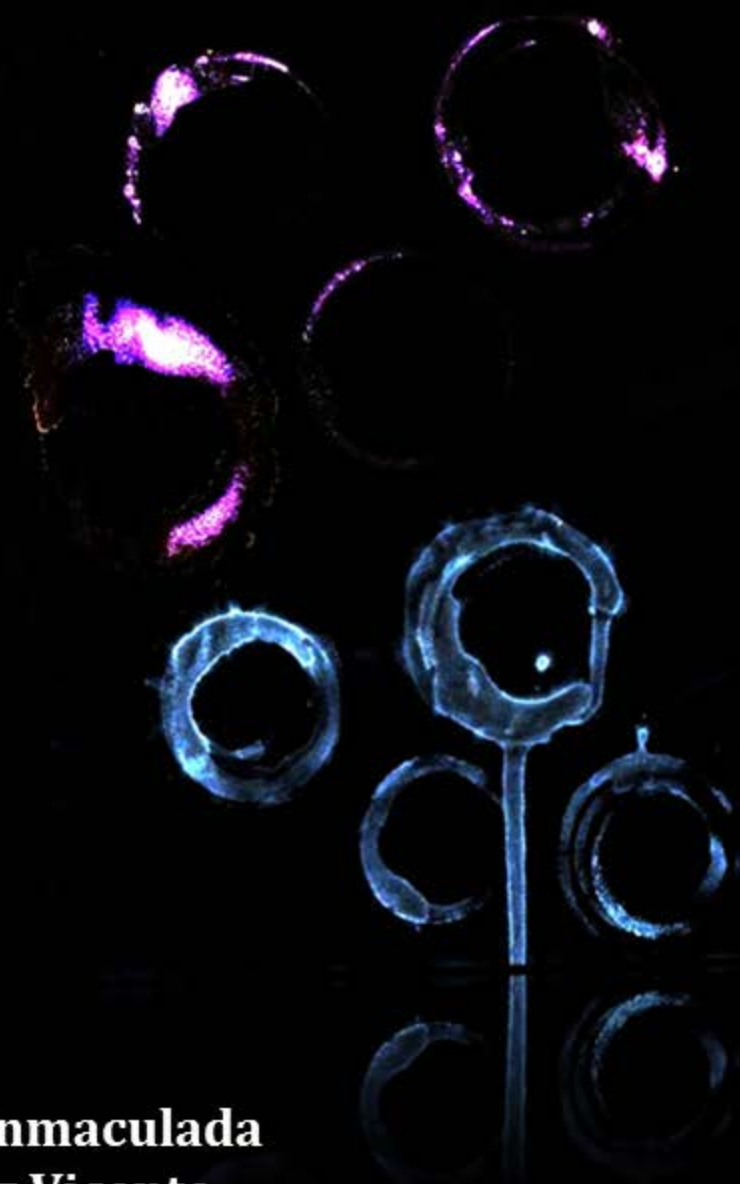


**NUEVAS FUNCIONES DEL ÓXIDO  
NÍTRICO (NO) EN LA SEMILLA Y EL  
DESARROLLO TEMPRANO DE  
*Arabidopsis thaliana***



UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

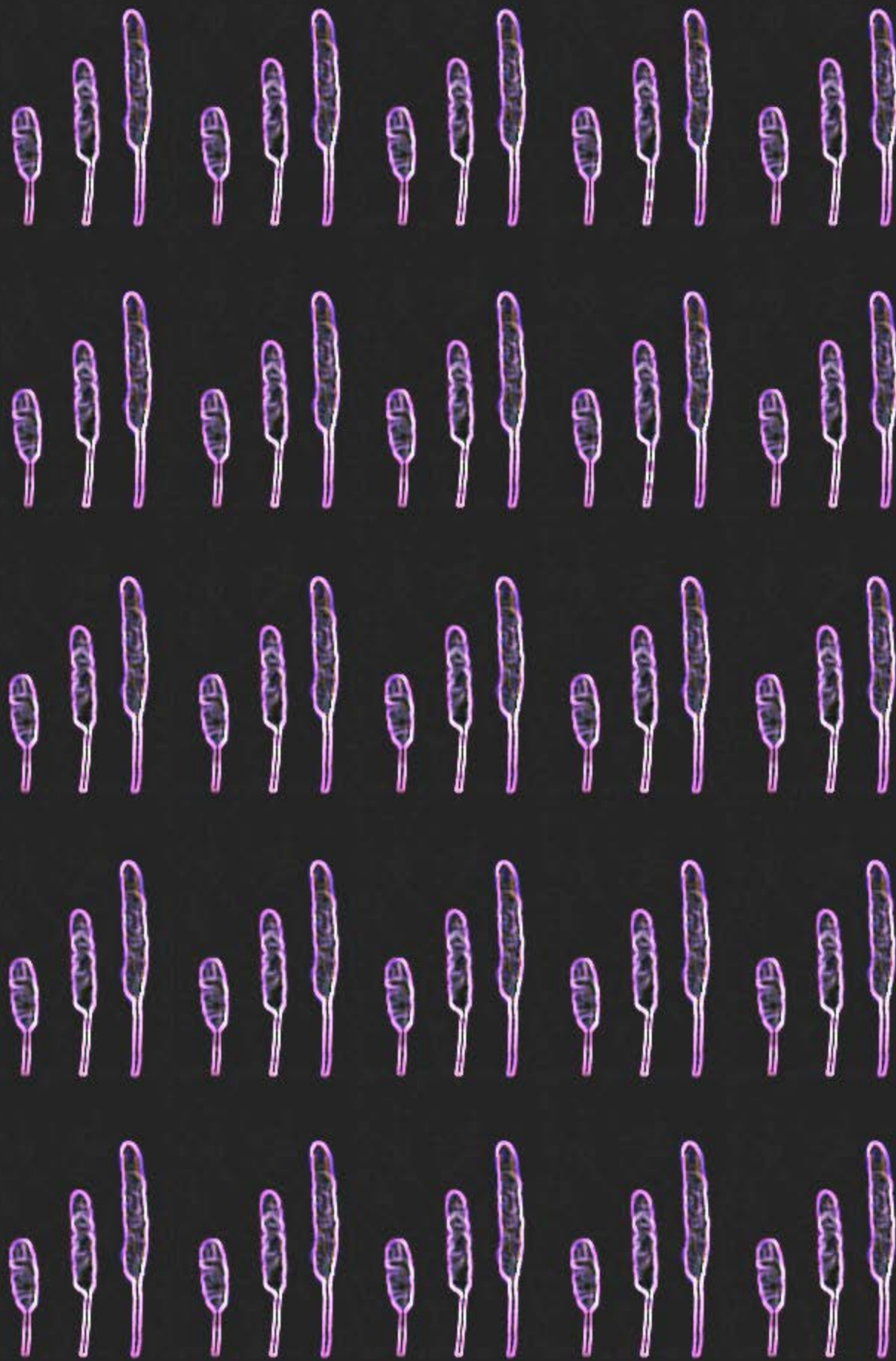


800 AÑOS  
1218 - 2018



**María Inmaculada  
Sánchez Vicente**

**TESIS DOCTORAL-SALAMANCA 2017**



# RESUMEN



# 1. Introducción general: El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) forma parte del grupo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), cuyo efecto nocivo o regulador viene dado por las concentraciones del compuesto. Dichas especies altamente inestables y reactivas han estado siempre estrechamente relacionadas con el ambiente celular, dando forma paulatinamente a una regulación implicada en el equilibrio redox. Podemos decir, por tanto, que estos compuestos forman una parte fundamental del propio desarrollo y evolución de la vida.

Continuando con esta línea tan fina que separa el más absoluto requerimiento de dicha molécula en pequeñas dosis con respecto a la nocividad que presenta para los organismos en altas concentraciones, podemos añadir que la caracterización de este compuesto se relacionó con la formación del *smog* fotoquímico provocado por la combustión de los combustibles fósiles, lo que provoca la degradación del ozono una vez que este gas alcanza la estratosfera (Howard, 1980). Sin embargo, es en 1987 cuando sale a la luz la función fisiológica de este compuesto, su participación en la regulación de la relajación muscular y la tonicidad de los vasos, lo que le valió inicialmente la denominación *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) (Palmer et al., 1987).

Desde el descubrimiento inicial de la participación del NO en la regulación de procesos fisiológicos en animales, los estudios que han mostrado su implicación en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo en plantas no han parado de aumentar. El NO regula mecanismos fisiológicos en diferentes estadios de desarrollo de la planta, así como frente a diversos estreses bióticos y abióticos,

dentro de intrincadas redes de señalización en las que participan diferentes actores, tales como hormonas, factores de transcripción, mensajeros secundarios, y diversos compuestos cuya catalogación dentro de uno u otro rango resulta compleja.

La presente introducción se centra en la caracterización de la biología del NO durante los procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de la planta en los primeros estadios, semilla y establecimiento de plántula, focalizando en los mecanismos mediante los cuales dicha molécula es percibida e integrada en los circuitos fisiológicos de regulación.

## 2. Concepto químico y biológico del óxido nítrico

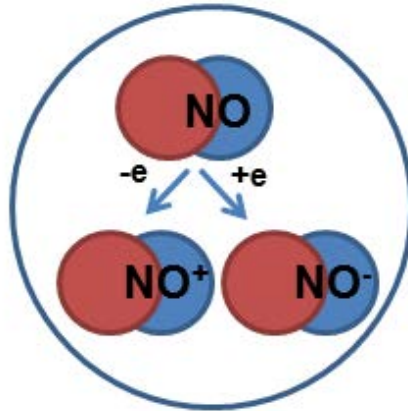
La definición del NO desde un punto de vista químico es simple. Se considera un radical libre compuesto por un átomo de oxígeno y otro de nitrógeno y que presenta un electrón desapareado, lo que le confiere paramagnetismo. Sin embargo, posee una serie de cualidades que le otorgan relevancia y complejidad en el entorno celular, como son su estado gaseoso, vida media corta y afinidad por ambientes lipofílicos.

Dentro de los tejidos, estas características hacen que el NO pueda difundir a través de las membranas celulares y que su acción sea altamente específica, dada la vida media tan escasa que posee en estado gaseoso (Simontacchi et al., 2013). Puede reaccionar con radicales libres, iones metálicos (p.e. metaloproteínas), intermediarios en la peroxidación lipídica y con grupos tiol presentes en las proteínas.

Posee dos formas redox (procedentes de la ganancia o la pérdida de un electrón), el anión nitrosilo ( $\text{NO}^-$ ) y el catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ), aparte del propio NO como tal que no posee carga, todas presentes en los organismos (Hughes, 1999) (Figura 1). Asimismo, es capaz de reaccionar con oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), originando dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), anhídrido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), y con el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dando lugar a peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ).

Desde un punto de vista fisiológico, el NO se engloba dentro del concepto de los gasotransmisores (Wang et al., 2002; Albertos et al., 2016). Sus características principales incluyen a pequeñas moléculas de naturaleza gaseosa, capaces de difundir en las membranas celulares (por lo que sus efectos no son desencadenados por receptores de membrana), son generados endógena- y enzimáticamente bajo una estricta regulación, poseen funciones muy específicas a concentraciones fisiológicamente relevantes dependiendo del contexto y por último, los procesos que regulan pueden o no estar mediados por mensajeros secundarios, pero se corresponden con dianas muy concretas.

Dentro del contexto celular, existe un estricto control espacio-temporal en la regulación de su ratio de formación, para el mantenimiento no sólo de la cantidad, sino del propio equilibrio entre las distintas especies nitrogenadas (Moreau et al., 2010; Baudouin 2011).



**Figura 1:** Balance químico entre las diferentes especies redox del NO.

### 3. Homeostasis del óxido nítrico

El NO constituye una molécula que ha estado presente en los organismos desde el inicio mismo de la vida (Durner et al., 1999; Olson et al., 2012). Aunque inicialmente fuese considerado como una molécula relacionada con el estrés oxidativo, actualmente apenas queda duda del papel dual que ejercen este tipo de moléculas, tóxicas a concentraciones elevadas pero con funciones esenciales y muy específicas a concentraciones bajas. Otro factor importante a tener en cuenta en relación con el NO es su producción a partir de uno de los componentes básicos de la ruta de asimilación del nitrógeno en plantas, el  $\text{NO}_2^-$ . De esta forma, el papel que el NO desempeña depende de la regulación de la concentración, así como del patrón espacio-temporal (Mur et al., 2013). Por ello, ha de existir una amplia batería de mecanismos con los que modular los niveles de NO dentro de los óptimos necesarios para el correcto desarrollo de los organismos, así como multitud de factores que influyen en la producción de

este gas, entre las que podemos citar la compartimentación celular, estado redox, balance NO/O<sub>2</sub>, pH, luz, etc, como describiremos a continuación de forma detallada.

### 3.1 Mecanismos de síntesis

En animales la síntesis de NO está ampliamente descrita, siendo uno de los mecanismos más importantes la oxidación de arginina por la NO sintasa (NOS), generando citrulina y NO. Existen dos subtipos, constitutivas e inducibles, y tres isoformas, neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) dentro de las constitutivas e inducible (iNOS) (Forstermann and Sessa 2012). Dentro del reino vegetal, se ha caracterizado una enzima NOS en el alga *Ostreococcus tauri* (Foresi et al., 2010), capaz de aumentar los niveles de NO en plantas transgénicas transformadas con el gen *OtNOS*, que codifica dicha enzima (Foresi et al., 2015). Sin embargo, en plantas superiores no se ha encontrado ninguna enzima que lo sintetice como tal, aunque se han descrito múltiples rutas que lo originan, que se pueden clasificar como reductoras enzimáticas y no enzimáticas y oxidativas (Gupta et al., 2011a) (Figura 2).



