición del crecimiento lo que pone de manifiesto la flexibilidad del metabolismo en estas plantas.

Del laboratorio al campo: perspectivas de futuro

Después de varias décadas de un suministro aparentemente ilimitado de alimentos, al menos en las naciones tecnológicamente más avanzadas, la creciente necesidad de impulsar la producción agrícola de alimentos, fibra y la bioenergía, junto al doble requerimiento de la previsibilidad del rendimiento y la sostenibilidad agrícola, son factores clave que demanda la investigación en plantas. En la actualidad, la humanidad se enfrenta a serios problemas como la pérdida de tierras fértiles, causada en parte por la agricultura intensiva convencional que agota los recursos naturales, el impacto potencialmente negativo de un incremento en los estreses ambientales (particularmente la sequía) asociado con cambios climáticos, y un aumento en la población mundial. La situación es particularmente seria para los países en vía de desarrollo como África, donde la población ha aumentado más del doble desde 1975, alcanzando cifras superiores a los 751 millones de personas, sin un incremento paralelo en la producción de alimentos. Más aún en las regiones del cuerno de África cada 10 años tiene lugar un ciclo de sequía severa que se alterna con un ciclo moderado de falta de agua cada 5 años. En el año 2006, por ejemplo 27 regiones del África Sub-Sahariana sufrieron hambruna debido a la fuerte sequía y 200 millones de persona estaban en estado de malnutrición. Actualmente la situación no es más alentadora: basta con ojear las informaciones sobre lo que está ocurriendo en Somalia. De acuerdo con el “Instituto Internacional de Investigación de Política Agraria” (<http://www.ifpri.org/Diciembre 2010>) la sequía ligada a una carencia de lluvia es la causa principal de malnutrición. De aquí que la necesidad de mejorar los cultivos para que puedan crecer más y mejor en condiciones ambientales adversas, entre ellas con déficit hídrico, es por tanto real y nunca ha sido más

urgente. La FAO denuncia constantemente que el problema de alimentación es tremendo, y que de aquí a 2050 hay que aumentar la cantidad de alimentos producidos en más de un cincuenta por ciento. Habrá más de nueve mil millones de personas para ese año, y ¿cómo se va a alimentar a todas ellas?

El descubrimiento de la estructura del ADN en doble hélice permitió dar cuerpo físico a ese ente de razón que había sido el gen hasta el momento. El modelo dejaba entrever dos propiedades asociadas al material genético, estabilidad y transmisión. Puede decirse, tal vez exagerando un poco, que también sugería un camino hacia el desarrollo tecnológico que tardaría aún tres décadas en desembocar en la Ingeniería Genética Vegetal. La nueva tecnología ha dado un impulso enorme a nuestro conocimiento del mundo vegetal. Genes que se activan en la planta en respuesta a sequía, salinidad, condiciones de elevadas temperaturas o bajo una helada, cadenas intra- o intercelulares de transducción de señales, las señales de la enfermedad o de la herida por un hongo o un insecto, cómo las plantas se avisan unas a otras, el control genético del crecimiento, de la senescencia....Estos nuevos conocimientos tal vez no se hubieran podido obtener sin el concurso de una nueva metodología que permite añadir o suprimir piezas de una maquinaria compleja precisamente para tratar de conocer sus funciones. Todo ello unido al avance bioquímico y en la tecnología de imagen asociada a la biología celular y molecular, nos han permitido alcanzar unos niveles bastantes sofisticados en el entendimiento de la biología de las plantas. Por estas razones, una solución que está adquiriendo cada vez más importancia en el arsenal de soluciones encaminadas a mejorar y defender la seguridad alimentaria, pasa por la modificación genética de cultivos mediante la introducción en ellos de genes con características determinadas, que les permita adquirir tolerancia a condiciones de estrés e incrementar el rendimiento y su calidad nutricional.

En la actualidad se están cultivando más de sesenta millones de hectáreas de plantas transgénicas. La superficie sembrada se distribuye por 23 países, lo que supone un aumento considerable frente a la docena de países que las cultivaban al inicio de este siglo XXI. Entre ellos no solo se encuentran países como Estados Unidos, Canadá y España, sino de modo creciente países como China, Brasil o India que representan una parte sustancial de la población mundial. Más aún, el crecimiento en los porcentajes de superficie sembrada de cultivos como la soja (60%), o la canola (18%) resistentes a herbicidas, el algodón resistente a insectos (28%), el maíz resistente al taladro (14%), reflejan el reconocimiento actual de esta prometedora tecnología como una alternativa esencial para impulsar la productividad vegetal y la producción alimentaria.

Estos últimos años han sido testigos de una verdadera explosión en el conocimiento de nuevos genes con características de tolerancia al estrés, que están siendo probados como marcadores potenciales de mejora y por sus potencialidades en defensa antioxidante. La producción del llamado “arroz dorado”, rico en pro-vitamina A, fue un paso pionero en este campo y surgió para intentar solucionar el problema de que unos 3 tres millones de niños se queden ciegos en el mundo por falta de este antioxidante vitamínico. La activación de mecanismos de seguridad para el control y seguimiento de los cultivos transgénicos podrá ayudar a que la caracterización de la función de genes no esté destinada a permanecer solo en el dominio de los laboratorios.

A pesar del hecho de que actualmente la teoría sobre la relación “antioxidantes y buena salud” está siendo cuestionada, estudios epidemiológicos muestran una asociación entre el consumo de frutas y hortalizas y una salud cardiovascular mejorada, un riesgo disminuido de enfermedades cardiacas y de determinados tipos de cáncer⁶⁰. Esto ha llevado a realizar importantes esfuerzos en la investigación dirigida a caracterizar los efectos de diferentes grupos de metabolitos secundarios de plantas, sobre la viabilidad celular en animales y los sistemas de eliminación, así como a una

extensa caracterización de las vías del metabolismo secundario en ellas. Mientras que el concepto simple que hace unos años se tenía sobre una relación clara y casual entre daño oxidativo y envejecimiento en animales, ha derivado hacia un cuadro mucho más complejo, que señala al envejecimiento como un fallo en el reciclaje de células y macromoléculas dañadas, la noción de que el contenido en antioxidantes de los alimentos vegetales es beneficioso para la salud y para el mantenimiento de la “juventud”, permanece fija en la filosofía de la nutrición humana. Los antioxidantes constituyen los componentes celulares esenciales de defensa frente al daño proteico y de los sistemas de eliminación de xenobióticos (agentes químicos extraños a los organismos vivos) y otros metabolitos, bien directamente o bien como “ayudantes” de otros sistemas protectores: un ejemplo es el de la enzima glioxalasa, que tanto en plantas como en animales tiene efectos anti-envejecimiento y otros efectos protectores relacionados, y que para ejercer su función requiere de glutatión.

