

# FOLATOS: SU SÍNTESIS, METABOLISMO, TRANSPORTE Y PAPEL EN EL DESARROLLO DE PLANTAS \*

Blanca Jazmín Reyes-Hernández<sup>1</sup>, Rocío I. Díaz de la Garza<sup>2</sup> y Joseph G. Dubrovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

<sup>2</sup>Escuela de Ingeniería y Ciencias, Centro de Biotecnología – FEMSA, Campus Monterrey, Tecnológico de Monterrey 64849, Mexico. Correo E: jdubrov@ibt.unam.mx.

## RESUMEN

El tetrahidrofolato (THF) y sus derivados (5-formil-THF, 10-formil-THF, 5-metil-THF, 5,10-metileno-THF, 5,10-metenil-THF) en conjunto son llamados folatos o vitamina B9. La deficiencia de estos compuestos en plantas como en otros organismos está relacionada con severas alteraciones en su desarrollo. Los animales no pueden sintetizarlos *de novo* y las plantas son su principal recurso. La función de los folatos radica en donar o aceptar unidades de carbono durante la síntesis de purinas, timidilato, metionina, pantotenato y formil-metionil-tRNA, así como en la interconversión serina-glicina y catabolismo de histidina. La síntesis de dichos metabolitos y la participación de los folatos en ella conforman una red compleja, parte del metabolismo de un carbono (1C). Estos aspectos metabólicos y el papel de los folatos en el desarrollo de plantas están revisados en este trabajo.

## PALABRAS

### CLAVE:

Folatos, vitamina B9, desarrollo de plantas.

## ABSTRACT

Tetrahydrofolate (THF) and its derivatives (5-formyl-THF, 10-formyl-THF, 5-methyl-THF, 5,10-methylene-THF, 5,10-methenyl-THF) are collectively called folates or vitamin B9. Folate deficiency in plants and other organisms causes severe alterations in their development. Animals cannot synthesize folates *de novo* and plants are the main source of them. Folates donate or accept carbon units for the synthesis of purines, thymidilate, methionine, pantothenate and formyl-methionyl-tRNA, and participate in serine-glycine interconversion and histidine catabolism. Folates, participating in the synthesis of these metabolites compose a complex network, known as one-carbon metabolism. These metabolic aspects and the role of folates in plant development are reviewed in this paper.

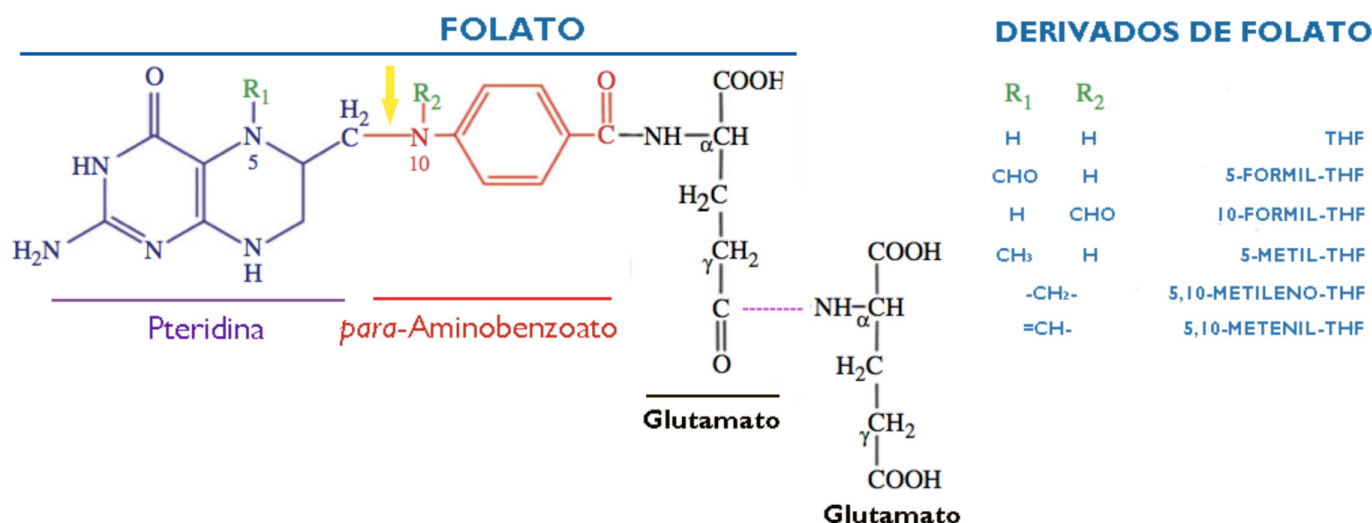
## KEY WORDS:

Folate, vitamin B9, plant development.

## INTRODUCCIÓN

Los folatos son compuestos conservados en todos los organismos, la forma más reducida es el THF compuesto por un anillo de pteridina, un *para*-aminobenzoato (*p*-ABA) y una cadena de glutamato (Glu) (entre 1 y 18) (Fig. 1). Las unidades de carbono que oxidan al THF (por ejemplo: formil, metileno o metil) se unen en las posiciones N5 de la pteridina o N10 del *p*-ABA, lo cual determina el derivado de THF y por lo tanto su participación en el metabo-

lismo de 1C (Fig. 1). La unión C9-N10 que une a la pteridina con el *p*-ABA de los folatos es susceptible a oxidación promoviendo la pérdida de su función (1). La poliglutamilación de los folatos puede modular este daño oxidativo, favorece su estabilidad y afecta su transporte. Los transportadores se unen con mayor afinidad a los folatos monoglutamilados (mono-Glu), mientras que la poliglutamilación (poli-Glu) induce su retención en los distintos organelos y tejidos y aumenta su afinidad como sustrato para las enzimas que los utilizan como cofactores.