## SÍNTESIS DE NO EN PLANTAS

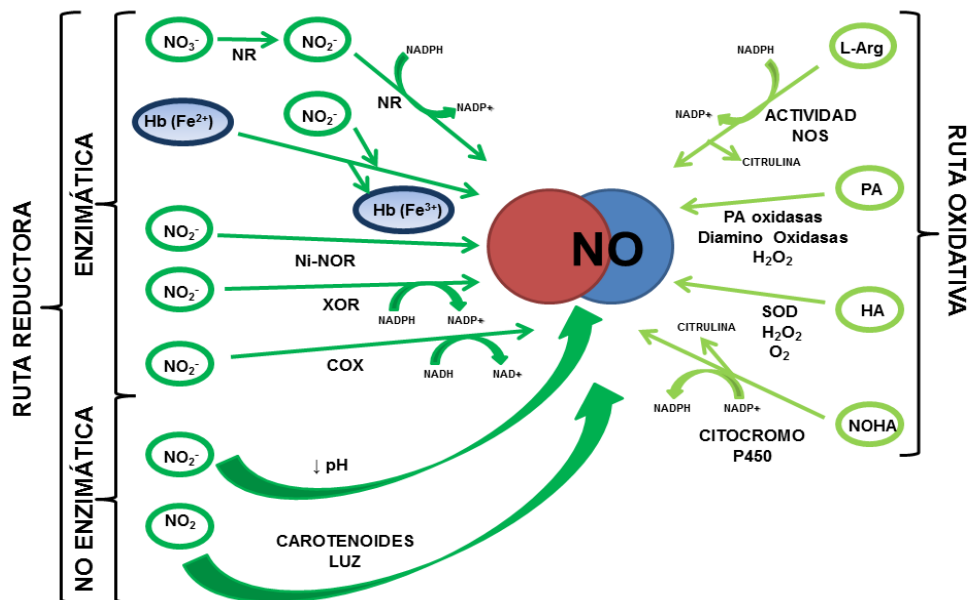


Figura 2: Resumen de las rutas de síntesis de NO descritas.

### 3.1.1 Ruta reductora enzimática

La vía reductora origina NO utilizando  $\text{NO}_2^-$  como sustrato. La principal fuente de producción de NO dentro de esta vía es la nitrato reductasa (NR). La NR es una enzima de localización citoplasmática clave para la asimilación de nitrógeno, catalizando la conversión de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  usando NADPH como donador de electrones (Wilkinson y Crawford, 1993; Yamasaki y Sikihama, 2000). Existen dos isoformas de la NR, codificadas por dos genes homólogos, *NIA1* y *NIA2* (Wilkinson y Crawford, 1993). La NR es capaz de catalizar la reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO cuando hay exceso del primero.

Otra de las fuentes de NO perteneciente a la vía reductora es la nitrito: óxido nítrico reductasa unida a la membrana plasmática (NiNOR), la cual libera NO al lado apoplástico de ésta. El  $\text{NO}_2^-$  producido por la NR unida a la membrana plasmática constituye el sustrato de la NiNOR, estando el NO producido por esta vía asociado, por tanto, al sistema global NR-NiNOR. Esta vía se ha caracterizado en raíces de tabaco (*Nicotiana tabacum*) pero no en hojas (Stöhr et al., 2001).

La xantina óxido reductasa (XOR) peroxisomal también cataliza la conversión de  $\text{NO}_2^-$  a NO en condiciones anaeróbicas, en presencia de NADH o xantina (Godber et al., 2000).

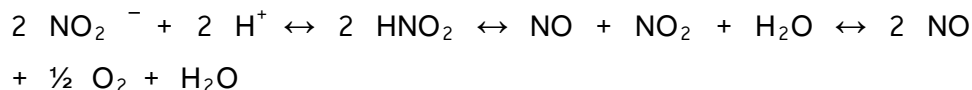
También en ausencia de  $\text{O}_2$ , las mitocondrias son capaces de originar NO a partir de  $\text{NO}_2^-$  en presencia de NADH (Stoimenova et al., 2007). Se ha postulado la citocromo *c* oxidasa (COX) terminal como componente principal implicado en este proceso, formando parte de un mecanismo de producción de ATP bajo condiciones de falta de  $\text{O}_2$ . Sin embargo, esta producción de NO sólo se ha detectado en raíces, por lo que aún no se conoce exactamente la magnitud ni las implicaciones fisiológicas de esta vía (Gupta et al., 2010). El control de la producción de NO vía COX es altamente dependiente de la condiciones redox, ya que el NO a su vez también es capaz de inhibir a la COX (Yamasaki et al., 2001; Zottini et al., 2002) siendo ésta capaz de catalizar la conversión de NO a  $\text{NO}_2^-$  (Torres et al., 2000; Brunori et al., 2004). Adicionalmente, está descrito en animales cómo el NO origina  $\text{NO}^-$  al interaccionar con la COX (a través del grupo hemo) y éste a su vez reaccionaría con  $\text{O}_2$  para dar lugar a  $\text{ONOO}^-$  (Sharpe y Cooper, 1998), otra de las moléculas básicas dentro de la señalización del NO y las RNS, que será descrita más adelante.

Bajo condiciones de hipoxia (p.e. periodos de inundación) que en plantas dan lugar a una sobreacumulación de  $\text{NO}_2^-$ , las hemoglobinas no simbióticas de tipo 1 (nsHb1) y tipo 2 (nsHb2) en su forma desoxigenada son capaces de reducir  $\text{NO}_2^-$  a NO (Sturms et al., 2011; Tiso et al., 2012), actuando a modo de nitrito reductasas anaeróbicas como adaptación de las concentraciones de  $\text{NO}_2^-$  y NO a las condiciones de bajo  $\text{O}_2$  en el medio exterior.

Podemos concluir que la regulación de la formación de NO a través de la vía reductora reviste gran complejidad, ya no sólo por las diferentes rutas enzimáticas, sino por la influencia de los factores ambientales y la localización subcelular de las enzimas implicadas (Rockel et al., 2002; Gupta et al., 2005; Planchet et al., 2005).

### 3.1.2 Ruta reductora no enzimática

La reducción de  $\text{NO}_2^-$  a NO requiere un pH bajo para que la reacción tenga lugar:



Este mecanismo se ha descrito en el apoplasto de las células de la capa de aleurona en cebada (*Hordeum vulgare*) (Bethke et al., 2004a).

El dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) también puede generar NO cuando está en presencia de carotenoides y luz, al mismo tiempo que la producción de agentes nitrosativos se reduce (Cooney et al., 1994).

### 3.1.3 Ruta oxidativa enzimática

La vía que origina NO a partir de reacciones de oxidación utiliza diferentes sustratos entre los que destaca la arginina, y como su propio nombre indica y a diferencia de la reductora, requiere O<sub>2</sub> para tener lugar. Las NOS de animales, como se menciona al inicio del apartado de la síntesis (apartado 3.1), catalizan la oxidación de arginina para originar citrulina y NO. En plantas superiores no se ha descrito nada determinante en cuanto a la presencia de una NOS tal y como existe en animales, estableciéndose hipótesis alternativas como puede ser la aglutinación de macrocomplejos enzimáticos multifuncionales, que en función de las condiciones de la planta pudieran unirse para catalizar la formación de NO (Del Rio et al., 2004).

A pesar de haber utilizado diferentes aproximaciones, como el uso de anticuerpos frente a NOS animales (Butt et al., 2003) o el análisis de secuencias génicas tras la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* en el año 2000, hasta el momento no se ha logrado caracterizar ninguna NOS clásica. En 2003 fue identificada una posible NO sintasa (NOS1) en base a su homología con una NOS del caracol *Helix Pomatia* (Guo et al., 2003). Sin embargo, ésta fue renombrada posteriormente como NOA1 (NO-ASSOCIATED 1) (Crawford et al., 2006) al observar que se correspondía con una GTPasa con funciones relacionadas con el ensamblaje de ribosomas en el cloroplasto (Flores-Pérez et al., 2008) y en la mitocondria (Moreau et al., 2008). Asimismo, los defectos en el crecimiento y desarrollo presentes en el mutante *atnoa1* son complementados con el ortólogo YqeH de *Geobacillus* al que se fusiona un péptido dirigido a cloroplastos (Sudhamsu et al., 2008). YqeH posee la capacidad de hidrolizar GTP, vinculada a la función como

adaptador entre proteínas y ácidos nucleicos, pero no es capaz de sintetizar NO a partir de L-arginina (Sudhamsu et al., 2008).

Aunque NOA1 no se corresponda con una NOS clásica, el mutante *atnoa1* presenta respuestas que estarían relacionadas con una deficiencia en NO (Guo et al., 2003; Zeidler et al., 2004). Van Ree y colaboradores (2011) describen que la cantidad de NO detectada en el mutante *atnoa1* se correlaciona con la cantidad de sacarosa del medio de crecimiento de las plantas, de modo que la controversia y la complejidad al respecto de esta proteína aún permanece inmanente a futuros estudios al respecto.

Posteriormente, se postuló la existencia de una NOS inducible, una variante de la proteína P de la glicina descarboxilasa (GDC), en respuesta frente a patógenos en tabaco (Chandoc et al., 2003), pero en 2004 se retractó por falta de reproducibilidad.

Hasta el momento no se ha caracterizado la existencia como tal de una NOS en plantas superiores, sin embargo sí se ha catalogado actividad de este tipo, principalmente en base a una disminución de NO provocado por la acción de inhibidores de NOS y por el efecto de la presencia/ausencia de cofactores (Delledonne et al., 1998; Del Río et al., 2004; Zeidler et al., 2004; Corpas et al., 2006; Zhao et al., 2007; Hao et al., 2008). Valderrama y colaboradores (2007) describen cómo el estrés nitrosativo provocado por alta salinidad promueve un aumento de NO dependiente de NADPH y calcio a través de una vía relacionada con la L-arginina.

Como ya mencionamos, el efecto del NO se debe en gran parte a la regulación de los patrones espacio-temporales, de ahí

que uno de los puntos clave sea el estudio de la producción del gas a nivel subcelular. La actividad NOS ha sido caracterizada en peroxisomas (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2004), donde estaría ligada a una posible proteína de tipo NOS que sería reconocida en el citosol e incorporada al interior del peroxisoma mediante el sistema PTS2-PEX7-PEX5 (relacionado con el transporte de proteínas al interior de dicho orgánulo) dependiente de calcio-calmodulina (Corpas y Barroso, 2014). Dentro de la caracterización subcelular, también se ha descrito la producción de NO a partir de L-arginina en cloroplastos (Jasid et al., 2006).

La citocromo P450 también puede generar NO y citrulina a partir de N-hidroxi-L-arginina (NOHA) y en presencia de NADPH y O<sub>2</sub> (Boucher et al., 1992). Este sistema está descrito en animales aunque podría actuar en plantas por poseer componentes similares.

Una prueba adicional de la formación de NO a partir de L-arginina se puede observar en la detección de una mayor acumulación de NO en raíz en los mutantes de las arginasas (Flores et al., 2008). Estas enzimas, codificadas por los genes *ARGAH1* y *ARGAH2*, catalizan la producción de L-ornitina y urea a partir de L-arginina. Sin embargo, Flores y colaboradores (2008) hacen referencia al contexto mitocondrial a la hora de tener en cuenta este efecto, en el cual las auxinas podrían estar promoviendo el incremento en NO dependiente de arginina a través de alguna proteína tipo NOS, de la síntesis de poliaminas o bien mediante la inhibición de las arginasas.

Otro factor a tener en cuenta es la interdependencia entre el NO, el calcio y la calmodulina, entre los que se establece una relación directa descrita en procesos patogénicos (Sang et al., 2008; Choi et al., 2009).

Otra ruta de producción de NO tiene lugar a partir de hidroxilaminas (HA), viéndose incrementada en presencia de  $H_2O_2$ ,  $O_2$  y superóxido dismutasa (SOD). No se conoce la relevancia fisiológica real de esta reacción debido a la controversia acerca de la existencia de concentraciones suficientes de HA en plantas (Rümer et al., 2009).

Las poliaminas (PAs) son aminos alifáticas presentes en todos los tejidos de plantas. Entre ellas, espermina y espermidina, originadas a partir de arginina y ornitina, generan NO en tejidos concretos de plántulas (Tun et al., 2006). Considerando que NO y PAs poseen funciones comunes en relación al desarrollo y a la respuesta frente a estreses bióticos y abióticos, este mecanismo de inducción de NO por PAs puede ser un punto importante dentro de la señalización de este tipo de procesos. En este sentido, parece que la cobre amino-oxidasa CuAO1 de arabidopsis está implicada en el aumento de NO en respuesta a ABA (Wimalasekera et al., 2011a). Las poliamino oxidasas (PAO) y diamino oxidasas (DAO) implicadas en la oxidación de las PAs parece que también tienen un papel en la regulación de la producción de NO a través de un mecanismo que podría estar mediado por  $H_2O_2$  (Wimalasekera et al., 2011b).

Para aumentar la complejidad y la estrecha comunicación entre los diferentes mecanismos de producción de NO, cabe citar la regulación interconectada que Modolo y colaboradores describen en 2006, al observar una disminución en los niveles de arginina en el doble mutante de las nitrato reductasas *nia1nia2* de arabidopsis, estableciendo así un posible punto de conexión entre ambas vías.

## 3.2 Mecanismos de secuestro, transporte o detoxificación

La modulación de los niveles de NO a nivel espacial y temporal se ejerce mediante el control de la síntesis, mencionada anteriormente, y el secuestro o transporte, de tipo no enzimático, entre los que destaca la reacción con radicales libres; y enzimático, con el ciclo de las hemoglobinas y el sistema de la S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR).