La capacidad de los alimentos vegetales de potenciar un buen estado de salud parece que descansa en la habilidad de los metabolitos vegetales para regular la transcripción de genes humanos y de inducir las defensas endógenas que contrarresten carcinogénesis y el desarrollo de niveles elevados de lípidos y colesterol. Una vía por la que los compuestos bioactivos presentes en la dieta pueden inducir la expresión de genes protectores es a través de la activación del factor de transcripción Nrf2⁶⁰ que se une al “elemento de respuesta antioxidante” (ARE) presente en los promotores de genes que codifican una batería de enzimas metabólicas y de defensa, como ya he comentado anteriormente al referirme a la similitud encontrada entre células humanas y de plantas, en los procesos de regulación redox implicados en determinadas respuestas de defensa. Entre las enzimas inducidas se encuentran algunas implicadas en la biosíntesis, reducción y conjugación del antioxidante glutatión, y enzimas de la vía de las pentosas fosfato, junto a componentes del proteosoma 20S independiente de ubiquitina

que degrada proteínas dañadas^{61,62}. La puesta en marcha de la orquestación del metabolismo defensivo a través de este factor Nrf2 por los compuestos vegetales, suministra un rango de protección no solo mucho más amplio y eficaz que la potencialidad ofrecida por el suplemento de antioxidantes, sino que también es mucho más duradera, ya que la acumulación de metabolitos está limitada tanto por su degradación como por su excreción. En frutos y hortalizas un amplio rango de metabolitos actúan como inductores que activan Nrf2, entre ellos, los ácidos grasos omega-3 oxidados, carotenoides, índoles e isotiocianatos derivados de glucosinolatos, polifenoles y sulfuros de alilo. Independientemente del modo por el que se perciben las señales derivadas de las plantas, como por ejemplo pro-oxidantes o xenobióticos y de los mecanismos a través de los que éstas incrementan las respuestas celulares de resistencia que conllevan beneficios para la salud, se ha llegado a la conclusión de que es crucial no solo el entender los procesos redox que dirigen el metabolismo primario y secundario en las plantas para producir estos metabolitos en abundancia, sino también la relación holística entre la homeostasis o equilibrio redox celular y el crecimiento y desarrollo vegetal.

Actualmente la rutina del empleo de suplementos vitamínicos en los países tecnológicamente “avanzados” ha levantado una importante controversia, ya que un número consistente de estudios ha demostrado que esta práctica puede ser peligrosa ya que puede incrementar las causas de muerte⁶³. El efecto negativo de los antioxidantes sobre la mortalidad humana puede explicarse considerando que las especies reactivas del oxígeno son esenciales para el funcionamiento normal de todos los organismos, incluyendo los humanos, y que un aumento en su eliminación interfiere con los mecanismos esenciales para la creación y la erradicación controlada de células que aseguran la salud humana. De estos mecanismos, la apoptosis de células animales, o la muerte celular programada en plantas (PCD), son quizás los mejor caracterizados en términos del papel central que en ellos tiene la homeostasis redox celular.

El campo de la Biología Redox ha presenciado una drástica re-evaluación de la función de los ROS y los antioxidantes. Unos y otros gobiernan el estado redox celular, que en plantas es un regulador convergente ligando las respuestas de estrés biótico y abiótico al control del crecimiento y la muerte celular programada. Los antioxidantes como ascorbato, glutatión y alfa-tocoferol desempeñan funciones que van más allá de sus actividades como secuestradores de ROS, particularmente en señalización celular y en la regulación de la expresión de genes. Sin embargo aún permanece el concepto de que las ROS ejercen sus efectos principales a través del daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN. Mientras que la bioquímica por la que las ROS oxidan a los componentes celulares puede describirse en términos precisos, la complejidad del sistema celular hace que el paradigma “daño” frente a “señalización” sea más difícil de definir. Sin embargo la elección de paradigma gobierna nuestros conceptos, entendimiento y la apreciación de la importancia de los mecanismos bioquímicos subyacentes y su importancia fisiológica, así como las aplicaciones prácticas dirigidas a antioxidantes específicos. Los conceptos emergentes de cómo las ROS se encuentran implicadas en el control del crecimiento vegetal y de las respuestas de defensa, suministran nuevas vías con posibilidades de desarrollo práctico, para la regulación positiva de genes apropiados. Junto a la información que la abundancia de los transcritos suministra “per se”, los promotores de los diferentes transcritos marcadores, pueden utilizarse para dirigir genes reporteros. Dentro de las áreas emergentes con un gran interés se encuentra la señalización derivada de las cadenas de transporte electrónico mitocondrial, siendo necesario un mayor entendimiento de la integración de la expresión de cientos de genes nucleares codificantes de los componentes respiratorios mitocondriales, con la expresión de las subunidades codificadas en este orgánulo. La identificación de una posible relación entre la biogénesis de las mitocondria y la demanda respiratoria o la función, permitirá explorar la dinámica mitocondrial en células, los sistemas de control de calidad en

plantas y los procesos de fusión y fisión que definen el entramado de redes de mitocondrias en las células. Aún quedan por describir muchos de los procesos de transporte que ocurren en mitocondrias y su identificación permitirá comprender cómo tiene lugar la interacción de las mismas con otros procesos celulares. De forma similar la investigación sobre el recambio y la reparación de las proteínas modificadas o dañadas es un campo especialmente importante que está aún en sus inicios.

