

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

**Regulación por el boro del transporte de  $H^+$  en  
suspensiones celulares y en membranas de girasol  
(*Helianthus annuus*, L.)**

Nuria Ferrol González

1991

REGULACION POR EL BORO DE LA EXTRUSION DE H<sup>+</sup> EN SUSPENSIONES  
CELULARES Y EN MEMBRANAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus*, L)

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencias  
Químicas Nuria Ferrol González para optar al  
grado de Doctora

*Nuria Ferrol*

Fdo. Nuria Ferrol González

VºBº

EL DIRECTOR DEL TRABAJO



Fdo. Juan Pedro Donaire Navarro

DOCTOR EN FARMACIA

PROFESOR DE INVESTIGACION DEL C.S.I.C.

*En el mayor acuerdo,  
alemanca y repeto  
su anexo y  
anexo*

La presente Memoria ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín del C.S.I.C. con la ayuda de una Beca de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Director de esta Tesis Doctoral, Dr. Juan Pedro Donaire Navarro, no sólo por sus valiosas enseñanzas y amplio significado de la investigación que en mí ha confiado, sino también por su constante dedicación al trabajo y por su gran categoría humana. Todo ello, ha hecho posible la realización de esta Memoria, al tiempo que ha constituido una acertada guía de mi labor.

Mi más sincera gratitud al Dr. Andrés Belver, quien me facilitó enormemente los estudios a nivel de membranas y a Sylvain Unique por sus valiosas orientaciones durante la puesta a punto del cultivo celular.

Así mismo, mi más sincero agradecimiento a las Doctoras Marta Roldán y Pilar Rodríguez-Rosales por las enseñanzas que de ellas siempre he recibido y por sus continuas muestras de amistad y compañerismo.

Agradecer a mis compañeros de laboratorio, Pedro Burgos, Manuel Díaz, Jose Manuel Moya, Isabel Agüi y Emilia Ballesteros; su gran ayuda y muestras de compañerismo que han hecho posible superar los momentos más difíciles con éxito.

Mi reconocimiento al Dr. Manuel Lachica, quien me facilitó las determinaciones analíticas, a Dña. Concepción Santiago por su colaboración en la preparación de los cultivos y a D. Rafael Bellver por su generosa ayuda en la resolución de los problemas informáticos.

Agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Suárez, Tutora de esta Tesis Doctoral, por haber seguido con cuidado el curso de esta investigación y por la gran ayuda que me ha prestado en la resolución de las cuestiones burocráticas.

Así mismo, mi más sincera gratitud a todos los miembros de la Estación Experimental del Zaidín que de una manera más o menos directa han hecho posible la realización de esta Memoria.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento

A mis padres

## ABREVIATURAS

BAP: 6-benzilaminopurina

BTP: 1,3-bis[tri(hidroximetil-metilamino) propanol

2,4-D: Acido 2,4-diclorofenoxiacético

D.E.: Desviación estándar

$\Delta N_3^-$ : Actividad ATPasa de tonoplasto

$\Delta NO_3^-$ : Actividad ATPasa de mitocondria

$\Delta Va$ : Actividad ATPasa de plasmalema

DCCD: N,N-diciclohexilcarbodiimida

DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno

EGTA: Acido N,N,N',N'tetraacético etilenglicol-bis( $\beta$ -aminoetileter)

DTT: Ditiotreititol

FC: Fusicocina

IDP: Inosina-tri-fosfato

LFC: Lisofosfatidilcolina

$Q_{m\acute{a}x}$ : Extinción máxima de fluorescencia

MES: Acido 2-N morfolin-etanolsulfónico

PMSF: Fenilmetilsulfonil-fluoruro

$T_c$ : Temperatura crítica

TMA-DPH: 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamida

Tris: Tris (hidroximetil)-aminometano

$r_s$ : Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario

SDS: Dodecilo hidrogenosulfato sódico

Va: Ortovanadato sódico

VQS: Velocidad inicial del flujo de  $H^+$  referida a mg de proteína

INDICE



<b>I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS</b> .....	14
<b>II. PARTE TEORICA</b> .....	18
1. EL PORQUE DEL ESTUDIO DEL BORO .....	19
1.1. Boro y Metabolismo .....	19
1.2. Boro y Membranas .....	22
2. SISTEMAS BIOELECTROGENICOS DE LA MEMBRANA PLASMATICA .....	26
2.1. Enzima H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática .....	29
2.1.1. Propiedades del enzima .....	29
2.1.2. Funciones fisiológicas .....	33
2.1.3. Regulación de la actividad enzimática .....	35
2.2. Sistemas redox .....	36
2.2.1. Transportadores de electrones .....	37
2.2.2. Carácter electrogénico del sistema redox .....	39
2.2.3. Principales funciones en la célula .....	44
3. ASPECTOS DINAMICOS Y ESTRUCTURALES DE LAS MEMBRANAS BIOLOGICAS .....	47
3.1. Propiedades de las membranas .....	49
3.1.1. Mesomorfismos de los fosfolípidos .....	50
3.1.2. El polimorfismo de las estructuras fosfolipídicas .....	52
3.1.3. Interacción lípido-proteína: Propiedades de membrana .....	53
<b>III. PLAN DE TRABAJO</b> .....	56

<b>IV. MATERIAL Y METODOS</b> .....	58
1. OBTENCION DE LOS CULTIVOS CELULARES .....	59
1.1. Esterilización y germinación de las semillas .....	59
1.2. Inducción de la callogénesis .....	60
1.3. Obtención de las suspensiones celulares. Medios diferenciales de boro .....	61
1.3.1. Determinación del crecimiento y viabilidad celular .....	62
1.3.2. Determinación del contenido en boro de las células .....	62
2. ESTUDIOS A NIVEL DE LA CELULA ENTERA .....	63
2.1. Determinación de la extrusión de $H^+$ .....	63
2.1.1. Fundamento del método de medida .....	63
2.1.2. Medida de la extrusión de $H^+$ y evaluación del registro .....	65
2.2. Determinación de la reducción del ferricianuro por las células .....	66
3. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS .....	67
3.1. Obtención de membranas microsomales .....	67
3.1.1. Método de aislamiento .....	67
3.2. Análisis de actividades enzimáticas asociadas a los microsomas aislados .....	69
3.2.1. Actividad ATPasa .....	69
3.2.2. Actividad ATPasa sensible a $NO_3^-$ .....	70
3.2.3. Actividad ATPasa sensible a $N_3^-$ .....	70
3.2.4. Actividad ATPasa sensible a $VO_4^{3-}$ e insensible a $NO_3^-$ y $N_3^-$ .....	71
3.2.5. Actividad IDPasa .....	71

3.2.6. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A . . . . .	71
3.2.7. Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa . . . . .	72
3.2.8. Actividad NADH oxidasa . . . . .	72
3.3. Determinación del contenido en proteínas . . . . .	73
3.4. Determinación del flujo de H <sup>+</sup> dependiente de ATP . . . . .	74
3.4.1. Fundamento del método de medida . . . . .	74
3.4.2. Evaluación del registro . . . . .	75
3.5. Análisis y síntesis de proteínas microsomales . . . . .	75
3.5.1. Solubilización de las proteínas microsomales . . . . .	75
3.5.2. Electroforesis bidimensional . . . . .	77
3.5.3. Tinción de los geles . . . . .	79
3.5.4. Fluorografía . . . . .	79
3.6. Determinación del grado de fluidez de las membranas microsomales: anisotropía de fluorescencia . . . . .	80
<b>V. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>84</b>
<b>1. OBTENCION DEL CULTIVO CELULAR . . . . .</b>	<b>85</b>
1.1. Inducción de la callogénesis . . . . .	85
1.1.1. Efecto de diferentes niveles hormonales en el medio de cultivo . . . . .	85
1.1.2. Efecto del boro . . . . .	87
1.2. Crecimiento celular en función de boro . . . . .	88
1.3. Contenido en boro de las células . . . . .	91
<b>2. EFECTO DEL BORO SOBRE LA EXTRUSION DE H<sup>+</sup> EN CELULAS DE GIRASOL . . . . .</b>	<b>92</b>
2.1. Caracterización de la extrusión . . . . .	92

2.1.1. Efecto del tiempo de cultivo sobre la extrusión de H <sup>+</sup> por las células . . . . .	92
2.1.2. Efecto del pH y de la temperatura . . . . .	93
2.1.3. Efecto de la concentración de iones minerales . . . . .	95
2.1.4. Efecto de la iluminación . . . . .	97
2.1.5. Definición del medio de incubación estándar de las células . . . . .	98
2.2. Efecto de la deficiencia en boro sobre la extrusión de H <sup>+</sup> por las células . . . . .	99
2.2.1. Inducción de la deficiencia . . . . .	99
2.2.2. Extrusión de H <sup>+</sup> dependiente de la actividad H <sup>+</sup> -ATPasa de plasmalema . . . . .	101
2.2.2.1. Efecto de activadores e inhibidores específicos de la H <sup>+</sup> -ATPasa en el medio de incubación de las células . . . . .	101
2.2.2.2. Efecto del contenido auxínico . . . . .	104
2.2.3. Extrusión de H <sup>+</sup> dependiente de la actividad redox de plasmalema . . . . .	107
2.2.3.1. Extrusión de H <sup>+</sup> dependiente de ferricianuro . . . . .	107
2.2.3.2. Efecto del vanadato y DCCD . . . . .	109
2.2.3.3. Efecto de la fusicocina . . . . .	110
2.2.3.4. Efecto del contenido auxínico . . . . .	111
2.2.3.5. Efecto del calmidazolium y de ionóforos de calcio . . . . .	113
2.3. Efecto del boro en el medio de incubación sobre la capacidad extractora de H <sup>+</sup> por las células . . . . .	114
<b>3. EFECTO DEL BORO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS A NIVEL DE LAS MEMBRANAS MICROSOMALES . . . . .</b>	<b>116</b>
3.1. Actividades enzimáticas asociadas a los microsomas . . . . .	117

3.2. Efecto del boro <i>in vivo</i> sobre la actividad ATPasa de plasmalema . . . . .	118
3.2.1. Cinética enzimática . . . . .	120
3.2.2. Efecto del pH y de la temperatura . . . . .	126
3.2.3. Especificidad de sustrato . . . . .	129
3.2.4. Efecto del DCCD . . . . .	129
3.2.5. Efecto del calcio . . . . .	130
3.2.6. Efecto del contenido auxínico . . . . .	132
3.2.7. Acción de la fusicocina, calmidazolium e ionóforos de calcio . . . . .	133
3.2.8. Recuperación de la actividad ATPasa por la adición de boro al medio de cultivo en células mantenidas en medios sin boro . . . . .	134
3.3. Efecto del boro <i>in vivo</i> sobre el flujo de H <sup>+</sup> dependiente de ATP . . . . .	135
3.4. Efecto del boro <i>in vitro</i> sobre la actividad ATPasa y flujo de H <sup>+</sup> dependiente de ATP . . . . .	136
3.5. Efecto del boro sobre la actividad de enzimas del sistema redox de plasmalema . . . . .	138
3.5.1. Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa . . . . .	138
3.5.2. Actividad NADH oxidasa . . . . .	141
4. ACCION DEL BORO SOBRE EL PERFIL Y SINTESIS DE PROTEINAS MICROSOMALES . . . . .	142
5. ACCION DEL BORO SOBRE LA FLUIDEZ DE LOS MICROSOMAS . . . . .	145
<b>VI. DISCUSION . . . . .</b>	<b>153</b>
<b>VII. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>171</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>174</b>

## I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Aunque todos y cada uno de los temas de interés científico muestran características más o menos diferenciales, siendo posible en todos ellos descubrir aspectos específicos que determinan la inclinación del investigador a definirlos y situarlos en un contexto integrado y preciso del área científica de que se trate, algunos problemas se identifican entre sí por una relativa coincidencia en cuanto a la dificultad que entraña el poder llegar a descifrarlos, cualquiera que sea el ámbito en el que se plantee la investigación.

La investigación del boro cumple sobradamente estas premisas, sirviendo esta introducción de base para entender el contenido de este trabajo. En él se profundiza en el problema que representa la utilización inadecuada del boro en la agricultura y, muy especialmente, en los fundamentos científicos-básicos que determinan su papel en el metabolismo vegetal.

En el estudio de la esencialidad del boro en plantas, cualquier biólogo, sobre todo si ha elegido la bioquímica como área de especialización, podría preguntarse a la vista de los múltiples procesos metabólicos en los que se ha sugerido una intervención del elemento (división celular, mecanismo de acción hormonal, metabolismo de fenoles y ácidos nucleicos, biosíntesis y degradación de azúcares, transporte iónico), si la regulación de alguna de dichas vías se identifica con su acción primaria o, más bien, se deben a una serie de reacciones secundarias que enmascaran el verdadero efecto primario.

Estas y otras cuestiones, formuladas desde distintas vertientes, llevó en su día a los miembros de nuestro grupo a un planteamiento del problema capaz de favorecer un enfoque integrador y clarificador de la función biológica del boro a nivel celular. Los resultados derivados de esta investigación han situado la acción primaria del boro en el ámbito de las membranas, de forma que una perturbación en la actividad de procesos ligados a estas estructuras por una nutrición inadecuada del elemento (respiración, fotosíntesis, transporte iónico), pudiera desencadenar una serie de alteraciones que, en último término, afectara al crecimiento y desarrollo de las plantas. De aquí, que estos hechos hayan conducido a que sea a nivel de las membranas celulares donde se haya buscado la fundamentación de esta memoria.