### 3.2.1 Reacciones no enzimáticas

El NO puede reaccionar con el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) dando lugar a  $ONOO^-$ , un fuerte agente oxidante de vida media corta relacionado con situaciones de estrés oxidativo, en las que se engloban daños en ácidos nucleicos y peroxidación lipídica. Sin embargo, cada vez más trabajos asocian esta molécula con mecanismos de regulación a través de la modificación de residuos de tirosina de proteínas, lo que se conoce como nitración (Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek, 2011; Vandelle y Delledonne, 2011).

En ambientes acuosos el NO es capaz de reaccionar con  $O_2$ , originando dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), que posteriormente se degrada para dar lugar a  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$  (Neill et al., 2003). Esta reacción reviste importancia debido a que estos dos compuestos finales son por una parte, importantes moléculas dentro de la vía de señalización del nitrógeno (Wang et al., 2000; Wang et al., 2007), mientras que por la otra forman



parte de los sustratos de la NR, que a su vez origina NO por la vía reductora.

### 3.2.2 Ciclo de las hemoglobinas

Las hemoglobinas constituyen una familia proteica presente en todos los organismos, capaces de unir gases diatómicos como son el NO y el O<sub>2</sub> gracias a la presencia del ion hierro del grupo hemo (Hoy y Hargrove, 2008; Gupta et al., 2011b). Están asociadas con transporte, secuestro y detoxificación de los ligandos que unen, con funciones relacionadas con la percepción y la regulación de éstos (Arredondo-Peter et al., 1998). Aunque el papel principal se asocia con el transporte, es necesario tener en cuenta las implicaciones del control del balance de especies reactivas que llevan a cabo al eliminar estos compuestos del medio celular (Igamberdiev et al., 2006).

En plantas podemos encontrar tres grupos, hemoglobinas simbióticas (sHb), no simbióticas (nsHb) y truncadas (trHb). Las primeras están relacionadas con la fijación de nitrógeno en los nódulos, facilitando el transporte de O<sub>2</sub> en éstos para la regulación de la simbiosis (Ott et al., 2005). Las nsHbs y las trHbs poseen funciones relacionadas con el transporte y regulación de NO y O<sub>2</sub> durante otros procesos relacionados con el metabolismo y las situaciones de estrés. Hasta el momento no se conoce mucho acerca de las trHbs respecto de los procesos fisiológicos en plantas, existiendo en la bibliografía estudios que hacen referencia principalmente a las características bioquímicas y estructurales (Wittenberg et al., 2002; Bustamante et al., 2016). La trHb descrita en arábidopsis (*GLB3*) se expresa en tallo y raíz principalmente, sugiriendo especificidad en cuanto a los

tejidos, y se inhibe en condiciones de hipoxia (Watts et al., 2001). En la leguminosa *Medicago truncatula*, dos trHbs (*MtTrHb1* y *MtTrHb2*) son inducidas en respuesta a simbiosis, donde hipotéticamente tendrían una función moduladora de NO en la supresión de mecanismos de defensa contra los hongos micorrícicos (Vieweg et al., 2005).

Dentro de las nsHbs se han identificado dos tipos, las nsHb1 y las nsHb2, de las cuales existe una amplia bibliografía que hace referencia principalmente a la función de secuestro y transporte de los gases mencionados. Las diferencias principales entre ambas se basan en su patrón de expresión y la afinidad que presentan por el O<sub>2</sub>. La nsHb1 posee una alta afinidad por el O<sub>2</sub> así como una baja constante de disociación, mientras que la nsHb2 presenta baja afinidad por O<sub>2</sub> y una constante elevada de disociación (Arredondo-Peter et al., 1998; Hoy y Hargrove, 2008).

Las Hbs cumplen un papel vital en la regulación de la detoxificación/transporte de O<sub>2</sub> y NO, así como del mantenimiento de unas condiciones óptimas de los niveles de energía (ATP) (Dordas et al., 2003; 2004). Así lo demuestran diferentes grupos, generando plantas transgénicas sobreexpresoras de *nsHb1* (Hunt et al., 2002; Perazzolli et al., 2004), las cuales son capaces de crecer mejor en condiciones de hipoxia. Cabe remarcar que las condiciones de hipoxia en hoja promueven la emisión de NO a través de la activación de la NR (Rockel et al., 2002), estando este incremento suprimido en las líneas sobreexpresoras (Perazzolli et al., 2004). En cebada, sin embargo, dicha sobreexpresión disminuye el crecimiento y el vigor de la semilla, a pesar de que secuestra NO durante las condiciones hipóxicas ya mencionadas (Hebelstrup et al., 2014).

También está caracterizada la supresión de la producción de NO catalizada por la NR en respuesta a frío sobreexpresando la *nsHb1* en arábidopsis (Cantrel et al., 2011).

La nsHb1 posee función detoxificadora de NO, catalizando la formación de  $\text{NO}_3^-$  a partir de NO, a expensas de NADPH. Asimismo está descrita la transnitrosilación de esta proteína mediante la transferencia de NO desde el GSNO a un residuo de cisteína, actuando también de esta forma como vehículo de transporte/secuestro en forma de S-nitrosohemoglobina (Perazzolli et al., 2004).

En arroz está descrito que los genes *GLB1a* y *GLB1b*, que codifican dos *nsHbs* de tipo 1, se inducen en respuesta a  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y NO, mientras que en los mutantes de la NR no se observa dicha respuesta, estableciéndose una relación entre la nsHb1 y la NR (Ohwaki et al., 2005).

En arábidopsis, *GLB2* (clase II) se expresa en raíces, hojas e inflorescencias y se induce bajo condiciones de frío y en tratamientos con citoquininas (CKs) en plántulas, mientras que *GLB1* (clase I) es activa durante la germinación y en raíces de plantas adultas y se induce en hipoxia y en medios suplementados con sacarosa (Hunt et al., 2001).

Una óptima regulación de los niveles de NO requiere de ambas nsHbs (Hebelstrup et al., 2006; Hebelstrup y Jensen, 2008), siendo estrictamente necesario el funcionamiento de al menos una de ellas para la viabilidad de la plántula, aún en ausencia de condiciones de estrés por hipoxia. La sobreexpresión de *nsHb1* y de *nsHb2* reduce los niveles de NO en planta y mejoran su supervivencia bajo condiciones de hipoxia. De la misma forma, la sobreexpresión de las *nsHbs* disminuye la emisión del gas,

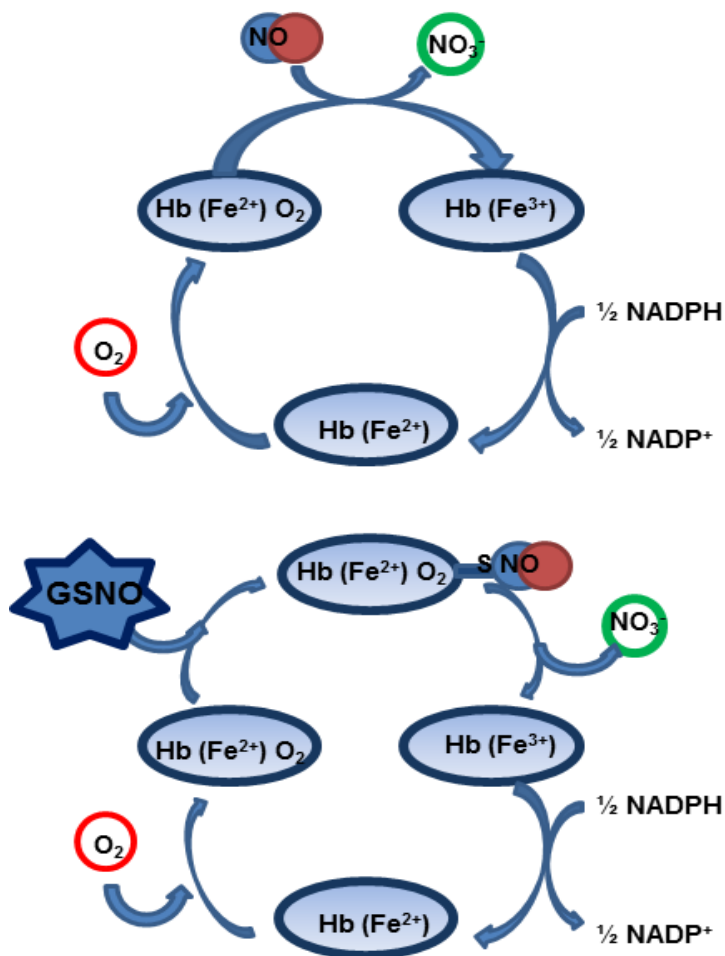
evitando la pérdida de nitrógeno por esta vía (Hebelstrup et al., 2012).

Las nsHbs también juegan un papel importante en el desarrollo de la planta, estando relacionadas con la emergencia del tallo floral en *arabidopsis* (Hebelstrup y Jensen, 2008).

En semillas son particularmente relevantes las condiciones de hipoxia ya que es necesario un balance equilibrado entre la concentración de  $O_2$  y su consumo, siendo requerido para la actividad metabólica y el estado energético (Borisjuk et al., 2007). La sobreexpresión de *nsHb2* en semillas de *arabidopsis* promueve un incremento del estado energético en forma de ATP y un cambio en el acúmulo de ácidos grasos insaturados (Vigeolas et al., 2011). En la misma dirección, la sobreexpresión de *nsHb1* bajo un promotor específico de semilla promueve la disminución en el contenido de NO en condiciones de hipoxia, así como una reprogramación en el metabolismo, mejorando la tolerancia frente a condiciones de estrés oxidativo y aumentando el peso de la semilla (Thiel et al., 2011). Dicha sobreexpresión también da lugar a una inhibición de la transcripción del gen *NIA2*, contribuyendo a la regulación de los niveles de NO.

Es importante hacer referencia al denominado ciclo Hb-NO (Figura 3) (Dordas et al., 2004; Igamderdiev y Hill, 2009). En condiciones de hipoxia/anoxia, la oxidación de NO por las Hbs va acoplada a la reducción de  $NO_3^-$ , sustrato cuya conversión en  $NO_2^-$  será catalizada por la NR. El NADPH es oxidado con el fin de mantener el flujo de electrones y la producción de ATP. Posteriormente, el  $NO_2^-$  puede dar lugar de nuevo a NO a través de la NiNOR de la membrana plasmática. Asimismo, en la misma línea de preservación del nivel energético, el  $NO_2^-$  también puede actuar como aceptor de electrones en la

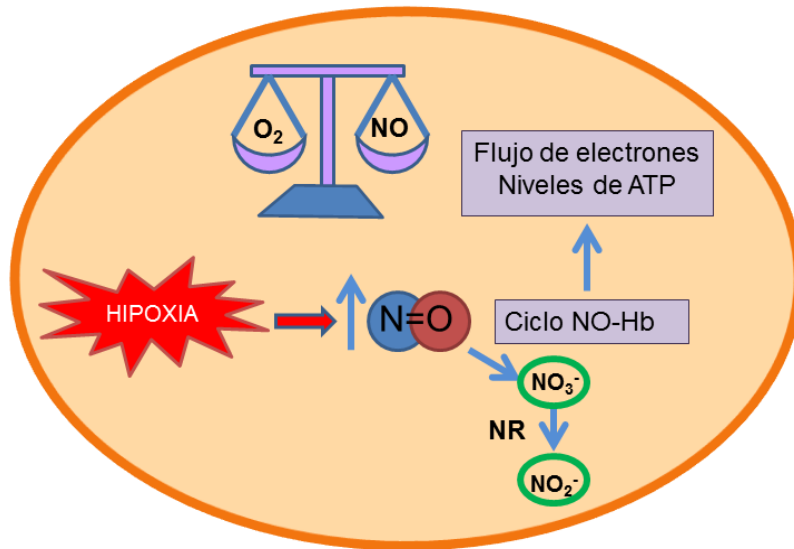
cadena de transporte mitocondrial, facilitando la formación de ATP a expensas del poder oxidativo del NAD(P)H (Stoimenova et al., 2007).



**Figura 3:** Ciclo Hb/NO. Mecanismos por los cuales la nsHb1 detoxifica/secuestra el NO. La reducción de las hemoglobinas está ligada a la presencia de agentes reductores y/o enzimas reductasas. Adaptado de Perazzolli et al., 2005.

Este ciclo adquiere gran importancia en la modulación del estado redox y el mantenimiento del metabolismo durante la

deseccación y la imbibición de las semillas, donde la difusión de  $O_2$  entre tejidos se ve afectada en gran medida (Figura 4) (Matilla y Rodríguez-Gacio, 2013).



**Figura 4:** El mantenimiento del nivel energético en la semilla es fundamental bajo condiciones de hipoxia y baja difusión de  $O_2$ . El NO, a través del ciclo de NO-Hb es capaz de generar  $NO_3^-$ , cuya conversión a  $NO_2^-$  es catalizada por la NR, actuando como aceptor de electrones. De esta forma, la mitocondria mantiene la capacidad de generar ATP.

La complejidad del sistema conformado por las hemoglobinas dentro de la regulación de los niveles de NO es muy elevada, ya que no sólo podemos hacer referencia al secuestro, sino como recientemente se ha demostrado, a la liberación (Tiso et al., 2012). Las formas desoxigenadas de AtHb1 y AtHb2 poseen actividad NR *in vitro* bajo condiciones de anoxia e hipoxia, promoviendo la producción de NO a partir de  $NO_2^-$ , modulando

de esta forma unos niveles de NO que den lugar a condiciones óptimas de funcionamiento.

### 3.2.3 Sistema de la S-nitrosoglutación reductasa

Una de las principales formas de transporte/secuestro de NO en la planta se da mediante la formación de enlaces que dicha molécula establece con los grupos azufre presentes en residuos de cisteína, dando lugar a lo que se conoce como S-nitrosotioles (SNO).