Como inicialmente he descrito, considerando que el cambio global antropogénico continúa impactando de forma importante la producción y sostenibilidad de los cultivos, se necesitarán también soluciones biotecnológicas para incrementar la resistencia respiratoria a condiciones de altas temperaturas, salinidad o sequía, permitiendo de este modo alterar la tasa de crecimiento y la producción de biomasa en los cultivos. Por otro lado, la evidencia de que al igual que en plantas, las vías respiratorias no fosforilantes pueden operar en *Drosophyla*, en humanos y en células de hongos, con el fin de alterar la eficiencia energética en fondos respiratorios comprometidos y considerando la extensión de la longevidad encontrada en *Caenorhabditis elegans*, mediante la disminución de los procesos respiratorios, estudios de eficiencia respiratoria en plantas suministrarían una información interesante sobre los mecanismos que distinguen la historia vital de la diferentes especies vegetales.

Epílogo

El estudio de la Biología de las Plantas no ha sido nunca tan interesante e importante. El conocimiento del que disponemos está haciendo posible el desarrollo de plantas capaces de suministrarnos de forma más eficiente alimento, medicinas, fibras y materiales básicos de los que la población humana es totalmente dependiente.

Permítanme concluir expresando mi convencimiento del interés creciente y el papel crucial que tanto las especies reactivas del oxígeno y los sistemas antioxidantes tienen en la Biología actual. Estos agentes constituyen los principales “directores” de la evolución: “Todos los aspectos de la vida aeróbica implican a las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes, no podemos escapar de ellos ni deberíamos desearlo”. Uno de los retos más importantes que quedan por elucidar es el “auténtico papel”, que junto con el de las mitocondrias, tienen en el proceso de envejecimiento, especialmente para poder hacer algo al respecto. Mientras esto se consigue y aunque realmente no suene muy ortodoxo, me he permitido presentarles un breve comentario del Dr. Fernández Moreno sobre lo que en un futuro lejano podrían depararnos las mitocondrias, invitándonos textualmente “a echar un vistazo” en: <http://www.theforce.net/midichlorians/midi-what.asp>.

Aquí les presento lo que he considerado más interesante:

.....El chico mostró su entendimiento con una inclinación de la cabeza. “¿Puedo preguntarte algo?” El Jedi Master asintió con la cabeza. “¿Qué son los midi-chlorians?”

“Los midi-chlorians son criaturas microscópicas que viven dentro de las células de todos los seres vivos y comunican con la Fuerza.”

“¿Viven dentro de mí?” preguntó el chico.

“En tus células.” Qui-Gon paró. “Somos simbioses con los midi-chlorians.”

“¿Simbioses?”

“Simbioses, criaturas que conviven para el beneficio mutuo. La vida no podría existir sin los midi-chlorians, y no tendríamos ningún conocimiento de la Fuerza. Nuestros midi-chlorians hablan con nosotros de forma continua, Annie, y nos cuentan la voluntad de la Fuerza.”

“¿Lo hacen?”

Qui-Gon levantó una ceja. “Cuando aprendas a acallar tu mente, les vas a oír cuando hablan contigo.”

Anakin se lo pensó un momento y luego frunció el ceño. “No lo entiendo.”

Qui-Gon sonrió y sus ojos eran afectuosos y también herméticos. “Con el tiempo y la práctica, Annie, sí lo vas a entender”....

Muchas gracias por su atención

He dicho

Bibliografía

- [1] Margulis L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14(3): 225-274.
- [2] Margulis L. 1975. Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, ISBN 0-300-01353-1.
- [3] Doolittle RF. 2000. Searching for the common ancestor. *Res. Microbiol.* 151(2): 85-89.
- [4] Palmer, J. D., 1997 Organelle genomes: going, going, gone! *Science* 275: 790-791.
- [5] Margulis L. 1992. Symbiosis in cell evolution: Microbial communities in the Archean and Proterozoic eons. Freeman, New York, ISBN 0-7167-7028-8
- [6] Woese CR, Fox GE. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74: 5088–
- [7] Raven PH. 1970. A multiple origin for plastids and mitochondria. *Science* 169(3946): 641-646.
- [8] De Duve, C. 1996. The birth of complex cells. *Scientific American* 274: 50–57.
- [9] Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D. 2002. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12246–51.
- [10] Richly E, Leister D. 2004. An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* 329:11–16.
- [11] Thorsness PE, Fox TD. 1990. Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 346:376–79.
- [12] Huang CY, Ayliffe MA, Timmis JN. 2003. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422:72–76.
- [13] Turner C, Killoran C, Thomas NS, Rosenberg M, Chuzhanova NA, Johnston J, Kemel Y, Cooper DN, Biesecker LG. 2003. Human genetic disease caused by de novo mitochondrial-nuclear DNA transfer. *Hum. Genet.* 112: 303–309.
- [14] Martí MC, Olmos E, Calvete JJ, Díaz I, Barranco-Medina S, Whelan J, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A. 2009. Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiol.* 150(2): 646-657.
- [15] Andrés C, Lurin C, Small ID. 2007. The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol. Plant.* 129: 14–22.
- [16] Pesaresi P, Scheneider A, Kleine T, Leister D. 2007. Interorganular communication. *Current Opinion in Plant Biol.* 10: 600-606.
- [17] Page MJ, di Cera E. 2008. Evolution of peptidase diversity, *JBC* 283(4): 30010-30014.
- [18] Halliwell B. 2006. Update on reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322.
- [19] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (5806): 457-465.

- [20] Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427–1430.
- [21] Logan DC. 2010. Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 38: 789–795.
- [22] del Río LA. 2011. Redox Pioneer: Professor Christine Helen Foyer. *Antioxidants and Redox Signaling* 15(8). 2383-2391.
- [23] Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–639.
- [24] Sevilla F, López-Gorgé J, del Río LA. 1982. Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 70: 1321-1326.
- [25] 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 (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiol* 114: 275-284.
- [26] Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M. 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* 36: 1157-1162.
- [27] Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Sevilla F, Lázaro JJ. 2011. The dual targeted plant sulfiredoxin retroreduces the sulfinic form of atypical mitochondrial peroxiredoxin. *Plant Physiology* 155, 944-955.
- [28] Biteau B, Labarre J, Toledano MB. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425: 980–984.
- [29] Barranco-Medina S, Lázaro JJ, Dietz KJ. 2009. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Letters* 583: 1809-1816.
- [30] Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lázaro JJ. 2010. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J. Exp Bot.* 61(5): 1509–1521.
- [31] Martí MC, Florez-Sarasa I, Camejo D, Ribas-Carbó M, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A. 2011. Response of the mitochondrial antioxidant redox system and respiration to salinity in pea plants. *J. Exp. Bot.* 62(11): 3863-3874.
- [32] Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X. 2008. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-Nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956.
- [33] Furukawa M, Xiong Y. 2005. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the cullin 3-Roc1 ligase. *Mol. Cell Biol.* 25: 162–171.
- [34] Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2, ra45.
- [35] Zhuo L, Aon MA, Almas T, Cortassa S, Winslow RL, O'Rourke B (2010) A reaction-diffusion model of ROS-induced ROS release in a mitochondrial network. *PLoS Computational Biology* 6, e1000657
- [36] Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459: 996-999.
- [37] Bashandy T, Guillemot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichhelda JP. 2010. Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in *Arabidopsis* auxin signaling. *Plant Cell* 22:376-391.