En esta línea de pensamiento científico en la que hemos situado esta investigación, la conceptualidad que entraña el transporte iónico y, de forma particular, la extrusión electrogénica de  $H^+$  en la célula, aparece como un elemento clave. A este respecto, trabajos previos obtenidos en nuestro laboratorio habían demostrado que condiciones de deficiencia o toxicidad en boro inhiben la extrusión de  $H^+$  en raíces de plantas como el girasol muy sensibles a condiciones de deficiencia o toxicidad en este micronutriente, así como la actividad  $H^+$ -ATPasa y la generación del gradiente de  $H^+$  dependiente de ATP a nivel de vesículas microsomales. Por otra parte, en íntima conexión con el transporte de  $H^+$ , evidencias experimentales obtenidas por otros investigadores han demostrado que la membrana plasmática de las células vegetales contiene los sistemas enzimáticos implicados en el transporte de electrones, cuya actuación puede favorecer también la liberación de los  $H^+$  a través de la  $H^+$ -ATPasa o de otros canales de membrana.

Tomando como base estas evidencias, se ha elaborado la hipótesis de que la participación relativa de la  $H^+$ -ATPasa y de los sistemas redox de la membrana plasmática en la extrusión de  $H^+$  inducida por diferentes agentes físicos y químicos



(condiciones de luz u oscuridad, aceptores electrónicos, activadores e inhibidores enzimáticos y contenido hormonal), podría venir influenciada por las condiciones de boro del medio de cultivo.

Así mismo, en el estudio de la acción primaria del boro planteado en este trabajo, no menos importante ha sido el haber tenido en cuenta la conceptualidad que surge de aplicar a las membranas los principios termodinámicos que rigen las relaciones energéticas de cualquier sistema macromolecular, y que definen las propiedades de la bicapa fosfolipídica y de las proteínas que integran estas estructuras. Ello, ha llevado a determinar también los cambios en la fluidez de la membrana, en función del boro.

Intimamente vinculada a los fundamentos que pueden permitirnos hacer uso de la membrana para entender la acción primaria del boro en plantas, aparece la necesidad de disponer de un buen modelo biológico, donde poder investigar la hipótesis aquí planteada. En este sentido, las suspensiones celulares se han erigido en el modelo experimental óptimo, habiéndose utilizado como origen vegetal el girasol no sólo por la importancia económica de este cultivo sino también por la posibilidad, previamente contrastada, de poder obtener membranas funcionales a partir de suspensiones celulares.

## II. PARTE TEORICA

## **1. EL PORQUÉ DEL ESTUDIO DEL BORO**

No cabe la menor duda de las incuestionables singularidades que concurren en el estudio de la acción primaria del boro en plantas. Una alta reaccionabilidad por su configuración electrónica, una composición isotópica estable que impide su aplicación metabólica como precursor radioactivo, el ser el único micronutriente que actúa en forma aniónica en el medio externo para todo el rango de pH en el que es posible el crecimiento, así como sus niveles de requerimiento, son hechos que definen las propiedades, esencialidad y participación de este elemento en el metabolismo vegetal. Por ello, la investigación de su mecanismo de acción no se deja enmarcar dentro de las hipótesis usuales que delimitan la funcionalidad de otros elementos minerales en las plantas.

### **1.1. BORO Y METABOLISMO**

A diferencia de los demás micronutrientes, por el momento no se ha demostrado que el boro actúe como cofactor o constituyente activo de algún sistema enzimático. Sin embargo, numerosas investigaciones han puesto de manifiesto su intervención en diversos procesos metabólicos, de forma que la variedad de funciones que se le han atribuido en el metabolismo vegetal, hace pensar que las alteraciones provocadas por niveles inadecuados de este elemento sean consecuencia

de efectos secundarios más que primarios, habiéndose sugerido la existencia de una acción generalizada e inespecífica del micronutriente (LOVATT y DUGGER, 1984).

De los múltiples papeles asignados al boro en el crecimiento y desarrollo de las plantas, éste ha sido implicado principalmente en el metabolismo y transporte de azúcares, debido a los múltiples grupos cis-OH de estos compuestos capaces de reaccionar con el elemento. El aumento del contenido en azúcares en plantas deficientes en boro (GAUCH y DUGGER, 1954; DUGGER, 1973; DUGGER, 1983) y la respuesta observada en algunas reacciones enzimáticas de la síntesis, transformación y utilización de carbohidratos (EICHORN Y AUGSTEN, 1974; ROBERTSON y LOUGHMAN, 1974; AUGSTEN Y EICHORN, 1976; BIRNBAUM y col., 1977; SMYTH y DUGGER, 1980; PILBEAM y KIRKBY, 1983, DONAIRE Y BELVER, 1985), ha conducido a la hipótesis de que el boro pueda actuar más bien a nivel del metabolismo de estas sustancias que a nivel de su traslocación.

Del mismo modo, se ha demostrado que la presencia de boro es crucial para la polimerización de alcoholes y azúcares de la pared celular (SPURR, 1957; RAJARATNAM y LOWRY, 1974; AUGSTEN y EICHORN, 1976; TIMASHOV, 1977; DUGGER y PALMER, 1980), habiéndosele asignado un papel importante como elemento estructural de la pared (HIRSCH y TORREY, 1980; GOLDBACH, 1990).

La rápida detención del crecimiento de la raíz producida en condiciones de deficiencia en boro, hizo pensar a los investigadores en una estrecha relación con la biosíntesis y degradación de los ácidos nucleicos, existiendo una fuerte contradicción al respecto (WHITTINGTON, 1959; SHERSTNEV y RAZUMOVA, 1965; CHAPMAN y JACKSON, 1974; COHEN y ALBERT, 1974; BIRNBAUM y col.,

1977; KRUEGER y col., 1979; DAVE y KANNAN, 1980; WAINWRIGHT, 1980; LOVATT y col., 1981; MOORE y HIRSCH, 1983; LOVATT, 1985; ALI y JARVIS, 1988).

Uno de los síntomas más típicamente asociados a la deficiencia en boro en plantas es la acumulación de compuestos fenólicos. LEE y ARONOFF (1967) explicaron esta acumulación como una acción indirecta del micronutriente a nivel del ciclo de las pentosas fosfato, en función de la activación del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa. Aunque se ha sugerido la posibilidad de un efecto directo del micronutriente sobre enzimas claves de la síntesis y oxidación de fenoles, los resultados obtenidos al respecto son también confusos y contradictorios (SHIVE y BARNETT, 1973; PACHECO DE AGUIRRE y col., 1977; SHKOL'NIK y MAEVSKAYA, 1977; AGARWALA y col., 1981; BELVER y DONAIRE, 1983; GOMEZ-RODRIGUEZ 1984; DONAIRE y BELVER, 1985).

El hecho de que el boro fuera esencial para el normal crecimiento y desarrollo de los meristemas apicales llevó a estudiar su relación con las auxinas. Muchos de los síntomas de deficiencia en boro son similares a los producidos por altas concentraciones de auxinas (BOHNSACK y ALBERT, 1977; HIRSCH y col., 1982), habiéndose postulado que el boro podría actuar sobre el contenido y metabolismo de estas sustancias al provocar cambios en su contenido endógeno. Por otra parte, TANG Y DE LA FUENTE (1986) han demostrado una reducción en el transporte de estas hormonas en condiciones de deficiencia en boro, habiendo sido postulado recientemente que el boro puede influenciar los procesos metabólicos regulados por las auxinas (GOLDBACH y col., 1990).

## 1.2. BORO Y MEMBRANAS

Las hipótesis más recientes sobre los efectos del boro en plantas superiores apuntan hacia una implicación del micronutriente en procesos relacionados con las membranas biológicas. PARR y LOUGHMAN (1983), sugirieron que el único aspecto capaz de englobar toda la gama de respuestas metabólicas en las que se ha implicado a este micronutriente es la alteración de las funciones de las membranas.

Aunque el boro había sido localizado a nivel de las membranas celulares por TANADA (1983), las primeras evidencias sobre una posible relación boro-membranas derivan de las observaciones llevadas a cabo por ROBERTSON y LOUGHMAN (1974), POLLARD y col. (1977), PARR y LOUGHMAN (1983) y GOLDBACH (1985), al comprobar que condiciones de deficiencia inhibían la absorción de fosfato, cloruro, rubidio y glucosa, revirtiendo dicha respuesta al adicionar boro al medio de cultivo.

La evidencia de una alteración en el transporte iónico por una nutrición inadecuada de boro, no clarificaba si esta alteración tenía lugar como consecuencia de una acción directa del micronutriente sobre algún sistema de transporte específico de la membrana, o más bien a través de un efecto más o menos generalizado sobre la misma. Varios autores trataron de discernir entre ambas posibilidades mediante estudios bioquímicos (acción sobre el enzima  $H^+$ -ATPasa), electrofisiológicos y ultra-estructurales.

POLLARD y col. (1977) fueron los primeros en observar una inhibición de la actividad ATPasa en vesículas microsomales de raíces deficientes en boro, la cual es restituida casi completamente al tratar con el elemento. Estos autores postularon que el efecto inhibitor era más bien debido a una alteración de la configuración de la membrana que a una actuación directa sobre el enzima. Estos resultados coinciden con los obtenidos recientemente por ROLDAN y col (1991) al demostrar que la

actividad ATPasa de microsomas de raíces boro deficientes no se afectaba *in vitro* por concentraciones crecientes de boro, mientras que la generación del gradiente de  $H^+$  dependiente de ATP era inhibido claramente a partir de concentraciones de 10 ppm de boro. Concluyeron estos autores que el efecto del boro podría estar relacionado con el mantenimiento del potencial de membrana, lo que aproximaría su mecanismo de acción a las propiedades de superficie de la bicapa, fundamentales para la actividad de una serie de procesos relacionados con el transporte iónico, regulación hormonal y captación de señales ambientales.

Los estudios a nivel ultraestructural y electroquímico han apoyado la afirmación de que una nutrición anormal de boro conduce rápidamente a la pérdida de la integridad de las membranas y de la homeostasia celular (HERICH y HUDACK, 1977; HIRSCH y TORREY, 1980). VOROB'EV y PELKANOV (1973) mostraron en la membrana plasmática de *Nitella symcarpa* que el boro inducía una hiperpolarización de la membrana plasmática en presencia de  $K^+$  y una despolarización en presencia de  $Na^+$ , lo que les llevó a sugerir una alteración por este micronutriente de la permeabilidad selectiva al  $Na^+/K^+$ . Posteriormente, TANADA (1974, 1978, 1982) en hipocotilos de *Vigna radiata* deficientes en boro, comprobó una alteración del potencial de membrana generado por estímulos gravitatorios y lumínicos, concluyendo que el elemento es requerido para estabilizar la carga electrostática positiva generada en la membrana plasmática por acción del fitocromo y la gravedad.

Recientemente, BLASER-GRILL y col. (1989) han observado en hojas de *Elodea densa* y en raíces de *Helianthus annuus* cultivadas en condiciones de deficiencia en boro, una despolarización de la membrana, recuperable al adicionar boro. Estos datos y la inhibición de la extrusión de  $H^+$  detectada bajo las condiciones ensayadas les llevó a concluir que el boro podría afectar directa o indirectamente la formación del gradiente protónico a través del plasmalema. En este sentido, ROLDAN y col. (1991) habían observado una clara inhibición de la extrusión de  $H^+$

en raíces de plántulas de girasol desarrolladas bajo condiciones tóxicas o deficientes en boro. En íntima conexión con estos datos, SCHON y col. (1990) acaban de sugerir que la hiperpolarización de la membrana producida por el boro, puede ser consecuencia bien de una activación directa de la bomba de  $H^+$ , bien de un aumento de la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ .

Teniendo en cuenta que las interacciones entre lípidos y proteínas constituyen uno de los factores reguladores del equilibrio de la membrana, nuestro grupo se planteó hace varios años un estudio encaminado a descifrar la implicación del boro en la biosíntesis de los constituyentes lipídicos de estas estructuras. Los resultados obtenidos a nivel de cotiledones, raíces y microsomas de plántulas de girasol, han permitido definir una acción del boro sobre varias actividades enzimáticas (CDP-colina-diacilglicerol-colina fosfotransferasa, lipoxigenasa y enzima formador de etileno) y sobre la capacidad de producción de hidroperóxidos lipídicos precursores de radicales libres, habiéndose sugerido una actuación del elemento en procesos relacionados con la degradación de las membranas y con la senescencia de los tejidos (BELVER y DONAIRE, 1983; DONAIRE y BELVER, 1985; BELVER y DONAIRE, 1987; BELVER y col., 1988).

Otra prueba de una relación boro-membrana la constituye el hecho de que este elemento sea esencial para la fijación del nitrógeno atmosférico en cianobacterias, al haberse sugerido un efecto estabilizador sobre los glicolípidos del heterocisto, importantes para controlar la difusión de oxígeno en los mismos (BONILLA y col., 1984; MATEO y col., 1986; GARCIA-GONZALEZ, y col., 1988; GARCIA-GONZALEZ y col., 1990).

El balance de estos resultados, llevó a una serie de reflexiones encaminadas a profundizar en el soporte científico sobre el cual hacer descansar el futuro del estudio de la acción primaria del boro en plantas que, inevitablemente, debía



relacionarse, una vez más, con los fenómenos de transporte. Para ello, ha sido fundamental la conceptualidad que representa el hecho de que en la célula el transporte iónico venga dirigido por el gradiente electroquímico de  $H^+$  generado en la membrana plasmática por una  $H^+$ -ATPasa en ella integrada (REINHOLD y KAPLAN, 1984; SZE, 1985) o, como se viene postulando últimamente, por la actividad de los sistemas redox ubicados en dicha membrana (MAERI y VIANELLO, 1986).