**Figura 1.** Estructura de los folatos. La pteridina es mostrada en su forma tetrahidro. La flecha amarilla indica el enlace susceptible a oxidación. A la derecha se muestran los principales derivados de THF. La línea punteada rosa muestra la posición donde pueden añadirse más glutamatos. THF, Tetrahidrofolato. (Modificado de las referencias 20, 46, 51).

## FUNCIONES MEDIADAS POR FOLATOS

### Los Folatos Como Donadores de 1C

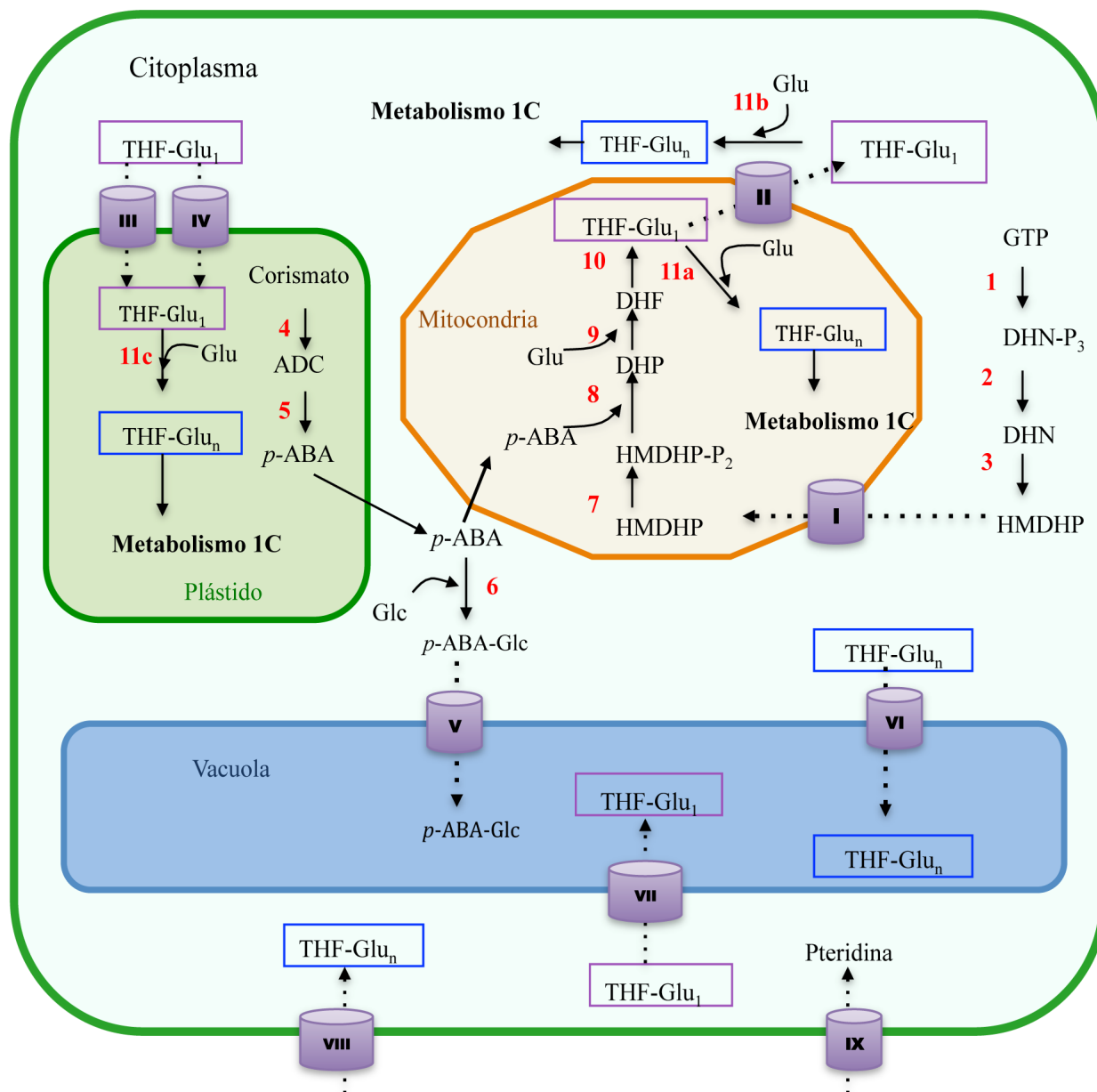
En la síntesis de purinas el C2 y C8 provienen del 10-formil-THF, el cual puede participar también en la síntesis de formil-metionina-tRNA, al final de las reacciones anteriores se reduce a THF compuesto aceptor de unidades de 1C. El 5,10-metileno-THF puede donar unidades de 1C para convertir dUMP a dTMP (timidilato, el cual es precursor de timina), por acción de la timidilato sintetasa (TS). Al final de la reacción anterior, el folato queda en forma de dihidrofolato (DHF) y puede reducirse nuevamente para formar THF, por acción de la DHF reductasa (DHFR), reacción que en plantas es catalizada por la enzima bifuncional DHFR-TS (2). En la síntesis de pantotenato (vitamina B5) también se utiliza 5,10-metileno-THF, el cual también puede reducirse a 5-metil-THF. Este último derivado de THF dona el grupo metilo a homocisteína para formar metionina, la cual puede ser convertida a S-adenosilmetionina, por la S-adenosilmetionina sintetasa, y participar en la síntesis de otros metabolitos. Los grupos metilo son necesarios para abastecer de S-adenosilmetionina a la célula, la cual es sustrato de metiltransferasas que metilan diversos sustratos como proteínas, lípidos, DNA y hormonas (3). Por último, entre los folatos donadores, el 5-metil-THF es necesario también para la síntesis de clorofila y lignina (4).