- [38] Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16(6): 300-309.
- [39] Jiménez A, Hernández JA, Pastori GM, Del Río LA, Sevilla F. 1998. On the role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol* 118(4): 1327-1335.
- [40] Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah ChC, Siedow JN. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol* 141: 357-366.
- [41] Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sevilla F. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol. Plant.* 89: 103-108.
- [42] Møller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561–591.
- [43] Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J. 2009. Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2: 1310–1324.
- [44] Kirstein-Miles J, Morimoto RI. 2010. Peptides signal mitochondrial stress. *Cell Metabolism* 11 :177-178
- [45] Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA, Ron D. 2010. The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* 37: 529-540.
- [46] Moller I, Sweetlove LJ. 2010. ROS signalling - specificity is required. *Trends Plant Science* 15: 370-374.
- [47] Noctor G, De Paepe R, Foyer CH. 2007. Mitochondrial redox biology, an interface between bioenergetics and genetics. *Trends Plant Science* 12:125-134.
- [48] Jiménez A, Romojaro F, Llanos MR, Gómez JM, León A, Sevilla F. 2003. Antioxidant systems and their relationship with the response of pepper fruits to the storage at 20°C. *J. Agric. Food Chem.* 51(21): 6293-6299.
- [49] Martí, MC, Camejo D, Olmos E, sandalio LM, Fernández-García N, Jiménez A, Sevilla F. 2009. Characterization and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biol.* 11(4): 613-624.
- [50] Pavet V, Olmos E, KiddleG, Mowla S, Kumar S, Antoniw J, Alvarez ME, Foyer Ch. 2005. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* :139:1291-1303.
- [51] Zechmann B, Mauch F, and Müller M. 2008. Subcellular immune-cytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids. *J Exp. Bot.* 59: 4017–4027.
- [52] Fernández-García N, Martí MC, Jiménez A, Sevilla F, Olmos E. 2009. Subcellular distribution of glutathione in an *Arabidopsis* mutant (*vitc1*) deficient in ascorbate. *J. Plant Physiol.* 166: 2004-2012.
- [53] Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. 2007. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem* 282: 29296–29304.
- [54] Del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E and Hernández JA. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* 116: 1195-1200.

- [55] He R, Drury GE, Rotari VI, Gordon A, Willer M, Farzaneh T, Woltering EJ, Gallois P. 2008. Metacaspase 8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 283: 774-783.
- [56] Garmier M, Priault P, Vidal G, Driscoll S, Djebbar R, Boccara M, Mathieu C, Foyer CH, De Paepe R. 2008. Light and oxygen are not required for harpin-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 282: 37556–37566.
- [57] Muñoz-Gómez JA, Rodríguez-Vargas JM, Quiles-Pérez R, Aguilar-Quesada R, Martín-Oliva D, de Murcia G, JM, Almendros, A, de Almodovar, MR. 2009. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 5: 61-74.
- [58] Kaminaka H, Näke C, Epple P, Dittgen J, Schu" tze K, Chaban C, Holt BF, Merkle T, Schä fer E, Harter K, Dangl JL. 2006. bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in *Arabidopsis* following infection. *EMBO J.* 25: 4400–4411.
- [59] Huang X, Li Y, Zhang X, Zuo J, Yang S. 2010. The *Arabidopsis* *LSD1* gene plays an important role in the regulation of low temperature-dependent cell death. *New Phytol.* 187: 301-312.
- [60] Surh YJ, Na HK. 2008. NF-*κ*B and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with antiinflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes Nutr.* 2: 313-317.
- [61] Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 278: 311–318.
- [62] Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, and Biswal S. 2002. Identification of Nrf2 regulated genes by oligonucleotide microarray: potential role in cancer chemoprevention. *Cancer Res* 62: 5196–5203.
- [63] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. 2007. Mortality in Polyceralde trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention – systematic review and meta-analysis. *J. Am. Med. Assoc.* 297: 842–857.

Astrónomas, médicas, matemáticas, físicas, químicas, biólogas....

La pasión por descubrir no entiende de sexos, es algo inherente al ser humano.

Discurso de Contestación del Académico de Número

Ilmo. Sr. D. Carlos García Izquierdo

DISCURSO DE CONTESTACIÓN A CARGO DEL ACADÉMICO DE NÚMERO, ILMO. Dr. D. CARLOS GARCÍA IZQUIERDO

Excelentísimo Sr. Presidente

Ilustrísimos Señores Académicos,

Excelentísimas e Ilustrísimas autoridades,

Señoras y señores,

Es para mí un honor haber recibido el encargo de pronunciar este Discurso de Contestación (algo que agradezco a la Academia de Ciencias y a su Presidente), en respuesta al Discurso de Ingreso que acaba de pronunciar la Dra. Francisca Sevilla Valenzuela en esta Sesión Solemne de su Toma de Posesión de Investidura como Académica de Número de nuestra Academia de Ciencias de la Región de Murcia. Y ese honor es doble para mí; de una parte, la calidad científica de la persona que ya es Académica es indudable, y no sólo para mí, sino para toda la comunidad científica, que ya la ha juzgado reiteradamente durante su amplia trayectoria investigadora. Sus méritos científicos recogidos en su *Currículum Vitae* así lo atestiguan. Pero además de lo dicho, se trata en este caso concreto, de pronunciar un Discurso de Contestación a una científica de prestigio que pertenece a mi misma institución, al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y a mi mismo instituto, el Centro de Edafología y Biología Aplicada de la Segura (más conocido como el CEBAS). Ello quiere decir que he convivido con ella durante muchos años, y de ahí el que este Acto sea aún más entrañable para quien les habla. Por todo lo mencionado, poder dirigirme hoy a todos ustedes con el motivo que aquí nos ha reunido, me hace sentirme particularmente

feliz, y sólo espero poder estar a la altura de las circunstancias, tanto por la persona que acaba de leer su Discurso, como por la Institución que la acoge como Académica.

