
LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LAS PLANTAS: ¿ES SEMEJANTE A LA “APOPTOSIS” EN ANIMALES?

YORNAYSER PÉREZ DELGADO, IVÁN GALINDO CASTRO
y FRANCISCO ARVELO

RESUMEN

La muerte celular programada (MCP) es esencial para mantener la homeostasis tisular en muchas formas de vida. En las plantas, de igual forma que en los animales, la MCP es el mecanismo por el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos tales como la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas. La MCP también juega un papel importante en otros procesos como la resistencia a condiciones ambientales desfavorables. A diferencia de los modelos animales, la MCP en plantas está poco descrita al nivel molecular, lo que ha dado lugar a debates sobre el paralelismo entre este tipo

de muerte programada y el proceso conocido en animales como apoptosis. Sin embargo, en los últimos años han surgido evidencias importantes que permiten concluir que en las plantas existe tal proceso. En esta revisión se analizan hallazgos recientes del reino vegetal en esta área, que comienzan a vislumbrar elementos claves sobre la modulación de la respuesta de la planta ante muy diversos factores de estrés, tanto bióticos como abióticos, abriendo además la posibilidad de utilizarlos en programas de mejoramiento genético de rubros agrícolas estratégicos.

Introducción



sí como en los animales existe un mecanismo bien orquestado que permite eliminar de manera programada células individuales para alcanzar y mantener la homeostasis de los tejidos y órganos, en las plantas también ha sido observado este proceso desde hace algún tiempo. Al comienzo de la década de los 70 se introdujo el término apoptosis como un fenómeno biológico con un sinnúmero de implicaciones en la fisiología tisular (Kerr *et al.*, 1972). Sin embargo, es en los años 90, con el auge del estudio de la apoptosis en animales, cuando la teoría de la muerte celular programada (MCP) en plantas ha conocido un gran desarrollo, promovido entre otros factores por intereses agro-

económicos por su asociación con procesos tales como resistencia a patógenos, estrés abiótico y rendimiento de los cultivos (Ranganath y Nagashree, 2001).

Hay similitudes generales entre la apoptosis y la MCP en plantas, tales como condensación del citoplasma, activación de proteasas y nucleasas, degradación del ADN nuclear en fragmentos nucleosomales, la implicación del Ca y la generación de especies reactivas de O₂. Sin embargo hay diferencias particulares en las plantas, tales como la presencia de una pared celular que impide la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, cuya respuesta evolutiva ha sido la generación de una extensiva vacuolización del citoplasma, donde las enzimas hidrolíticas se encargan de ir digiriendo los restos celulares

Durante la vida de las plantas, células, tejidos y órganos son eliminados en un momento determinado en beneficio del propio organismo. Durante el curso normal de su desarrollo, germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de las semillas, las plantas recurren a mecanismos clásicos de MCP. Las plantas también recurren a la muerte controlada para adaptarse y resistir a condiciones adversas de su ambiente tales como falta de nutrientes, temperaturas extremas, hipoxia y patógenos.

Algunos eventos morfológicos de la apoptosis, así como las rutas de regulación y las moléculas de señalización presentan similitudes entre plantas y animales; sin embargo, también han sido observadas diferencias en la ejecución de la MCP. El objetivo de esta revisión es

PALABRAS CLAVES / Apoptosis / Caspasas / Mitocondria / Muerte Celular Programada / Plantas /

Recibido: 06/03/2007. Aceptado: 08/10/2007.

Yornayser Pérez Delgado. Licenciado en Biología. Universidad Central de Venezuela, (UCV). Venezuela. Tesista, Laboratorio de Genómica y Proteómica. Centro de Biotecnología. Fundación IDEA. Venezuela.

Iván Galindo Castro. Licenciado en Biología. UCV. Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Venezuela. Investigador, Laboratorio de Genómica y Proteómica. Centro de Biotecnología. Fundación IDEA. Venezuela.

Francisco Arvelo. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Farmacología Celular y Molecular, Universidad París VI, Francia. Investigador, Instituto de Biología Experimental. UCV. Venezuela. Dirección: Apartado 47117, Caracas 1041-A, Venezuela. e-mail: franarvelo@yahoo.com

comparar las características comunes y diferenciales de la MCP entre plantas y animales.

La Apoptosis y sus Rutas Clásicas de Inducción

En la mayoría de los organismos eucariotas, la muerte celular programada (MCP) o apoptosis representa un mecanismo por el cual se regula una serie de funciones tales como la morfogénesis, la proliferación y el control del número de células en organismos multicelulares, y con el cual se eliminan células que presenten alteraciones o daños a nivel genético (Vaux y Korsmeyer, 1999; Arvelo, 2002). El término apoptosis fue utilizado inicialmente en la antigua Grecia para nombrar el proceso de caída de hojas de los árboles durante los cambios de estaciones. Posteriormente Kerr *et al.* (1972) utilizaron el término para denominar un proceso de MCP que comprende una serie de eventos citológicos como condensación y fragmentación de la cromatina, contracción de la membrana plasmática y formación de vesículas que empaquetan los organelos de la célula en los denominados cuerpos apoptóticos. Dichos eventos vienen dados por interacciones proteína-proteína (proteínas adaptadoras), transcripción y activación de moléculas ejecutoras como las caspasas, y cambios a nivel mitocondrial que conducen a la liberación al citoplasma de compuestos pro-apoptóticos tales como Apaf-1 y Citocromo C, entre otros (Reed, 2000).

La apoptosis en mamíferos se lleva a cabo esencialmente por dos vías. Una extrínseca que se inicia por la interacción de los receptores de muerte (como FasR o TNF-R1) con sus respectivos ligandos. Esta unión produce un agrupamiento de los receptores que estimula la formación de agregados de procaspasa-8 por moléculas adaptadoras, ocasionando su coactivación proteolítica. Finalmente, la caspasa 8 activa a la caspasa 3, iniciándose así el programa de muerte celular (Shen y Pervaiz, 2006).

La vía intrínseca o mitocondrial es dependiente de señales intra y extracelulares tales como citotoxicidad, estrés oxidativo o daños al ADN, donde intervienen numerosas proteínas pro-apoptóticas, tales como citocromo C, AIF y SMAC/DIABLO (Porter y Urbano, 2006). La regulación de esta vía se da por los miembros pro y anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2, los que inducen o reprimen la liberación de estos factores al citoplasma. (Hengartner, 2000; Le Bras *et al.*, 2006)

Ambas vías están reguladas por las proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs), cuya función es inhibir diferentes caspasas. Sin embargo, este control depende del tipo de célula y del estímulo inductor (Kim *et al.*, 2006).