## **2. SISTEMAS BIOELECTROGENICOS DE LA MEMBRANA PLASMATICA**

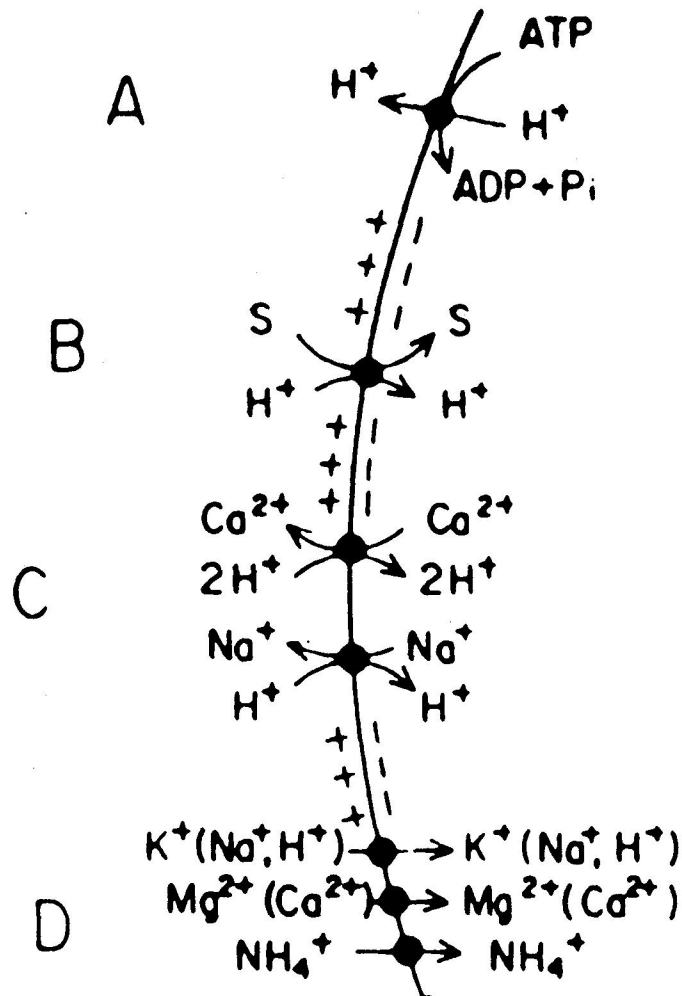
La teoría quimiosmótica de Mitchell ha asignado un papel fundamental a las bombas transportadoras de iones a través de las membranas celulares en el establecimiento de las propiedades de estas estructuras (MITCHELL, 1961; MITCHELL, 1977).

El fundamento de esta teoría se basa en la generación de un potencial electroquímico derivado del flujo de  $H^+$  transmembranario producido a partir de una fuente energética luminosa o química. El potencial electroquímico generado tiene dos componentes bien diferenciados: un gradiente de pH y un potencial eléctrico, siendo posible utilizar la energía acumulada en este proceso para la síntesis de ATP o para el transporte iónico.

Han sido identificados un gran número de enzimas o complejos enzimáticos capaces de generar un potencial electrogénico (SKULACHEV, 1981). Así, las primeras evidencias sobre la existencia de una bomba electrogénica en las células vegetales datan de 1973, al haberse demostrado que la diferencia de potencial eléctrico en la vacuola era dependiente de la energía respiratoria (HIGINBOTHAM, 1973). Posteriormente, fue comprobado que en plantas la mayoría de las bombas electrogénicas de  $H^+$  se asocian fundamentalmente a la membrana plasmática (FISCHER y col., 1976; SERRANO, 1985).

Han sido descritos dos sistemas claves para el acoplamiento de la energía metabólica al transporte de solutos a nivel de la membrana plasmática: el enzima endomembranario  $H^+$ -ATPasa y los sistemas redox. El primero de los sistemas indicados, genera un gradiente electroquímico mediante la hidrólisis del ATP, definiendo así un pH ácido en el exterior y un potencial eléctrico negativo en el interior de la membrana. La energía que de este proceso se deriva constituye la fuerza protón motriz para el transporte iónico secundario (Figura 1).

Por otra parte, durante los últimos años se ha venido comprobando la contribución de los sistemas redox del plasmalema a la formación del gradiente electroquímico mediante el eflujo de  $H^+$  y  $e^-$  generado por la oxidación del sustrato NAD(P)H (BIENFAIT y LÜTTGE, 1988).



**Figura 1.** Sistemas de transporte asociados a la membrana plasmática de las células vegetales: (A) Bomba electrogénica primaria. (B) Influjó activo secundario (simporte). (C) Eflujo activo secundario (antiporte). (D) Influjó pasivo de cationes (uniporte).

## 2.1. ENZIMA H<sup>+</sup>-ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El enzima H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática ha sido estudiado con especial interés, habiéndosele asignado una participación importante en procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo vegetal.

### 2.1.1. Propiedades del enzima

El trabajo pionero de HODGES y col. (1972), representó el primer paso hacia la caracterización molecular de la bomba de H<sup>+</sup> dependiente de ATP, al demostrarse en vesículas de membrana la existencia de una ATPasa estimulada por K<sup>+</sup> con propiedades diferenciales a las ATPasas de mitocondrias y cloroplastos. Los estudios realizados por SZE (1985) a nivel de vesículas de plasmalema y por SERRANO (1983) en proteoliposomas, han puesto de manifiesto una similitud entre las ATPasas de la membrana plasmática de hongos y plantas. En la Tabla 1 se presenta un resumen de las características de los dos tipos de ATPasas bombeadoras de iones identificadas en las membranas biológicas (SERRANO, 1990a).

Durante los últimos años se han secuenciado un gran número de (E-P)ATPasas habiéndose indicado que todas ellas proceden de una única proteína ancestral diferente a las (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>)ATPasas (SERRANO, 1988; HARPER y col., 1989; NAKAMOTO y SLAYMAN, 1989).

Hasta el momento presente, no ha sido fácil la identificación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática en fracciones crudas e incluso en vesículas purificadas utilizando sistemas de polímeros de polietilenglicol-dextrano o gradiente de sacarosa. La dificultad ha estribado en la existencia en los homogenados vegetales de un gran número de enzimas interferentes capaces de hidrolizar ATP (Tabla 2).

**Tabla 1. Propiedades de los dos tipos de ATPasas bombeadoras de cationes.**

	<b>(F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>)ATPasas</b>	<b>(E-P)ATPasas</b>
<b>Membranas</b>	Bacterias Mitocondrias Tilacoides Vacuolas	Bacterias Membrana plasmática Retículo endoplasmático
<b>Catión bombeado</b>	H <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup>
<b>Inhibidores (K<sub>i</sub>)</b>	DCCD (10 <sup>-6</sup> M) Nitrato (10 <sup>-2</sup> M)	Vanadato (10 <sup>-6</sup> M))
<b>Subunidades</b>	<b>Parte F<sub>1</sub>:</b> 3 catalíticas y 3 de 8 - 16 KD <b>Parte F<sub>0</sub>:</b> 6-12 proteolípidos de 8-16 KD Otras subunidades en diferentes enzimas	Catalítica de 70-140 KD Otras subunidades de 10-50 KD en diferentes enzimas
<b>Mecanismo de actuación del enzima</b>	Intermedio no fosforilado Cooperatividad de las subunidades catalíticas	Intermedio acilfosfato Monómero activo

**Tabla 2.** Enzimas que hidrolizan ATP en los homogenados de las plantas superiores

ENZIMA	pH OPTIMO	SUSTRATO	COFACTOR	ACTIVADORES	INHIBIDOR	REF*
ATPasas mitocondriales y tilacoidales	8-9	ATP > GTP	Mg <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Oligomicina (1 μM, mitoc) Azida (1 mM) NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (50 mM) DCCD (1 μM)	( 1 )
ATPasa vacuolar	7-8	ATP > GTP	Mg <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (20 mM) DCCD (10 μM) N-etilmaleimida (10 μM) DES (0.1 mM) Eritrosina B (50 μM)	(2)
H <sup>+</sup> -ATPasa plasmalema	6-7	ATP > NTP	Mg <sup>2+</sup>	H <sup>+</sup>	DCCD (0.1 mM) DES (0.1 mM) Eritrosina B (50 μM) Vanadato (50 μM)	(3)
Fosfatasa ácida	4-6	Esteres fosfato	----	---	Molibdato (0.1 mM) Vanadato (0.1 mM)	(4)
Apirasa	6-7	NTP NDP	Ca <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup>	---	Desconocido	(5)

\*Referencias: (1) CHURCHILL y SZE, 1983; BENNETT y SPANSWICK, 1984; DUPONT y ZABALA, 1985. (2) PENDERSEN, 1975; NGUYEN y col., 1987; LARSON y col., 1989; LARSON y JAGENFORD, 1989; MINKOV y STROTMAN, 1989. (3) DUPONT y col., 1981; PERLIN y SPANSWICK, 1981; HARADA y col., 1990. (4) VAN ETTEN y col., 1974; GALLAGHER y LEONARD, 1982. (5) VARA y SERRANO, 1981; KETTLUM y col., 1982.

Los estudios cinéticos realizados con preparaciones de membranas parcialmente purificadas, indican que el Mg-ATP es el sustrato específico del enzima, presentando una cinética hiperbólica con un valor de  $K_M$  entre 0.3 y 0.7 mM (BALKE y HODGES, 1975; COCUCCI y MARRÉ, 1984; BENNETT y col., 1985). Aunque el  $Mg^{2+}$  es probablemente el cofactor fisiológico de la proteína, éste puede sustituirse por  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  o  $Zn^{2+}$  sin pérdida importante de la actividad (HARADA y col., 1990). Por el contrario, en presencia de  $Ca^{2+}$  no se detecta actividad, inhibiendo el enzima en presencia de  $Mg^{2+}$  (TERRY y col., 1989). Por otra parte, los cationes monovalentes ( $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+$ ) activan el enzima, presentando un máximo a 38 °C y pH 6.5 (LEONARD y HODGES, 1973; KASAMO, 1986).

En cuanto al efecto de los inhibidores, aunque todavía no se ha descrito ninguno que sea totalmente específico para la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema; vanadato, eritrosina B, dietilestilbestrol (DES) y N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) han sido considerados los más efectivos (O'NEILL y SPANSWICK, 1984; BALL y col., 1987; OLESKI y BENNETT, 1987; GIBRAT y col., 1989). El hecho de que el enzima sea inhibida por vanadato es indicativo de la formación de un intermediario fosforilado, existiendo evidencias experimentales al respecto (BRISKIN y LEONARD, 1982; SCALLA y col., 1983; VARA y SERRANO, 1983; SCHALLER y SUSSMAN, 1988).

Por otra parte, existen múltiples evidencias indicativas de que el enzima  $H^+$ -ATPasa es una bomba electrogénica que se activa por  $K^+$ , lo que sugiere una relación entre dicha activación y el transporte de este catión en plantas (VARA y SERRANO, 1982; LEONARD, 1983; MARRE y BALLARIN-DENTI, 1985). Así, KOCHIAN y LUCAS (1989) sugieren que en la célula vegetal la absorción de potasio podría ser mediada por un antiporte  $H^+/K^+$  o mediante una  $K^+$ -ATPasa similar a la de *E. coli*. Recientemente, GIBRAT y col. (1990) de acuerdo con la observación de una activación por el  $K^+$  de la bomba de  $H^+$  en vesículas nativas y



reconstituidas en liposomas de raíces de maíz, han propuesto la hipótesis de que el transporte de este catión pueda estar dirigido por la ATPasa de plasmalema a través de un antiporte  $H^+/K^+$ , concluyendo que dicho efecto puede deberse a una acción directa del elemento sobre la ATPasa.

En relación a la estequiometría  $H^+/ATP$ , BRAUER y col. (1989) han definido un valor de 0.8 y SERRANO (1985) y BRISKIN (1990) de 1.0, valores muy similares a los encontrados en hongos por WARNCKE y SLAYMAN (1980), MALPARTIDA y SERRANO (1981) y por PERLIN y col. (1986).

### 2.1.2. Funciones fisiológicas

Como se ha venido indicando el enzima  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática de plantas participa en numerosos procesos fisiológicos a nivel celular.

En cuanto a la influencia de este enzima en la regulación del pH citoplasmático, diferentes autores han sugerido una intervención de la  $H^+$ -ATPasa del plasmalema sobre el sistema bioquímico implicado en la síntesis y utilización del malato (SMITH y RAVEN, 1979; KURKJIAN y GUERN, 1989). Para los investigadores indicados, la síntesis de ácido málico podría activarse por la alcalinización derivada del eflujo de  $H^+$ , provocado por la activación del enzima fosfoenol piruvato carboxilasa a dicho pH. Del mismo modo, se ha demostrado que la absorción de nutrientes y el turgor celular (concentración en  $K^+$  y en malato) son dependientes del gradiente protónico generado por la  $H^+$ -ATPasa (POOLE, 1978; MARRÉ, 1979; SERRANO, 1985).

Aunque la absorción de nutrientes y el turgor celular son requerimientos necesarios para el crecimiento, varios autores han sugerido que el pH puede afectar al crecimiento celular mediante otros mecanismos regulatorios diferentes a los

anteriormente indicados. A este respecto, la teoría del crecimiento ácido sugerida por HAGER y col. (1971) y RAYLE y CLELAND (1977) indicaba que la pérdida de rigidez de la pared celular inducida por las auxinas, se producía como consecuencia de la acidificación resultante de la activación de la  $H^+$ -ATPasa por estas hormonas. Esta teoría permite explicar también la inducción del crecimiento observada por la fusicocina, toxina fúngica activadora de la  $H^+$ -ATPasa del plasmalema (KUTSCHERA y SCHOPFER, 1985a; SENN y GOLDSMITH, 1988). Sin embargo, otras evidencias experimentales ponen de manifiesto que la inducción del crecimiento de la pared por la hormona no puede explicarse claramente por un mecanismo tal (TERRY y JONES, 1981; KUTSCHERA y SCHOPFER, 1985b).

