

Oxígeno

herramienta para fabricar

DEFENSAS BIOQUÍMICAS

en la planta del chile

→ Uno de los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas es la utilización y modificación del oxígeno molecular para convertirlo en derivados con un alto grado de toxicidad hacia microorganismos potencialmente patógenos. El objetivo de la presente publicación es difundir un aspecto del estudio bioquímico de los mecanismos de defensa en la planta de chile basado en la utilización de oxígeno molecular.



Durante su ciclo de vida las plantas enfrentan una gran cantidad de factores ambientales adversos para su desarrollo tales como sequía, falta de nutrientes, temperaturas cambiantes, plagas y ataques por diversos patógenos como hongos, virus y bacterias. No obstante la gran cantidad de potenciales patógenos que podrían provocarles diversas enfermedades, las plantas son capaces de mantenerse sanas debido a la estrategias de defensa que han desarrollado a lo largo de su evolución y les han permitido adaptarse a diferentes ambientes. Tales estrategias pueden clasificarse en dos tipos:

Físicas. Son aquellas relacionadas con la estructura de la planta, un ejemplo es la pared celular compuesta por polímeros complejos derivados de los carbohidratos y cuyo principal componente es la celulosa; otro caso es la cutícula, la cual se deposita sobre la pared celular y está formada principalmente por moléculas derivadas de ácidos grasos. Estas dos estructuras proporcionan barreras mecánicas contra la penetración de patógenos, contribuyendo así a la defensa de la planta.

Bioquímicas. Las plantas cuentan con estrategias que dependen de la producción de compuestos químicos tóxicos (para los microorganismos), cuya síntesis se estimula cuando la planta reconoce la presencia de un posible patógeno. Estos mecanismos incluyen la acumulación de compuestos de bajo peso molecular (conocidos como fitoalexinas) y la deposición, en la pared celular, de glicoproteínas ricas en el aminoácido prolina; las cuales se entrecruzan químicamente con los componentes de la pared celular incrementando su fuerza y la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno molecular.

→ **Especies reactivas derivadas del oxígeno molecular**

El oxígeno molecular es relativamente no reactivo y no tóxico para los organismos que consumen oxígeno durante la respiración; es decir, los organismos aeróbicos, lo cual se atribuye a su estructura electrónica estable; sin embargo, una vez que se altera su distribución electrónica, su estructura se vuelve muy reactiva y puede alterar sistemas biológicos. Las especies reactivas derivadas del oxígeno se pueden generar por modificación del sentido de rotación de sus electrones más externos, o por la adición sucesiva de electrones al oxígeno molecular, produciendo el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), respectivamente. Estas moléculas reaccionan fácilmente ante cualquier tipo de molécula sin necesidad de energía adicional.

La generación de derivados reactivos del oxígeno, específicamente la producción del radical anión superóxido, es un mecanismo de defensa bien caracterizado que utilizan las células del sistema inmunológico de los animales para matar microorganismos y eliminar la amenaza de enfermedades. Las características de cada uno de los derivados reactivos del oxígeno y su posible efecto sobre los sistemas biológicos se describen a continuación:

Radical anión superóxido. La producción de esta molécula en las plantas se realiza mediante una reacción que involucra a la enzima NADPH oxidasa, localizada en la membrana plasmática de las células. Por el sitio en donde se genera, reacciona con facilidad con los lípidos que componen la membrana plasmática, generalmente rompiéndolos y provocando daños irreversibles a esta estructura. Este radical puede actuar como uno oxidante o como un agente reductor y, por lo tanto, puede ser capaz de oxidar una gran variedad de moléculas orgánicas tales como proteínas, carbohidratos y lípidos. El $O_2^{\bullet-}$ se puede transformar (dismutar) en H_2O_2 , así, mientras más $O_2^{\bullet-}$ se produzca mayor cantidad de H_2O_2 se formará.

Peróxido de hidrógeno. Se considera que la mayoría del peróxido de hidrógeno presente en una célula proviene de la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, aunque también se puede generar por la adición directa de dos electrones al oxígeno molecular a través de reacciones catalizadas por algunas enzimas. Éste es un compuesto oxidante relativamente estable y puede atravesar la capa de lípidos de las membranas celulares debido a la ausencia de carga eléctrica de su molécula. Hasta hace muy poco tiempo, esta molécula había sido considerada como un metabolito celular tóxico. Sin embargo, ahora se sabe que uno de sus papeles importantes es funcionar como una molécula que transmite las señales exteriores derivadas de estímulos tanto de origen ambiental como de biótico al interior de la célula.

Se ha reportado que el peróxido de hidrógeno modula la expresión de varios genes relacionados con la defensa de la planta. Además, a través de las reacciones de lignificación (cambio de consistencia) participa en el reforzamiento de la pared celular de células vegetales que han sido atacadas por patógenos o sufrido una herida. El peróxido de hidrógeno puede oxidar directamente metales de transición tales como el Fe_{2+} a través de la reacción de Fenton y producir el radical hidroxilo.

Radical hidroxilo. Es un agente altamente oxidante (tiene una afinidad extremadamente alta por átomos de hidrógeno) y se genera por la adición de un electrón al peróxido de hidrógeno. Es el derivado reactivo del oxígeno más tóxico que se produce. Tiene una vida media que no rebasa el rango de microsegundos debido a que reacciona con cualquier tipo de biomolécula cercana y por su corta existencia ha sido difícil estudiarlo con detalle. Los ácidos grasos no saturados, de gran importancia biológica por ser los constituyentes principales de las membranas celulares, son particularmente susceptibles a la oxidación por parte del radical hidroxilo. La reacción de éste con los lípidos de la membrana genera la degradación de los ácidos grasos, lo que repercute en la pérdida de la integridad de la membrana y, finalmente, en muerte celular.

Puesto que los derivados reactivos del oxígeno reaccionan de la misma manera con cualquier tipo de biomolécula, sus efectos tóxicos sobre los organismos patógenos son muy importantes como mecanismo de defensa para la planta. Con el objeto de controlar la toxicidad hacia sus



propios componentes celulares, la planta ha desarrollado algunos mecanismos de destoxificación para eliminarlos cuando éstos ya no sean requeridos.

→Control de los mecanismos de defensa

La conversión metabólica de especies tóxicas derivadas del oxígeno en compuestos menos tóxicos se denomina destoxificación y es un proceso muy importante en células aeróbicas. Para que las funciones celulares se realicen de manera normal debe existir un balance entre la formación y el metabolismo de las especies reactivas derivadas del oxígeno. Las células vegetales, al igual que las células animales, han desarrollado varios mecanismos, tanto enzimáticos, como no enzimáticos que les permiten mantener el control sobre la producción de los derivados tóxicos del oxígeno; algunos de ellos se describen a continuación.

Mecanismos enzimáticos. El peróxido de hidrógeno puede ser eliminado por varias enzimas antioxidantes tales como las Catalasas, las cuales se localizan en los peroxisomas y en las mitocondrias de las células y convierten en agua el peróxido de hidrógeno que se produce durante la respiración; las peroxidasas, que utilizan el peróxido de hidrógeno durante las reacciones de lignificación y la enzima Ascorbato peroxidasa localizada en los cloroplastos y en el citoplasma, eliminan el peróxido de hidrógeno utilizando ácido ascórbico para convertirlo en agua.

La enzima Superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ y lo convierte en peróxido de hidrógeno, se encuentra en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias de las plantas. El peróxido de hidrógeno producido por esta reacción enzimática puede a su vez ser eliminado por los mecanismos descritos con anterioridad.

Hasta la fecha no existen reportes de mecanismos enzimáticos para eliminar la producción del radical hidroxilo, quizá por su alto grado de reactividad y su corta vida media; así, parece que la eliminación de este radical de-

pende de su reactividad con las biomoléculas que se encuentran cerca de su sitio de generación y la síntesis o disponibilidad de moléculas pequeñas que son capaces de secuestrarlo, tales como el ácido ascórbico y el α -tocoferol.

Mecanismos no enzimáticos. El ácido ascórbico y la glutatióna son excelentes antioxidantes que se distribuyen en grandes cantidades en toda la célula vegetal. Pueden interactuar (secuestrar) directamente con el radical hidroxilo y el anión superóxido, respectivamente. El tocoferol (vitamina E) se localiza en la región de la bicapa de lípidos de las membranas y puede reaccionar con el radical hidroxilo protegiéndolas de la degradación de lípidos, evitando un daño irreversible a su estructura. En adición algunas investigaciones públicas revelan que numerosos compuestos flavonoides pueden reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ y, de la misma manera, prevenir la degradación de lípidos.