A continuación, voy a hacer una breve glosa de la labor científica de la Dra. Sevilla, labor que ha merecido nuestro reconocimiento a la hora de proponerla como Académica Numeraria. Señalaré aquellos aspectos científicos que pueden resultar de mayor interés, y que ha desarrollado a lo largo de su vida investigadora, años dedicados a esta sacrificada profesión de la investigación científica, aunque también me permitiré la licencia de hacer alusión a su personalidad al final de este Discurso.

TRABAJO PREDOCTORAL EN GRANADA (ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN, EEZ-CSIC)

La Doctora Sevilla, nacida en Melilla, cursó la licenciatura de Ciencias Biológicas en la Universidad de Granada, obteniendo el título de Licenciada por dicha Universidad en 1976. Finalizada su formación académica universitaria ingresó como becaria del Plan de Formación de Personal Investigador, en la **Estación Experimental del Zaidín (E.E.Z) (C.S.I.C) en Granada**, concretamente en la Unidad Estructural de Investigación de Bioquímica.

El trabajo que llevó a cabo durante este tiempo se basó en el hecho demostrado de la importancia que la optimización de la nutrición mineral tiene en el crecimiento y desarrollo de la planta, incidiendo directamente en el rendimiento cuantitativo de la población vegetal, así como en la calidad que determina el valor económico de la producción. Sin embargo, hasta entonces la mayor parte de los trabajos de fertilización se habían realizado dentro del más puro empirismo, estableciendo una relación directa aporte-rendimiento sin tener en cuenta la implicación de los nutrientes minerales en el

metabolismo general que condiciona las interacciones y, por tanto, la funcionalidad de otros nutrientes, ni la problemática que la generalización de su utilización puede presentar, ya que al ser los intervalos de eficacia muy estrechos pueden presentarse con facilidad estados de toxicidad que es preciso prevenir.

Por ello, a finales de los setenta se incrementó considerablemente la investigación en el campo de la Fisiología Vegetal, sobre el efecto de la toxicidad y la deficiencia de los micronutrientes en el metabolismo de la planta, así como aquellas otras conducentes al empleo de la funcionalidad biológica de los mismos con fines aplicados, como medio para estimar estados carenciales ó desequilibrios de los micronutrientes en plantas. Tras su incorporación al CSIC la labor científica que desarrolló, desde Septiembre de 1976 a Diciembre de 1980, culminó con la lectura y defensa de la Memoria de Doctorado. La realización de la Tesis Doctoral que supuso sus primeros contactos con la actividad investigadora permitió realizar los primeros trabajos científicos en plantas sobre la utilización de la actividad metaloenzimática "Superóxido dismutasa" (SOD), en los estudios del Mecanismo de Acción de los Micronutrientes y de sus Interacciones en la Planta a Nivel Enzimático. Como ya ha comentado a lo largo de su charla, las superóxido dismutasas (SOD; EC:1.15.1.1) catalizan la dismutación de los radicales libres superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producidos en distintos lugares celulares, a oxígeno molecular y agua oxigenada. Estas metaloenzimas se presentan en tres formas moleculares que difieren entre si en el grupo prostético metálico. Una clase contiene Cu y Zn y las otras dos contienen Fe y Mn, respectivamente. La única función conocida de estas enzimas es la protección celular frente a los daños letales que pueden originar los radicales libres $O_2^{\cdot-}$. La existencia de distintas isoformas de SOD sugirió la utilidad de las mismas en estudios de nutrición mineral al poder correlacionar cuatro metales distintos (Cu y Zn, Mn y Fe) con una misma actividad enzimática. Este hecho unido a la amplia distribución

celular de estas enzimas abría nuevas posibilidades en la investigación de las interacciones entre los micronutrientes en la planta y su implicación en el estado nutricional de las mismas. Con estos objetivos inició los primeros estudios sobre SODs en plantas de guisante, leguminosa de gran importancia en nutrición humana. Este trabajo fue pionero al demostrar la utilidad de las SODs como “indicadores” tanto de las deficiencias de Mn, como del metal biológicamente activo implicado en el metabolismo celular en estas plantas. Por otro lado y considerando la utilidad de la Mn-SOD para la investigación del mecanismo de acción del manganeso en la célula, la Dra. Sevilla llevó a cabo la purificación y total caracterización bioquímica de la primera Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) aislada de una planta superior (*Pisum sativum* L.).

Desde luego, a ningún científico se le escapa que eran tiempos difíciles para la investigación, profesión a veces no muy entendida por nuestra sociedad, y en donde realizar avances era complicado. En particular, la complejidad aumentaba cuando la investigación científica se hacía en España, país que no destacaba en esos tiempos por ser una potencia dentro del mundo de la investigación. Sin embargo, se debe señalar que los trabajos realizados en esta época por la Dra. Sevilla, sirvieron de base para estudios actuales en los que se ha clonado la enzima SOD, considerando la secuencia de aminoácidos en su día descrita, con el fin de profundizar en su función en condiciones de estrés ambiental y senescencia.

ETAPA POSDOCTORAL EN MURCIA, CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA (CEBAS-CSIC)

Finalizada esta primera etapa de su formación investigadora, en Enero de 1981 la Dra. Sevilla se trasladó al **Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (C.E.B.A.S) (C.S.I.C) en Murcia**, siendo admitida en la Unidad Estructural de Investigación “Desarrollo y Alimentación de la Planta”. El

trabajo que se le encomendó estaba incluido dentro del Programa de Investigación “**Estudio y Optimización de la Nutrición Vegetal en Plantas Cultivadas**”. Uno de los problemas más importantes de la Comunidad Autónoma de Murcia y que aún hoy día presenta muchos aspectos no resueltos, es el hecho de la clorosis ocasionada por la deficiencia de hierro, que produce cuantiosas pérdidas en la economía de esta Región y de nuestro País. Este problema motivó que la mayor parte de su investigación se centrara en los aspectos relacionados con el diagnóstico y corrección de la citada deficiencia. Esta circunstancia era propicia para que la Dra. Seilla y su equipo decidieran desarrollar este programa desde un punto de vista enzimológico, lo que unido a los criterios fisiológicos y analíticos, proporcionaría una visión más completa de la nutrición de la planta. Se pone de manifiesto cómo una investigación básica, realizada en un laboratorio determinado (en este caso, en la EEZ-CSIC de Granada), tiene su reflejo para desarrollar otra investigación muy ligada a su entorno, con problemas típicos de dicho entorno, y en este caso, de la Comunidad Autónoma de Murcia.