A pesar de las escasas evidencias existentes, se ha sugerido, como ocurre en hongos y células animales (NUCCITELLI y DEAMER, 1982), que en plantas la alcalinización intracelular regulada por la  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática también podría estar implicada en la iniciación de la división celular (KURDJIAN y GUERN, 1989). Así mismo, a nivel de la planta entera, el contenido en nutrientes inorgánicos del xilema de la raíz y en nutrientes orgánicos del floema de las hojas, así como los cambios de turgor responsables del movimiento estomático dependen de los procesos de transporte activo controlados por la  $H^+$ -ATPasa (LÜTTGE y HIGINBOTHAM, 1979; HUMPHREYS, 1988; PARETS-SOLER y col., 1990; SCHWARTZ y col., 1991).

Todos estos hechos permiten sugerir que la  $H^+$ -ATPasa puede ejercer una función reguladora y energética en la célula vegetal. Sin embargo, la mayoría de las evidencias que se tienen sobre la funcionalidad de esta proteína se han basado tanto en las correlaciones existentes entre la acidificación externa o hiperpolarización de la membrana y las funciones fisiológicas, como en las extrapolaciones de los resultados bioquímicos realizados *in vitro*. El trabajo llevado a cabo al respecto por SERRANO (1989, 1990), indica que estas correlaciones no demuestran una relación causa-efecto entre la actividad de la bomba y sus funciones fisiológicas, concluyendo

que sólo un análisis molecular que permita introducir mutaciones específicas en el gen de la ATPasa, podría proporcionar evidencias concretas sobre el papel fisiológico de este enzima. El grupo dirigido por SERRANO en el Molecular Biological Laboratory (Heidelberg), utilizando mutantes de levaduras, ha demostrado que la  $H^+$ -ATPasa es esencial para el crecimiento y que una reducción en la actividad del enzima disminuye el bombeo de  $H^+$  y el transporte de aminoácidos (SERRANO y col., 1986; CID y col., 1987; CID y SERRANO, 1988; VALLEJO y SERRANO, 1989). Como un paso más en este estudio, recientemente SERRANO (1990) ha indicado que estas conclusiones podrían extrapolarse a las células de plantas superiores, al haberse demostrado una gran similitud entre los circuitos quimiosmóticos en ambas membranas.

### **2.1.3. Regulación de la actividad enzimática**

Los hechos expuestos hacen pensar que la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de plasmalema debe ser modulada por todos aquellos factores que controlan la fisiología de la planta (hormonas vegetales, toxinas producidas por patógenos, luz y condiciones de estrés). Así, a nivel de las células guardas la inducción de la apertura de los estomas por la luz se produce como consecuencia de la estimulación de la bomba de  $H^+$ , habiéndose descrito tres tipos de fotoreceptores implicados en la regulación del enzima: fitocromo, sistema receptor de la luz azul y pigmentos cloroplastídicos (ASSMANN y col., 1985; SHIMAZAKI y col., 1986; PIWOWARCZYK, 1988; SERRANO y col., 1988).

Hasta el momento presente, han sido muy poco estudiados los mecanismos bioquímicos que regulan la actividad ATPasa de la membrana plasmática de plantas superiores. Los efectos más claros e inmediatos corresponden a la activación inducida por fusicocina (MARRÉ, 1979; DE MICHELIS y col., 1989;

ABRAMYCHEVA y col., 1991) y siringomicina (BIDWAI y TAKEMOTO, 1987b), habiéndose comprobado, sobre todo, para esta última toxina la participación de una proteína-quinasa dependiente de calcio (BIDWAY y TAKEMOTO, 1987a). En el caso de la regulación auxínica se ha propuesto un mecanismo de activación similar (ALTABELLA y col., 1990).

Del mismo modo, el efecto inhibitor inducido por diferentes tipos de estrés sobre el enzima, parece correlacionarse con un incremento en la fosforilación de proteínas de membrana catalizado por proteínas-quinasas dependientes de calcio (ZOCCHI y col., 1983; ZOCCHI, 1985).

## 2.2. SISTEMAS REDOX

La existencia en las membranas celulares de cadenas transportadoras de electrones es una característica común a todos los seres vivos, habiéndose estudiado con mayor profundidad la cadena respiratoria de las mitocondrias y la cadena fotosintética de los cloroplastos. Bastante menos se conoce sobre la cadena de transporte electrónico a nivel de la membrana plasmática de células eucariotas. Aunque ya en 1897, WALLER discutió la posibilidad de una relación entre los procesos redox, los potenciales bioeléctricos y el transporte de iones, no fue hasta 1955 cuando LUNDEGARDH desarrolló el concepto de la respiración aniónica, según el cual los sistemas redox de la membrana plasmática podrían dirigir la absorción de iones en las raíces.

El acúmulo de datos experimentales obtenidos desde entonces, impulsó a diversos investigadores a reconsiderar la idea del transporte electrónico en la membrana plasmática y a estudiar su participación en diferentes procesos fisiológicos. Así, en células de mamíferos, bacterias y levaduras se ha comprobado la existencia de sistemas redox en la membrana plasmática capaces de oxidar NADH

e inducir la liberación de  $H^+$  al exterior (LÖW y CRANE, 1978; CRANE y col., 1985), de forma que el gradiente electroquímico generado puede ser utilizado para la absorción de aminoácidos, ácidos orgánicos e iones inorgánicos (RAMOS y KABACK, 1977; KILBERG y CHRISTENSEN, 1979; GARCIA y col., 1980).

En plantas superiores, la reinvestigación de los procesos redox a nivel del plasmalema se inició con los trabajos pioneros de NOVAK e IVANKINA (1977, 1978, 1980) que demostraron la implicación de estos sistemas en el transporte iónico, respiración, respuesta a herbicidas y patógenos, así como fotomorfogénesis y crecimiento.

### 2.2.1. Transportadores de electrones

La identificación de los componentes del sistema redox de la membrana plasmática no ha sido tarea fácil. Ello, se ha debido a la dificultad que plantea el conseguir fracciones puras de dicha membrana. En cualquier caso, utilizando vesículas enriquecidas en plasmalema se han localizado y cuantificado con bastante exactitud un buen número de componentes del sistema (Tabla 3).

Los sistemas redox en una membrana adquieren una dimensión vectorial, estando la dirección del transporte íntimamente relacionada con el potencial redox de los componentes, con la orientación de los grupos funcionales de los transportadores dentro de la membrana y con la disponibilidad de los sustratos. Los coenzimas NADH y NADPH son los sustratos para la mayoría de las oxidasas que forman parte de la membrana plasmática (SIJMONS y BIENFAIT, 1983; MARIGO y BELKOURA, 1985). La utilización de cada uno de ellos depende más bien de la capacidad de regeneración del sustrato por la célula a nivel del citoplasma, que de la especificidad de la deshidrogenasa por el mismo, lo que define el hecho de que, por razones funcionales, los lugares activos de las NAD(P)H deshidrogenasas tienen que estar localizados en la cara interna de la membrana plasmática.

**Tabla 3.** Actividades óxidoreductasas identificadas en la membrana plasmática de las células de las plantas superiores.

ENZIMA	SUSTRATO	ACEPTOR	LOCALIZACION	REFERENCIA
Oxidasa estimulada por auxina	NAD(P)H	O <sub>2</sub> K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	S.E. / TM	GUERRINI y col., 1987
Reductasa de quelatos Fe <sup>3+</sup>	NAD(P)H	Fe <sup>3+</sup>	TM	CHANEY y col., 1972
Ferricianuro reductasa	NAD(P)H	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	S.E. / TM	BOURDIL y col., 1990
Nitrato reductasa	NAD(P)H	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	TM	JONES y MOREL, 1988
Citocromo b <sub>5</sub> reductasa	NADH	O <sub>2</sub> Citocromo c	S.I.	SANDELIUS y col., 1986
Semidihidro-ascorbato reductasa	NADH	Semidihidro-ascorbato	TM	MORRE y col., 1986
Peroxidasa	NAD(P)H	O <sub>2</sub>	S.E.	MOLLER y BERZCI, 1986
Duroquinona reductasa	NAD(P)H	Duroquinona	?	LUSTER y BUCKHOUT, 1989
Xantina oxidasa	Hipoxantina	O <sub>2</sub>	S.E.	MOLLER y col., 1988
LIAC	Luz azul	O <sub>2</sub>	?	CAUBERGS y col., 1988

T.M.: Transmembranaria; S.E.: Superficie externa; S.I.: Superficie interna

En este sentido, se ha comprobado que los enzimas NADH-ferricianuro reductasa, NADH citocromo b<sub>5</sub> reductasa, NADH-semidihidroascorbato reductasa y xantina oxidasa se localizan en la cara citoplasmática de la membrana (BUCKHOUT y HRUBEC, 1986; MORRE y col., 1986; MOLLER y col., 1988).

Por otra parte, se ha comprobado que la mayoría de los tejidos y células vegetales son capaces de oxidar el NAD(P)H externo (LIN, 1984; IVANKINA y NOVAK, 1988; KRAASCH y col., 1988; BERNSTEIN y col., 1989), lo que llevó a pensar en la existencia de dos lugares activos para el enzima NAD(P)H deshidrogenasa: uno, en la cara citoplasmática y, otro en la cara externa.

Así mismo, se ha demostrado que la reducción del ferricianuro y de otros aceptores electrónicos impermeables se produce en la superficie externa de la membrana (LÜTHEN y BÖTTGER, 1988; LÜTHJE y BÖTTGER, 1989; DÖRING y col., 1990). La consideración de la naturaleza anfótera de los transportadores del sistema redox de bajo peso molecular, como las quinonas y las flavonas libres, hace pensar en la posibilidad de que estas moléculas se muevan libremente a través de la membrana actuando como lanzaderas de los electrones y de los protones.

### **2.2.2. Carácter electrogénico del sistema redox**

Diversos autores han sugerido que, en conexión con el potencial de difusión, el potencial electroquímico generado por la H<sup>+</sup>-ATPasa del plasmalema y el transporte iónico secundario, el sistema redox de la membrana plasmática podría ser uno de los componentes que contribuya al establecimiento y mantenimiento del potencial de la membrana. Esta hipótesis ha sido verificada mediante estudios encaminados a demostrar que la reducción de un aceptor electrónico extracelular se acompaña de una despolarización de la membrana (NOVAK e IVANKINA, 1983; IVANKINA y col., 1984; ELZENGA y PRINS, 1987; MARRE y col., 1988;

BERNSTEIN y col., 1989; DÖRING y col., 1990) y que la reducción del ferricianuro provoca un incremento de la extrusión de  $H^+$  (NOVACK y MICLASHEVICH, 1986; VAN BEUSICHEM y col., 1988; BARR y col., 1990). De la misma forma, en células de maiz y de caña de azúcar la oxidación del NAP(P)H externo produce una hiperpolarización de la membrana (THOM y MARETZKI, 1985), mientras que no fue observado efecto alguno en *Elodea* (LASS y col., 1986).

La electrogenicidad del sistema redox de la membrana plasmática ha sido así mismo demostrada utilizando vesículas enriquecidas en plasmalema, al haberse comprobado la generación de un gradiente protónico y de un potencial eléctrico en dichas vesículas incubadas en presencia de ferricianuro (HASSIDIM y col., 1987; BÖTTGER, 1989) y al haberse determinado mediante estudios electrofisiológicos un aumento de la conductancia del plasmalema en presencia de ferricianuro (NOVAK e IVANKINA, 1986).

En relación a la funcionalidad y electrogenicidad del sistema redox ha sido especialmente importante el concepto que se deriva de la razón entre los protones extruidos y los electrones transferidos. En la Tabla 4 se muestran los valores obtenidos para dicha razón en diferentes tejidos y órganos vegetales. A pesar de la importancia de este dato, algunos investigadores no han podido definir una relación estequiométrica entre los protones extruidos y los electrones transportados, sugiriendo la existencia de un transportador de electrones acoplado energéticamente al enzima  $H^+$ -ATPasa (GUERN y ULLRICH-EBERIUS, 1988; MARRE y col., 1988; TROCKNER y MARRE, 1988; BERNSTEIN y col., 1989). Para estos autores, las deshidrogenasas de la membrana plasmática transportarían los electrones desde el sustrato NAD(P)H citoplasmático al ferricianuro extracelular, provocando el eflujo de cargas negativas una despolarización de la membrana. Como un paso más en esta idea, los mismos autores sugirieron, al considerar que únicamente los electrones atravesaban la membrana, que los  $H^+$  resultantes de la oxidación del



**Tabla 4.** Valores de la proporción de protones extruidos a la reducción de ferricianuro ( $H^+/e^-$ ) detectados en los sistemas redox del plasmalema de las células de las plantas superiores.

GENERO	CELULA O TEJIDO	$H^+/e^-$	REFERENCIA
<i>Acer</i>	Células	0.93	BLEIN y col., 1986
<i>Asparagus</i>	Células, oscuridad	1.00	BOWN y CRAWFORD, 1988
<i>Asparagus</i>	Células, iluminación	1.10	BOWN y CRAWFORD, 1988
<i>Corn</i>	Raíces	1.24	BÖTTGER y HILGENDORF, 1988
<i>Daucus</i>	Células	1.1	GRAIG y CRANE, 1985
<i>Daucus</i>	Células	1.25	CRANE y col., 1983
<i>Daucus</i>	Células	1.00	BARR y col., 1990
<i>Elodea</i>	Hojas	1.00	MARRE y col., 1988
<i>Lemna</i>	Fronde	1.22	ULRICH y GUERN, 1990
<i>Zea</i>	Raíces, aerobiosis	0.40	FEDERICO y GIARTOSIO, 1983
<i>Zea</i>	Raíces, anaerobiosis	0.03	FEDERICO y GIARTOSIO, 1983

NAP(P)H podrían acidificar el citoplasma con la consecuente activación de la H<sup>+</sup> ATPasa del plasmalema (Figura 2).