### Los Folatos Como Aceptores de 1C

Los folatos pueden participar como aceptores de 1C en la interconversión de serina y glicina, por acción de la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT). La serina puede donar 1C que se incorpora a THF para dar como producto glicina y 5,10-metileno-THF. Evidencias bioquímicas sugieren que la SHMT se encuentra en citosol, mitocondria y plástidos, indicando que la serina puede donar unidades de 1C en estos tres compartimentos (5). Por otro lado, la glicina sólo es capaz de aportar unidades de 1C a THF en la mitocondria como resultado de su oxidación, por el complejo glicina decarboxilasa (GDC), produciendo 5,10-metileno-THF durante la fotorespiración. Por lo tanto, SHMT y GDC son esenciales en las células de todos los tejidos de las plantas. Finalmente, en algunas bacterias y animales el catabolismo de la histidina en su último paso requiere del THF como aceptor. En este paso, un grupo formimino se transfiere al THF por acción de la enzima bifuncional formiminotransferasa-ciclododeaminasa, resultando en la formación de 5-formimino-THF (6). En plantas, particularmente en *Arabidopsis*, se conoce una proteína con un dominio formiminotransferasa que aún no ha sido caracterizada.

### BIOSÍNTESIS DE FOLATOS

Las moléculas que componen a los folatos son sintetizadas en compartimentos celulares distintos. La síntesis del anillo de pteridina ocurre en citosol



**Figura 2.** Síntesis, compartimentación y transporte de folatos (THF). 1-10 (en rojo), Pasos de la síntesis de folato (THF). 11a, b y c (en rojo), Muestra las 3 isoformas de la FPGS, enzima encargada de poliglutarilar las unidades de THF. I-IX (en morado), Transportadores propuestos en la vía de THF. Las líneas punteadas representan el transporte de las moléculas que señalan. THF son remarcados con recuadros purpura (monoglutamados) y azul (poliglutamados). (Modificado de la referencia 51).

mientras que la de *p*-ABA en plástidos y, la unión de estas dos moléculas y el primer glutamato ocurre en mitocondria (Fig. 2, (1-10)).

### Síntesis de la Pteridina

La síntesis de pteridina se realiza en el citosol en tres pasos. El primero, comienza con la conversión de GTP a dihidroneopterina (DHN) trifosfato, reacción en la cual participa la GTP-ciclohidrolasa

I (GCHI) (Fig. 2, (1)). La GCHI de plantas es un homodímero con dos dominios GCHI en tándem en cada monómero. Estos dominios se requieren para la actividad enzimática, sin embargo, no es claro como actúan catalíticamente (7). La carencia de secuencias señaladoras hacia organelos en GCHI sugiere que es una enzima citosólica. En el segundo paso, la DHN trifosfato se defosforila (Fig. 2, (2)) para formar DHN y esto ocurre en dos etapas. En plantas, así como en bacterias, durante

la primera etapa se remueve el pirofosfato para obtener DHN monofosfato. En *Arabidopsis*, una enzima de la familia Nudix localizada en citoplasma puede catalizar esta reacción *in vitro*, pero no se ha comprobado su actividad *in vivo* (8). La segunda etapa consiste en la hidrólisis de la DHN monofosfato y en plantas no se conoce aún la enzima que realiza esta función (9). En el tercer y último paso, la cadena de DHN se procesa a 6-dihidroximetil-dihidropterina (HMDHP) y glicolaldehído por una dihidropterina aldolasa presumiblemente citosólica (Fig. 2, (3)) (10).

### Síntesis del *P*-Aminobenzoato

El *p*-ABA se sintetiza en los plástidos a partir de corismato, producto de la vía de Shikimato, en dos pasos. En el primer paso, el corismato se convierte a aminodeoxicorismato (ADC) por la ADC sintasa (ADCS) (Fig. 2, (4)). ADCS es una molécula bipartita con dominios en tándem que son homólogos a las subunidades presentes en *Escherichia coli*, PabA y PabB (11). En el segundo paso, la ADC liasa (ADCL) convierte la ADC a *p*-ABA (Fig. 2, (5)) (12). Este último producto puede ser esterificado con una glucosa en una reacción reversible mediada por una UDP-glucosiltransferasa (Fig. 2, (6)). El *p*-ABA esterificado es más abundante que su forma libre (13) y se encuentra acumulado en vacuolas, por lo que se ha sugerido que las vacuolas pueden ser un sitio de almacenaje de este precursor de folatos (14). Dicho éster puede ser reconvertido en *p*-ABA, sin embargo, la enzima esterasa que pudiera hacerlo *in vivo* se desconoce.

### Síntesis del THF

Los precursores de las moléculas de folato, HMDHP y *p*-ABA junto con una unidad de glutamato (Glu) son unidos para producir primero el THF en la mitocondria. Cuatro pasos son requeridos para formar THF: 1) HMDHP se activa por pirofosforilación (Fig. 2, (7)); 2) HMDHP se acopla a *p*-ABA para dar dihidropteroato (Fig. 2, (8)). Estas dos primeras reacciones son catalizadas por los dominios HMDHP pirofosfocinasa y dihidropteroato sintetasa (respectivamente), que pertenecen a una proteína bifuncional en plantas (15). En *Arabidopsis* existe además una isoforma citosólica de dicha enzima que sólo es expresada durante el desarrollo de la semilla y durante estrés salino, y la cual parece no tener homólogos en otras especies de plantas (16). En los dos últimos pasos: 3), la DHF sintetasa (DHFS) acopla dihidropteroato a Glu para generar DHF (Fig. 2, (9)); y 4), el DHF es reducido a THF por la DHFR (Fig. 2, (10)), la cual, como mencionamos,

en plantas es una enzima bifuncional (DHFR-TS) (2, 17).