El desarrollo de esta investigación constituyó a su vez el punto de partida para la creación de un Grupo de Trabajo y una nueva Línea de Investigación, en el departamento de Nutrición y Fisiología Vegetal del CEBAS, sobre “Sistemas Antioxidantes y Metabolismo del Oxígeno Activado en Plantas” y del que la Dra. Sevilla es responsable desde 1985. Sobre esta base y utilizando durante varios años consecutivos plantas de limonero (*Citrus lemon* var. Verna) crecidas en la Finca Experimental del CEBAS, y afectadas de deficiencias en Fe y Mn, propusieron la utilidad, también en plantas cítricas, del sistema metaloenzimático SOD como indicador para el diagnóstico diferencial de ambas deficiencias. También demostraron la utilidad de la “actividad peroxidasa inducida” así como la de “ferredoxina” en el establecimiento del estado nutritivo del Fe en plantas de limonero.

Estos estudios, a la vez evidenciaron la presencia en estas plantas de ferro-superóxido dismutasas, Fe-SODs, enzimas de especial interés por haber estado consideradas hasta 1980 como procariotas, por lo que aquellos resultados, en 1984, constituyeron la primera descripción de la presencia de esta clase de dismutasas en la familia *Rutaceae*, lo que llevó a cuestionar las teorías hasta entonces existentes sobre la evolución y expresión en plantas de estas metaloenzimas.

Antes de proseguir, debo de señalar que en el año 1985, la Dra. Sevilla superó las pruebas selectivas a la escala de **Colaboradores Científicos del CSIC** (hoy llamada de Científicos Titulares del CSIC) y posteriormente en Septiembre de 1989 las correspondientes a **Investigadores Científicos del CSIC**, con toma de posesión 1-3-1990. Haber llegado, en esos momentos de 1990, a un escalafón importante dentro del CSIC sin duda dice mucho a favor de la labor científica que la Dra. Sevilla llevó a cabo por entonces.

A partir de ese momento, la Dra. Sevilla centra su labor investigadora en el estudio del “Metabolismo del Oxígeno Activado y de los Sistemas Antioxidantes a Nivel Subcelular en Plantas en Condiciones de Estrés Abiótico, concretamente Situaciones de Salinidad y Senescencia”. En la agricultura actual un aspecto de considerable importancia es la problemática originada por el uso con fines agrícolas de aguas de riego con un contenido elevado en sales. Este hecho resulta en una situación de estrés salino con efectos altamente perjudiciales para la planta al alterar el crecimiento, la producción y calidad de la misma. Además, en zonas caracterizadas por baja pluviometría y temperaturas elevadas, características que concurren en la Región de Murcia, y en el Sureste Español, la problemática del estrés salino constituye, sin lugar a dudas, uno de los desafíos de mayor interés desde el punto de vista agrícola y de investigación. Por otro lado, se ha demostrado que en determinadas condiciones de estrés ambiental tiene lugar en plantas un incremento en los niveles celulares de especies de oxígeno activado (O_2^- ,

$\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ y H_2O_2) capaces de alterar el metabolismo celular y la funcionalidad de las membranas. Por todo ello, y debido a la carencia de información sobre la relación *estrés salino/metabolismo oxidativo*, la Dra Sevilla decidió prestarle atención especial al papel de los compuestos antioxidantes (glutación, ácido ascórbico, vitamina E, etc) y de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasas, ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR), estas últimas componentes del ciclo ascorbato-glutación (ASC-GSH), en la respuesta de plantas leguminosas frente a situaciones de estrés salino, y ampliar estos estudios a condiciones de senescencia.

Estas investigaciones han sido pioneras en este área, al demostrar que bajo condiciones de salinidad tiene lugar el establecimiento en mitocondrias, cloroplastos y apoplasto de un estrés oxidativo mediado por radicales libres superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y por H_2O_2 que parece estar relacionado con la aparición de lesiones necróticas en las hojas, y cuya intensidad a su vez está relacionada con el grado de sensibilidad a la sal de las variedades analizadas. Además como conclusión general de los estudios fisiológicos, enzimáticos, celulares y moleculares de los distintos sistemas antioxidantes, se demostró que en la respuesta al estrés por NaCl se inducía de forma coordinada la síntesis “*de novo*” de isoformas enzimáticas específicas según su localización en las respectivas organelas, y el hecho de que estas inducciones ocurran a diferentes concentraciones de sal dependiendo de la respuesta fisiológica frente a las mismas de cada cultivar analizado, sugiere su implicación e importancia en determinar el grado de adaptación a condiciones moderadas de estrés por NaCl, en plantas de leguminosas. Estas isoformas específicas de enzimas antioxidantes pueden por tanto ser utilizadas como **marcadores enzimáticos de tolerancia al NaCl** en estas plantas.

Las investigaciones descritas a su vez conllevaron la necesidad de avanzar en el conocimiento de la posible presencia y funcionalidad en

mitocondrias y en peroxisomas del “**ciclo ascorbato-glutación**” (**ASC-GSH**), cuya importancia en la eliminación del H_2O_2 y en la regeneración del ascorbato en cloroplastos y en citoplasma ya estaba establecida. Sin embargo hasta el inicio de esta investigación en 1997 no se conocía su presencia en ambos orgánulos respiratorios. En este sentido el grupo de la Dra Sevilla demostró, por vez primera en plantas superiores, la presencia en mitocondrias y peroxisomas de todos los componentes enzimáticos y no enzimáticos del ciclo ascorbato-glutación así como la localización intraorganular de las distintas enzimas implicadas (APX, MDHAR, DHAR y GR). Esta línea de trabajo a su vez permitió proponer nuevas funciones para este ciclo relacionadas con señalización retrógrada y un papel diferencial de peroxisomas y mitocondrias relacionado con especies de oxígeno activado, en el proceso de la senescencia foliar y en la respuesta de plantas de guisante al estrés salino.