Regulación transcripcional de la apoptosis

Además de las IAPs, existen otros reguladores importantes del proceso apoptótico como lo son las proteínas p53, NFκB y Retinoblastoma (Rb). La proteína p53 controla la transcripción de genes como Bax (Miyashita *et al.*, 1994), Puma (Nakano y Vousden, 2001), Noxa (Oda *et al.*, 2000) y Bid (Sax *et al.*, 2000). Los promotores de todos estos genes comparten el elemento de respuesta a p53. Adicionalmente p53 también puede activar la transcripción de genes que codifican para proteínas efectoras de la ruta apoptótica, como es el caso del gen que codifica para Apaf-1, quien actúa como un co-activador de la caspasa 9 ayudando a iniciar la cascada de activación. La p53 también induce la expresión de caspasa 6, proteína efectora de la cascada apoptótica (Fridman y Lowe, 2003).

El NFκB es un factor transcripcional que se encuentra normalmente secuestrado por IκB en el citoplasma. Al ocurrir una señal de peligro para la célula, IκB es fosforilado y luego ubiquitinado para su ulterior degradación por el proteosoma; provocando la liberación de NFκB y ulterior traslado hacia el núcleo, donde interactúa con elementos de respuesta de los promotores de los genes que están bajo su regulación, entre los que están proteínas anti-apoptóticas que actúan a nivel mitocondrial (Bcl-xL y Bfl-1), o bloquea la activación de las caspasas al promover la expresión de las IAPs (Nakanishi y Toi, 2005; Karin, 2006).

La proteína Rb se encuentra constitutivamente expresada en las células animales y los cambios en su estado de fosforilación determinan su función. En el ciclo celular, Rb media la transición de la fase G1 a S. Al inicio de la fase G1, Rb se encuentra hipofosforilada (estado activo) y es capaz de unirse al factor de transcripción E2F, impidiendo la transcripción de genes importantes para la progresión del ciclo. Este equilibrio se rompe cuando Rb es fosforilada por quinasas dependientes de ciclinas y se separa del E2F, iniciando la transcripción de genes importantes para el ciclo celular (Knudsen *et al.*, 2006). Rb también inhibe la transcripción mediada por E2F, de genes claves en la apoptosis como Apaf1 y algunas caspasas (Echevarría-Machado *et al.*, 2002; DeGregori, 2004). En la apoptosis, la función de Rb puede ser regulada a través de su degradación mediada por caspasas.

Principales efectores de la apoptosis

Caspasas. Las caspasas son proteínas altamente conservadas en la naturaleza, presentes en organismos tan diferentes como nemátodos, insectos y mamíferos (Riedl y Shi, 2004). Son esencialmente cisteín-pro-

teasas aspartato-específicas, lo que significa que son proteasas que poseen un aminoácido cisteína en su sitio activo y son capaces de reconocer motivos de cuatro aminoácidos contiguos en sus sustratos, P4-P3-P2-P1, cortando el enlace peptídico después del extremo C-terminal del residuo (P1), que es generalmente un residuo Asp (Shi, 2002). La preferencia hacia el residuo en la posición P4 varía entre diversos grupos de caspasas y eso contribuye a su especificidad con respecto a ciertos sustratos (Hawkins *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2006).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, los que tienen un dominio regulador N-terminal que les confiere una baja actividad enzimática y dominios p20 y p10 que conforman la enzima activa.

De acuerdo a su función, las caspasas se clasifican en dos tipos: a) caspasas iniciadoras que activan otras caspasas aguas abajo y de esta forma se establece una cascada de caspasas que amplifica la señal de inicio del programa de muerte celular; y b) caspasas efectoras que son capaces de inactivar una serie de enzimas claves en la homeostasis celular como la Poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) y, por otra parte, son capaces de activar otras proteínas pro-apoptóticas como CAD (*Caspase-activated DNase*), al separarla de su inhibidor ICAD (Hengartner, 2000; Strasser *et al.*, 2000).

Proteínas de la superfamilia Bcl-2. Como se mencionó, estas proteínas se caracterizan por actuar a nivel mitocondrial, permitiendo o impidiendo la liberación de factores pro-apoptóticos al citosol. Esta familia se divide en tres grupos basados en parentescos tanto estructurales como funcionales.

Los miembros de la subfamilia Bcl-2, tales como Bcl-XL, A1, Bcl-W y Mcl1 poseen actividad anti-apoptótica y están caracterizados por poseer cuatro dominios BH homólogos a Bcl-2. Estas proteínas también poseen una cola hidrofóbica en su extremo C-terminal, que las ubican en la superficie externa de la mitocondria y en el retículo endoplasmático.

Los miembros pro-apoptóticos de la superfamilia Bcl-2 se clasifican en dos sub-familias, la de dominio único BH3 y Bax, la cual comparte tres dominios BH con la sub-familia Bcl-2, además de su cola hidrofóbica. La familia antiapoptótica Bcl-2 la componen Bcl-2, Bcl-x y Bcl-w, que son homólogas e inhiben la apoptosis en gran variedad tejidos y organismos. El extremo C-terminal de estas proteínas las dirige hacia la membrana citoplasmática de la mitocondria y el retículo endoplasmático. Bcl-2 siempre se encuentra como una proteína integral de membrana, mientras que Bcl-w y Bcl-x_L aparecen en respuestas a

agentes citotóxicos. Todas poseen un surco hidrofóbico formado por cinco α -hélices anfipáticas, que a su vez se encuentran alrededor de otras dos α -hélices centrales hidrofóbicas. Este surco conforma los motivos BH1, BH2 y BH3 e interactúa con proteínas de motivos BH3 a través de una α -hélice en su motivo BH3 (Cory y Adams, 2002; Walensy, 2006).

Subfamilia de proteínas con motivos BH3. Los miembros de este grupo son fuertemente expresados durante la apoptosis, como respuesta a señales específicas durante el desarrollo y daño celular (Huang y Strasser, 2000). A excepción de Bid, se piensa que todas las demás integrantes actúan uniéndose y neutralizando su contraparte apoptótica. Sin embargo, ninguno de los miembros de esta familia puede producir apoptosis sin la presencia de Bax y Bak, y por lo tanto de otros integrantes que están aguas arriba de esta ruta.

La Subsubfamilia Bax. Bax y Bak están ampliamente distribuidos en casi todos los tejidos, pero no así Bok, más relacionado con el tejido reproductivo. La inactivación de Bak o Bax afecta pobremente la apoptosis, mientras que la ausencia de ambas produce efectos dramáticos en gran variedad de tejidos, lo que supone cooperación entre ambos miembros para poder mantener la respuesta bajo un determinado estímulo.