Contrariamente a lo anteriormente indicado, otros investigadores sugirieron la existencia de dos vías bien definidas para el eflujo de H<sup>+</sup> por la célula. Una, mediada por la H<sup>+</sup>-ATPasa y, otra, por el sistema redox (LASS y col., 1986; BARR, 1988; CHEN y col., 1990). Sin embargo, desde un punto de vista experimental les resultó muy difícil discernir entre ambos procesos, incluso utilizando inhibidores específicos de la H<sup>+</sup>-ATPasa. Ello, quizás fuera debido a lo cuestionable que resulta llegar a saber hasta que punto inhibidores como DCCD y DES pueden ejercer su efecto sobre el eflujo de H<sup>+</sup> dependiente de ATP. En apoyo de esta hipótesis BOWN y CRAWFORD (1988) han comprobado en células de mesófilo de *Asparagus* en condiciones de luz y oscuridad, mediante el uso de estos inhibidores, la existencia de una bomba de H<sup>+</sup> independiente de ATP. Así mismo, BARR y col. (1990b) han sugerido mediante la utilización de oxidantes permeables la participación de algún canal protónico diferenciable de la H<sup>+</sup>-ATPasa.

Para clarificar el modo de acción de los sistemas redox es fundamental la existencia de resultados objetivos sobre la síntesis de ATP en presencia de ferricianuro. NOVAK y MICLASHEVICH (1986) observaron un contenido relativamente constante de ATP en suspensiones celulares de *Chlorella* durante la reducción de ferricianuro, mientras que para NOVAK e IVANKINA (1986) el elevado contenido en ATP encontrado en hojas de *Elodea* fue atribuido a una estimulación de la respiración mitocondrial inducida por ferricianuro. Contrariamente, TROCKNER y MARRE (1988) han observado en las especies mencionadas una disminución del nivel de ATP en presencia de ferricianuro.

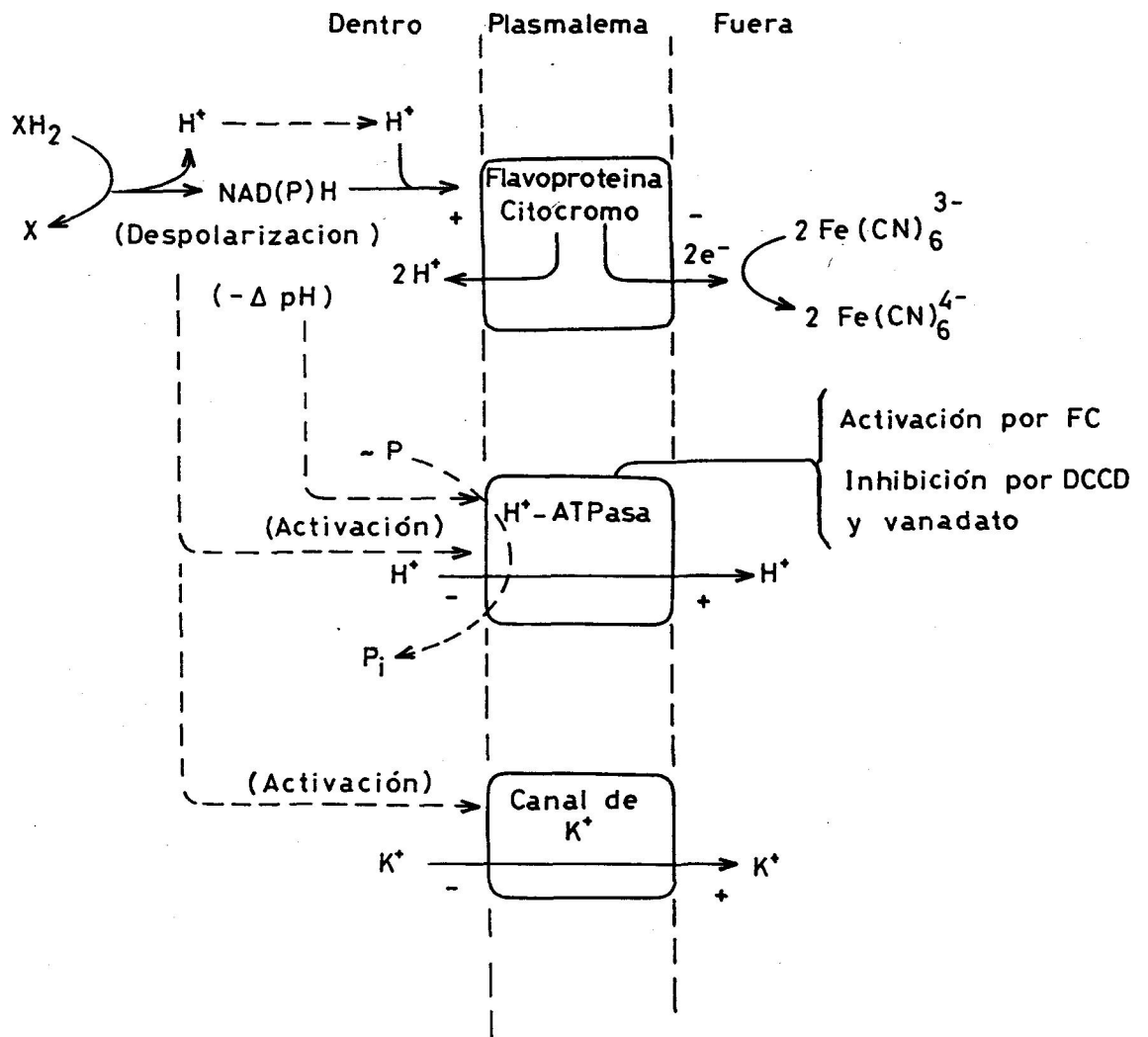


Figura 2. Modelo propuesto por MARRE y col. (1988) para explicar la relación entre el sistema redox y el enzima  $H^+$ -ATPasa del plasmalema.

### 2.2.3. Principales funciones en la célula

Como ha quedado reflejado en el apartado anterior, la transferencia de  $H^+$  en la célula vegetal es un hecho inherente a los sistemas redox del plasmalema. Teniendo en cuenta que la absorción de iones, azúcares y aminoácidos depende de la generación de un gradiente electroquímico a través de la membrana, cabía esperar una contribución de estos sistemas en la generación de la fuerza protón motriz y del potencial de membrana. Sin embargo, debido a la falta de activadores e inhibidores específicos de estos sistemas redox de la membrana, ha resultado muy difícil la obtención de evidencias experimentales que avalen esta contribución.

La utilización del ferricianuro como aceptor electrónico externo ha venido a clarificar este problema. En este sentido, es conocido que el ferricianuro actúa despolarizando la membrana, de lo que cabría esperar una inhibición de la absorción catiónica y una estimulación de la absorción aniónica. Así, se ha comprobado en diferentes tejidos una inhibición de la absorción de  $K^+$  ( $^{86}Rb^+$ ) (KOCHIAN y LUCAS, 1985; RUBINSTEIN y STERN, 1986, BLEIN y col., 1986) y una estimulación del eflujo de  $K^+$  (SIJMONS y col., 1984; MICLAESHEVICH y NOVAK, 1985; MARRE y col., 1988), no habiendo sido posible detectar una clara estimulación de la absorción aniónica. Sin embargo, los resultados obtenidos por LASS y col. (1986) contradicen esta última hipótesis al encontrar una inhibición de la absorción de sulfato en presencia de ferricianuro.

El transporte de aminoácidos y de azúcares ha sido así mismo relacionado con la actividad del sistema redox del plasmalema (IVANKINA y col., 1984; MISRA y col., 1984; THOM y MARETZKI, 1985; RUBINSTEIN y STERN, 1986; VREUGDENHIL y SPANSWICK, 1987; WEBER y col., 1988), existiendo también múltiples evidencias de que dicho sistema constituye el mecanismo primario para la absorción de hierro en la mayoría de las plantas superiores (RÖMHELD y MARSCHNER, 1986; BIENFAIT y LÜTTGE, 1988).

Existen múltiples evidencias sobre la estimulación de la reducción del ferricianuro por la luz en tejidos fotosintéticos, habiéndose comprobado que dicha estimulación no tiene lugar en presencia de inhibidores de este proceso del tipo del DCMU (NEUFELD y BOWN, 1987; MARRÉ y col., 1989). Una estimulación tal parece derivarse de un aporte de fotosintetizados al citosol, donde posteriormente suministran el poder reductor necesario (NADPH) para el transporte transmembranario de electrones en el plasmalema. En hojas de *Elodea* se ha demostrado durante la fotosíntesis una fuerte estimulación de la extrusión de  $H^+$  en ausencia de ferricianuro, lo que sugiere una estimulación del sistema redox por la luz al utilizar el oxígeno como aceptor electrónico, provocando de esta forma la estimulación de la extrusión de  $H^+$  (ELZENGA y PRINS, 1987; MARRE y col., 1989).

Ha quedado bien establecido el control ejercido por la luz azul sobre un gran número de procesos fisiológicos, habiéndose propuesto que el fotoreceptor responsable de la percepción de dicho tipo de luz es un complejo formado por una flavoproteína y un citocromo (GALLAND y SENGER, 1988), siendo por el momento confusa la existencia de una relación entre dicho complejo y las deshidrogenasas u oxidasas del plasmalema. En todo caso, la existencia de flavoproteínas y citocromos en la membrana plasmática y la identificación de estos compuestos como constituyentes del sistema de transporte electrónico transmembranario, hacen pensar en una participación del sistema redox en la percepción de la luz azul por las células vegetales (KJELLBOM y col., 1985).

Teniendo en cuenta que los procesos reseñados, son modulados por la actividad del sistema redox de la membrana plasmática, cabría esperar una estrecha relación entre estos sistemas y el crecimiento celular. CRANE y col. (1988a, 1988b) demostraron una alta velocidad de reducción de ferricianuro en células de zanahoria durante la fase exponencial de crecimiento y MORRÉ y col. (1988) y BARR (1988) han comprobado que la adición de inhibidores del crecimiento a hipocotilos de

*Glycine max* provocaba una paralización de dicho proceso, así como de la extrusión de  $H^+$  y de la actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa. La inhibición de la extrusión de  $H^+$  inducida por ferricianuro en presencia de antagonistas de la calmodulina, constituye otra prueba que pone de manifiesto la implicación de estos sistemas en la regulación del crecimiento en plantas (BARR y col., 1990a).

Finalmente, indicar la importancia de un medio suficientemente oxigenado para la actividad de los sistemas redox de la membrana plasmática, al haberse observado que en varios órganos, tejidos y células vegetales se produce una estimulación del consumo de oxígeno en presencia de NAD(P)H (LIN, 1982a, 1982b; MISRA y col., 1984; PANTOJA y WILLMER, 1988; TROCKNER y MARRE, 1988), la cual es inhibida por cianuro (THOM y MARETZKI, 1985) y activada por SHAM (PANTOJA y WILLMER, 1988). A pesar de que algunos autores sugieren que dicho consumo de oxígeno procede de la actuación de peroxidasas localizadas en la pared celular (SPREEN BOUWER y col., 1986; KOMOR y col., 1987; PANTOJA y WILLMER, 1988), otros han demostrado la existencia de un consumo de oxígeno en preparaciones de membrana enriquecidas en plasmalema (MOLLER y BERCZI 1985 y 1986).

Como resumen de lo indicado, aunque se desconoce por el momento la naturaleza de la interacción entre los sistemas redox y la transmisión de señales implicadas en el crecimiento y funcionalidad celular, ha quedado bien establecido que el uso de oxidantes impermeables externos (ferricianuro) proporciona una inestimable ayuda para el estudio de dichos sistemas en células intactas y en tejidos vegetales. Desde esta perspectiva, el hecho de que el boro ejerza una influencia en la extrusión de  $H^+$  y en el potencial de membrana de la célula (BLASER-GRILL y col., 1989; SCHON y col., 1990; ROLDAN y col., 1991), permite la pregunta de si el control de estos procesos por el micronutriente podría producirse a nivel de los sistemas redox de la membrana.

### 3. ASPECTOS DINAMICOS Y ESTRUCTURALES DE LAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Como ha sido indicado, las investigaciones llevadas a cabo por diferentes equipos sobre una posible acción del boro a nivel de las membranas, permiten definir, en alguna medida, su modelo de actuación. De esta forma, el abordaje de esta hipótesis se ha constituido en uno de los objetivos más importantes de nuestro grupo en los últimos años. Teniendo en cuenta que en este trabajo se estudia el efecto del micronutriente en función de su implicación en los mecanismos primarios de extrusión de  $H^+$  (sistemas redox y ATPasa de la membrana plasmática) y dada la importancia del funcionamiento de estos sistemas de membrana en el metabolismo celular, parece fundamental un conocimiento básico de algunas propiedades de estas estructuras, a la hora de establecer una aproximación bioquímica y fisiológica, capaz de definir el mecanismo de acción del boro en plantas.

Los conceptos más actuales sobre la estructura y funcionalidad de las membranas biológicas, definen a éstas como una bicapa lipídica con proteínas incorporadas en un estado de gran fluidez. En este modelo propuesto por SINGER y NICOLSON (1972) denominado *Mosaico Fluido*, se maximizan las interacciones entre los diferentes componentes de la membrana, lográndose estados de baja energía libre y consiguiéndose, de esta forma, un equilibrio dinámico favorecedor de los

movimientos de moléculas en el plano de la bicapa.

Este modelo no sólo continúa siendo válido hoy día, sino que la estructura en mosaico de los componentes proteicos que integran la membrana, es la que mejor describe la funcionalidad de los sistemas implicados en la transducción energética y de señales en la célula, dependientes del potencial electrogénico de la membrana. Así mismo, la bicapa lipídica determinante de una matriz fluida y de una barrera impermeable a los iones, muestra grandes diferencias en el contenido y calidad de sus componentes (variación de la cabeza polar, carga, longitud e insaturación de las cadenas de ácidos grasos), que justifican funciones diferenciales entre las membranas.

En la célula, la membrana plasmática sirve de separación con el medio externo a través de la cual se relaciona con él. En las plantas superiores, a pesar de la protección que representa la pared celular y del hábil sistema de criba del xilema, las células están expuestas en un alto grado a las fluctuaciones del medio externo (iones, pH, hormonas, luz, temperatura, patógenos). Así, ante condiciones ambientales adversas y, sobre todo, cuando éstas persisten, ha de lograrse que las repercusiones en el sistema celular sean mínimas, siendo en la membrana plasmática donde recaen los mecanismos de defensa contra estos agentes. Para ello, además de adoptar estrategias particulares (cambios en los componentes lipídicos, en la fluidez, en el potencial de membrana o en las propiedades eléctricas de superficie), la membrana es capaz de inducir los mecanismos bioquímicos necesarios (transporte iónico, actividad de enzimas, número y afinidad de receptores celulares) que permitan la respuesta celular adecuada a los estímulos externos (BLUM y EBERCON, 1981; WOLFE y STEPONKUS, 1981; CHAPMAN y col., 1983; VIGH y col., 1986; NAVARRI-IZZO y col., 1988; LESHEM, 1990; DUXBURY y col., 1991).

En general, el control de todos estos parámetros tiene una notable



significación en los cambios de funciones específicas que se establecen en condiciones adversas, como por ejemplo, de toxicidad o de deficiencia en determinados nutrientes minerales. En el caso que aquí nos ocupa, estudio de la acción primaria del boro en células de girasol, parece lógico considerar los cambios que puedan provocarse por la carencia de este micronutriente, en algunos fenómenos de membrana (fluidez), claves para el mantenimiento de la funcionalidad e integridad celular.

### **3.1. PROPIEDADES DE LAS MEMBRANAS**

La relación existente entre la fluidez y la funcionalidad de las membranas en plantas superiores ha sido documentada en numerosas publicaciones, habiéndose podido comprobar cómo la alteración en la composición lipídica o en otros parámetros relacionados con la fluidez puede influenciar sus propiedades (LEGGE y col., 1982; MAYAK y col., 1983; ROBERTS y col., 1986; LYNCH y STEPONKUS, 1987; TAsAKA y col., 1990; COOKE y col., 1991).

La posibilidad de realizar estructuras fosfolipídicas (liposomas) que mimeticen la situación de estas moléculas en las membranas biológicas, ha permitido entender los conceptos que actualmente se tienen de la organización de las membranas. Estas estructuras artificiales o vesículas limitadas por una o muchas bicapas de fosfolípidos que delimitan compartimentos acuosos, han constituido el modelo fundamentalmente utilizado en los estudios biofísicos, al corresponder su estructura exclusivamente a bicapas de fosfolípidos, así como por la facilidad para su formación y comodidad que representa su manipulación (CHAPMAN, 1984).

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en esta Memoria, únicamente agruparemos en este apartado algunos datos sobre aquellos aspectos que puedan

guardar relación con cambios en la fluidez de la membrana, los cuales pensamos que pueden ser modulados en función de los tratamientos de boro.

### 3.1.1. Mesomorfismos de los fosfolípidos

Los fosfolípidos deshidratados forman a la temperatura ambiente estructuras casi cristalinas, teniendo lugar la fusión de las cadenas de ácidos grasos al aumentar la temperatura. En presencia de agua, numerosos tipos de estructuras pueden ser adoptadas según la temperatura y la concentración de agua (mesomorfismos termo- y lio-trópicos). Así, la hidratación provoca una disminución de la temperatura de fusión; cuando la hidratación es completa la temperatura de fusión tiende hacia un valor límite, denominada temperatura crítica ( $T_c$ ).

A temperaturas inferiores a la  $T_c$ , la estructura adoptada corresponde a un estado de gel donde los fosfolípidos se organizan en bicapas, mientras que a temperaturas superiores a  $T_c$ , los fosfolípidos constituyen estructuras intermedias entre cristal y líquido (estado líquido-cristalino). Al paso de una a otra se denomina transición gel/líquido cristalino y gel/fluido para expresar el gran aumento de movilidad de las cadenas de ácidos grasos a partir de la transición.

El valor de la  $T_c$  depende de las interacciones entre las cadenas de ácidos grasos y entre las cabezas polares, lo que la relaciona directamente con las características bioquímicas de los fosfolípidos (longitud e insaturación de los ácidos grasos y naturaleza de las cabezas polares) (COOLBEAR y col., 1983; CHAPMAN, 1975; HUANG, 1991; MARSH, 1991). Así, a mayor longitud de la cadena corresponde un mayor número de interacciones de Van der Waals entre ellas y una  $T_c$  más elevada. Por el contrario, cuanto mayor insaturación menos contacto entre las cadenas y menos interacciones de Van der Waals, lo que determina una menor  $T_c$ .

En cuanto a los efectos de la naturaleza de las cabezas polares sobre la  $T_c$ , éstos se han fundado en la posibilidad de interacciones inter-moleculares por medio de uniones de hidrógeno. En fosfolípidos donde el ácido mirístico es el ácido graso constitutivo, la temperatura crítica depende del fosfolípido en cuestión, siendo la más baja la de fosfatidilcolina al no desarrollarse uniones hidrógeno intermoleculares (HAUSER y col., 1981).

En general, un aumento de pH entraña la ionización de una función ácida o la desprotonación de un grupo básico, lo que provoca una disminución de la  $T_c$  (HARLOS y col., 1979; ROSSIGNOL y col., 1982; CEVC y col., 1988). Del mismo modo, la presencia de calcio induce un incremento de la  $T_c$  de los fosfolípidos ácidos, más o menos importante según la naturaleza de las cabezas polares y de los ácidos grasos constitutivos. Como en el caso del pH, los efectos de este catión son interpretados en términos de interacciones de cargas eléctricas; al neutralizar el catión divalente las cargas negativas de los fosfolípidos disminuirán las repulsiones electrostáticas (HAUSER y SHIPLEY, 1984; SACKMANN, 1986).

Todos estos hechos son indicadores de que la manera más simple de racionalizar las observaciones, a un nivel cualitativo, es definir la aptitud de las mezclas de fosfolípidos por las diferencias entre las  $T_c$  individuales. Sin embargo, dos características comunes a la mayoría de las mezclas naturales, pueden *a priori* conducir a asegurar una miscibilidad global y un estado fluido, al menos en condiciones normales de temperatura y de medio iónico. Una, la predominancia de ácidos grasos de 16 ó 18 C, que debe limitar los efectos ligados a la longitud de las cadenas, y otra, la preponderancia de ácidos grasos poliinsaturados, que debe limitar los efectos ligados a la insaturación.

### 3.1.2. El polimorfismo de las estructuras fosfolípicas

Diversas condiciones del medio pueden conducir a ciertos fosfolípidos a abandonar la organización clásica de estructura en bicapa (CULLIS DE KRUIJFF, 1979). La estructura adoptada por los sistemas constituidos por fosfolípidos puros corresponde a fases hexagonales del tipo II (fase  $H_{II}$  de la nomenclatura de TARDIEN y LUZZATI, 1973), es decir, estructuras cilíndricas donde el interior estará delimitado por las cabezas polares de los fosfolípidos. En mezclas de fosfolípidos, cuando solamente una parte de los constituyentes abandonen la estructura en bicapa, éstos forman micelas dispuestas entre las dos hojas de la bicapa (VAN VENETIE y VERKLEIJ, 1981).

La formación de estas estructuras es inducida por las modificaciones del balance entre las interacciones a nivel de los ácidos grasos. En el caso de las bicapas, estas interacciones son comparables en las dos partes de la bicapa fosfolípica y la superficie media ocupada en el plano de la membrana por las cabezas polares. En las fases  $H_{II}$  o micelares, la aproximación entre las cabezas polares es tal, en relación al volumen dinámico de los ácidos grasos, que impone una curvatura en la estructura resultante.

Como en el caso de la transición gel/fluido, las transiciones bicapa - hexagonal o bicapa micelar, dependen de la naturaleza de los constituyentes (cabeza polar y ácidos grasos) y de los factores del medio (temperatura, pH, calcio). La naturaleza de los ácidos grasos tiene la misma influencia que en el caso antes indicado de la transición gel/fluido; las características que favorecen la fluidez (cadenas cortas o insaturación) favorecen igualmente la adopción de estructuras no lamelares.

Admitiendo que los comportamientos polimórficos observados en las mezclas simples de fosfolípidos existen también en las membranas naturales (DE KRUIJFF

y col., 1981), ha sido posible demostrar que la presencia de elementos minerales como el calcio inducen la separación de fases rígidas (fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol), fluidas (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) o micelares (difosfatidilglicerol, ácido fosfatídico) (SACKMAN, 1986; LANDAU y LESHEM, 1988), lo que explicaría el aumento de permeabilidad de las membranas bajo dichas condiciones iónicas.

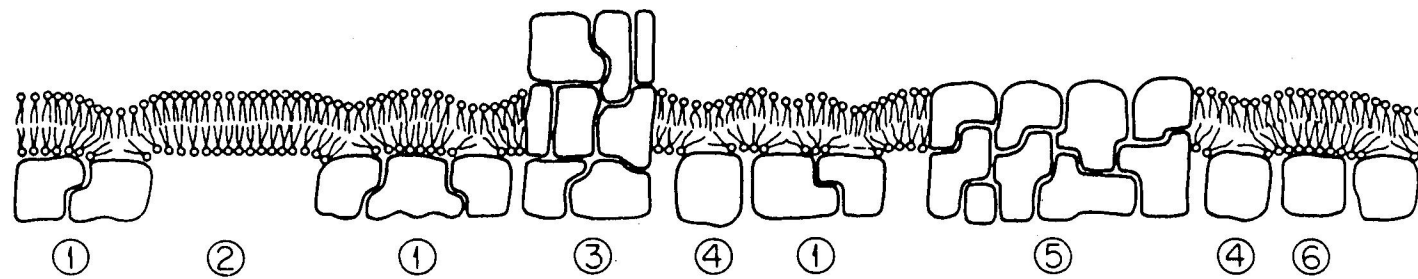
Estas consideraciones teóricas muestran, en su conjunto, que la permeabilidad de las bicapas fosfolipídicas está fuertemente controlada por la fluidez de las membranas. De aquí, que dentro del plan de trabajo propuesto en esta Memoria para determinar el mecanismo de acción del boro en plantas, se haya propuesto, investigar en las membranas microsomales aisladas de células de girasol desarrolladas en medios con o sin boro, los cambios en la fluidez (polarización de fluorescencia), como parámetro clave para el control de un gran número de procesos fisiológicos relacionados con la permeabilidad celular.

### **3.1.3. Interacción lípido-proteína: Propiedades de membrana**

Para que la membrana plasmática pueda actuar manteniendo una diferencia electroquímica entre el interior y el exterior celular, es preciso que forme una vesícula cerrada, constituyendo la asimetría estructural y funcional de las membranas otra propiedad esencial. En este sentido, las moléculas proteicas incrustadas en las membranas o ligadas a ellas, al ofrecer una orientación fija, determinan su lateralidad lo que conlleva la existencia de funciones distintas en sus superficies interior y exterior. Del amplio abanico de funciones vitales que presentan las proteínas de membrana destaca la permeabilidad selectiva de iones o moléculas específicas, la cual se explica en función de que ciertas proteínas formen canales o

bombas que franquean el paso de éstos a través de la membrana, o los conducen a su través en contra de un gradiente de concentración (ATPasa y sistemas redox). En esta misma línea de argumentos, la respuesta de una célula vegetal a las hormonas también depende de proteínas receptoras que detectan la presencia de esas moléculas y transmiten sus señales a través de la membrana. Del mismo modo, las proteínas ejercen efectos sobre los lípidos de las membranas, que modulan a su vez a las proteínas, bien a nivel de su conformación o a nivel de su actividad (SJOSTRAND y KREMAN, 1979; HOFFMAN y col., 1980; COOKE y BURDEN, 1990) (Figura 3).

En su conjunto, estas consideraciones sobre las propiedades de las membranas, definidas por sus componentes lipídicos y protéicos, demuestran que los cambios estructurales inducidos por las interacciones lípido-proteína, e influenciados por distintos agentes físicos y químicos, pueden ser de gran importancia para el estudio de la acción del boro en plantas.



**Figura 3.** Interacción lípido-proteína: 1. Agregados de moléculas proteicas que interaccionan parcial o hidrofóbicamente con la bicapa lipídica. 2. Bicapa lipídica sin proteínas asociadas. 3. Complejos proteicos multimoleculares penetrando en la bicapa lipídica. 4. Moléculas proteicas que interaccionan individual e hidrofóbicamente con la bicapa. 5. Complejos de proteínas extendidos a través de las membranas. 6. Moléculas proteicas unidas a la membrana por interacciones eléctricas con las cabezas polares de los lípidos (SJOSTRAND y KREMAN, 1979).

### III. PLAN DE TRABAJO



De acuerdo con la introducción y los antecedentes expuestos, se ha establecido el siguiente Plan de Trabajo para el estudio de la acción primaria del boro a nivel de membranas y suspensiones celulares de girasol:

1° Obtención y optimización del cultivo celular: Inducción de la callogénesis y evaluación del crecimiento celular en función del boro.

2° Estudio del efecto del boro sobre la extrusión de  $H^+$  a nivel de la célula entera:

- Caracterización de la extrusión de  $H^+$ .
- Efecto de la deficiencia en boro sobre la extrusión de  $H^+$  dependiente de la actividad  $H^+$ -ATPasa y de los sistemas redox de la membrana plasmática.

3° Efecto del boro sobre la actividad de enzimas de membranas aisladas a partir de las suspensiones celulares:

- Caracterización de los microsomas aislados.
- Actividad ATPasa y flujo de  $H^+$  dependiente de ATP.
- Actividad de enzimas del sistema redox de la membrana plasmática.