Todo el trabajo desarrollado por la Dra. Sevilla, le ha reportado el propio reconocimiento de su institución, el CSIC, habiendo en 2005 adquirido el máximo rango de **Profesora de Investigación**, al que puede llegar un investigador en la mencionada institución.

LINEAS FUNDAMENTALES DE INVESTIGACION DE LA DRA. SEVILLA EN LA ACTUALIDAD

Los trabajos que la Dra. Sevilla Valenzuela está desarrollando, junto a su equipo de investigación, en el CEBAS-CSIC, constituyen una ampliación de las líneas de investigación que se han llevado a cabo hasta la fecha, y podrían dividirse en dos apartados, uno de ellos de investigación más básica y otro más aplicada, constante ésta que la Dra. Sevilla ha perseguido a lo largo de su vida investigadora. En ambos casos los estudios abordan aspectos fisiológicos, bioquímicos y aproximaciones celulares y moleculares.

En lo que respecta a la parte de su investigación más básica, se pueden encuadrar los estudios más recientes a nivel subcelular de la participación de las mitocondrias en los mecanismos de respuesta a estrés abiótico y maduración de frutos; el equipo de la Dra. Sevilla ha demostrado además la implicación de la vía respiratoria alternativa característica de plantas “Oxidasa Alternativa” como posible mecanismo de regulación retrógrada entre las mitocondrias y el núcleo en la respuesta de las mismas al crecimiento en condiciones de salinidad. Esta participación es dependiente de la regulación redox que en estas condiciones parece implicar a la actividad del sistema tiorredoxina mitocondrial (PsTrxo1), cuya identificación en esta organela ha sido muy recientemente descrita por el grupo de la Dra. Sevilla. La activación reductora de la AOX por esta tiorredoxina ha llevado a sugerir la importancia de los procesos de regulación redox mitocondriales en los que se encuentra implicada la tiorredoxina, en la respuesta al estrés ambiental. Junto a estos resultados, el grupo de Investigación ha identificado también la presencia en mitocondrias del sistema peroxirredoxina /sulfirredoxina (Prx/Srx), cuya acción junto con la de la tiorredoxina anteriormente citada, supone una vía de control del peróxido de hidrógeno mitocondrial complementaria al ciclo ASC/GSH que en su día describió este grupo. La participación de estos sistemas de regulación redox en procesos de respuesta a estrés y durante la maduración de frutos, como intermediarios en la regulación post-traducciona l de proteínas mitocondriales, es uno de los Objetivos actuales de este grupo de investigación.

Las acciones de investigación realizadas hasta el momento por la Dra. Sevilla, tendentes a lograr los objetivos comentados con anterioridad, y que conllevan el empleo de técnicas fisiológicas, bioquímicas, celulares y moleculares, han merecido financiación a través de diferentes programas regionales de la **Fundación Séneca**, nuestra Agencia Regional de Investigación, adscrita a la Consejería de la Comunidad Autónoma de Murcia

encargada de Universidades e Investigación. Asimismo, ha merecido subvención de proyectos de la **Unión Europea** dentro del programa Human Potential Programme. Y por supuesto, un buen montante de la financiación necesaria para la investigación que lleva a cabo este equipo, les llega de los **Planes Nacionales de I+D**, a través de una sucesión de proyectos adscritos al Programa de Promoción General del Conocimiento actual Biología Fundamental Integrativa en colaboración con el Dr. Luis Alfonso del Río y el Dr Juan José Lázaro de la EEZ-CSIC. Se debe señalar como HITO dentro del soporte financiero para su investigación, y que además recoge los frutos de su labor científica desarrollada a lo largo de los años, el reconocimiento de su grupo de investigación dentro de los **Grupos de Excelencia de la Región de Murcia**, desde el año 2008, lo que supone una ayuda económica de interés por parte de la fundación Séneca para dicho grupo, así como un reconocimiento al pertenecer al conjunto de los 20 mejores grupos de investigación existentes en nuestra Región.

Además de una vertiente básica de su investigación, tal y como se ha expuesto anteriormente, también es cierto que una parte de esta investigación que lleva a cabo la Dra. Sevilla es susceptible de generar conocimientos que puedan ser transferibles a la sociedad y a la empresa. Como ejemplo, se puede hablar de la investigación con plantas de pimiento, las cuales tienen un notable interés económico fundamentalmente en la Región de Murcia. Los resultados que se han obtenido sobre el efecto del estrés por NaCl y por elevadas temperaturas sobre los sistemas antioxidantes y el metabolismo del oxígeno activado en ellas, pueden ser muy útiles para la identificación de marcadores de tolerancia, con vistas a la obtención de plantas transgénicas adaptadas a situaciones desfavorables. También son interesantes desde un punto de vista nutricional como una posible vía de incrementar la calidad y valor nutricional de los frutos, con incidencia directa en la salud, ya que han comprobado que situaciones moderadas de estrés por NaCl inducen

capacidad antioxidante en las plantas. Estos resultados se podrían extrapolar a otros cultivos de interés económico y permitir obtener mejores cosechas utilizando aguas de baja calidad en ambientes semiáridos. Todo ello ha abierto la puerta de la Transferencia de Resultados de Investigación, al grupo de la Dra. Sevilla, a través de proyectos de transferencia (**PETRI, PROFIT**), dentro del Plan Nacional de I+D, en colaboración con el grupo del Dr. Juan Luis Ramos de la Estación Experimental del Zaidín, (CSIC), de Granada y la **empresa REPSOL YPF**; asimismo, se puede señalar la participación del equipo en varios proyectos en colaboración con el Dr. José Palma de la Estación Experimental del Zaidín, (CSIC), financiados de forma recurrente por CICYT y Comunidad Autónoma en los que participa la **empresa Syngenta Seeds**.