Posibles mecanismos de acción de los miembros del clan Bcl-2

Se ha sugerido que los miembros de la superfamilia Bcl-2 pueden actuar de muy diversas maneras (Hengartner, 2000): a) A través de la formación de un canal que permite la salida al citosol de proteínas antiapoptóticas como el Citocromo C. b) Por heterodimerización entre los miembros anti- y proapoptóticos de esta superfamilia, contrarrestando así el efecto de uno sobre el otro, en cuyo caso la respuesta dependería de la relación entre ellos. c) Mediante la regulación directa de caspasas a través del secuestro de moléculas adaptadoras, como se ha descrito en *C. elegans*. Si se considera a Ced-4 como homólogo de Apaf-1 (presente en humanos), algunos miembros de la familia Bcl-2 podrían inhibir la actividad de la holoenzima conocida como apoptosoma, mediante la interacción con proteínas mitocondriales tales como VDAC y el transportador del nucleótido adenosina (ANT), generando un poro que permita la salida del Citocromo C o que desestabilice la homeostasis mitocondrial (como el PTP; *permeability transition pore*). Finalmente, d) por medio de su oligomerización para formar un canal iónico pobremente selectivo.

La Muerte Celular Programada (MCP) en las Plantas

En las plantas, la MCP es el mecanismo por el cual se regula una serie de procesos fisiológicos que a continuación se revisan y juega un papel importante en procesos como resistencia a condiciones ambientales desfavorables (carencia de nutrientes, temperaturas extremas, hipoxia, estrés oxidativo) y ataques de patógenos.

Germinación. Las semillas de las plantas superiores concentran la energía necesaria para el proceso de germinación (Raven *et al.*, 1999). Estas reservas deben ser hidrolizadas para proporcionar el N₂ y C necesarios en las primeras etapas de la vida de la planta. En las monocotiledóneas como arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*) y avena (*Avena sativa*) tales reservas se almacenan en el endospermo, rico en almidón, que constituye la parte principal de la semilla. Ésta presenta una delgada capa de células especializadas conocidas como estrato aleurónico, las cuales están situadas en la periferia del endospermo y poseen reservas peptídicas y lipídicas, así como enzimas hidrolíticas necesarias para la degradación de las reservas de almidón. Al contrario de las células del endospermo, las del estrato aleurónico están vivas y mueren mediante una MCP durante la germinación. Este proceso está controlado por fitohormonas; el ácido giberélico activa este tipo de muerte y la hidrólisis de las reservas, mientras que el ácido abscísico retrasa el proceso. La muerte de las células del sustrato aleurónico se caracteriza por vacuolización, activación de nucleasas (y proteasas), y desaparición de organelos, culminando en una pérdida precipitada de la integridad de la membrana plasmática (Fath *et al.*, 2000). Además de las características antes mencionadas, Domínguez *et al.* (2004) mostraron que las células del estrato aleurónico que pasan por un proceso de MCP generan tanto condensación de la cromatina como fraccionamiento internucleosomal del ADN.

Crecimiento y diferenciación. El extremo apical de las raíces está provisto de una cofia de células muertas denominadas caliptra que se renueva continuamente, protegiendo el meristemo radical contra la abrasión en el período de crecimiento de las raíces, proceso caracterizado por condensación de la cromatina y fragmentación de su material genético (Wang *et al.*, 1996). El ejemplo mejor caracterizado es el de *Zinnia elegans* durante la diferenciación de los elementos vasculares (Fukuda, 2000), donde estos últimos están conformados por células muertas, con la pared celular en forma de tubos (Figura 1) para mejorar el transporte de agua. La diferenciación del procambium de los elementos

vasculares está caracterizada por la entrada de Ca²⁺ en la célula, la acumulación de nucleasas y proteasas, lo que culmina con el colapso de las vacuolas. En ese momento se liberan enzimas hidrolíticas que degradan el contenido celular, quedando solo un tubo vacío (Groover y Jones, 1999; Fukuda, 2000)

Reproducción y desarrollo floral. La MCP también puede determinar el sexo de las plantas. La mayoría de las angiospermas son hermafroditas, aunque ciertas especies tienen sexo separado por planta. Otras especies, como el maíz, tienen ambos sexos en la misma planta, pero las estructuras reproductivas (gineceo y androceo) están ubicadas en flores separadas (Wu y Cheung, 2000). El meristemo apical puede dar lugar a los cuerpos de los dos sexos, surgiendo la flor unisexual como producto de la eliminación de uno de los dos. En las anteras, la producción de granos funcionales de polen y su dispersión se debe a la MCP del tapetum y del stomium, respectivamente (Figura 1).

Fecundación de las angiospermas. Cuando un polen compatible se une al estigma, se activa el desarrollo del tubo polínico y su paso hasta el óvulo es facilitado por la MCP de las células vecinas del pistilo. Posteriormente, el tubo polínico penetra en el óvulo al abrirse paso entre las células del tegumento que mueren concertadamente por MCP. Tras la fertilización, otras células alrededor del óvulo también mueren y los pétalos de la flor, que ya no son útiles (convenientes para atraer a los polinizadores), entran en senescencia (Rubinstein, 2000). En el caso que un polen incompatible se una al estigma, las células en el pistilo activan un tipo de MCP en el tubo polínico, previniéndose de esta forma la fecundación (Stone *et al.*, 2003; Newbiggin y Vierstra, 2003). Con tantos casos de MCP implicados en el desarrollo de los cuerpos reproductivos y del proceso de la fertilización, no es sorprendente observar que las anomalías en el mecanismo de MCP a este nivel conlleven a la esterilidad vegetal.

Producción de semillas. Este proceso requiere también de la muerte de tejidos, siendo el caso del endospermo de los cereales el más estudiado (Young y Gallie, 2000). Durante la formación de la semilla, la mayoría de las células del endospermo mueren por MCP, mientras que las de la capa externa (estrato aleurónico) mueren solamente durante la germinación (Figura 1). En este caso se observa la fragmentación internucleosomal del ADN. El etileno desempeña un papel clave en la activación de la MCP en el endospermo y el ácido abscísico influye de manera negativa en este proceso al interferir en la biosíntesis del etileno y, posiblemente, disminuyendo la sensibilidad a esta fitohormona (Young y Gallie, 2000; Mauch-Mani y Match, 2005).