### Poliglutamilación de los Folatos

La poliglutamilación de los folatos la cataliza la folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), de la cual existen 3 isoformas en *Arabidopsis*. El monitoreo de estas isoformas, a partir de fusiones transcripcionales con genes reporteros y expresados en protoplastos, muestra su localización en mitocondria (Fig. 2, (11a)), citosol (Fig. 2, (11b)) y plástidos (Fig. 2, (11c)) (18). Aunque fue reportado que la expresión de la FPGS1 es plastídica, esta isoforma también podría ser expresada en citoplasma (19). Esa expresión fuera de plástidos está de acuerdo con el fenotipo de tipo silvestre observado en mutantes "knock-outs" sencillas y dobles, de las 3 isoformas de FPGS, donde se observa una probable compensación de la función entre ellas (20). Además, en algunas especies como en tomate, maíz y arroz solo existen dos isoformas de dicha enzima, lo que sugiere que podrían localizarse en más de un compartimento celular (20).

En *Arabidopsis*, la presencia de FPGS en citosol, mitocondria y plástidos es consistente con la ubicación de folatos poli-Glu en estos compartimentos (20). Sin embargo, se ha encontrado 5-metil-THF poli-Glu en vacuolas, aun cuando éstas no contienen FPGS o el ATP requerido para la reacción de poliglutamilación (21). Esto sugiere que los folatos poli-Glu podrían ser importados a este organelo. El grado de extensión de la cola de Glu en los folatos puede variar en parte por acción de la enzima gamma-glutamyl hidrolasa (GGH). *Arabidopsis* cuenta con 3 GGHs localizadas en vacuolas, estas enzimas presentan sitios de corte diferentes en la cadena de Glu, particularmente, AtGGH2 es la isoforma que corta la cadena a folatos mono-Glu. Esto apoya la hipótesis de que la vacuola puede ser un organelo donde se almacenan los folatos poli-Glu y donde la GGH podría remover los Glu para que folatos mono-Glu sean transportados y reutilizados en otros compartimentos celulares (21).

### REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE FOLATOS

Como en otras vías biosintéticas, parece existir un circuito regulatorio a nivel de transcripción y actividad enzimática en la síntesis de folatos. Por ejemplo, estudios *in vitro* demuestran que hay una regulación negativa de la DHP sintasa por el DHP, DHF y THF (22). DHP y DHF también pueden interrumpir la síntesis de *p*-ABA *in vitro*, inhibiendo la enzima ADCS (23). Sin embargo, esta regulación

podría ser diferente *in vivo* ya que se propone que DHP y DHF se encuentran principalmente en mitocondria mientras que la ADCS está en plástidos. En plantas que sobre producen folatos se ha descubierto bajo porcentaje de folatos poli-Glu comparado con la acumulación que ocurre en los controles (24). Esto sugiere la existencia de saturación de la enzima encargada de poliglutarilar los folatos. Además se ha visto que el bloqueo de la síntesis de folatos en *Arabidopsis*, por la aplicación de metotrexato, provoca un incremento en el nivel de transcripción de la forma citosólica de FPGS (25). Esto sugiere dos posibilidades: 1) que exista una asa de retroalimentación sobre la actividad de la enzima FPGS de citosol dependiente de altos niveles de folatos o 2) que cuando el contenido de folatos es bajo se induce el incremento del nivel de folatos poli-Glu, aumentando la eficiencia de los mismos.

Otro ejemplo de regulación en la síntesis de folatos es el resultado de la sobreexpresión de los transgenes de GCHI y ADCS en plantas de tomate, la cual causa acumulación de estos compuestos (24). El incremento de expresión de dichas enzimas también eleva la expresión de genes río abajo de la dihidropterina aldolasa, ADCL y FPGS mitocondrial. Por otro lado, se ha visto que la acumulación de DHN y ADC aparentemente induce la DHN aldolasa y la ADCL, respectivamente (26). Por lo tanto podría sugerirse que la producción de pterinas y *p*-ABA, precursores para la formación de los folatos, parecen ejercer un control importante en la vía de síntesis de folatos en especies vegetales (24). Sin embargo, este control es diferente en distintas especies vegetales sobreproductoras de folatos, por ejemplo, en las semillas de arroz que sobre producen *p*-ABA se inhibe la síntesis de folatos, mientras que en los frutos de tomate se induce (27). Estos datos muestran que la regulación de la síntesis de folatos puede ser modulada a diferentes niveles y puede variar entre especies, incluso en órganos y tejidos o edades de una misma planta.

## TRANSPORTE DE FOLATOS

La síntesis y exportación de los precursores que forman a los folatos en conjunto con la compartimentación de los folatos sugiere un complejo sistema de transporte. Hasta ahora, en plantas no han sido caracterizados por completo los posibles transportadores involucrados en la vía de folatos. Sin embargo, evidencia experimental sugiere la existencia de un mínimo de 9 transportadores en esta vía (Fig. 2, (I-IX)). El primer transportador se trata de un importador de pterina a mitocondria (Fig. 2, (I)). En el parásito *Leishmania* se identificó un transportador específico de pterina (28). Basados

en la secuencia del gen de este transportador se han identificado 9 genes hipotéticos en *Arabidopsis*. Sin embargo, la expresión de 5 de estos genes en mutantes de pérdida de función del transportador en *Leishmania*, no ha demostrado tener la misma función (29).