Para finalizar me gustaría indicar que el conjunto de estas últimas investigaciones ha sido objeto de trabajos que han derivado en la formación de personal científico; en concreto, han constituido la base científica de 7 Tesis Doctorales defendidas durante los últimos años, y dirigidas o codirigidas por la Dra. Sevilla. Asimismo, ha participado en numerosos congresos nacionales e internacionales, y ha impartido cursos a lo largo de este tiempo. Su labor investigadora ha contribuido a consolidar en el CEBAS el grupo de investigación sobre **“Metabolismo del Oxígeno Activado y Sistemas Antioxidantes en Plantas”** y que constituye junto con el del Dr Luis A del Río, de la E.E.Z. (CSIC) de Granada, los dos equipos de investigación probablemente más consolidados en España en el campo de la biología de las especies reactivas del oxígeno en células vegetales. Como resultado de la investigación realizada, el grupo de la Dra. Sevilla mantiene además una estrecha colaboración internacional con grupos destacados italianos, franceses, alemanes, ingleses y australianos del área de la Biología Redox en plantas.

PACA SEVILLA: RASGOS DE SU PERSONALIDAD

Siempre es recurrente establecer una serie de alabanzas sobre las personas a las que en algún momento de su vida, se les ofrece un determinado reconocimiento. Es claro que la entrada como Académica Numeraria de la Dra. Sevilla en la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, supone sin duda un reconocimiento a su labor científica; y en este caso, las alabanzas a las que me refería anteriormente estarían plenamente justificadas, echando un simple vistazo a su labor investigadora. Sin embargo, me gustaría además, poner de manifiesto ciertos aspectos sobre la Dra. Sevilla (Paca Sevilla, para la todos los que la conocemos y hemos convivido con ella), y que sin ellos, desde luego la perspectiva como persona de manera integral, tan importante para tener un conocimiento completo de ella, no sería del todo entendida.

Me gustaría en primer lugar, poner en valor algunas facetas de Paca Sevilla, diferentes a la de investigadora ampliamente comentada anteriormente. Y en este sentido, quisiera señalar su papel como mujer, algo fundamental para forjar los valores que se agrupan en la personalidad de Paca Sevilla.

La oportunidad de glosar aquí su condición como “mujer”, parecería algo absurdo y desproporcionado en nuestros días; pero hay que retrotraerse a 1976, cuando Paca Sevilla comenzó su trabajo de investigación, para darse cuenta de lo que quiero señalar. En esos años, tanto ella como otras muchas mujeres Investigadoras, iniciaron una lucha para competir en condiciones de igualdad, con investigadores (hombres o mujeres), en una sociedad que aún distaba mucho de la igualdad en la plena concepción del término. Y he de decir en honor a la verdad, que conociendo a mi organismo (CSIC) y a muchos de sus investigadores (hombres) de entonces, no creo que en algún momento existiese discriminación sexista ni para ella, ni para ninguna otra mujer. Sin embargo, mi admiración por la lucha de entonces de una mujer en

el ámbito de la investigación, que es el que conozco, se basa en la necesidad para compartir (yo creo que en muchas ocasiones, en mayor medida que los hombres), el tiempo necesario para investigar, con tareas que precisamente son limitantes para dicho tiempo. Y hablo en el caso concreto de Paca, del tiempo dedicado a sus padres (como hija), a sus hermanos, a sus hijos, y en general, a su familia, con el sacrificio que todos sabemos que impone la investigación. Todos hemos de “dar” ese tiempo normalmente a lo largo de nuestra vida, pero mi sensación es que la mujer, aún más. Paca Sevilla, en este aspecto, supo compaginar de manera admirable su función como hija y su función como madre, con su trabajo de investigadora, algo nada sencillo. Y además, supo ser competitiva como así demuestran los hechos. Sirva este comentario, no sólo para Paca, sino para todas las demás mujeres que en situaciones similares, e incluso mucho más complicadas, llegaron lejos en su profesión, sin olvidar otros valores como los aquí comentados. Paca ha sabido llevar al seno de la Comisión de “Mujeres y Ciencia” del CSIC, de la que ha sido vocal durante 7 años, criterios acertados para conseguir mejoras, siempre con la equidad requerida, para la mujer en el ámbito de la investigación. Y no podía ni quería olvidar lo que para ella ha supuesto contar con un compañero de viaje, Miguel, su marido, que siempre ha estado ahí para apoyarla y ayudarla; esto, desde luego, ha sido una ventaja para sobreponerse a momentos difíciles, y situaciones de desesperación en los que apetece darse por vencido; ese apoyo yo creo que ha sido decisivo para ella y su carrera.

Y ya por último, y puesto que como ya señalé, trabajó en el mismo instituto que Paca, no puedo dejar de mencionar su talante como compañera; todos los que hemos trabajado cerca de ella sabemos de su compañerismo, siempre salpicado de buen humor, para los que la rodean. Hay que decir que Paca es una mujer con carácter, y eso a veces hay quien lo entiende como algo que impide la amistad o el compañerismo, pero cuando se ahonda un

poco, en el caso de Paca, esa premisa no se corresponde para nada con la realidad.

Por último, no quiero dejar de destacar un hecho que positivamente, sé que a Paca le ha hecho una tremenda ilusión. Haber nacido en Melilla, y que tu ciudad te nombre “Melillense del Año” por ser considerada una melillense ilustre, como así le ocurrió en el año 2007, es sin duda un hito que merece la pena resaltar. El título le fue entregado un jueves 6 de septiembre de dicho año, en la tradicional cena que cada año la Ciudad Autónoma ofrece a los medios de comunicación en el Salón Dorado del Palacio de la Asamblea. La Consejera de Cultura de entonces, Simi Chocrón, explicó que Sevilla tiene una trayectoria profesional envidiable y ha llevado el nombre de Melilla tras de sí.

Y ya para concluir este Discurso, quería pedirles disculpas a todos ustedes si no he cumplido con las expectativas esperadas, o no he conseguido estar a la altura de esta ceremonia. Sin duda el propio Acto y la Académica Numeraria, la Dra. Sevilla, se merecen todo lo mejor en estos momentos. Pero sí les diré que para mí, ha sido un verdadero orgullo entrar hoy en esta sala, junto a la Dra. Ángela Molina, y ofrecer mi humilde aportación para acoger de manera entrañable a nuestra nueva Académica. Le doy por tanto mi más cordial enhorabuena, y le digo que estoy seguro que su entrada en la Academia de Ciencias de la Región de Murcia, cuyas puertas le hemos abierto de par en par, será productiva; le deseo por tanto todo lo mejor. Espero también, que así como en la vida hay momentos entrañables que jamás se olvidan, para la Dra. Francisca Sevilla éste sea uno de ellos.

He dicho.

Carlos García Izquierdo

Académico Numerario de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia