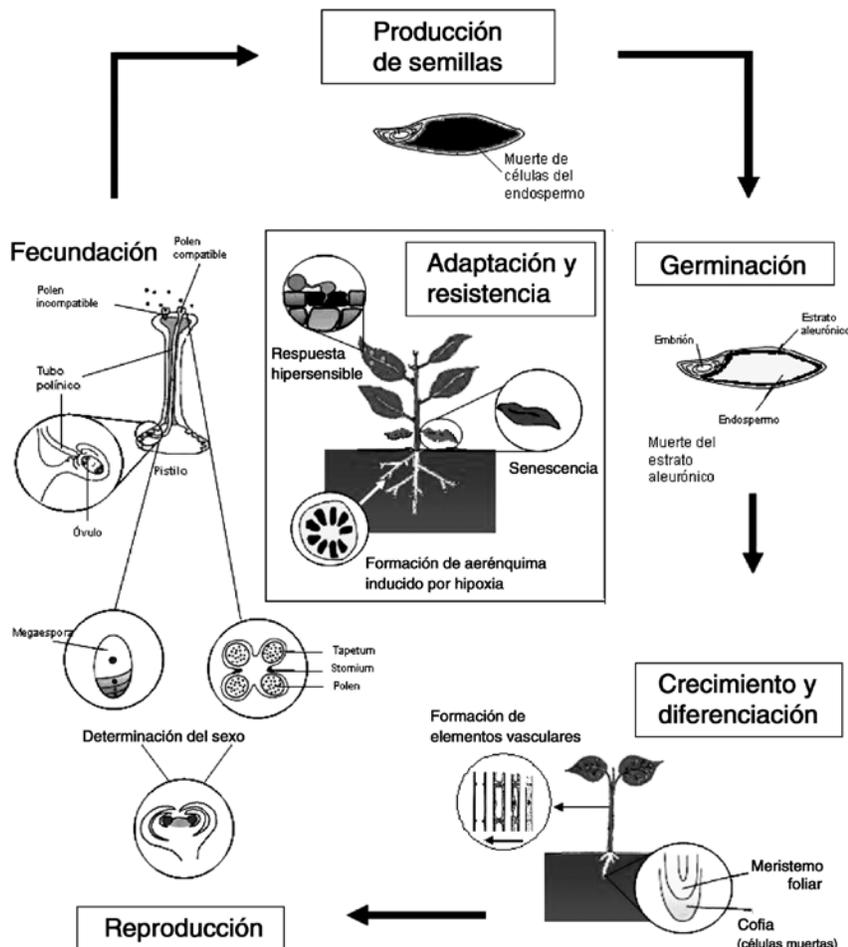


Figura 1. Muerte celular programada (MCP) en angiospermas. Durante la germinación, el estrato aleurónico o los cotiledones (no mostrados) proporciona la energía para la MCP. Los elementos vasculares y cofias de las raíces están constituidas por células muertas de manera concertada. El meristemo apical floral puede dar lugar a anteras o carpelos; en las especies con flores unisexuales como el maíz, uno de éstos se desarrolla y el otro muere. En la flor femenina una megaspora haploide formará el gametofito, las tres otras células mueren por MCP. En las anteras, el tapetum degenera para suplir la formación del polen y la muerte del stomium permite su dispersión. En la polinización, la llegada al pistilo de polen incompatible causa la muerte del tubo polínico, mientras que un polen compatible causa crecimiento del tubo, y su paso es facilitado por la muerte de las células vecinas. El tubo polínico entra al óvulo por la abertura resultante de la muerte de una de las dos células que lo rodean; después de la fecundación, las células antípodas también mueren. La producción de la semilla implica MCP masiva en el endospermo. En toda su vida (centro enmarcado) la MCP permite resistir ataque de patógenos o adaptarse a la carencia de nutrientes u O_2 . Basado en Buckner *et al.* (1998) y Wu y Cheung (2000).

Respuesta al estrés biótico y abiótico en las plantas. En la medida que las hojas envejecen, son menos eficaces para realizar la fotosíntesis e inician un lento proceso de senescencia, caracterizado por pérdida de la clorofila, reflejada en el color pardo de las hojas, que culmina con la marchitez y, a menudo, la abscisión de la hoja. A nivel celular, la senescencia se caracteriza por el rol de las vacuolas en la digestión progresiva de organelos. Los cloroplastos desaparecen primero, luego las mitocondrias y finalmente el núcleo (Munné-Bosch y Alegre, 2004). El proceso de senescencia puede ser precedido por carencia de nutrientes (como N_2 y C), asociada a la autofagia en cultivos celulares (Aubert *et al.*, 1996; Moriyasu y Ohsumi, 1996).

La adaptación de las plantas a las condiciones ambientales adversas también manifiesta otros modelos tradicionales de MCP. Por ejemplo, cuando las raíces carecen de O_2 , como sucede cuando el suelo se inunda, las plantas sobreviven al fomentar la formación del aerénquima, un tejido poroso cuya función es facilitar el transporte del O_2 del vástago a las células de la raíz. La formación del aerénquima implica la muerte orquestada de células normales, dando lugar a la formación de cavidades que facilitan el intercambio gaseoso mientras se reduce el número de células que requieren O_2 . La hipoxia aumenta la producción del etileno, que induce la formación del aerénquima; a nivel celular, este tipo de muerte programada se acompaña de una importante vacuolización

(Jones, 2001). De igual forma, otros tipos de presiones externas, como tratamientos con radiación UV (Danon y Gallois, 1998), el H_2O_2 (McCabe *et al.*, 1997; Desikan *et al.*, 1998; O'Brien *et al.*, 1998), choque hipertérmico (McCabe *et al.*, 1997; Fan y Xing, 2004), choque hipotérmico (Koukalová *et al.*, 1997) o por activación de ionóforos de Ca (McCabe *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1998) han mostrado ser capaces de inducir MCP en cultivos celulares de plantas.

Sin embargo, el caso de MCP en plantas más estudiado hasta el momento es el que se conoce como respuesta hipersensible (RH; (Heath, 2000; Lam *et al.*, 2001). La RH se manifiesta en plantas resistentes a patógenos virales, bacterianos o fúngicos. Las plantas tienen un gen de resistencia R que se expresa en los tejidos circundantes a la zona atacada por un patógeno, produce su muerte y restringe la diseminación de la infección. Así, a pesar de que las plantas no tienen un sistema inmune sofisticado como los animales, han desarrollado mecanismos de defensa sutiles y eficaces, de los cuales la RH es quizás el más importante (Dangl y Jones, 2001; Seay *et al.*, 2006).

En conclusión, la MCP es un mecanismo vinculado estrechamente a todos los aspectos de la fisiología de las plantas. Sin embargo, la maquinaria molecular implicada en este tipo de muerte programada aun es poco comprendida.