Como el *p*-ABA es sintetizado en plástido, esto sugeriría la existencia de un transportador para exportarlo a citosol para que posteriormente fuera importado a mitocondria. Sin embargo, la naturaleza del *p*-ABA, ácido débil e hidrofóbico, sugiere que su movimiento es por difusión (13). Después de que la pteridina y el *p*-ABA entran a la mitocondria, junto con Glu forman el folato THF, el cual debería ser exportado de dicho organelo hacia citoplasma, lo cual sugiere un segundo transportador (Fig. 2, (II)). En mamíferos se reportó la existencia del transportador Mitochondrial Folate Transporter (MFT), el cual realiza esa función (30). A partir de la secuencia de MFT, se identificaron 3 homólogos en *Arabidopsis* y sólo uno de ellos, AtFOLT1, mantiene la misma función. Sin embargo, AtFOLT1 se localiza en cloroplasto y no en mitocondria como se esperaba (31). Entonces, en plantas aun cuando los folatos deben ser transportados desde la mitocondria, hasta ahora no ha sido demostrada la presencia y actividad de un transportador de folatos en este compartimento celular.

Una vez que los folatos son exportados de mitocondria al citosol, algunos de ellos tienen que ser importados a plástidos donde son requeridos también para las reacciones de metabolismo de 1C. En *Arabidopsis* han sido identificadas dos proteínas en cloroplastos que pueden transportar folatos: el mencionado AtFOLT1 y la proteína codificada por el gen *At2g32040* (Fig. 2, (III-IV)) (32). La función como transportador de AtFOLT1 fue demostrada utilizando una línea celular mutante (*mft*) de ratón, la cual pierde la capacidad de transportar folatos a la mitocondria. Una vez que AtFOLT1 es expresado en las células mutantes *mft*, éstas son capaces de recuperar dicho transporte. Otra evidencia de la función de, AtFOLT1, es que su expresión en *E. coli* permite que estas bacterias metabolizan folato exógeno. Sin embargo, en plantas de pérdida de función de AtFOLT1 no se afectan los niveles de folato en plástidos ni presentan un fenotipo mutante en su desarrollo (31). Esto sugiere la función redundante de AtFOLT1 con un segundo transportador de folatos en plástidos, el cual sería codificado por el gen *At2g32040*. Esto es apoyado por experimentos de expresión de este transportador en mutantes de *E. coli* incapaces de producir o importar folato exógeno, lo cual le permite recuperar la toma de estos compuestos a estas bacterias. La pérdida de función de *At2g32040* en *Arabidopsis* incrementa



el contenido total de folatos en plástidos y disminuye el de la forma 5 metil-THF. Sin embargo, estas plantas no presentan un fenotipo afectado en el desarrollo (31). Esto apoya parcialmente la hipótesis de que *AtFOLT1* y *At2g32040* son redundantes.

Debido a que los conjugados de *p*-ABA y glucosa, al contrario que *p*-ABA libre, no pueden cruzar membranas pero han sido encontrados en vacuolas se sugiere la existencia de otros 3 transportadores, que estarían localizados en tonoplasto (Fig. 2, <sub>(v)</sub>) (14). El transporte de dichos conjugados hacia la vacuola es apoyada con evidencia de que moléculas unidas a glucosa pueden ser importadas a la vacuola por medio de transportadores en el tonoplasto (33). Como los folatos encontrados en la vacuola pueden estar poli-Glu, se ha propuesto además la existencia de un sexto transportador capaz de importarlos para permitir su almacenamiento en dicho organelo (Fig. 2, <sub>(vi)</sub>). Esta idea es apoyada por el hecho de que FPGS no esta presente en vacuolas. Estos transportadores podrían ser parte de un sistema menos común que el sugerido para folatos mono-Glu. Por ejemplo, en células de múridos se ha demostrado que en los lisosomas ocurre el importe de una molécula análoga a folato poli-Glu y la presencia de GGH en el mismo organelo (34). Recordemos que la GGH reduce el número de Glu de folatos poli-Glu, lo cual podría dejar nuevamente folatos mono-Glu para que sean exportados y reutilizados hacia y en otros compartimentos. Desafortunadamente, éste es otro de los aspectos relacionado a transporte de folatos del cual no se tiene suficiente evidencia que ocurra en las células vegetales.

El tercer transportador de folatos en vacuolas (el séptimo propuesto en la vía de folatos) es *AtMRP1* (Fig. 2, <sub>(vii)</sub>). *AtMRP1* también puede transportar glutatión y debido a que pertenece a la familia de proteínas Multidrug Resistance-associated Protein y subfamilia de proteínas con dominios de unión a ATP, se sugiere que transporta folato mono-Glu en una sola dirección (importador a vacuola). La pérdida de función de *AtMRP1* en protoplastos de *Arabidopsis*, disminuye un 50 % el importe de un análogo de folato mono-Glu (metotrexato) a vacuolas. Esto demuestra que es requerido para el transporte de al menos ciertas formas de folatos mono-Glu y sugiere otro sistema de transporte de estas mismas formas de folatos en la vacuola (35).

Por último, se propone la existencia de otros dos transportadores que funcionarían a nivel celular. Uno sería encargado de importar folatos (Fig. 2, <sub>(viii)</sub>), ya que se ha demostrado que folatos o análogos exógenos pueden ser importados y me-

tabolizados por las células en distintos tejidos de las plantas (25, 36). Finalmente, el último transportador propuesto estaría involucrado específicamente en el transporte de pterinas (Fig. 2, <sub>(ix)</sub>). La existencia de este último transportador ha sido estudiada sólo en *Leishmania* (37).