Los S-nitrosotioles se pueden clasificar en base a su peso molecular en bajo, *low molecular mass* (LMM) o alto, *high molecular mass* (HMM), siendo el S-nitrosoglutación (GSNO) el nitrosotiol de bajo peso molecular más abundante en la planta.

El GSNO constituye la principal forma de reserva y transporte de NO a largas distancias debido a que presenta una mayor estabilidad química (Malik et al., 2011). Se origina mediante la incorporación de una molécula de NO a un azufre del grupo tiol de los residuos de cisteína, lo que se conoce como S-nitrosilación, presente en las moléculas de glutatión reducido (GSH).

La enzima GSNO reductasa (GSNOR) cataliza la oxidación de GSNO a GSSG, que constituye el sustrato de la glutatión reductasa (GR), originando de nuevo GSH, uno de los principales antioxidantes solubles de bajo peso molecular presente en las plantas (Corpas et al., 2013a). A parte de la regulación enzimática llevada a cabo por la GSNOR y la GR, la estabilidad

del GSNO también se ve influenciada por la presencia de ascorbato, dependiente del pH, y de metales de transición, en especial cobre (Gorren et al., 1996; Smith y Dasgupta, 2000). Este sistema juega un papel fundamental dentro del control de los niveles de GSNO y NO en la planta (Malik et al., 2011). Otro punto adicional de control viene dado por la propia *S*-nitrosilación de la GSNOR, cuya actividad es suprimida a través del NO generado por la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Fruingillo et al., 2014). Bajo condiciones de estrés salino, la unión de calmodulina, concretamente CaM4, a la GSNOR también reduce su actividad, promoviendo la acumulación de NO (Zhou et al., 2016).

La concentración de este compuesto es mayor en raíces, seguida de hojas y tallos, correlacionándose de forma directa con el contenido detectable de NO en cada órgano así como de forma indirecta con la actividad de la enzima GSNOR (Airaki et al., 2011). A nivel subcelular, se ha visto que en hojas de guisante tanto GSNO como GSNOR se localizan en citosol, cloroplastos, mitocondria y peroxisomas, pudiendo estar relacionado con la comunicación intercelular entre diferentes orgánulos (Barroso et al., 2013).

El GSNO es capaz de mediar respuestas de señalización relacionadas con el NO a través de la modificación postraducciona de residuos de cisteína de proteínas mediante una reacción de transnitrosilación en la cual el NO es transferido a un residuo de cisteína (Cys-NO), dando lugar a cambios en actividad/estabilidad de proteínas. Estos cambios también afectan diferencialmente a los programas de expresión en función de tejidos y condiciones concretas (Begara-Morales et al., 2014a).

El mantenimiento de los niveles de GSNO por la GSNOR constituye un punto de vital importancia para el control del



correcto funcionamiento de la planta. En *arabidopsis* la pérdida de función del gen *GSNOR1/HOT5/PAR2*, que codifica la GSNOR, da lugar a un aumento en la cantidad de GSNO y de proteínas S-nitrosiladas, así como a una desregulación de multitud de procesos relacionados tanto con crecimiento y desarrollo, como con situaciones de estrés (Feechan et al., 2005; Lee et al., 2008; Chen et al., 2009; Kwon et al., 2012; Leterrier et al., 2012; Frungillo et al., 2013).

## 4. El óxido nítrico como molécula señalizadora

### 4.1 Importancia del balance redox

Como ya se mencionó al comienzo de la introducción, la vida misma se desarrolló y se desarrolla en un balance entre la oxidación y la reducción, sin exclusión posible de uno u otro, siendo clave la regulación capaz de mantener en equilibrio las condiciones necesarias para el desarrollo y el crecimiento óptimo de cualquier organismo.

Las reacciones que tienen lugar dentro de las células requieren de la existencia de flujos de electrones que a su vez necesitan de compuestos oxidados y reducidos que permitan su movimiento. La eficiencia de estos procesos ha de estar acoplada con el mantenimiento de un equilibrio entre ambos estados, reducido y oxidado, que permita un correcto funcionamiento de los procesos biológicos (Foyer 2005; Halliwell 2006).

La existencia de condiciones adversas, como los estreses bióticos y abióticos, modifican el balance óptimo del estado redox, originando compuestos cuya acumulación resulta nociva para el organismo. Estas situaciones dan lugar a las ROS y RNS, que provocan daños oxidativos en las proteínas y los ácidos nucleicos.

La acumulación de moléculas que promueven el estrés oxidativo es minimizada en plantas gracias a diferentes sistemas antioxidantes formados por compuestos, destacando el papel del ascorbato y el glutatión, y enzimas, como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX), las peroxiredoxinas (Prx) y la catalasa (CAT) (Mittler et al., 2004).

Las ROS son derivados originados de la reducción del  $O_2$  entre las que se engloban los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $\cdot OH$ ), peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y alcoxi ( $RO\cdot$ ), y los no radicales, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ozono ( $O_3$ ) y ácido hipocloroso ( $HOCl^-$ ) (Halliwell 2006). Las RNS proceden de la reacción del NO con las ROS, dando lugar a radicales, como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y no radicales, entre los que se encuentran los óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ ), tetróxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ), y el ácido nitroso ( $HNO_2$ ) (Bellin et al., 2013). ROS y RNS están a su vez interconectadas tanto en su producción, como en sus efectos, dando lugar a un complejo mapa de señalización (Romero-Puertas y Sandalio, 2016).

Aunque inicialmente se relacionó a las ROS/RNS exclusivamente con el daño celular, al igual que en el caso del NO, conforme la investigación al respecto ha ido evolucionando, se ha comprobado cómo también juegan un papel clave dentro de la señalización molecular, actuando como mensajeros dentro de los

sistemas biológicos principalmente a través de modificaciones postraduccionales (del Río 2015).

Cabe destacar en este punto la importancia de los residuos de cisteína dentro de la estructura de las proteínas, por su papel de sensores del redox intracelular mediante la modificación postraduccionales citada (Mittler et al., 2011; Couturier et al., 2013; Spoel y Van Ooijen, 2014; Del Río, 2015). Estos residuos poseen diferente estado de oxidación/reducción en función del microambiente celular y de los compuestos adyacentes (Spadaro et al., 2010; Figura 5), en base a los cuales, la estructura proteica varía, dando lugar a cambios en la estabilidad, actividad, formación de macrocomplejos o unión a DNA (Hicks et al., 2007; Skryhan et al., 2015; Tabla 1).



**Figura 5:** Diferentes estados redox que pueden presentar los residuos de cisteína. Empezando por los más reducidos: tiol, S-nitrosotiol, ácido sulfénico, puente disulfuro, compuesto S-glutatión, ácido sulfinico, ácido sulfónico.

El citoplasma de las células vegetales constituye un ambiente reductor, promoviendo por tanto la existencia de grupos -SH. Sin embargo, ante la llegada de un estímulo de carácter oxidativo,

este estado es modificado, produciendo cambios en las proteínas, con el fin de transmitir dicha información en forma de cascadas de señalización, cuyo resultado final sea una reprogramación global de la célula. Dentro del espectro de estados redox que puede presentar un residuo de cisteína, los ácidos sulfínico (SO<sub>2</sub>H) y sulfónico (SO<sub>3</sub>H) son de carácter irreversible (excepto el ácido sulfínico en el ciclo catalítico de las peroxiredoxinas) (Couturier et al., 2013). En este aspecto, el NO podría actuar como protector frente a las mencionadas oxidaciones irreversibles. El resto de las modificaciones postraduccionales a las que aquí se hace referencia son reversibles mediante la acción enzimática de tioredoxinas (Trx), glutaredoxinas (Grx), sulfiredoxinas (Srx) y peroxiredoxinas (Prx), las cuales están emergiendo como enzimas clave a la hora de regular dichas modificaciones, y por consiguiente, el estado y la conformación de numerosas proteínas implicadas en condiciones de estrés y en el mantenimiento de un correcto crecimiento y desarrollo de la planta (Meyer et al., 2007; 2012; Sevilla et al., 2015).

**Tabla 1:** Principales factores transcripcionales descritos regulados por redox.

PROTEÍNA	EFEECTO	REFERENCIA
II HD-Zip HAHR1; Hahb-10	En un estado oxidado se forman puentes disulfuro, mientras que la reducción promueve la unión al DNA	Tron et al., 2002
MYB domain protein (R2R3 MYB)	La formación de dímeros mediante puentes disulfuro, en condiciones oxidantes, impide la unión al DNA	Heine et al., 2004

<p><b>III HD-Zip Athb9/ PHAVOLUTA (PHV)</b></p>	<p>El estado reducido de las cisteínas es indispensable para la unión al DNA, mientras que la formación de puentes disulfuro en condiciones oxidantes inhibe la unión</p>	<p>Comelli et al., 2007</p>
<p><b>MYB domain protein (MYB2)</b></p>	<p>La S-nitrosilación de la cisteína 53 inhibe la unión al DNA</p>	<p>Serpa et al., 2007</p>
<p><b>ERF/AP2 transcription factor family (RAP2.4a)</b></p>	<p>En presencia de agentes oxidantes, se fomenta la presencia de oligómeros. En ambientes moderadamente reductores, se favorece la formación de dímeros (unión al DNA)</p>	<p>Shaikhali et al., 2008</p>
<p><b>TGACG sequence- specific binding protein 1 (TGA1)</b></p>	<p>TGA1 se nitrosila en las cisteínas 260 y 266, favoreciendo la unión al DNA en presencia de NPR1</p>	<p>Lindermayr et al., 2010</p>
<p><b>Stress-associated protein 12 (SAP12)</b></p>	<p>Cambios estructurales dependiente de las condiciones redox</p>	<p>Ströher et al., 2009</p>
<p><b>GRUPO G bZIPs: bZIP16, bZIP68 y GBF1</b></p>	<p>Las condiciones reductoras favorecen la unión al DNA, ya sea en forma de dímeros (reducción moderada) o monómeros</p>	<p>Shaikhali et al., 2012</p>
<p><b>TEOSINTE BRANCHED1/CYCL OIDEA/PCF15 (TCP15)</b></p>	<p>La formación de dímeros bajo condiciones oxidantes promueve la inactivación</p>	<p>Viola et al., 2013; 2016</p>

<b>MYB domain protein (MYB30)</b>	La <i>S</i> -nitrosilación inhibe unión al DNA	Tavares et al., 2014
<b>GBF1-Interacting protein 1 (GIP1)</b>	Bajo condiciones reductoras, forma complejos con los bZIPs 16, 68 y GBF1, favoreciendo su unión al DNA. En ambientes oxidantes, se favorece la oligomerización, actuando como chaperona	Shaikhali, 2015
<b>Heat shock transcription factor A8 (HSFA)</b>	El tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> promueve la translocación al núcleo	Giesguth et al., 2015
<b>PERIANTHIA (PAN)</b>	Bajo condiciones reductoras se favorece la unión al DNA	Gutsche y Zachgo, 2016

El modelo de equilibrio redox que se propone hace hincapié en la producción de ROS, como parte integrante de los productos del metabolismo y de las condiciones externas para dar lugar a la aclimatación y posterior adaptación de la planta a las condiciones existentes, o bien, en casos extremos, a la muerte celular (Foyer 2005; Mittler et al., 2011; 2012; Spoel y Van Ooijen, 2014). La facilidad a la hora de generar/secuestrar ROS/RNS hacen de estas moléculas mensajeros rápidos de gran utilidad a la hora de reprogramar molecularmente a la planta para hacer frente a diferentes situaciones, dada la condición sésil de estos organismos. Evolutivamente, se les otorga no sólo la capacidad de “sentir” las condiciones internas y externas referentes al propio organismo, sino de comunicación con otros organismos adyacentes (Mittler et al., 2011). Asimismo, mediante análisis genéticos en

organismos de diferente escala evolutiva (desde algas unicelulares a plantas superiores), se puede observar cómo las enzimas encargadas del secuestro están conservadas, mientras que las relacionadas con la producción aparecen más tarde, pudiendo ser consecuencia de la necesidad de presentar un mayor control sobre la distribución espacio-temporal (Mittler et al., 2011).

## 4.2 Mecanismos de señalización del óxido nítrico

El NO es una molécula simple con una regulación muy compleja, dada la gran cantidad de mecanismos de síntesis y secuestro que influyen en su homeostasis. La señalización ejercida por el NO abarca todo el ciclo de la planta, desde la regulación del crecimiento y desarrollo hasta las situaciones de estrés biótico y abiótico. El NO actúa como molécula señalizadora a través de la modificación de moléculas de importancia biológica, principalmente proteínas, aunque recientemente se ha observado también en ácidos grasos. Estos cambios tienen importantes efectos en la estructura proteica de factores de transcripción y en la regulación de la expresión génica.

En ambos casos, las modificaciones que el NO ejerce en los factores diana da lugar a cambios conformacionales cuyo resultado puede ser aumento o disminución de la estabilidad, activación o inhibición de la actividad, formación de complejos, translocación e influencia en la unión al DNA.

## 4.2.1 Regulación de la expresión génica

Mediante el empleo de técnicas de microarrays y de análisis bioinformático, se han identificado numerosos genes regulados por NO, entre los cuales las categorías más representadas se corresponden con transducción de señales, defensa, muerte celular, transporte, metabolismo básico y producción y degradación de ROS (Polverari et al., 2003). Analizando las zonas de los promotores, se han observado motivos que predominan en estos genes de respuesta a NO, entre los que destacan bZIPs (principalmente aquellos que presentan una caja G de unión a DNA en los primeros 250 pares de bases; OCSEs, *octopine synthase element-like sequence*, y OPAQs, *opaque-2-like transcriptional activators*), WRKY, cajas L1 (L1BX), cajas TATA (TBP), MYCL y MYB (Palmieri et al., 2008). Cabe resaltar la importancia de módulos compuestos por una combinación de varios (OPAQ, OCSE, GBOX y MYB) en los genes relacionados con la síntesis de ácido jasmónico, una de las rutas regulada estrechamente por el NO.

En respuesta a tratamientos con GSNO, se han descrito también dos motivos oligoméricos en el DNA de los promotores de los genes que se expresan diferencialmente, AATTAT y AAAACA, cuyos patrones de expresión están vinculados diferencialmente a tejidos y condiciones concretas (Begara-Morales et al., 2014a).

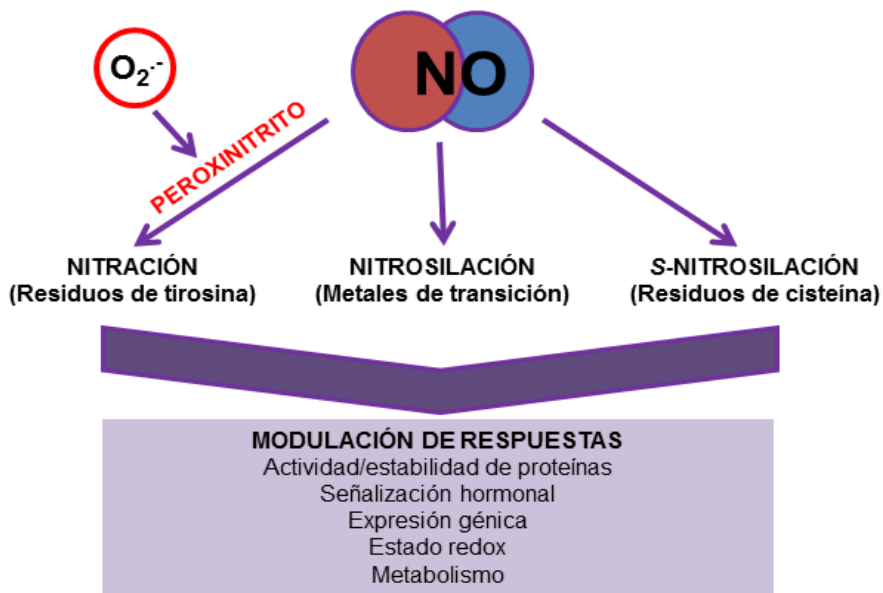
Este papel del NO en la regulación de la expresión génica se ejerce directamente sobre aquellos factores de transcripción que se unen al DNA, o bien sobre otros que afectarán a los primeros (Lindermayr et al., 2008).



Otro mecanismo de regulación mediante el cual el NO puede ejercer un efecto específico en la expresión génica podría estar relacionado con la S-nitrosilación de las enzimas HDAC (*HISTONE DEACETYLASES*) (Mengel et al., 2013), como ya ha sido descrito en humanos en el caso concreto de HDAC2 (Nott et al., 2008).

## 4.2.2 Modificaciones postraduccionales

Para ejercer su efecto en tan diverso abanico de procesos, el NO modifica postraduccionamente ciertas proteínas a través de dos mecanismos, la S-nitrosilación de residuos de cisteína y metales, y la nitración de residuos de tirosina (Figura 6).



**Figura 6:** Modulación de las respuestas ejercidas por el NO a través de las diferentes modificaciones postraduccionales de proteínas.

En primer lugar, la nitración de los residuos de tirosina es llevada a cabo principalmente por el  $\text{ONOO}^-$ , resultante de la reacción del NO con el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , que modifica la posición 3 del anillo fenólico, adicionándole un grupo nitro ( $-\text{NO}_2$ ), y por el radical dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ ), procedente de las reacciones entre el NO en presencia de oxidantes, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y metales de transición (Radi et al., 2004). No todas las tirosinas de una proteína son susceptibles de ser nitradas, sino que depende de la conformación que presente, que hará que unos residuos estén más expuestos que otros dependiendo del ambiente (Abello et al., 2009; Corpas et al., 2013b).

Como ocurre con la mayor parte de las RNS, el  $\text{ONOO}^-$  ha sido considerado como una de las moléculas más potentes a la hora de provocar daño oxidativo, dado que se produce de forma muy rápida y es capaz de causar daños en ácidos nucleicos y peroxidación lipídica. Sin embargo, con el avance de la investigación, se ha observado cómo esta molécula también posee una gran importancia señalizadora (Arasimowicz-Jelonek y Floryszak-Wieczorek, 2011; Vandelle y Delledonne, 2011).

Dentro de la regulación global de las proteínas, la nitración es un punto importante de interacción con otras señales, puesto que los residuos de tirosina también son susceptibles de fosforilación (Galetskiy et al., 2011).

Asimismo, el NO es capaz de regular la cantidad de  $\text{ONOO}^-$  a través de la inhibición por *S*-nitrosilación de la PrxIIIE, la cual detoxifica dicho compuesto, promoviendo su acumulación (Romero-Puertas et al., 2007).

Se han identificado a nivel general numerosas proteínas nitradas, el denominado nitroproteoma, tanto bajo condiciones

normales de crecimiento (Lozano-Juste et al., 2011a; Chaki et al., 2012 corrección de Chaki et al., 2009; Begara-Morales et al., 2013) como en situaciones de estrés (Cecconi et al., 2009; Begara-Morales et al., 2013). Algunos estudios han focalizado el análisis en el efecto del  $\text{ONOO}^-$  sobre proteínas concretas, observando que su acción es predominantemente inhibitoria (Tabla 2).

Aunque inicialmente la nitración se clasificó como modificación irreversible, se ha observado la existencia de enzimas con actividad denitrasa en animales (Irie et al., 2003; Smallwood et al., 2007; Deeb et al., 2013).

**Tabla 2:** Dianas y efectos de la nitración de proteínas descritos en plantas.

PROTEÍNA	PROCESO	REFERENCIA
<b>Catalasa</b>	Inhibición de la actividad frente a patógenos	Clark et al., 2000
<b>S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAHH)</b>	Inhibición de la actividad.	Chaki et al., 2009
<b>Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</b>	Inhibición de la actividad	Lozano-Juste et al., 2011a
<b>Metionina sintasa</b>	Inhibición de la actividad	Lozano-Juste et al., 2011a
<b>Complejos del PSI y PSII</b>	Inactivación y desensamblaje de los complejos dependiente de las condiciones de luz	Galetskiy et al., 2011

<b>Ferredoxin-NADP oxidoreductasa</b>	Inhibición de la actividad, provocando cambios en la actividad fotosintética	Chaki et al., 2011
<b>O-acetilserina (tiol) liasa 1</b>	Inhibición de la actividad en condiciones de estrés para la regulación del metabolismo de cisteína y glutatión	Álvarez et al., 2011
<b>Glutamina sintetasa (GS1a)</b>	Inhibición de la actividad para la regulación del metabolismo del N en nódulos	Melo et al., 2011
<b>NADP-isocitrato deshidrogenasa (ICDH)</b>	Inhibición de la actividad para la reprogramación del metabolismo y la homeostasis redox durante la senescencia	Begara-Morales et al., 2013
<b>NADH-hidroxipiruvato reductasa (HPR1)</b>	Inhibición de la actividad, cambios en el metabolismo peroxisomal	Corpas et al., 2013c
<b>Ascorbato peroxidasa (APX)</b>	Inhibición de la actividad	Clark et al., 2000 Begara-Morales et al., 2014b
<b>Monodehidro-ascorbato reductasa</b>	Inhibición de la actividad	Begara-Morales et al., 2015
<b>Superóxido dismutasas (MSD1, FSD3, CSD3)</b>	Inhibición de la actividad	Holzmeister et al., 2015

<b>Pyrabactin resistance1/ PYR1-like/regulatory components of ABA receptors (PYR/PYL/ RCAR)</b>	Inhibición de la actividad	Castillo et al., 2015
<b>Leghemoglobina</b>	Posible papel protector, secuestrando ONOO <sup>-</sup>	Sainz et al., 2015

Por su parte, la *S*-nitrosilación es una modificación postraduccional de proteínas que consiste en la unión covalente de una molécula de NO a un grupo tiol de una cisteína, dando lugar a un *S*-nitrosotiol (SNO). Aparece como el mecanismo principal mediante el cual el NO, en forma protonada, NO<sup>+</sup>, o en un estado mayor de oxidación, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Hill et al., 2010) ejerce su efecto y es altamente específico, ya que depende de la proximidad entre el NO y la proteína diana, así como de su conformación y secuencia aminoacídica (Lindermayr y Durner, 2009; Lamotte et al., 2015).

Aún no se conoce con exactitud en qué medida esta modificación está mediada por mecanismos no enzimáticos (a través de la acción de NO/N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> libre), o por reacciones de transferencia mediante la interacción entre dos componentes conocida como transnitrosilación (p.e. proteína-GSNO), ya que los mutantes que sobreacumulan NO o GSNO no se comportan de la misma forma (Kneeshaw et al., 2014).

Uno de los puntos importantes en la biología del NO es la capacidad para mantener concentraciones óptimas en el lugar específico de acción. De esta forma, el control de proteínas nitrosiladas supone un importante punto de regulación. Se han

descrito ciertos sistemas enzimáticos que son capaces de denitrosilar proteínas, destacando el de la glutatión/*S*-nitrosoglutatión reductasa (GR/GSNOR) y la tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TrxR) (Tada et al., 2008; Malik et al., 2011; Paris et al., 2013). Recientemente, se ha descrito el caso específico de la denitrosilación de NPR1 por el sistema compuesto por la tiorredoxina TRXH5 y la tiorredoxina reductasa NTRA (Kneeshaw et al., 2014). Aunque se necesita dilucidar mucho al respecto, dada la alta especificidad que muestra la *S*-nitrosilación, posiblemente también lo sea la regulación de la denitrosilación, al menos en cuanto a sistemas se refiere, como ocurre en el caso de GAPDH (Zaffagnini et al., 2013). También se han descrito mecanismos no enzimáticos capaces de eliminar esta unión entre los que se encuentran la exposición a agentes reductores, compuestos nucleofílicos o metales de transición, así como calor o luz (Kovacs y Lindermayr, 2013).

Existe una amplia bibliografía que hace referencia a la multitud de procesos en los que esta modificación ejerce su acción (Mengel et al., 2013; Paris et al., 2013; Romero-Puertas et al., 2013). Hasta el momento, se han descrito numerosas proteínas que son susceptibles de nitrosilarse (Lindermayr et al., 2005), gracias a la técnica conocida como “Biotin switch” (Jaffrey y Snyder, 2001), resaltando dianas concretas que describen en más profundidad las cisteínas específicas y los efectos a los que da lugar dicha modificación (Tabla 3).

Cabe resaltar la fina regulación a la que está sometida toda la esfera del NO en el mundo vegetal, incidiendo en algunos casos específicos dentro de la *S*-nitrosilación que controlan la propia autoregulación homeostática de dicha molécula. Así, la *S*-

nitrosilación de la GSNOR inhibe su actividad enzimática a través del NO generado por la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  (Frunghillo et al., 2014). Por su parte, la enzima PrxII E, que cataliza la detoxificación de  $\text{ONOO}^-$ , es inhibida por dicha modificación, resultado en un aumento en la cantidad de proteínas nitradas (Romero-Puertas et al., 2007). La posible S-nitrosilación de la NR inhibe o activa dicha enzima en función de la concentración de  $\text{CO}_2$  y de los niveles de  $\text{NO}_3^-$  en el medio, aunque no hay cisteínas específicas ni grupo hemo o molibdeno detallados, ni un mecanismo claro al respecto (Jin et al., 2009; Frunghillo et al., 2014; Begara-Morales, 2016).

**Tabla 3:** Dianas y efectos de la S-nitrosilación de proteínas descritas en plantas.

PROTEÍNA	PROCESO	REFERENCIA
Nonsymbiotic hemoglobin1 (nsHb1)	Modulación niveles de $\text{NO}/\text{O}_2$	Perazzolli et al., 2004
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Inhibición de la actividad	Lindermayr et al., 2005; Zaffagnini et al., 2013
Metionina adenosiltransferasa (MAT1)	Inhibición de la actividad	Lindermayr et al., 2006
Peroxiredoxina II E (PrxII E)	Inhibición de la actividad que da lugar a un aumento de $\text{ONOO}^-$ , lo que desencadena una mayor nitración de residuos de Tyr	Romero-Puertas et al., 2007

<b>Metacaspasa MC9</b> (forma no procesada)	Inhibición del autoprocesamiento y de la actividad proteolítica	Belenghi et al., 2007
<b>MYB domain protein</b> (MYB2)	Inhibición de la unión a DNA	Serpa et al., 2007
<b>Nonexpresser of PR genes 1</b> (NPR1)	Cambios conformacionales (oligomerización) en citoplasma	Tada et al., 2008
<b>Salicylic acid-binding protein 3</b> (SABP3)	Impide la unión con el ácido salicílico (SA) e inhibe la actividad	Wang et al., 2009
<b>Complejo glicina descarboxilasa</b> (GDC)	Inhibición de la actividad	Palmieri et al., 2010
<b>TGACG Sequence-specific binding protein 1</b> (TGA1)	Promueve la unión a DNA en presencia de NPR1	Lyndermayr et al., 2010
<b>Aldolasa</b>	Cambio conformacional que da lugar a la inhibición de la actividad	van der Linde et al., 2011
<b>NADPH oxidasa</b> (RBOHD)	Inhibición de la actividad, minimizando la síntesis de ROI (intermediarios ROS)	Yun et al., 2011



<b>Transport inhibitor response 1 (TIR1)</b>	Fomenta la interacción con Aux/IAA, promoviendo su degradación y desencadenando la respuesta a auxinas	Terrile et al., 2012
<b>Cell división cycle 48 (CDC48)</b>	Inhibición de la actividad ATPasa	Astier et al., 2012
<b>Histidine phosphotransfer protein 1 (AHP1)</b>	Inhibición de la actividad fosforilasa, regulando negativamente la ruta de señalización de las citoquininas (CKs)	Feng et al., 2013
<b>Acorbato peroxidasa (APX)</b>	Promueve la actividad	Begara-Morales et al., 2014b
<b>GSNO reductasa (GSNOR)</b>	Inhibición de la actividad	Frungillo et al., 2014
<b>MYB domain protein (MYB30)</b>	Inhibición de la unión al DNA	Tavares et al., 2014
<b>Open stomata 1/Sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 2.6 (OST1/SnRK2.6)</b>	Inhibición, regulación negativa de la respuesta a ABA	Wang et al., 2015a

<p><b>ABA Insensitive 5 (ABI5)</b></p>	<p>Desestabilización de la proteína, promoviendo la degradación por el proteasoma</p>	<p>Albertos et al., 2015</p>
<p><b>Peroxiredoxina II F (PrxII F)</b></p>	<p>Inhibición de la actividad peroxidasa y adquisición de actividad transnitrosilasa, previniendo la agregación de la citrato sintasa</p>	<p>Camejo et al., 2015</p>

El tercer mecanismo descrito mediante el cual el NO ejerce su efecto es la nitrosilación de metales de transición presentes en metaloproteínas, en concreto hierro, zinc y cobre, provocando cambios conformaciones que repercutirán en la actividad de la proteína (Astier y Lindermayr, 2012) (Tabla 4).

No hay mucha bibliografía respecto al papel relativo de esta modificación dentro del contexto del NO, mientras que la S-nitrosilación de residuos de cisteína posee un número considerable de efectos específicos sobre proteínas concretas. El papel más relevante descrito está relacionado con la unión al grupo hemo de las hemoglobinas, relacionándolo con el transporte/secuestro de NO (Gupta et al., 2011b). Curiosamente, en animales se ha descrito un mecanismo de auto-nitrosilación mediante transferencia intramolecular desde el grupo hemo hasta una cisteína del dominio globina (Jia et al., 1996; Gow y Stamler, 1998).

**Tabla 4:** Dianas y efectos de nitrosilación de metales en plantas.

PROTEÍNA	PROCESO	REFERENCIA
Lipooxigenasa-1	Regulación redox	Nelson, 1987
Catalasa	Inhibición de actividad para la modulación de respuesta a patógenos	Clark et al., 2000
Ascorbato peroxidasa	Inhibición de actividad para la modulación de respuesta a patógenos	Clark et al., 2000
NITRIC OXIDE-DEPENDENT GUANYLATE CYCLASE (NOGC1)	Hidrólisis de GTP, generación de cGMP dependiente de NO	Mulaudzi et al., 2011
Nonsymbiotic hemoglobin1 (nsHb1)	Modulación niveles de NO/O <sub>2</sub>	Perazzolli et al., 2004
Aconitasa	Inhibición de la actividad para la modificación del metabolismo, favoreciendo la biosíntesis de aminoácidos y la activación de la oxidasa alternativa	Gupta et al., 2012

Una de las apreciaciones más importantes respecto de la relación del NO con el hierro, es la regulación de la homeostasis

de este último, de vital importancia para un correcto crecimiento y desarrollo de las plantas. Es capaz de formar complejos mononitrosil (MNIC) y dinitrosil (DNIC) con el hierro, permitiendo su transporte y aumentando su disponibilidad en el interior de la planta (Graziano y Lamattina, 2005; Simontacchi et al., 2012; Buet y Simontacchi, 2015), pudiendo además tener importancia biológica como compuesto trans-nitrosilador, aunque esto sólo se ha estudiado hasta el momento en animales (Ueno et al., 2002).

Al mismo tiempo, promueve la acumulación de transcrito de ferritina, proteína encargada del almacenamiento de hierro, tras la rápida acumulación de NO en los plastos que se produce como consecuencia de un aumento de este metal, actuando de esta forma a varios niveles que van en la misma dirección (Arnaud et al., 2006).

### 4.2.3 Modificaciones de lípidos

Recientemente, se está comenzando a dar importancia a otra modificación adicional que tiene lugar entre ácidos grasos insaturados y compuestos procedentes de las reacciones del NO, como  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_2\cdot$ , para dar lugar a ácidos grasos nitrados ( $\text{NO}_2\text{-FAs}$ ). El mecanismo fisiológico por el cual se generan aún no se conoce con exactitud, sin embargo, sí se sabe que participan en procesos biológicos relevantes, tanto en plantas como en animales (Rubbo, 2013).

La generación de  $\text{NO}_2\text{-FAs}$  en ambientes lipofílicos, como las bicapas lipídicas celulares, constituyen zonas apropiadas para la formación y la señalización de este tipo de moléculas. Se han

propuesto modos de acción dependientes del NO, que incluyen su liberación en ambientes acuosos o la transferencia de dicho compuesto a residuos de cisteína de proteínas (nitroalkilación) o moléculas de GSH (Lima et al., 2005; Schopfer et al., 2005b), e independientes del NO, que podrían estar relacionados con la propia bioactividad de la molécula global (Schopfer et al., 2005a).

En animales, los ácidos grasos nitrados se consideran moléculas señalizadoras al estar implicados en la modulación de la respuesta inflamatoria (Rubbo, 2013). Cabe resaltar la especificidad que muestran ciertos NO<sub>2</sub>-FAs con respecto a sus dianas, como el nitro-oleato (NO<sub>2</sub>-OA) y nitro-linoleato (NO<sub>2</sub>-LA) (Iles et al., 2009).

En plantas, tanto la detección (Fazzari et al., 2014) como la asignación de funciones fisiológicas (Sánchez-Calvo et al., 2013; Mata-Pérez et al., 2016 a,b,c) ha sido posterior, estableciéndose recientemente la participación del ácido nitrolinolénico en la regulación de la actividad chaperona y la respuesta antioxidante frente a condiciones de estrés abiótico (Mata-Pérez et al., 2016b).

Adicionalmente, se ha demostrado cómo el ácido oleico (18:1), uno de los principales ácidos grasos en plantas, susceptible de ser nitrado, es capaz de controlar la producción de NO mediante la interacción con NOA1 en los plastos y la regulación de la transcripción de los genes *NIA1* y *NIA2*. El uso del mutante *ssi2* (SUPPRESSOR OF SA INSENSITIVITY OF *npr1-5*), con niveles reducidos de 18:1 posee una mayor proporción de NOA1, así como una mayor expresión de los genes citados. Asimismo, la reducción de los niveles de ácido oleico y la aplicación exógena de NO activan grupos similares de genes, lo que implicaría que

poseen mecanismos de acción comunes (Mandal et al., 2012). Apoyando esta relación, en humanos también está descrita la inhibición de la NO sintasa por ácido oleico y linoleico (Davda et al., 1995).

## 5. Papel fisiológico del óxido nítrico

Una vez esbozados los mecanismos principales de síntesis, secuestro y modo de acción del NO, podemos decir que su distribución, concentración y regulación son muy específicas, lo que le confiere una identidad de molécula señalizadora versátil y de amplio espectro, capaz de regular numerosos procesos de forma muy concreta (Freschi et al., 2013). Posee un papel vital en diferentes procesos a lo largo de todo el ciclo de la planta, desde la semilla hasta la planta adulta, pasando por crecimiento, desarrollo, situaciones de estrés biótico y abiótico (Tabla 5). Tal como se cita al inicio de la introducción y dada la temática del trabajo de investigación, se desarrollará más en profundidad la regulación ejercida en los primeros estadios de desarrollo, principalmente en el modelo de estudio, *Arabidopsis thaliana*.

**Tabla 5:** Efectos fisiológicos más relevantes del NO durante el ciclo de vida de la planta.

PROCESO	REFERENCIA
Ruptura de la dormición y estimulación de la germinación	Bethke et al. 2004b, 2006 a,b, 2007, 2011; Libourel et al., 2006; Sarath et al., 2006; Albertos et al., 2015

Modulación del crecimiento y estructura radicular	Stöhr y Stremlau, 2006; Fernández-Marcos et al., 2011, 2012; Bai et al., 2014; Sanz et al., 2014
Elongación del hipocotilo y desetiología	Beligni y Lamattina, 2000; Lozano-Juste y León, 2011b; Gibbs et al., 2014; Melo et al., 2016
Floración	He et al., 2004; Seligman et al., 2008; Kumar et al., 2016
Crecimiento del tubo polínico	Prado et al., 2004, 2008; Wang et al., 2012; Pasqualini et al., 2015
Maduración de frutos	Leshem et al., 2000; Singh et al., 2009; Zhu et al., 2006; Zhu y Zhou, 2007; Zaharah y Singh, 2011
Senescencia	Mishina et al., 2007; Du et al., 2014; Ji et al., 2016
Cierre estomático	Desikan et al., 2002; García-Mata y Lamattina, 2001, 2002, 2003; Bright et al., 2006; Neill et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Wang et al., 2015a
Respuesta frente a patógenos	Tada et al., 2008; Sun y Li 2013; Kovacs et al., 2015

<p>Respuesta frente a estreses abióticos</p> <p>(1) Salino</p> <p>(2) Osmótico</p> <p>(3) Temperatura elevada</p> <p>(4) Bajas temperaturas</p> <p>(5) Metales pesados</p> <p>(6) Hipoxia</p>	<p>Revisado por Fancy et al., 2016</p> <p>(1) Arasimowicz-Jelonek et al., 2009; Monreal et al., 2013</p> <p>(2) Wawer et al., 2010</p> <p>(3) Xuan et al., 2010</p> <p>(4) Cantrel et al., 2011</p> <p>(5) Rodríguez-Serrano et al., 2009; Hasanuzzaman y Fujita, 2013</p> <p>(6) Dordas et al., 2003, 2004</p>
<p>Deficiencias nutricionales</p>	<p>Buet et al., 2014; Royo et al., 2015</p>
<p>Homeostasis de Fe</p>	<p>Revisado en Graziano y Lamattina, 2005; Arnaud et al., 2006; García et al., 2010; Simontacchi et al., 2012; Buet y Simontacchi, 2015;</p>
<p>Nodulación/simbiosis</p>	<p>Leach et al., 2010; Del Giudice et al., 2011</p>
<p>Muerte celular</p>	<p>Beligni et al., 2002</p>



## 5.1 El óxido nítrico en la semilla

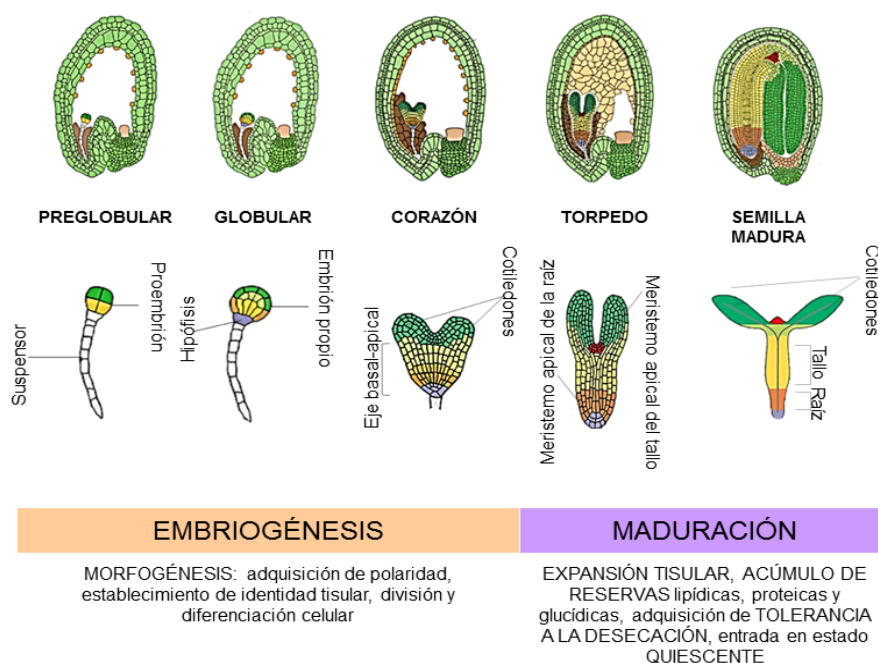
La semilla constituye un estadio fundamental en el ciclo de vida de las plantas, ya que es el vínculo entre dos generaciones, por lo que es indispensable para la transferencia del material hereditario a lo largo del tiempo y, por consiguiente al mantenimiento de la especie.

Previamente a la formación de la semilla como tal, tienen lugar dos procesos de gran importancia en el mundo vegetal, como son la polinización, en el cual se transfiere polen desde los estambres hasta el estigma, y la fecundación o unión de los dos gametos de diferente sexo para dar lugar al cigoto (Faure et al., 2002). En el caso de las plantas con flor, como es el caso de *arabidopsis*, se produce una doble fecundación que origina el cigoto ( $2n$ ) y el endospermo ( $3n$ ), fundamental éste último para dar soporte energético y protección al embrión durante la fase de crecimiento, así como en su regulación (Yan et al., 2014).

El desarrollo de la semilla se divide en embriogénesis y maduración (Goldberg et al., 1994) (Figura 7). La primera fase comprende los cambios morfológicos y fisiológicos que se dan desde la formación del cigoto hasta el estado de corazón, en los que se engloban la diferenciación celular y la especificación de tejidos, en los que una comunicación intra- e intercelular coordinada en el tiempo y el espacio es vital para el establecimiento del eje basal-apical del embrión (Zhang y Laux, 2011; Wendrich y Weijers, 2013). Tras este punto, tenemos ya la arquitectura básica de la planta formada.