Las Caspasas y Metacaspasas de Origen Vegetal

En las plantas, el ensamblaje celular por MCP implica la activación de una serie de proteasas. Conocida la importancia que tienen las caspasas en la apoptosis animal, no es sorprendente que gran parte de los estudios de la MCP en plantas esté dedicada a la búsqueda de sus contrapartes estructurales y funcionales. El análisis de varios genomas de plantas (como el de *A. thaliana* y algunas gramíneas) aún no ha reportado contrapartes vegetales de las caspasas a nivel de secuencia de aminoácidos. Sin embargo, varios trabajos han demostrado la existencia de una actividad proteolítica similar a caspasas, lo que es un fuerte argumento para creer que este tipo de proteína puede jugar un papel protegónico en la MCP vegetal. (D'Silva *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999; Lam y del Pozo, 2000; Woltering *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004)

De igual forma, se ha reportado la existencia de PARP con un alto grado de conservación tanto estructural como funcionalmente (Babiyshuk *et al.*, 1998; Doucet-Chabeaud *et al.*, 2001), y que su procesamiento por las caspasas, tanto exógeno (D'Silva *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999) como endógeno (Tian *et al.*, 2000),

ocurre también durante el transcurso de la MCP en plantas.

La enzima del procesamiento vacuolar (VPE), que interviene como agente ejecutor en plantas, es una cisteín-proteasa semejante a las caspasas, con la que comparten importantes propiedades estructurales. La VPE se localiza en la vacuola, mientras que las caspasas lo hacen en el citosol. La MCP mediada por vacuolas es única en plantas, ya que no se ha observado en animales, probablemente como consecuencia de la presencia de la pared celular (Hara-Nishimura *et al.*, 2005; Hatsugai *et al.*, 2006).

Las metacaspasas, por otro lado, han sido consideradas como candidatas de la regulación y ejecución de la MCP en las plantas (Van der Hoorn y Jones, 2004). Su estructura tridimensional tipo hemoglobina se agrupa en una superfamilia de proteasas, junto a las caspasas, paracaspasas, legumainas y gingipainas (Dietrich *et al.*, 1997; Uren *et al.*, 2000).

Las metacaspasas se dividen en dos clases relativamente bien definidas. Las de tipo I, como las gingipainas, se caracterizan por un predominio con motivos repetidos ricos en prolina o glutamina (Dietrich *et al.*, 1997). Varias de ellas también tienen en su predominio motivos tipo "dedos de cinc" que se asemeja a la proteína Isd-1, un inhibidor de la RH que actúa posiblemente como factor de transcripción (Uren *et al.*, 2000). Las metacaspasas del tipo II, encontradas solamente en plantas, no contienen predominio sino una extensión del extremo C-terminal de ~200 aminoácidos.

Otras Proteasas

Adicionalmente, otras clases de proteasas pudieran tener un papel protagónico en el desarrollo de la MCP en plantas; sin embargo, aun no se comprende bien su mecanismo de acción. En primer lugar, las cisteín proteasas (diferentes a las caspasas y metacaspasas) como la familia de la papaína (Beers *et al.*, 2000) y las fitocalpains, son dependientes de Ca. Las fitocalpains han sido encontradas en varios tipos de plantas, tanto angiospermas como gimnospermas, hallándose solo una por especie hasta el momento (Ahn *et al.*, 2004; Grudkowska y Zagdańska, 2004). De estos dos grupos de proteasas, las fitocalpains tienen un particular interés debido a la implicación de sus contrapartes animales en la apoptosis.

Las serín proteasas también han sido asociadas a varios modelos de MCP. Entre las enzimas con una actividad similar a la tripsina y de la superfamilia de las subtilisinas están las halladas en plantas como *Arabidopsis* y *Lycopersicon*. Asimismo, otras serín proteasas importantes en la

apoptosis, como Omi/HtrA, han sido encontrados en plantas por homología de secuencia (Koonin y Aravind, 2002), aunque su expresión y función no ha sido comprobada.

Coffeen y Wolpert (2004) lograron purificar dos proteasas implicadas en la MCP en plantas. Sus estudios mostraron que estas proteasas, a pesar de presentar una actividad similar a caspasas, contienen en el sitio activo un residuo de Ser, por lo que definieron a estas proteínas como saspasas (serín-proteasas aspartato específicas).

En plantas solo se ha podido hallar un tipo de aspartil proteasas conocidas como fitepsinas. Éstas se sintetizan en forma de propéptidos, similar a las aspartil proteasas bacterianas y a la Catepsina D, asociadas a ejemplos de MCP en animales (Beers *et al.*, 2000). Varios trabajos han relacionado el sistema ubiquitina-proteasoma como regulador de la MCP en plantas (Kim *et al.*, 2003; Newbiggin y Vierstra, 2003); sin embargo, los mecanismos implicados y su papel fisiológico no están todavía claros.

Nucleasas

La degradación coordinada del material genético a través de la activación de nucleasas específicas constituye uno de los caracteres más distintivos durante la MCP. En el reino vegetal se conocen dos clases importantes de endonucleasas (dependientes de Zn²⁺ y de Ca²⁺), muchas de las cuales han estado asociadas a la MCP (Sugiyama *et al.*, 2000). Por ejemplo, Ito y Fukuda (2002) observaron que la nucleasa proveniente de *Zinnia elegans* (ZEN1) es la enzima que se encarga de la fragmentación del ADN durante la diferenciación de los elementos vasculares.

En células animales la endonucleasa G y AIF son liberadas del espacio intermembranal de las mitocondrias hacia el núcleo, causando la degradación del ADNg, independientemente de las caspasas. Estas proteínas se encuentran igualmente conservadas en las plantas, lo que las hace candidatas para la misma función en el reino vegetal. Apoyando esta idea, recientemente se reportó la existencia de dos tipos de actividad de DNasa dependientes de Mg²⁺ en el espacio intermembrana de mitocondrias de *Arabidopsis thaliana* (Balk *et al.*, 2003). La primera actividad generó fragmentos grandes de ADN de aproximadamente 30kpb, induciendo condensación de la cromatina (similar a AIF), mientras que la segunda requirió la contribución de algún factor citosólico para generar fragmentación internucleosomal del ADNg, de manera similar a la endonucleasa G. Estos hallazgos apoyan la idea que durante la MCP en plantas, al igual que en animales, la fragmentación del ADN ocurre en dos etapas. No obstante, estas proteínas no han podido ser estudiadas directamente.

Rutas de Señalización y su Regulación

A pesar que en la actualidad hay abundante información sobre las rutas y los reguladores por lo cuales se lleva a cabo la MCP en animales, en las plantas estos conocimientos son pobres. La búsqueda de posibles semejanzas entre este tipo de muerte y la apoptosis ha permitido esbozar rutas de señalización comunes, pero la identificación de las proteínas implicadas en ellas ha sido un trabajo poco fructífero.