### Distribución de Folatos y su Papel en el Desarrollo de Plantas

Aunque la mayor demanda de unidades de 1C es en el citosol, los folatos están presentes en citosol (40%), mitocondria (30%), plástido (10%) y vacuola (20%) (38). Sin embargo, los patrones de distribución pueden volverse complejos si se diferencian los distintos derivados de folatos. En plantas superiores, los folatos se presentan entre 45-65% en forma metil, 30-35% en formil y 10-15% en metileno del contenido total de folatos (39). En cloroplasto se concentran principalmente 10-formil-THF y 5-metil-THF (21), donde participan en la síntesis de purinas y metionina. En citosol predominan los derivados de folato metilados que son requeridos para la síntesis de metionina (40). En vacuolas se encuentra predominantemente 5-metil-THF como posible forma de almacenaje (21). En mitocondria está predominante acumulado el 5-formil-THF, sin embargo, este derivado de folato no actúa como donador de 1C como la mayoría de los otros (41).

En la mayoría de las plantas, todos los derivados de folato no importando su compartimentación celular están poli-Glu, pero los niveles de glutamilación también pueden variar entre tejidos u organelos. Por ejemplo, Bensson y colaboradores en 1993 demostraron que en la matriz mitocondrial de células de hoja de chícharo, el 25% de los folatos se encuentran en forma tetrapoliglutamilada y el 55% pentaglutamilada (42). Entonces, todo esto muestra que la cantidad, distribución y nivel de glutamilación de los folatos en los distintos tejidos y células corresponde a las necesidades de unidades de 1C requeridas en distintos procesos biosintéticos y del desarrollo. Un hecho que sustenta esto, es que en tejidos con alta actividad proliferativa, como los tejidos meristemáticos de la raíz, contienen 5 veces más de folatos que en la zona madura (38).

La acumulación y distribución de folatos son importantes desde etapas tempranas del desarrollo. Gambonnet en 2001 demostró que los folatos acumulados en las semillas son necesarios para la germinación (43). En la presencia de un inhibidor de la síntesis de folatos en el medio hace que las plántulas detengan su desarrollo poco después de la germinación. Esto sugiere que la acumulación


de folatos en la semilla no es suficiente y que la síntesis se requiere desde etapas muy tempranas del desarrollo.

Esto ha sido evidenciado también en la mutante de *Arabidopsis gla1*, la cual no es capaz de llegar a la etapa de desarrollo llamada "corazón" del embrión (44). GLA1 es homóloga a FPGS y DHFS, aunque presenta mayor identidad de aminoácidos con DHFS, la cual es necesaria para la síntesis del folato THF.

Además del requerimiento de los folatos en etapas embrionarias, estos compuestos son requeridos también para el desarrollo en etapas post-embrionarias. Se ha demostrado que en *Arabidopsis* la pérdida de función de la enzima FPGS de plástido, afecta el desarrollo del sistema radical después de la germinación (45). Srivastava y colaboradores en el 2011 demostraron que los folatos poli-Glu son los principales cofactores que pueden mantener el crecimiento de la raíz y el meristemo apical de la raíz (45). Además, la mutante de pérdida de función de FPGS plastídica de *Arabidopsis* (*moots koom2*, *mko2* [raíz corta en Maya]), demuestra crecimiento determinado de la raíz. El trabajo con *mko2* demostró que la vía de folatos participa en el cambio del programa de desarrollo de crecimiento indeterminado al de determinado de la raíz. Además, en *mko2* la morfogénesis de los primordios de las raíces laterales también esta severamente afectada (46), lo cual demuestra el papel esencial de la FPGS plastídica en distintos procesos del desarrollo del sistema radical.

Otro estudio que demuestra la importancia de los folatos en el desarrollo post-germinación es el de la mutante de pérdida de función en la isoforma mitocondrial de FPGS (*atdfc*) (47). La mutante *atdc* presenta un menor número de raíces laterales desarrolladas en condiciones de deficiencia de nitrógeno, fenotipo que no se presenta si es cultivada en condiciones estándares de crecimiento, lo cual prueba que los folatos son requeridos para el desarrollo de las raíces laterales de manera dependiente del metabolismo de nitrógeno. Mutantes de pérdida de función de la enzima 5-metil-THF ciclólisis, encargada de metabolizar 5-metil-THF, muestran un retraso en el desarrollo general de la planta y en el tiempo de floración. Esto podría encontrarse relacionado a una redistribución de los folatos encontrada en estas mismas mutantes. En conjunto los estudios en las distintas mutantes mencionadas remarcan que existe un papel de los folatos en distintos procesos y etapas de desarrollo de las plantas y que no conocemos por completo como es regulado.

Entre lo poco que se conoce sobre el papel de los folatos y su regulación esta lo observado durante la diferenciación de órganos en la cual la cantidad de folatos aumenta en hojas. Esto sugirió que la fotosíntesis o algún aspecto relacionado con la luz pueden regular el proceso de acumulación de los folatos además de modular su distribución intracelular. Esto es apoyado con la observación de que en hojas, los folatos suelen acumularse 5 veces más en el citosol y 2 veces más en mitocondrias que en los mismos organelos de células de otros órganos (38, 43). En semillas de chícharo germinadas en medio con presencia de un inhibidor de síntesis de folatos y en oscuridad después de la germinación, disminuye el 5-metil-THF y la síntesis de clorofila (4). Lo anterior sustenta también que los procesos de la síntesis de folatos y distribución celular podrían encontrarse regulados por luz.