4° Acción del boro sobre el grado de fluidez y sobre el perfil proteico de las membranas microsomales aisladas.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

## **1. OBTENCION DE LOS CULTIVOS CELULARES**

Los diferentes estudios planteados en el plan de trabajo de esta Memoria se han realizado en suspensiones celulares obtenidas a partir de callos de ápices radiculares de girasol.

A fin de minimizar las variables en el sistema experimental, se han utilizado sistemáticamente semillas certificadas de girasol (*Helianthus annuus*, L. variedad híbrido enano) suministradas por Koipesol.

### **1.1. ESTERILIZACION Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS**

Las semillas desinfectadas con cryptonol al 1 % durante 30 minutos y con hipoclorito sódico al 50 % durante 15 minutos y esterilizadas mediante tres lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos, respectivamente, fueron sembradas en condiciones asépticas en tubos de ensayo conteniendo 20 ml de agar-agar al 0.6 %, previamente autoclavado a 120 °C durante 1 hora. Posteriormente, se mantuvieron para su germinación a  $27 \pm 0.5$  °C en oscuridad durante 48 horas hasta la formación de un radícula de 0.1 a 0.5 cm de longitud.

## 1.2. INDUCCION DE LA CALLOGENESIS

La formación de un callo se consigue colocando el explanto en un medio de cultivo relativamente simple cuyos componentes principales son sales inorgánicas, azúcares, vitaminas, auxinas y/o citoquininas (BHOJWANI y RAZDAN, 1983).

Las radículas fueron cultivadas asepticamente en placas de Petri estériles conteniendo 25 ml de un medio semisólido, previamente autoclavado a 120 °C durante 1 hora, compuesto por las sales minerales de MURASHIGE y SKOOG (1962) y complementado con 500 mg/l mio-inositol, 100 mg/l ácido ascórbico, 0.01 mg/l tiamina, 1 mg/l piridoxina, 60 g/l sacarosa, 6 g/l agar, 2 mg/l BAP y 0.25 mg/l 2,4-D. El pH del medio se ajustó a 7.0 con 10 % KOH (medio basal de cultivo).

Las placas con el explanto fueron selladas con parafilm e incubadas a  $27 \pm 0.5$  °C en oscuridad durante 20 días hasta la formación del callo.

Para que tenga lugar un crecimiento y división celular óptimos, la mayoría de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* necesitan un aporte exógeno de auxinas y/o citoquininas. Teniendo en cuenta que los requerimientos varían ampliamente en función de la especie vegetal y del explanto utilizado, éste ha sido el primer aspecto analizado en este trabajo.

A fin de optimizar el balance hormonal requerido para inducir la callogénesis en ápices radiculares de girasol, se han utilizado las siguientes concentraciones de auxinas y citoquininas:

BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	AIA (mg/l)
2.0	0.5	0.0
0.1	2.0	0.0
0.1	0.1	0.0
3.0	0.0	0.0
0.0	2.0	0.0
0.0	0.0	4.0

Por otra parte, puesto que el estudio de la acción primaria del boro ha constituido el objetivo básico de este trabajo, fue necesario determinar previamente la respuesta de la callogénesis a este elemento. Para ello, se han utilizado tres concentraciones de boro en el medio de callogénesis (0, 0.1 y 0.2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), evaluándose finalmente las variables indicadas en función del peso fresco y de la morfología de los callos.

### **1.3. OBTENCION DE LAS SUSPENSIONES CELULARES. MEDIOS DIFERENCIALES DE BORO**

Las suspensiones celulares han sido obtenidas a partir de callos cronológicamente idénticos (20 días) desarrollados en el medio basal de cultivo. 2.0 ± 0.2 g de tejido indiferenciado (callo) se suspendieron en 50 ml del medio utilizado para la inducción del callo, con diferente contenido de hormonas (1 mg/l BAP y 0.25 mg/l 2,4-D). Las células una vez disgregadas fueron cultivadas a 27 ± 0.5 °C, 30

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (16 horas/día) y 80 rpm en un agitador <techne, MCS-1045> (condiciones óptimas de cultivo).

Para el estudio de la acción primaria del boro a nivel de las suspensiones celulares, se han utilizado tiempos cortos de deficiencia, en los que el crecimiento celular no se viera aún afectado por la carencia del mismo. De aquí, que en los estudios de deficiencia se eliminara el boro durante el desarrollo del cultivo celular y, no así, durante la callogénesis.

Así, el efecto del boro sobre el crecimiento celular fue determinado en células de callos procedentes del medio basal de cultivo (0.1 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), modificando las concentraciones de boro (0, 0.1 y 0.2 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) durante el desarrollo del cultivo celular.

### **1.3.1. Determinación del crecimiento y viabilidad celular**

El crecimiento fue analizado midiendo la densidad celular en un hemocitómetro y la viabilidad mediante la tinción con diacetato de fluoresceína (WIDLÖM, 1972). Para ello, se preparó una solución madre de este compuesto en acetona al 0.002%, utilizándose con la suspensión celular en una proporción 1:1 (volumen de células: volumen diacetato). La preparación así obtenida se incubó en un portaobjetos durante 5 minutos en oscuridad, analizándose la viabilidad de las células por microscopía de fluorescencia.

### **1.3.2. Determinación del contenido en boro de las células**

El contenido en boro de las células se determinó espectrofotométricamente según el método de la azometina (LACHICA, 1976).

## **2. ESTUDIOS A NIVEL DE LA CELULA ENTERA**

### **2.1. DETERMINACION DE LA EXTRUSION DE H<sup>+</sup>**

#### **2.1.1. Fundamento del método de medida**

La capacidad extractora de H<sup>+</sup> por las células de girasol se ha determinado utilizando un sistema de regulación continua y automática de pH, que consta esencialmente de un embudo Buchner provisto de una placa porosa de vidrio fritado y en el que se mantienen las células en suspensión haciendo pasar a través de la placa una corriente continua de aire descarbonatado. El sistema consta también de un baño termostatzado que permite mantener constante la temperatura del medio de incubación, para lo que se hace pasar el agua a través de la doble pared del embudo, así como de un equipo Metrohm pH-stat para la regulación del pH, compuesto por módulos de pH-meter, multidosimat e impulsomat. Al objeto de mantener una elevada concentración de oxígeno en el medio de incubación de las células y evitar la interferencia del CO<sub>2</sub> atmosférico, el aire impulsado por una bomba de pecera se hace pasar sucesivamente a través de cuatro columnas de vidrio, una rellena de gel de sílice y tres de cal sodada con indicador de saturación (Figura 4).

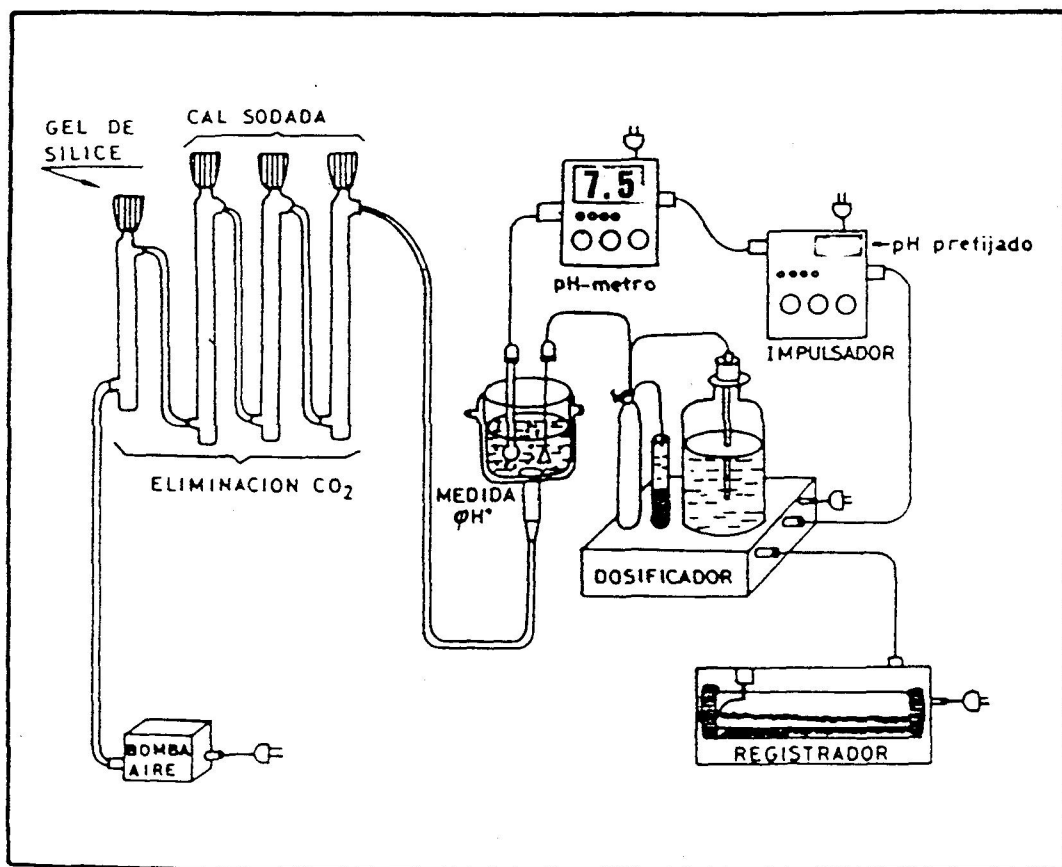


Figura 4. Dispositivo experimental utilizado para medir la extrusión de  $H^+$ .



El funcionamiento de este dispositivo se basa en la generación de un impulso eléctrico derivado del cambio de pH del medio de incubación de las células, respecto al prefijado en el impulsomat, el cual se transmite al multidosimat haciendo que éste libere al medio de incubación de las células volúmenes fijos de una solución de KOH de concentración conocida. El volumen de solución adicionado, indicado por el multidosimat y reflejado analógicamente en el registrador, es proporcional a la cantidad de  $H^+$  extruidos por las células al medio de incubación (DAVIDIAN, 1984).

### **2.1.2. Medida de la extrusión de $H^+$ y evaluación del registro**

Se utilizaron sistemáticamente células en la mitad de su fase exponencial de crecimiento (36 horas de cultivo).  $2 \times 10^6$  células obtenidas por filtración y lavadas con solución isoosmótica de sorbitol (3.5 %) fueron resuspendidas en 12 ml del medio estándar de incubación (100  $\mu$ M  $CaCl_2$ , 2 mM KCl, 3.5 % sorbitol y 400  $\mu$ g/ml de estreptomycin), determinándose la extrusión de  $H^+$  durante un período de 5 horas a 27 °C, bajo una iluminación de 10  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s.

A partir de los registros en función del tiempo de medida, se obtuvo la primera derivada a intervalos de tiempo constantes de 1 h. Esta curva transformada, representa la velocidad de flujo de  $H^+$  en nmol  $H^+$ /10<sup>6</sup> células/h. La utilización de la velocidad máxima y el flujo neto de  $H^+$  (variables discretas), en lugar del registro continuo del flujo de  $H^+$ , simplificó en gran medida el análisis estadístico de los datos.

## 2.2. DETERMINACION DE LA REDUCCION DEL FERRICIANURO POR LAS CELULAS

La capacidad de reducción del ferricianuro adicionado al medio de incubación por las células de girasol, se determinó simultáneamente a la capacidad extractora de  $H^+$ . Para ello, a tiempo cero y tras 5 horas de incubación se tomaron alícuotas de dicho medio suplementado con 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , centrifugándose a 12000 rpm durante 5 minutos y determinándose en el sobrenadante la reducción del ferricianuro espectrofotométricamente a 420 nm. El cálculo de los nmoles de  $Fe(CN)_6^{3-}$  reducidos/ $10^6$  células en las células testigos y tratadas con boro, auxinas y otros compuestos, se llevó a cabo utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

En la expresión de los resultados en función de la razón  $H^+/e^-$ , los  $H^+$  extruidos corresponden a la diferencia entre la actividad extractora medida en presencia y ausencia de 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$ .