Durante la segunda fase, la maduración, se va a producir la expansión de los órganos en todos los planos hasta alcanzar su

tamaño definitivo, así como el acúmulo de reservas lipídicas y glucídicas, la adquisición de tolerancia a la desecación y la entrada en un estado de quiescencia (Baud et al., 2002).

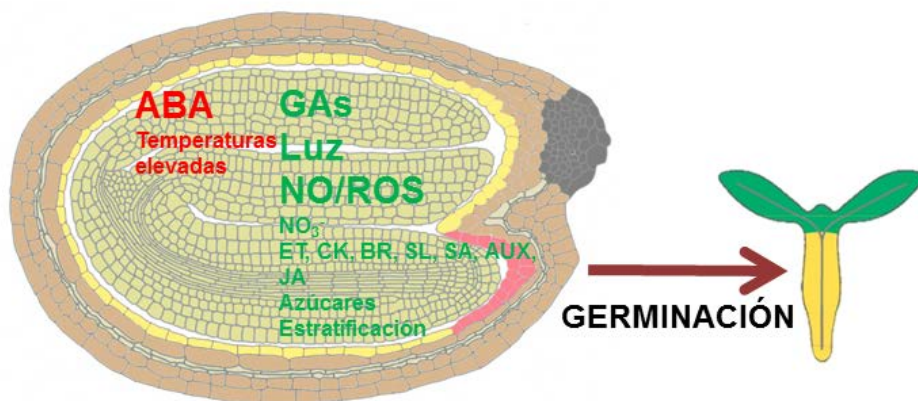


**Figura 7:** Desarrollo general de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Goldberg et al., 1994 y de las ilustraciones de Meryl Hashimoto, UC Davis.

La germinación comienza con la toma de agua en tres fases. La semilla seca en estado quiescente sufre una reprogramación genética para recuperar un estado basal del metabolismo. A nivel macroscópico, este evento finaliza con la protrusión de la radícula y la rotura de las capas externas de la semilla, el endospermo y la testa (Bewley, 1997; Weitbrecht et al., 2011). Evolutivamente, las semillas presentan un mecanismo adaptativo conocido como dormición, esto es, la incapacidad de semillas viables para

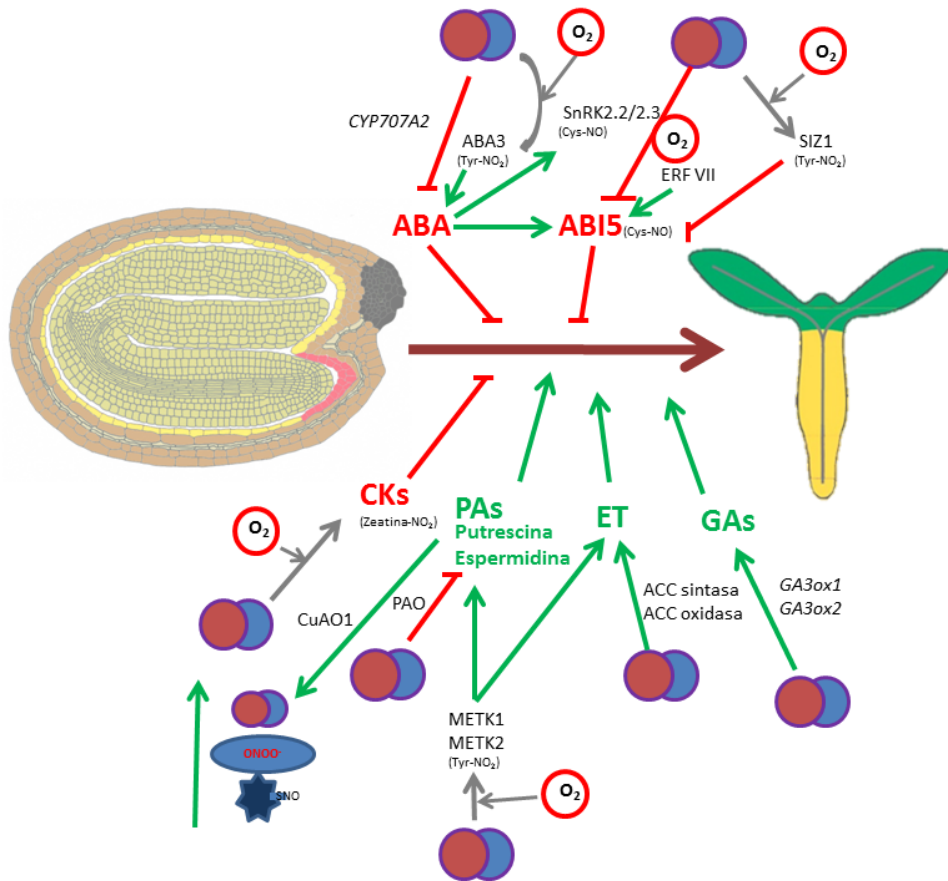
germinar en condiciones ambientales favorables (Bewley, 1997; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Graeber et al., 2012).

Dormición y germinación están tan estrechamente relacionadas, que resulta difícil establecer el comienzo y el fin de cada evento, así como la influencia real de factores internos y externos en cada uno de ellos. Ambos procesos están regulados por una serie de complejas redes de señalización conformadas por hormonas [(ácido abscísico (ABA), giberelinas (GAs), auxinas (AUX), citoquininas (CKs), ácido salicílico (SA), brasinosteroides (BR), poliaminas (PAs) y etileno (ET)] entre las que destaca el papel ejercido por ABA y GAs (Bentsink y Koornneef, 2008; Nambara et al., 2010; Finkelstein, 2013) y factores ambientales (temperatura de almacenamiento de la semilla, luz, contenido en agua, compuestos nitrados, tratamientos con frío) (Alboresi et al., 2005; Carrera et al., 2008; Holdsworth et al., 2008). Asimismo, las condiciones en las que la planta madre ha crecido durante el desarrollo de la semilla también ejercen influencia en la dormición/germinación de las semillas (Munir et al., 2001). El balance redox es otro de los puntos fundamentales en la regulación en estas etapas (Marx et al., 2003; Bykova et al., 2011a, b; Revisado en Diaz-Vivancos et al., 2013). Todos estos factores cumplen un papel importante y su interconexión es vital para que la semilla germine (Seo et al., 2009; Footitt et al., 2011) (Figura 8).



**Figura 8:** Influencia de los diferentes factores (promotores en verde e inhibitorios en rojo) sobre la dormición y la germinación de la semilla. ABA: ácido abscísico. GAs: giberelinas. NO: óxido nítrico. ROS: especies reactivas de oxígeno.  $\text{NO}_3^-$ : nitrato. ET: etileno. CKs: citoquininas. BR: brasinosteroides. SL: estrigolactonas. SA: ácido salicílico. AUX: auxinas. JA: ácido jasmónico. Adaptado de Bentsink y Koornneef, 2008 y de las ilustraciones de Meryl Hashimoto, UC Davis.

El NO juega un papel muy importante dentro de la regulación de la dormición y germinación (Figura 9). Existe una estrecha relación entre el balance hormonal ABA/GA controlado por dicho compuesto (Revisado en Sanz et al., 2015). Asimismo, el balance que se establece entre el NO y el  $\text{O}_2$  es de gran importancia para el mantenimiento de unas condiciones adecuadas respecto del balance energético de la semilla (Borisjuk et al., 2007).



**Figura 9:** Efectos descritos del NO sobre las diferentes hormonas en el marco de regulación de la germinación (promotores en verde, inhibitorios en rojo y por determinar en gris) (Las dianas reguladas a nivel de transcripción aparecen en cursiva). PAs: poliaminas. ET: etileno. GAs: giberelinas. ABA: ácido abscísico. ABI5: ABA insensitive 5. CKs: citoquininas. CYP707A2: ABA 8´hidroxilasa. ABA3: sulfurasa de molibdeno. SnRK2.2/2.3: protein–quinasas de respuesta a ABA. ERFVII: grupo VII de factores de respuesta a etileno. SIZ1: SUMO E3 ligasa. CuAO1: cobre amino oxidasa1. PAO: poliamino oxidasas. METK1,2: S–adenosilmetionina sintasas. GA3ox1, 2: GAs oxidasas. Ilustraciones de Meryl Hashimoto, UC Davis.

Está descrito cómo la aplicación de compuestos donadores de NO eliminan la dormición, promoviendo la germinación, mientras que los secuestradores mantienen la dormición (Bethke et al., 2004 b; 2006 a,b; 2007; Libourel et al., 2006). Aislado cada uno de los componentes que constituyen la semilla, se observó como la parte que percibe el NO en este proceso es la capa de aleurona (Bethke et al., 2007). En la misma dirección, se detectó la acumulación de NO en capas de aleurona de cebada tras la adición de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$  (Vitecek et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, el balance hormonal entre ABA y GAs es fundamental para que la semilla germine. El NO presenta un papel opuesto al del ABA, actuando a diferentes niveles, todos ellos encaminados al establecimiento de la plántula. La aplicación exógena de ABA promueve la acumulación de NO en el apoplasto de la capa de aleurona (Bethke et al., 2006 a,b), mientras que el NO provoca la disminución de esta hormona mediante la regulación positiva de CYP707A2, enzima que cataliza la degradación de ABA (Liu et al., 2009; Liu y Zhang, 2009). En esta línea de acción, se ha identificado al cofactor de molibdeno sulfurasa ABA3, que participa en la síntesis de ABA (Mendel, 2007) como posible diana susceptible de nitración (Lozano-Juste et al., 2011a).

Dentro de la regulación transcripcional, uno de los puntos más importantes dentro de la caracterización de la relación entre el NO y el ABA, hace hincapié en el factor transcripcional ABI5. ABI5 pertenece a la familia de los bZIPs, de gran importancia a lo largo de todo el desarrollo de la planta (Jakoby et al., 2002; Correa et al., 2008), dato que reafirma el hecho de que *Arabidopsis* posea con diferencia muchos más que otras especies (Riechmann et al., 2000). Asimismo estos factores son

susceptibles de numerosas modificaciones postraduccionales, entre las que se encuentran el redox y el NO (Schütze et al., 2008), lo que los hace que posean gran complejidad tanto al ser regulados como a la hora de controlar los diferentes procesos en los que están implicados. Adicionalmente, los bZIPs que poseen cajas G (GBOX) de unión al DNA se encuentran sobrerrepresentados dentro de los genes de respuesta a NO (Palmieri et al., 2008).

ABI5 es uno de los reguladores maestros de la señalización de ABA (López-Molina et al., 2002), ejerciendo un efecto activador en dormición y represor en germinación (Finkelstein y Lynch, 2000; Xu et al., 2014). Hemos descrito cómo la *S*-nitrosilación de ABI5 favorece su interacción con E3 ubiquitín-ligasas, desencadenando su degradación y favoreciendo la germinación (Albertos et al., 2015). Otras de las proteínas de gran importancia dentro de la ruta del ABA en semilla son las proteína-kinasas SnRK2.2 y SnRK2.3, enzimas que catalizan la activación de ABI5 mediante fosforilación y cuya actividad es inhibida mediante *S*-nitrosilación (Wang et al., 2015b).

Otro punto de regulación sobre ABI5 viene dado por la sumoilación que lleva a cabo la enzima SUMO E3 ligasa SIZ1 (Miura et al., 2009), la cual ha sido detectada como posible diana de nitración (Lozano-Juste et al., 2011a). Aumentando la complejidad de la regulación en este marco de acción, se encuentra también el grupo VII de factores de respuesta a etileno (ERFVII), los cuales son reguladores positivos de la transcripción de *ABI5*. Estos factores son degradados por la ruta N-terminal de proteólisis dirigida (“N-end rule pathway”), de gran importancia tanto en el reino vegetal como en el animal (Graciet et al., 2010; Varshavsky, 2011), dependientemente de O<sub>2</sub> y NO (Gibbs

et al., 2014). Todas las dianas citadas en relación al NO y al ABA estarían encaminadas a la disminución del contenido e inhibición de los efectos de dicha hormona, promoviendo la salida de la dormición y favoreciendo la germinación (Revisado en Arc et al., 2013 a, b).

El papel entre las CKs y el NO también es antagonista en cuanto a la germinación se refiere. Mientras el NO promueve la germinación (Bethke et al., 2006 a,b), las CKs la inhiben (Riefler et al., 2006). Aunque el mecanismo no está completamente claro, el mutante insensible a NO *cnu1* (*continuous NO-unstressed 1*) presenta mayores niveles de CKs, lo que establece la base de una posible relación opuesta entre ambos, mientras que el doble mutante de *cnu1;nox1* (*nitric oxide overexpression 1*) presenta un fenotipo más leve asociado con mayores niveles de NO (Liu et al., 2013). Asimismo, el  $\text{ONOO}^-$  es capaz de interactuar con la zeatina *in vitro*, lo que sugiere un posible mecanismo regulatorio de interacción física (Liu et al., 2013).

Las poliaminas (PAs) participan en la regulación de la germinación. Entre ellas putrescina y espermidina estimulan la germinación en embriones de manzana, contrariamente al efecto de la espermina. Este efecto va asociado con un aumento de ROS y RNS, principalmente NO y  $\text{ONOO}^-$  en el eje embrionario, donde está descrito un aumento en la actividad de las poliamino oxidasas (PAO) (Krasuska et al., 2014). Asimismo, como ya se menciona en el apartado de la síntesis (apartado 3.1.3), estaría a su vez conectada con la ruta del ABA, ya que el mutante de pérdida de función de la cobre amino oxidasa1 (CuAO1) muestra una menor acumulación de NO en respuesta a la aplicación exógena de PAs así como una menor insensibilidad



frente a la adición de ABA en la germinación (Wimalasekera et al., 2011a).