Se ha propuesto que el papel de los folatos sería en parte modular la sensibilidad a auxina e influir en su distribución durante el desarrollo de las plantas. Lo anterior fue sugerido a partir de la observación de una redistribución de auxina en plántulas de *Arabidopsis* desarrolladas en presencia de un inhibidor de la síntesis de folatos, lo cual afecta la elongación sus hipocótilos (48). Por lo tanto, la falta de folatos en una planta puede modular su sensibilidad a auxina y por lo tanto su desarrollo. Recientemente, se demostró que otra manera indirecta de regulación de los folatos sobre el desarrollo de las plantas podría darse a través de metilación de DNA y proteínas (49, 50). Sin embargo, aun no tenemos evidencia contundente sobre ello y los futuros avances en bioquímica, biología molecular y la biología del desarrollo de plantas podrán ayudar a entender el papel y mecanismo de acción de los folatos en la fisiología y el desarrollo vegetal. Estos mismos avances permitirían nuevas implicaciones biotecnológicas de los folatos para beneficio del hombre, tales como el manejo de contenido endógeno de folatos en las plantas cultivadas para su biofortificación o modulación controlada del desarrollo y crecimiento de la planta dependientes de metabolismo de folatos para mejoramiento de producción agrícola. 

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos los apoyos de UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN205315) y CONACYT (127957 y 237430) otorgados a JGD y los apoyos de la Fundación FEMSA por medio de la Cátedra de Nutrigenómica y del Tecnológico de Monterrey a través del Grupo de Tecnologías Emergentes para la Estabilización de Nutrientes Esenciales (Cuenta 0821A01001) otorgados a RIDG.

## REFERENCIAS

1. Orsomando G, Bozzo GG, De la Garza RD, Basset GJ, Quinlivan EP, Naponelli V, Rebeille F, Ravanel S, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2006) Evidence for folate-salvage reactions in plants. *Plant J* 46:426-435.
2. Cox K, Robertson D, Fites R (1999) Mapping and expression of a bifunctional thymidylate synthase, dihydrofolate reductase gene from maize. *Plant Mol Biol* 41:733-739.
3. Scott J (2000) Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* 80:795-824.
4. Van Wilder V, De Brouwer V, Loizeau K, Gambonnet B, Albrieux C, Van Der Straeten D, Lambert WE, Douce R, Block MA, Rebeille F, Ravanel S. (2009) C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytol* 182:137-145.
5. Shane B (1989) Folylpolyglutamate synthesis and role in the regulation of one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 45:263-335.
6. Gao YS, Alvarez C, Nelson DS, Sztul E (1998) Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. *J Biol Chem* 273:33825-33834.
7. Basset G, Quinlivan EP, Ziemak MJ, Díaz De La Garza R, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2002) Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12489-12494.
8. Klaus SM, Wegkamp A, Sybesma W, Hugenholtz J, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2005) A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *J Biol Chem* 280:5274-5280.
9. Suzuki Y, Brown GM (1974) The biosynthesis of folic acid. XII. Purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase. *J Biol Chem* 249:2405-2410.
10. Goyer A, Illarionova V, Roje S, Fischer M, Bacher A, Hanson AD (2004) Folate biosynthesis in higher plants. cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases. *Plant Physiol* 135:103-111.
11. Basset GJ, Basset GJ, Quinlivan EP, Ravanel S, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Seki M, Adams-Phillips LC, Giovannoni JJ, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2004) Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1496-1501.
12. Basset GJ, Ravanel S, Quinlivan EP, White R, Giovannoni JJ, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Seki M, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2004) Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. *Plant J* 40:453-461.
13. Quinlivan EP, Roje S, Basset G, Shachar-Hill Y, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2003) The folate precursor p-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *J Biol Chem* 278:20731-20737.
14. Eudes A, Bozzo GG, Waller JC, Naponelli V, Lim EK, Bowles DJ, Gregory JF and Andrew Hanson AD (2008) Metabolism of the Folate Precursor p-Aminobenzoate in Plants GLUCOSE ESTER FORMATION AND VACUOLAR STORAGE. *J Biol Chem* 283: 15451-15459.
15. Rebeille F, Macherel D, Mouillon JM, Garin J, Douce R (1997) Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *EMBO J* 16:947-957.
16. Storozhenko S (2005) Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends Food Sci Technol* 16:271-281.
17. Luo M, Piffanelli P, Rastelli L, Cella R (1993) Molecular cloning and analysis of a cDNA coding for the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Daucus carota*. *Plant Mol Biol* 22:427-435.
18. Ravanel S, Cherest H, Jabrin S, Grunwald D, Surdin-Kerjan Y, Douce R, Rebeille F (2001) Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folypolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15360-15365.
19. Srivastava AC, Tang Y, de la Garza RI, Blancaflor EB (2011) The plastidial folypolyglutamate