Las fitohormonas influyen y controlan prácticamente todos los aspectos de la fisiología vegetal (Raven *et al.*, 1999). La respuesta ante las diferentes fitohormonas es compleja y varía de un tipo celular a otro, debido principalmente a la sensibilidad diferencial a estos compuestos. Se conoce desde hace tiempo que el etileno induce la senescencia, la abscisión y la diferenciación del aerénquima (Oraez y Granell, 1997). La muerte del sustrato aleurónico durante la germinación representa el modelo mejor conocido de control hormonal de la MCP en plantas; el ácido giberélico induce este proceso, mientras que el ácido absísico lo retrasa. Igualmente, el ácido salicílico es un compuesto fenólico con un papel importante en los mecanismos de defensa en las plantas (Álvarez, 2000; Halim *et al.*, 2006). Finalmente, el ácido jasmónico también ha sido asociado con la activación del mecanismo de defensa en las plantas (RH). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la MCP por las fitohormonas siguen siendo desconocidos (Lam, 2004).

Por otro lado, se ha especulado que los productos de los genes R se ubican aguas arriba en las rutas que llevan a la MCP (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000). El clonamiento y la caracterización de estos genes y el acceso a los genomas de plantas, han permitido revelar que su estructura general está muy conservada, siendo su diversidad adjudicada al patógeno que reconocen (Dangl y Jones, 2001). La mayor de las familias de genes R es llamada NB-LRR y codifica proteínas generalmente citoplásmicas compuestas de una región de unión a nucleótidos (NB; *nucleotide binding*) y una región de repeticiones ricas en leucina (LRR; *leucine-rich repeats*). Es de interés que estas proteínas son estructuralmente similares a otras que tienen un papel conocido en la apoptosis, tal como Apaf-1/CED-4, así como la presencia de dominios de muerte tipo CARD (*caspase recruitment domain*). CED-4/Apaf-1 representa uno de los componentes del complejo ternario llamado apoptosoma, que es producto de señales extracelulares que conllevan a la activación de las caspasas y, por ende, de la MCP. Este tipo de proteínas se unen en pentámeros con el nombre de motivo AP-ATPasa y se encuen-

tra en varios organismos procariotas, lo que sugiere un origen ancestral común (Dangl y Jones, 2001; Koonin y Aravind, 2002).

Asimismo, las especies reactivas de O₂ (ROS) también son reconocidas como elementos significativos de la señalización en varios modelos de MCP en plantas (Neuenschwander, 1995; Rao *et al.*, 1996; Delle Donne *et al.*, 2001; Fath *et al.*, 2002; Pillinen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). En condiciones normales existen mecanismos celulares que evitan la acumulación accidental de H₂O₂ y sus efectos nocivos, pero una gran variedad de estímulos, tanto bióticos como abióticos, incrementa la producción de este compuesto. La exposición al H₂O₂ causa varias respuestas celulares, como la activación de MAPK quinasas, aumento o represión de la transcripción de varios genes, la entrada de Ca²⁺ a la célula, aumento en la producción de NO, así como la acumulación de ácido salicílico y etileno (Ogawa *et al.*, 2005). Los mecanismos implicados no están del todo dilucidados.

Otra característica común entre plantas y animales observada durante la MCP es la liberación de Citocromo C al citoplasma (Sun *et al.*, 1999; Pasqualini *et al.*, 2003). Tiwari *et al.* (2002) mostraron que en cultivos celulares de *Arabidopsis*, la exposición corta a una alta concentración de H₂O₂, o una más prolongada a bajas concentraciones, causa un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno vía una aceleración en la cadena respiratoria, trayendo como consecuencia una pérdida de ATP, liberación de citocromo C de la mitocondria y finalmente la muerte celular. La inducción de la MCP por calor en cultivos de pepino produjo la salida de Citocromo C hacia el citoplasma (Balk *et al.*, 1999). La liberación de Citocromo C de las mitocondrias tanto en animales como plantas sugiere que es un evento conservado durante la evolución y probablemente derivado de un ancestro común.

Los Reguladores en la MCP en Plantas

Hasta la fecha se han caracterizado varios mutantes con una inadecuada MCP, particularmente los relacionados con la RH (Heath, 2000). Mutaciones en los genes LSD de *A. thaliana* y MLO de *H. vulgare* generan plantas con un fenotipo similar a la RH, sin necesidad de interacción con algún patógeno. Ambos genes han sido reportados en monocotiledóneas y en dicotiledóneas, siendo específicos para las plantas. Aunque se conocen ciertas características de las proteínas codificadas por estos genes, su modo de acción aún está por dilucidarse (Lam, 2004).

Con respecto a las proteínas de la superfamilia Bcl-2, no se han encontrado sus contrapartes en el reino vege-

tal. Sin embargo, varios reguladores de esta familia han mostrado su funcionalidad en plantas. Por ejemplo, Mitsuhashi *et al.* (1999) evidenciaron que plantas de tabaco que expresan de manera heteróloga las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL o Ced-9 son resistentes a la MCP inducida por UV o por el virus del mosaico del tabaco (TMV). Lacomme y Santa Cruz (1999) utilizaron el mismo modelo experimental y mostraron que la expresión heteróloga de Bax era capaz de causar lesiones similares a las que ocurren durante la RH. Dickman *et al.* (2001) demostraron que plantas de tabaco que expresan proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL, Ced-9 o Op-IAP eran resistentes a varios patógenos fúngicos. Chen y Dickman (2004) mostraron que los genes Bcl-2, Bcl-xL y CED-9 al ser expresados en *N. tabacum* son capaces de localizarse en el cloroplasto, además de la mitocondria como cabría esperar, observando también que dichas líneas transgénicas eran resistentes a herbicidas cloroplasto-específicos.

Otra prueba indirecta de la existencia de este tipo de proteínas en plantas es el hallazgo de Bi-1 (Bax inhibidor-1) en *O. sativa* (OsBI-1) y en *Arabidopsis* (AtBI-1), capaz de prevenir la MCP inducida por Bax en levaduras (Kawai *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000).

Todos estos hallazgos constituyen fuertes evidencias acerca de la existencia de las contrapartes vegetales de estas proteínas, así como del papel regulador de la mitocondria y otros organelos propios de las plantas como son los cloroplastos.

Regulación transcripcional

En las plantas se han encontrado secuencias muy similares a las que codifican proteínas con roles importantes en la regulación transcripcional de la apoptosis, tales como Rb y p53. Con respecto a los homólogos vegetales de la proteína retinoblastoma (Rb), varios estudios *in vitro* han mostrado su similitud funcional como proteína reguladora (Echevarría-Machado *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005).