Como hormonas promotoras de la germinación, tenemos GAs (Finkelstein et al., 2008) y ET (Gniazdowska et al., 2010), estando ambas reguladas positivamente por el NO. En el caso de las GAs, el NO actúa promoviendo la transcripción de dos genes relacionados con su biosíntesis, *GA3ox1* y *GA3ox2* (Bethke et al., 2007).

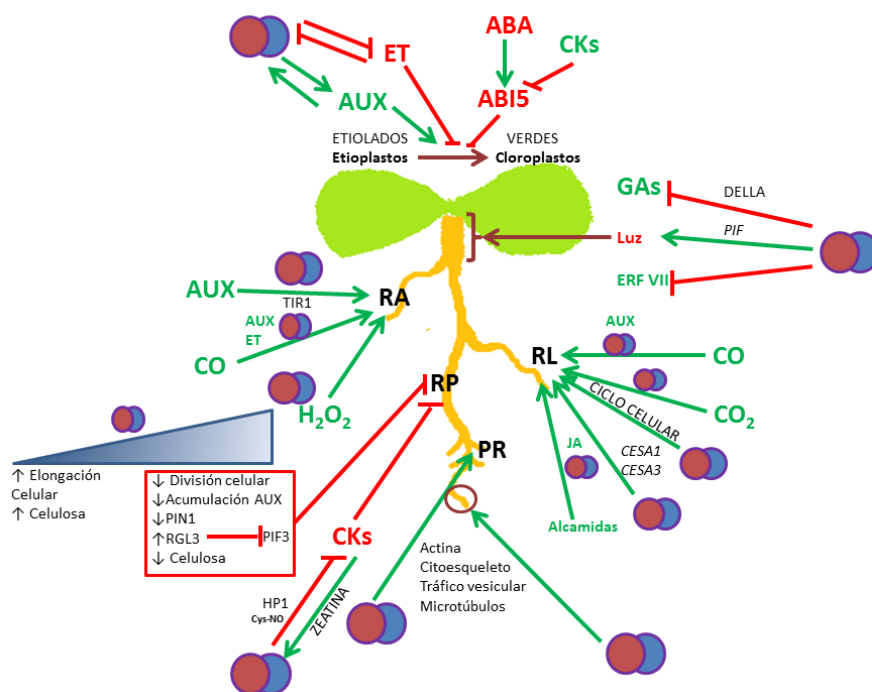
Respecto al ET, aunque en estadios adultos está caracterizada la acción opuesta entre ambos en procesos como la maduración de frutos, la senescencia y la abscisión (Lyndermayer et al., 2006; Manjunatha et al., 2012), en tejidos no senescentes así como en semilla se ha observado el mismo tipo de modulación, estando descrita la inducción de la síntesis por NO en embriones de manzana, posiblemente a través de dos enzimas que tienen que ver con este proceso, la ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) sintasa y la ACC oxidasa (ACO) (Gniazdowska et al., 2010).

La regulación de la germinación viene dada no sólo por la acción desencadenada por las diferentes hormonas que participan en el proceso, sino por la coordinación entre cada una de las rutas. Como ejemplo de interconexión mediada por NO, podemos citar a las S-adenosilmetionina sintasas METK1 y METK2, involucradas en la síntesis de ET y PAs, que constituyen una diana potencial de nitración (Lozano-Juste et al., 2011a). Adicionalmente, hay que remarcar la relación con el ABA en este punto, ya que la CuAO1 está involucrada en el aumento de NO en respuesta a ABA (Wimalasekera et al., 2011a). Los mutantes deficientes de esta enzima presentan una mayor tasa de

germinación en medios suplementados con ABA (Wimalasekera et al., 2011a).

## 5.2 El óxido nítrico en el establecimiento de plántula

Una vez que la semilla ha germinado, el correcto establecimiento de la plántula es fundamental para el posterior crecimiento y desarrollo de la planta adulta. En *Arabidopsis thaliana*, la etapa inicial del establecimiento del eje basal-apical en la morfogénesis dará lugar a los cotiledones y a la raíz, conectados por el hipocotilo (Figura 10).



**Figura 10:** Regulación ejercida por el NO durante los primeros estadios de desarrollo temprano en parte aérea y en raíz (RP:

raíz principal, RL: raíces laterales, RA: raíces adventicias, PR: pelos radiculares). Los efectos ejercidos dependen en gran medida de la concentración, como aparece representado a la izquierda de la figura. Las dianas reguladas a nivel de transcripción aparecen en cursiva, los factores promotores en verde y los inhibitorios en rojo.

En esta etapa, el crecimiento está marcado principalmente por la elongación celular, en la que intervienen diferentes factores como son la luz, la temperatura, la gravedad y la red de señalización hormonal, en la que destaca la acción de las GAs.

## 5.2.1 El papel del óxido nítrico en la elongación del hipocotilo y la desetiología

Las GAs controlan el crecimiento del hipocotilo por medio de la elongación celular a través de la degradación de las DELLAs (de Lucas et al., 2008). La luz y la temperatura regulan la elongación mediante los factores PIF (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR) (de Lucas et al., 2008). Mientras la luz promueve la fotomorfogénesis, inhibiendo el crecimiento del hipocotilo, las GAs inducen la elongación.

El NO está implicado en la regulación de la morfogénesis (Figura 10), inhibiendo la elongación de los hipocotilos y promoviendo la presencia de clorofila en condiciones de oscuridad (Beligni y Lamattina, 2000). Apoyando esta relación, el mutante deficiente en GAs *ga1-3* acumula niveles mayores de NO en oscuridad, lo que sugiere un papel inhibitorio de las GAs sobre el NO en los hipocotilos (Lozano-Juste y León, 2011b). Asimismo,

está descrito que el NO reprime la expresión de los genes *PIF*, mientras que provoca un incremento en las proteínas DELLA (Lozano-Juste y León, 2011b).

La inhibición de la elongación del hipocotilo en oscuridad, mediada por NO también está regulada por el grupo ERFVII, puesto que se ha observado que varios mutantes de la ruta proteolítica del extremo amino, por la cual estos factores son degradados, son insensibles a la adición exógena de NO (Gibbs et al., 2014).

En los primeros estadios de desarrollo de la plántula, la transición de cotiledones etiolados a cotiledones verdes está marcada por la conversión de los etioplastos en cloroplastos, los cuales pueden realizar fotosíntesis, capacitando a la planta para la autotrofia. La inducción de esta diferenciación viene dada por redes de señalización en la que están implicados fitocromos, ABA, CKs, GAs, NO, ET y AUX.

En este contexto, está descrita una relación opuesta entre ABA y CKs, en la cual el ABA posee un efecto represor mientras las CKs promueven la biogénesis y maduración de los cloroplastos (Galpaz et al., 2008; Kravtsov et al., 2011; Cortleven y Schmölling, 2015). Las CKs antagonizan el papel del ABA en la inhibición del paso de cotiledones etiolados a verdes mediante la inducción de la degradación de ABI5 (Wang et al., 2011; Guan et al., 2014), y dado que el NO promueve igualmente la degradación mediada por *S*-nitrosilación (Albertos et al., 2015), podría existir una conexión directa en la regulación del proceso.

Adicionalmente, la presencia de NO regula positivamente la desetiolación mediante la represión de la síntesis de ET y la inducción de la acumulación de AUX, al mismo tiempo que estas

hormonas regulan negativamente, en el caso del ET, y positivamente, en el caso de las auxinas, la propia producción de NO (Melo et al., 2016). De la misma forma, se ha visto que el tratamiento exógeno de NO mimetiza los cambios transcripcionales promovidos por el fitocromo (Melo et al., 2016).

## 5.2.2 El óxido nítrico en el desarrollo de la raíz

La raíz constituye un órgano vital para la planta, ya que le permite la toma de agua y de los diferentes nutrientes para crecer y desarrollarse, así como un soporte al medio, por lo que la organogénesis radicular juega un papel de suma importancia en el mundo vegetal. El NO también es capaz de modular la arquitectura de las raíces desde los primeros estadios (Figura 10), inhibiendo el crecimiento de la raíz principal y promoviendo la formación de raíces laterales (RL) y adventicias (RA) mediante la acción coordinada con las auxinas. Éstas constituyen el principal entramado de señalización hormonal en la regulación de los procesos de organogénesis, mediante la formación de gradientes que definen patrones moleculares encargados de regular el crecimiento (Overvoorde et al., 2010).

En este aspecto la acción del NO resulta sinérgica con respecto a las auxinas (Pagnussat et al., 2002, 2003, 2004; Lanteri et al., 2006) y dependiente de la concentración, resultando negativa sobre el crecimiento de la raíz primaria a niveles elevados, que provocan una disminución en las divisiones celulares (He et al., 2004; Fernández-Marcos et al., 2011; Chen et al., 2013) y viceversa a bajas concentraciones, induciendo la

elongación celular (Pagnussat et al., 2002; Hunt et al., 2002; Zhao et al., 2007; Liu et al., 2016; Sun et al., 2016).

Se ha demostrado cómo el NO provoca una menor tasa de división, una disminución del tamaño celular en la zona meristemática de la raíz, así como una menor acumulación de auxinas y del transportador PIN1 (PIN-FORMED1), dando lugar a una reducción en el transporte de dicha hormona (Fernández-Marcos et al., 2011; 2012). También se ha observado una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria en respuesta a tratamientos con NO en luz, en una ruta de señalización en la cual el NO promueve la acumulación del fotorreceptor PHYB y de la proteína DELLA RGL3, que degradan a PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3), componente fundamental en la regulación positiva del crecimiento radicular (Bai et al., 2014).

La exposición a monóxido de carbono (CO) promueve la formación de RL por mecanismos dependientes de NO y AUX (Guo et al., 2008) y de RA por NO, AUX y ET (Guo et al., 2009). El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por otra parte también fomenta la formación de RL, mediante un aumento en la acumulación de NO producido por actividad NOS (Wang et al., 2012). Dentro de la conexión entre auxinas y NO en la modulación de las RL, la mayor parte de los trabajos que se citan hacen referencia al ácido 3-indol acético, sin embargo se ha observado como el NO también actúa de forma espacial y temporalmente coordinada con el ácido indol-3-butírico, otra de las formas auxínicas activas, en este proceso (Schlicht et al., 2013). Adicionalmente, está descrito que las alcamidas, pequeñas moléculas lipídicas presentes en plantas, inducen la formación de primordios de RL por mecanismos en los cuales el ácido

jasmónico y el NO están involucrados, actuando por debajo o independientemente de las auxinas (Méndez-Bravo et al., 2010).

La formación de RA también está influenciada por NO, actuando por debajo de las auxinas (Pagnussat et al., 2002, 2003, 2004; Lanteri et al., 2006, 2008). En arroz se ha propuesto una relación con la ruta de asimilación del N, en la cual el NO generado por la NR jugaría un papel fundamental aumentando la tasa de adquisición de nitrógeno mediante un incremento en el número de RL (Sun et al., 2015). El NO también parece actuar sinérgicamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la formación de RA, como se ha observado en *Tagetes erecta* (Liao et al., 2009).

La acción conjunta del NO con las auxinas en la regulación de la organogénesis radicular también viene marcada por la modificación que el NO ejerce sobre el transporte y la señalización de estas hormonas (Fernández-Marcos et al., 2011, 2012; Terrile et al., 2012; Sanz et al., 2014).

El NO también modula la morfología y la estructura radicular mediante otros procesos, como el ciclo celular, mediante el control de genes implicados en la regulación de dicho proceso (Correa-Aragunde et al., 2006), o la síntesis, y por tanto el contenido, de celulosa mediante la regulación transcripcional de celulosa sintetas (CESA) (Correa-Aragunde et al., 2008). La aplicación exógena de NO también modula la organización del citoesqueleto y la endocitosis a través de la actina en el ápice de la raíz (Kasprowicz et al., 2009; Lombardo y Lamattina, 2012), así como la orientación de los microtúbulos corticales (Yemets et al., 2009). Es necesario mencionar que el NO interviene en la estructura de la actina, dentro del contexto redox, a través de la S-nitrosilación (Rodríguez-Serrano et al., 2014).

Otro proceso de vital importancia para un correcto crecimiento de la raíz es la respuesta gravitrópica, para la que se requiere una acumulación asimétrica de NO dependiente de auxinas y GMPc (Hu et al., 2005).

Recientemente, se ha descrito otro punto en común mediante la S-nitrosilación del receptor TIR1, que facilita la degradación de los represores Aux/IAA y desencadena la señalización de respuesta a auxinas (Terrile et al., 2012).

Las CKs poseen efectos opuestos en el crecimiento y desarrollo de parte aérea y radicular, promoviendo la actividad del meristemo del tallo e inhibiendo la de la raíz (Werner et al., 2003). Se ha descrito un punto de interconexión entre las CKs y el NO dentro de la señalización de la división celular a través del gen de ciclo celular *CYCD3;1*, cuya regulación estaría mediada por el efecto de ambos, estando el NO por debajo de las CKs (Shen et al., 2013). A nivel postraduccional, el NO es capaz de modular la acción de las CKs mediante la S-nitrosilación de la proteína fosfotransferasa AHP1 (*histidine phosphotransfer protein 1*), desencadenando la inhibición de la señalización por dicha hormona (Feng et al., 2013). Como ya se mencionó en el apartado de la actividad biológica del NO en semilla (apartado 5.1), también existe una interconexión a nivel de modulación de bioactividad por unión de ONOO<sup>-</sup> y zeatina (Liu et al., 2013). Asimismo, la aplicación exógena de zeatina es capaz de incrementar la cantidad de NO (Tun et al., 2008), por lo que aparentemente existe una regulación recíproca.

En relación al NO con el ET, se ha observado una mayor acumulación de ET en respuesta a niveles elevados de NO promovidos por una menor expresión disminuida de los genes GLB1 y GLB2 (nsHbs) (Hebelstrup et al., 2012).