→Derivados reactivos del oxígeno en el chile

El estudio en plantas de la producción y regulación de las especies reactivas derivadas del oxígeno nos permite conocer el papel de éstas durante las respuestas de defensa en contra de patógenos. En el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas se realizan estudios para caracterizar la respuesta de la planta de chile (*Capsicum annum* L., variedad "Ancho"), en relación con la producción de derivados reactivos de oxígeno. El fruto de la planta de chile, en general, es ampliamente consumido en nuestro país en sus diversas presentaciones, y por lo tanto se cultiva en todo el territorio mexicano. No obstante, conocemos muy poco los mecanismos bioquímicos que utiliza esta planta como estrategias de defensa contra organismos patógenos; por ello en nuestro laboratorio seleccionamos el fruto de chile como modelo de estudio. Para estimular el metabolismo relacionado con las reacciones de defensa, se inocula con una jeringa la cavidad del fruto con una solución que contiene ácido araquidónico, una molécula normalmente presente en las



paredes celulares del hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans*, de esta manera se simula la presencia del hongo en el tejido del fruto. Un sistema establecido así resulta simple de manejar y las respuestas metabólicas generadas en el fruto de chile se derivan únicamente de la presencia de esta molécula.

Los resultados de nuestros estudios han demostrado que los tres derivados tóxicos del oxígeno analizados, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^{\bullet} , son producidos en el fruto de chile en respuesta al tratamiento con el ácido araquidónico, aunque el tiempo de producción es diferente para cada uno. El $O_2^{\bullet-}$ fue el primero en acumularse y el último fue el OH^{\bullet} , lo que concuerda con el origen de su formación mencionado anteriormente. La inoculación en forma directa al fruto de chile con H_2O_2 comercial (agua oxigenada) estimuló la acumulación de cantidades considerables de capsidiol, un compuesto antimicrobiano cuya síntesis y acumulación se activan por la presencia de patógenos o de moléculas derivadas de patógenos. Lo anterior permite sugerir que el H_2O_2 producido en el fruto de chile como respuesta al tratamiento con ácido araquidónico puede actuar como molécula

mediadora para la activación de otros mecanismos de defensa, lo que en conjunto resultaría en la manifestación de resistencia de la planta hacia potenciales patógenos.

→ Conclusiones

La producción de derivados reactivos del oxígeno en el fruto de la planta de chile, en respuesta al tratamiento con ácido araquidónico, nos permite sugerir que ésta puede ser una estrategia importante utilizada por la planta para evitar ser invadida por agentes patógenos.

→ Perspectivas

El estudio de los diversos mecanismos bioquímicos de defensa que puede utilizar una planta, en este caso, la producción de derivados reactivos del oxígeno, como parte de una estrategia de defensa contra potenciales microorganismos patógenos tales como bacterias, virus y hongos y nemátodos, nos permitirá conocer, en el ámbito molecular, la reacción de la planta y, en el futuro, proponer tácticas para mejorar la resistencia a los microorganismos que atacan esta planta económicamente significativa para México.

Agradecimientos

Esta publicación es el resultado de un proyecto de investigación apoyado por el Conacyt (clave J32747-B).

Ernesto García Pineda es doctor en biotecnología de plantas por el Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del Cinvestav-IPN profesor investigador en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Es autor de cinco publicaciones internacionales. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores.

Elda Castro Mercado es bióloga egresada de la Facultad de Biología de la UMSNH. Actualmente es estudiante de maestría en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Ha publicado artículos en revistas nacionales e internacionales y presentado trabajos de investigación en congresos nacionales e internacionales.

Araceli Arreola Cortés es quimicofarmacobióloga egresada de la UMSNH. Realizó la tesis de licenciatura en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Actualmente realiza la maestría en Biología Experimental en el mismo Instituto.

Bibliografía

- Elstner, E. F., "Metabolism of activated oxygen species", In The Biochemistry of Plants, Vol. II. Academic Press. 1987. 253-315 pp.
- Arreola Cortés, A., *Estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y capsidiol en chile* (*Capsicum annum* L.) tratado con ácido araquidónico. Tesis de licenciatura, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2002. 56 p.
- Neil, S., Desikan, R., Hancock, "J. Hydrogen peroxide signalling", *Current Opinion in Plant Biology*. 2002. 5:388-395.