Por otro lado, se aisló un gen (NIM1) de *A. thaliana* que codifica para una proteína homóloga a Ik-β, la cual aparentemente exhibe funciones similares a las ya conocidas para esta proteína en el proceso apoptótico. El gen MINI es regulador de la producción de ácido salicílico e inductor de la expresión de genes relacionados con la patogénesis y resistencia adquirida (Weigel *et al.*, 2005). Esto constituye una prueba indirecta sobre la existencia en el reino vegetal de otro de los reguladores claves de la apoptosis, como es NFκB (Ryals *et al.*, 1997).

En conclusión, la MCP es esencial y ubicua, tanto en animales como en plantas. Aunque ciertos reguladores y

efectores de la apoptosis aun no han sido encontrados en plantas, existen similitudes morfológicas, bioquímicas y funcionales que sugieren que la MCP es un proceso muy conservado en la evolución. Se puede inferir, a partir de la evidencia presente en la literatura, que ciertas vías que operan en la MCP están funcionalmente conservadas entre el reino animal y el vegetal, y en algunos casos los reguladores vegetales pueden producir iguales efectos en los animales y viceversa. Todavía resta por identificar las particularidades de los mecanismos de acción que seguramente existen en ambos reinos, donde la genómica funcional, al igual que la proteómica comparada, apenas comienza a jugar un papel muy importante.

REFERENCIAS

- Ahn JW, Kim M, Lim JH, Kim GT, Pai HS (2004) Phytoalexin controls proliferation and differentiation fates of cells in plant organ development. *Plant J.* 38: 969-981
- Álvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant. Mol. Biol.* 44: 429-442.
- Arvelo F (2002) Mitocondria y Apoptosis. *Acta Cient. Venez.* 53: 297-306.
- Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J. Cell Biol.* 133: 1251-1263.
- Babiychuk E, Cottrill PB, Storozhenko S, Fuangthong M, Chen Y, O'Farrell MK, Van Montagu M, Inzé D, Kushnir S (1998) Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J.* 15: 635-645.
- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF (1999) Translocation of Cytochrome C from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett.* 463: 151-154.
- Balk J, Chew SK, Leaver CJ, McCabe PF (2003) The intermembrane space of plant mitochondria contains a DNase activity that may be involved in programmed cell death. *Plant J.* 34: 573-583.
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 399-415
- Buckner B, Janick Buckner D, Gray J, Johal GS (1998) Cell-death mechanisms in maize. *Trends Plant Sci.* 3: 218-223.
- Chen S, Dickman MB (2004) Bcl-2 family members localize tobacco chloroplasts and inhibit programmed cell death induced by chloroplast-targeted herbicides. *J. Exp. Bot.* 55: 2617-2623.
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl-2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2: 647-656.
- Coffeen WC, Wolpert TJ (2004) Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* 16: 857-873.
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature* 411: 826-833.

- Danon A, Gallois P (1998) UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 437: 131-136.
- DeGregori J (2004) The Rb network. *J. Cell Sci.* 117: 3411-3413.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediate in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13454-13459.
- Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Neill SJ (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* 330: 115-120.
- Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6957-6962.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangel JL (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88: 685-694.
- Domínguez F, Moreno J, Cejudo J (2004) A Gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of Wheat Aleurone cells undergoing programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 279: 11530-11536.
- Doucet-Chabeaud G, Gordon C, Brutesco C, de Murcia G, Kazmaier M (2001) Ionizing radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in *Arabidopsis*. *Mol. Genet. Genom.* 265: 954-963.
- D'Silva I, Poirier GG, Heath MC (1998) Activation of cysteine proteases in cowpea plants during the hypersensitive response: a form of programmed cell death. *Exp. Cell Res.* 245: 389-399.
- Echevarría-Machado I, Loyola-Vargas VM, Hernández-Sotomayor T (2002) La proteína Retinoblastoma en plantas. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 46: 117-122.
- Fan T, Xing T (2004) Heat shock induces programmed cell death in wheat leaves. *Biol. Plant.* 48: 389-394.
- Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R (2000) Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol. Biol.* 44: 255-266.
- Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R (2002) Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J. Exp. Bot.* 53: 1273-1282.
- Fridman JS, Lowe SW (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22: 9030-9040.
- Fukuda H (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44: 245-253.
- Groover A, Jones AM (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119: 375-384.
- Grudkowska M, Zagdańska B (2004) Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* 51: 609-621.
- Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosal S (2006) The role of Salicylic acid and Jasmonic acid in pathogen defense. *Plant Biol.* 8: 307-313.
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi H, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 404-408.
- Hatsugai N, Kuroyanagi M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2006) A cellular suicide strategy of plants: Vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* 11: 905-911.
- Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernooy SY, Hay BA (2000) The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J. Biol. Chem.* 275: 27084-27093.
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44: 321-334.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Huang DCS, Strasser A (2000) BH3-only proteins: essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103: 839-842.
- Ito J, Fukuda H (2002) ZEN1 Is a Key Enzyme in the Degradation of Nuclear DNA during Programmed Cell Death of Tracheary Elements. *Plant Cell* 14: 3201-3211.
- Jones AM (2001) Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* 125: 94-97.
- Karin M (2006) Nuclear factor κ B in cancer development and progression. *Nature* 441: 431-435.
- Kawai M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H (1999) Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.* 464: 143-147.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
- Kim M, Ahn JW, Jin UH, Choi D, Paek KH, Pai HS (2003) Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *J. Biol. Chem.* 278: 19406-19415.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2006) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57: 545-553.
- Knudsen ES, Sexton CR, Mayhew CN (2006) Role of the retinoblastoma tumor suppressor in the maintenance of genome integrity. *Curr. Mol. Med.* 6: 749-757.
- Koonin E, Aravind L (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Diff.* 9: 394-404.
- Koukalová B, Kovarik A, Fajkus J, Siroký J (1997) Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Lett.* 414: 289-292.
- Lacomme C, Santa Cruz C (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7956-7961.
- Lam E (2004) Controlled Cell Death, Plant Survival and Development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 305-315.
- Lam E, del Pozo O (2000) Caspase-like involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 417-428.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.
- Le Bras M, Rouy I, Brenner C (2006) The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis. *Med. Chem.* 2: 1-12.
- Mauch-Mani B, Match F (2005) The role abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 409-414.
- McCabe PF, Levine A, Meijer PJ, Tapon NA, Pennington RI (1997) A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. *Plant J.* 12: 267-280.
- Mitsuhara I, Malik KA, Miura M, Ohashi Y (1999) Animal cell-death suppressors Bcl-x (L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Curr. Biol.* 9: 775-778.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805.
- Moriyasu Y, Ohsumi Y (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 111: 1233-1241.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct. Plant Biol.* 31: 203-216.
- Nakanishi CH, Toi M (2005) Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 5: 297-309.
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7: 683-694.
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friedrich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1995) Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8: 235-245.
- Newbigin E, Vierstra RD (2003) Plant reproduction: Sex and self-denial. *Nature* 423: 229-230.
- O'Brien IEW, Baguley BC, Murray BG, Morris BAM, Ferguson IB (1998) Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *Plant J.* 13: 803-814.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-1058.
- Oqawa D, Nakajima N, Sanot T, Tamaoki M, Aono M, Kubo A, Kanna M, Ioki M, Kamada H, Saji H (2005) Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 46: 1062-1072.
- Oraez D, Graneli A (1997) The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Letters* 404: 275-278.
- Park JA, Ahn JW, Kim YK, Kim SJ, Kim JK, Kim WT, Pai HS (2005) Retinoblastoma Protein regulates proliferation, differentiation and endoreduplication in plants. *Plant J.* 42: 153-163.
- Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F (2003) Ozone-Induced Cell Death in Tobacco Cultivar Bel W3 Plants. The Role of Programmed Cell Death in Lesion Formation. *Plant Physiol.* 133: 1122-1134.
- Pillinen RI, Korhonen M, Tauriainen AA, Tapio Palva E, Kangasjärvi J (2002) Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch. *Plant Physiol.* 130: 549-560.
- Porter AG, Urbano A (2006) Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death? *Bioessays* 28: 834-843.
- Ranganath RM, Nagashree NR (2001) Role of programmed cell death in development. *Int. Rev. Cytol.* 202: 159-242.
- Rao L, Pérez D, White E (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135: 1441-1455.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (1999) *Biology of Plants*. 6th ed. Freeman. Nueva York, EEUU. 944 pp.
- Reed JC (2000) Mechanisms of Apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157: 1415-1430.
- Riedl SJ, Yigong S (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Review-Mol. Cell. Biol.* 5: 897-907.