- synthetase and root apical meristem maintenance. *Plant Signal Behav* 6:751-754.
20. Mehrshahi P, González-Jorge S, Akhtar TA, Ward JL, Santoyo-Castelazo A, Marcus SE, Lara-Núñez A, Ravanel S, Hawkins ND, Beale MH, Barrett DA, Knox JP, Gregory JF 3rd, Hanson AD, Bennett MJ, Dellapenna D (2010) Functional analysis of folate polyglutamylation and its essential role in plant metabolism and development. *Plant J* 64:267-279.
  21. Orsomando G, De la Garza RD, Green BJ, Peng M, Rea PA, Ryan TJ, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2005) Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem* 280:28877-28884.
  22. Mouillon JM, Ravanel S, Douce R, Rebeille F (2002) Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropteroate synthase activities. *Biochem J* 363:313-319.
  23. Sahr T, Ravanel S, Basset G, Nichols BP, Hanson AD, Rebeille F (2006) Folate synthesis in plants: purification, kinetic properties, and inhibition of aminodeoxychorismate synthase. *Biochem J* 396:157-162.
  24. Diaz de la Garza RI, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2007) Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4218-4222.
  25. Loizeau K, De Brouwer V, Gambonnet B, Yu A, Renou JP, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rebeille F, Ravanel S (2008) A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate. *Plant Physiol* 148:2083-2095.
  26. Waller JC, Akhtar TA, Lara-Núñez A, Gregory JF 3rd, McQuinn RP, Giovannoni JJ, Hanson AD (2010) Developmental and feedforward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. *Mol Plant* 3:66-77.
  27. Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, Navarrete O, Blancquaert D, Zhang GF, Lambert W, Van Der Straeten D (2007) Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol* 25:1277-9.
  28. Lemley C, Yan S, Dole VS, Madhubala R, Cunningham ML, Beverley SM, Myler PJ, Stuart KD (1999) The *Leishmania donovani* LD1 locus gene ORFG encodes a biopterin transporter (BT1). *Mol Biochem Parasitol* 104:93-105.
  29. Eudes A, Kunji ER, Noiriel A, Klaus SM, Vickers TJ, Beverley SM, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2010) Identification of transport-critical residues in a folate transporter from the folate-biopterin transporter (FBT) family. *J Biol Chem* 285:2867-2875.
  30. Perchiniak E, Lawrence SA, Kasten S, Woodard BA, Taylor SM, Moran RG (2007) Probing the mechanism of the hamster mitochondrial folate transporter by mutagenesis and homology modeling. *Biochemistry* 46:1557-1567.
  31. Bedhomme M, Hoffmann M, McCarthy EA, Gambonnet B, Moran RG, Rebeille F, Ravanel S (2005) Folate metabolism in plants: an *Arabidopsis* homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts. *J Biol Chem* 280:34823-34831.
  32. Klaus SM, Kunji ER, Bozzo GG, Noiriel A, De la Garza RD, Basset GJ, Ravanel S, Rebeille F, Gregory JF 3rd, Hanson AD (2005) Higher plant plastids and cyanobacteria have folate carriers related to those of trypanosomatids. *J Biol Chem* 280:38457-38463.
  33. Dean JV, Mills JD (2004) Uptake of salicylic acid 2-O-beta-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiol Plant* 120:603-612.
  34. Barrueco JR, Sirotnak FM (1991) Evidence for the facilitated transport of methotrexate polyglutamates into lysosomes derived from S180 cells. Basic properties and specificity for polyglutamate chain length. *J Biol Chem* 266:11732-11737.
  35. Raichaudhuri A, Peng M, Naponelli V, Chen S, Sánchez-Fernández R, Gu H, Gregory JF 3rd, Hanson AD, Rea PA (2009) Plant Vacuolar ATP-binding Cassette Transporters That Translocate Folates and Antifolates in Vitro and Contribute to Antifolate Tolerance in Vivo. *J Biol Chem* 284:8449-8460.
  36. Prabhu V, Chatson KB, Lui H, Abrams GD, King J (1998) Effects of sulfanilamide and methotrexate on <sup>13</sup>C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 116:137-144.
  37. Lemley C, Yan S, Dole VS, Madhubala R, Cunningham ML, Beverley SM, Myler PJ, Stuart KD (1999). The *Leishmania donovani* LD1 locus gene ORFG encodes a biopterin transporter (BT1). *Mol. Biochem. Parasitol.* 104:93-105.
  38. Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rebeille F (2003) One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* 131:1431-1439.

39. Cossins EA (2000) The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Can. J. Bot.* 78:691–708.
40. Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rebeille F, Douce R (2004) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* 279:22548–22557.
41. Goyer A, Collakova E, Díaz de la Garza R, Quinlivan EP, Williamson J, Gregory JF 3rd, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2005) 5-Formyltetrahydrofolate is an inhibitory but well tolerated metabolite in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem* 280:26137–26142.
42. Besson V, Rebeille F, Neuburger M, Douce R, Cossins EA (1993) Effects of tetrahydrofolate polyglutamates on the kinetic parameters of serine hydroxymethyltransferase and glycine decarboxylase from pea leaf mitochondria. *Biochem J* 292:425–430.
43. Gambonnet B (2001) Folate distribution during higher plant development. *J Sci Food Agric* 81:835–841.
44. Ishikawa T, Machida C, Yoshioka Y, Kitano H, Machida Y (2003) The GLOBULAR ARREST1 gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 33:235–244.
45. Srivastava AC, Ramos-Parra PA, Bedair M, Robledo-Hernández AL, Tang Y, Sumner LW, Díaz de la Garza RI, Blancaflor EB (2011) The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155:1237–1251.
46. Reyes-Hernández BJ, Srivastava AC, Ugartechea-Chirino Y, Shishkova S, Ramos-Parra PA, Lira-Ruan V, Díaz de la Garza RI, Dong G, Moon JC, Blancaflor EB, Dubrovsky JG (2014) Folate polyglutamate dependent pathway is required for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 202: 1223–36.
47. Jiang L, Liu Y, Sun H, Han Y, Li J, Li C, Guo W, Meng H, Li S, Fan Y, Zhang C (2013) The mitochondrial folylpolyglutamate synthetase gene is required for nitrogen utilization during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 161:971–989.
48. Stokes ME, Chattopadhyay A, Wilkins O, Nambara E, Campbell MM (2013) Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:1552–1565.
49. Zhang H, Deng X, Miki D, Cutler S, La H, Hou YJ, Oh J, Zhu JK (2012) Sulfamethazine suppresses epigenetic silencing in *Arabidopsis* by impairing folate synthesis. *Plant Cell* 24:1230–1241.
50. Zhou HR, Zhang FF, Ma ZY, Huang HW, Jiang L, Cai T, Zhu JK, Zhang C, He XJ (2013) Folate polyglutamylation is involved in chromatin silencing by maintaining global DNA methylation and histone H3K9 dimethylation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:2545–2559.
51. Hanson AD, Gregory JF 3rd (2011) Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:105–125.