- Rubinstein B (2000) Regulation of cell death in flower petals. *Plant Mol. Biol.* 44: 303-318.
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney DP, Jesse T, Vos P, Uknes S (1997) The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IKB. *Plant Cell* 9: 425-439.
- Sánchez P, de Torres Zabala M, Grant M (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J.* 21: 393-399.
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El Deiry WS (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat. Rev. Cell Biol.* 4: 842-849.
- Seay M, Patel S, Dinesh-Kumar SP (2006) Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 8: 899-906.
- Shen HM, Pervaiz S (2006) TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *Faseb J.* 20: 1589-1598.
- Shi Y (2002) Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell* 9: 459-470.
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 371-385.
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003) ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible Brassica pollen. *Plant Cell* 15: 885-898.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217-245.
- Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, Fukuda H (2000) Endonucleases. *Plant Mol. Biol.* 44: 387-397.
- Sun YL, Zhao Y, Hong X, Zhai ZH (1999) Cytochrome c release and caspase activation during nemadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Lett.* 462: 317-321.
- Tian RH, Zhang GI, Yan CH, Dai YR (2000) Involvement of poly(ADP-ribose) and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.* 474: 11-15.
- Tiwari BS, Belenghi B, Levine A (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.* 128: 1271-1281.
- Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, Dixit VM (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6: 961-967.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999) Cell Death in Development. *Cell* 96: 245-254.
- Van der Hoorn RA, Jones JD (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 400-407.
- Walensy L (2006) BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Diff.* 13: 1339-1350.
- Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist DG (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-391.
- Weigel RR, Pfitzner UM, Gatz C (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 1279-1291.
- Woltering EJ, van der Bent A, Hoeberichts FA (2002) Do plant caspases exist? *Plant Physiol.* 130: 1764-1769.
- Wu H, Cheung AY (2000) Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol. Biol.* 44: 267-281.
- Yan N, Huh HR, Schirf V, Delemer B, Hay BA, Shi Y (2006) Structure and activation mechanism of the Drosophila initiator caspase Dronc. *J. Biol. Chem.* 281: 8667-8674.
- Young TE, Gallie DR (2000) Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 44: 283-301.
- Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH (2004) Autophagy and caspases: a new death program. *Cell Cycle* 3: 1124-1126.
- Zhang HK, Zhang X, Mao BZ, Li Q, He ZH (2004) Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. *Cell Res.* 14: 27-33.

PROGRAMMED CELL DEATH IN PLANTS: IT IS SIMILAR TO "APOPTOSIS" IN ANIMALS?

Yornayser Pérez Delgado, Iván Galindo Castro and Francisco Arvelo

SUMMARY

Programmed cell death (PCD) is essential to maintain tissue homeostasis in many forms of life. As in animals, in plants PCD is the mechanism whereby a series of physiological processes, such as germination, differentiation, growth, reproduction and seed development, are regulated. PCD plays a key role in other processes such as resistance to unfavorable environmental conditions. Unlike animal models, PCD in plants has been scarcely described at molecular level, which has given rise to controversy

about the parallelism between this type of PCD and the process known as apoptosis in animals. Nevertheless, evidences have come forth lately that allow to conclude that apoptosis occurs in plants as well. In this review, recent findings in this area in the plant kingdom are analyzed, which throw light on the modulation of the plant response against a diverse biotic and abiotic stress agent, paving the way for their use in genetic improvement programs for strategic crops.

A MORTE CELULAR PROGRAMADA NAS PLANTAS: É SEMELHANTE A "APOPTOSE" EM ANIMAIS?

Yornayser Pérez Delgado, Iván Galindo Castro e Francisco Arvelo

RESUMO

A morte celular programada (MCP) é essencial para manter a homeostase tissular em muitas formas de vida. Nas plantas, de igual forma que nos animais, a MCP é o mecanismo pelo qual se regulam uma série de processos fisiológicos tais como a germinação, diferenciação, crescimento, reprodução e desenvolvimento de sementes. A MCP também tem um papel importante em outros processos como o de resistência a condições ambientais desfavoráveis. Diferentemente dos modelos animais, a MCP em plantas é pouco descrita no nível molecular, o que há gerado debates sobre o paralelismo entre este tipo de morte programada

e o processo conhecido em animais como apoptose. No entanto, nos últimos anos tem surgido evidências importantes que permitem concluir que nas plantas existe tal processo. Nesta revisão se analisam descobertas recentes no reino vegetal para esta área, que começam a vislumbrar elementos chave sobre a modulação da resposta da planta diante de muitos diversos fatores de estresse, tanto biótico como abióticos e abrindo, além disso, a possibilidade de utilizá-los em programas de melhoramento genético de itens agrícolas estratégicos.