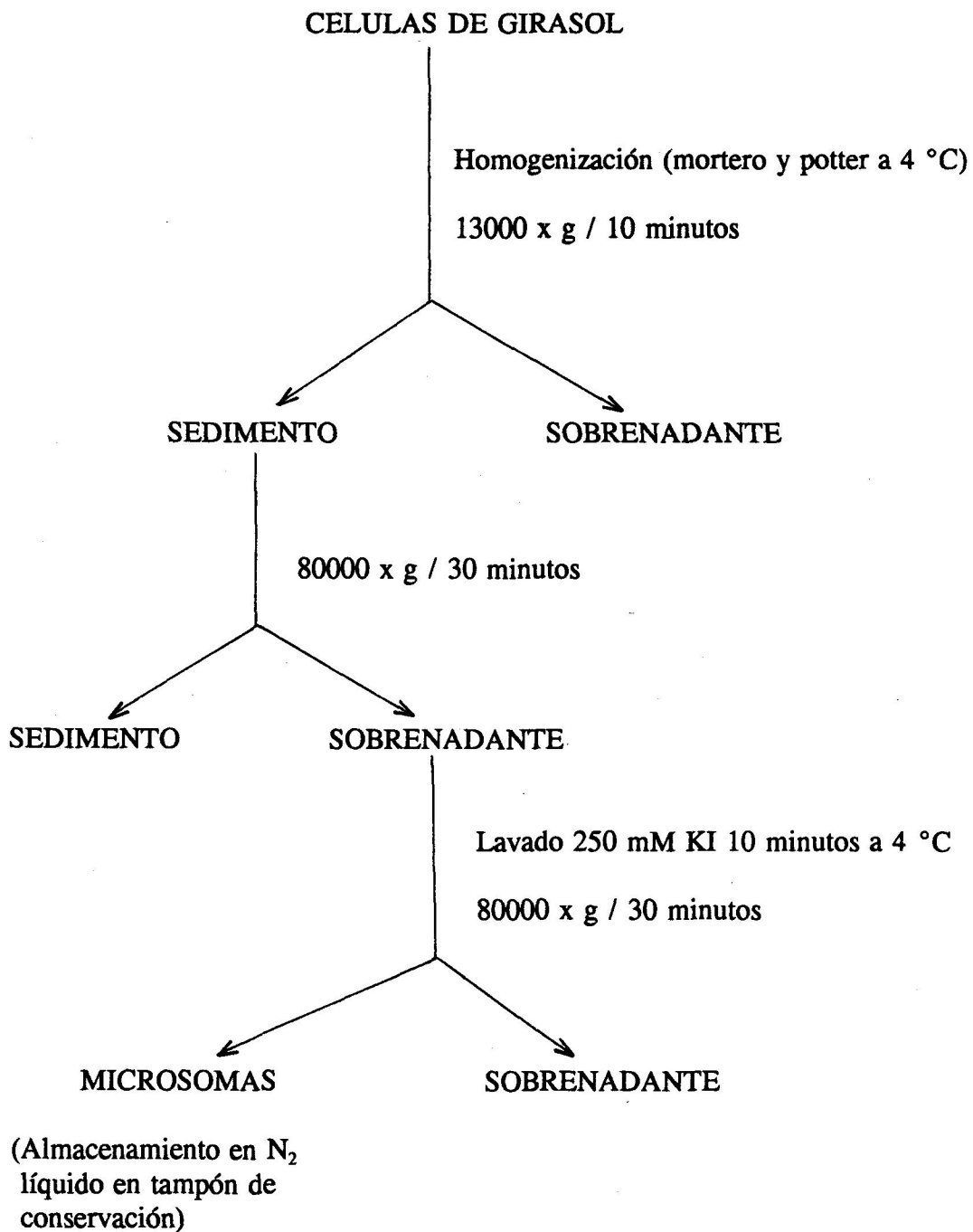
### **3. ESTUDIOS A NIVEL DE MEMBRANAS**

#### **3.1. OBTENCION DE MEMBRANAS MICROSOMALES**

##### **3.1.1. Método de aislamiento**

Para la obtención de vesículas microsomales con una alta actividad ATPasa sensible al vanadato e insensible a nitrato y azida se ha utilizado la metodología de DE MICHELIS y SPANSWICK (1986). Aunque con este método, no se consigue una absoluta purificación del plasmalema, si se obtiene una elevada actividad ATPasa, permitiendo establecer la contribución de las diferentes H<sup>+</sup>-ATPasas presentes en los microsomas aislados mediante la utilización de inhibidores específicos.

En el esquema de la Figura 5 se indican los pasos seguidos para el aislamiento de las membranas microsomales. 10 gramos de peso fresco de células filtradas y lavadas con solución isoosmótica de sacarosa, fueron homogenizadas en mortero y, posteriormente, en potter a 4 °C, manteniendo una proporción 1/4 de peso de células por volumen de medio de homogenización, el cual ha estado compuesto por 10 % glicerol, 250 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM DTT, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM ATP, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 10 % PVPP. El homogenado obtenido fue centrifugado a 13000 xg durante 10 minutos y



**Figura 5.** Obtención de membranas microsomales de células de girasol con una alta actividad H<sup>+</sup>-ATPasa sensible a vanadato e insensible a nitrato y azida.

posteriormente a 80000 xg durante 30 minutos. El sedimento resultante de esta segunda centrifugación fue resuspendido en 30 ml de medio de homogenización suplementado con 250 mM KI, incubándose durante 10 minutos a 4 °C. Tras la incubación el sedimento obtenido por centrifugación a 80000 xg durante 30 minutos fue resuspendido en tampón de conservación conteniendo 10 % glicerol, 250 mM sacarosa, 2 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM DTT, siendo finalmente almacenado en N<sub>2</sub> líquido.

## **3.2. ANALISIS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS ASOCIADAS A LOS MICROSOMAS AISLADOS**

### **3.2.1. Actividad ATPasa**

Se ha utilizado el método de HODGES y LEONARD (1974) con algunas modificaciones, basado en la determinación del P<sub>i</sub> liberado por la hidrólisis del ATP (AMES, 1966). Una alícuota de las membranas microsomales (8 µg de proteína) se incuban a 30 °C durante 30 minutos en 500 µl de un medio conteniendo 25 mM BTP-HCl pH 6.5, 100 mM KCl, 100 µM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 3 mM MgSO<sub>4</sub> y 3 mM ATP-BTP. La reacción se detiene mediante la adición de 1 ml del reactivo de Ames (10 % ácido ascórbico, 0.42 % (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> y 2 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) suplementado con 5 % SDS. La actividad enzimática se ha determinado espectrofotométricamente a 820 nm, frente a una curva patrón de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, expresándose los resultados en µmol P<sub>i</sub>/mg proteína/hora.

Para determinar la proporción de vesículas con orientación invertida como consecuencia del proceso de extracción, se analizó la actividad enzimática en presencia de 0.1 mM LFC, como agente permeabilizante de las membranas. La actividad latente se define como la diferencia entre la actividad medida en presencia y en ausencia de LFC y la latencia, como la actividad latente expresada en

porcentaje de la actividad ATPasa en presencia de LFC (GALTIER y col., 1988):

$$\text{Latencia} = \frac{\text{Actividad (+LFC)} - \text{Actividad (-LFC)}}{\text{Actividad (+LFC)}}$$

La determinación de la actividad ATPasa en función de inhibidores específicos de diferentes H<sup>+</sup>-ATPasas vegetales, permitió establecer la proporción de estas enzimas en la fracción microsomal.

### 3.2.2. Actividad ATPasa sensible a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

La contaminación debida a tonoplasto fue estimada como la actividad Mg<sup>2+</sup>-ATPasa sensible a nitrato (O'NEIL y col., 1983). La reacción se llevó a cabo a pH 8.5, en presencia de 0.1 mM LFC y de 100 mM de KCl o de KNO<sub>3</sub>, definiéndose la actividad sensible a nitrato como la diferencia entre las actividades medidas en presencia de KCl y KNO<sub>3</sub>.

$$\Delta\text{NO}_3^- = \text{Actividad (KCl)} - \text{Actividad (KNO}_3)$$

### 3.2.3. Actividad ATPasa sensible a N<sub>3</sub><sup>-</sup>

El grado de contaminación mitocondrial de los microsomas aislados, definida como la actividad Mg<sup>2+</sup>-ATPasa sensible a azida, se realizó así mismo a pH 8.5 en presencia de 0.1 mM LFC y  $\pm$  1 mM NaN<sub>3</sub> (GALTIER y col., 1988), expresándose como:

$$\Delta N_3^- = \text{Actividad } (-\text{NaN}_3) - \text{Actividad } (+\text{NaN}_3)$$

### 3.2.4. Actividad ATPasa sensible a $\text{VO}_4^{3-}$ e insensible a $\text{NO}_3^-$ y $\text{N}_3^-$

La actividad Mg-ATPasa del plasmalema definida como la actividad sensible a vanadato e insensible a nitrato y azida, fue analizada a pH 6.5 en presencia de 0.1 mM LFC, 1 mM  $\text{NaN}_3$  y 100 mM  $\text{KNO}_3$ , así como  $\pm 250 \mu\text{M}$  vanadato (SERRANO, 1990):

$$\Delta V_a = \text{Actividad } (+\text{KNO}_3 + \text{NaN}_3) - \text{Actividad } (+\text{KNO}_3 + \text{NaN}_3 + V_a)$$

### 3.2.5. Actividad IDPasa

La actividad IDPasa latente expresa la contaminación por membranas del aparato de Golgi (GREEN, 1983). Para su medida el medio de reacción contiene 50 mM BTP-HCl pH 7.2, 100 mM KCl, 3 mM IDP, 3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y 8  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ , llevándose a cabo a 30 °C durante 30 minutos y deteniéndose ésta por adición de 1 ml del reactivo de Ames. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 820 nm frente a una curva patrón preparada con una solución acuosa de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , definiéndose la actividad IDPasa latente como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y en ausencia de 0.1 mM LFC.

### 3.2.6. Actividad NADH-citocromo c reductasa insensible a antimicina A

Esta actividad permite cuantificar el contenido de retículo endoplasmático en la fracción microsomal. Para su determinación, sobre el medio de reacción

conteniendo 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.5, 1.66 mM KCN, 30  $\mu\text{M}$  citocromo c oxidado, 1  $\mu\text{M}$  antimicina A y 10  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana en un volumen de 1 ml, se adiciona NADH a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , midiéndose espectrofotométricamente a 500 nm el aumento de densidad óptica debido a la reducción del citocromo c exógeno (HODGES y LEONARD, 1974). La utilización de un coeficiente de extinción molar de  $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ha permitido expresar los datos en  $\mu\text{moles}$  citocromo c reducido/mg proteína/hora.

### 3.2.7. Actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa

La actividad NADH-ferricianuro óxidoreductasa de la membrana plasmática fue analizada espectrofotométricamente a 420 nm (SANDELIUS y col., 1986). El medio de reacción estuvo constituido por 25 mM Tris-Mes pH 7.0, 1.25 mM KCN, 25  $\mu\text{M}$  antimicina A, 100 mM de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 10  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 1 ml. Tras 3 minutos de incubación a 25 °C la reacción se inició por adición de NADH a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . Los nmoles de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  reducidos / mg proteína / minuto se determinaron utilizando un coeficiente de extinción molar de  $1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.8. Actividad NADH oxidasa

La actividad NADH oxidasa de plasmalema en las vesículas aisladas se determinó espectrofotométricamente en función de la disminución de la absorbancia a 340 nm (BRIGHTMANN y col., 1988). El medio de reacción contenía 25 mM Tris-MES pH 7.0, 0.1 M sacarosa, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 10 mM NaCl y 20  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 1 ml. Tras un período de incubación de 5 minutos a 25 °C, la reacción se inició mediante la adición de NADH a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . La utilización de un coeficiente de extinción molar de  $6.22 \text{ mM}^{-1}$



$^1\text{cm}^{-1}$  permitió expresar la actividad en nmoles de NADH oxidados / mg proteína / minuto.

### 3.3. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINAS

La determinación del contenido en proteínas a nivel de los microsomas aislados se llevó a cabo según el método de SCHAFFNER y WEISSMAN (1983), mediante el cual se evita la interferencia en la medida del medio de suspensión de las membranas. Las proteínas microsomales convenientemente diluidas con 0.1 M BTP-MES pH 7.0 y 0.1 % SDS, se precipitan mediante la adición de 1 volumen de ácido tricloroacético al 60 % por cada 3 volúmenes de la suspensión de membranas, recogiendo las proteínas así precipitadas por filtración a vacío en sistema Millipore HAWP 02500 utilizando membranas de  $0.45 \mu\text{m}$  de diámetro, y revelándose previa fijación y tinción, en las siguientes condiciones:

- Tinción durante 3 minutos con negro de amido al 0.1 % en una mezcla de ácido acético:agua:metanol (10:45:45, v:v:v).
- Lavado con agua destilada durante 30 segundos.
- Decoloración tres veces durante 1 minuto con la mezcla ácido acético:agua:metanol (2:8:90, v:v:v).
- Lavado con agua destilada durante 90 segundos.

La elución de las proteínas así teñidas se llevó a cabo mediante la adición de 1 ml de una solución conteniendo 25 mM NaOH y 0.05 mM EDTA en 50 % EtOH. Transcurridos 20 minutos, se midió la absorción espectrofotométricamente a 630 nm frente a una curva patrón de albúmina bovina.

### 3.4. DETERMINACION DEL FLUJO DE H<sup>+</sup> DEPENDIENTE DE ATP

#### 3.4.1. Fundamento del método de medida

La actividad bombeadora de H<sup>+</sup> a nivel de las vesículas microsomales aisladas se determinó midiendo la velocidad inicial de la extinción de fluorescencia de la quinacrina. Este fluoróforo es un indicador ideal para la medida del gradiente de pH que se establece a ambos lados de las membranas en las que actúan enzimas H<sup>+</sup>-ATPasas. Ello es debido a que la emisión de su fluorescencia se extingue al unirse los H<sup>+</sup> a la estructura de su molécula y a su facilidad para atravesar membranas biológicas en presencia de ionóforos como la valinomicina (BENNET y SPANSWICK, 1983).

La extinción de la emisión de fluorescencia de dicha sonda se ha medido con un espectrofluorímetro marca Shimatzu mod. RF540, provisto de sistemas de agitación magnética y termostatación, en el que se habían fijado las siguientes condiciones:  $\lambda_{exc.} = 423 \text{ nm}$ , rendija 10 nm;  $\lambda_{emis.} = 500 \text{ nm}$ , rendija 10 nm.

El medio de reacción (1 ml) contenía 50 mM BTP-HCl pH 6.5, 100 mM KCl, 0.1  $\mu\text{M}$  valinomicina, 3  $\mu\text{M}$  quinacrina, 3 mM ATP-BTP y 100  $\mu\text{g}$  de proteínas de membrana. Una vez incubadas las membranas durante 20 minutos en agitación a 25 °C, se inició la reacción mediante la adición de 3 mM MgSO<sub>4</sub>. Alcanzado el equilibrio, tras la pendiente inicial, la actividad enzimática se inhibió mediante la adición de 15 mM EDTA-Na pH6.5, recuperándose la emisión inicial del valor de fluorescencia con gramicidina o mediante otros ionóforos capaces de extinguir el gradiente generado.

### 3.4.2. Evaluación del registro

A partir de las curvas obtenidas se calculan los siguientes parámetros correspondientes a la actividad bombeara de  $H^+$  en las vesículas problemas:

- Velocidad inicial de extinción (Quenching,  $VO_0$  %): Define la pendiente inicial de la curva que resulta del cociente entre la emisión inicial y el tiempo necesario para que dicha emisión se extinga por completo.

- Velocidad específica de extinción (VOS): Corresponde a la velocidad inicial expresada por mg de proteína.

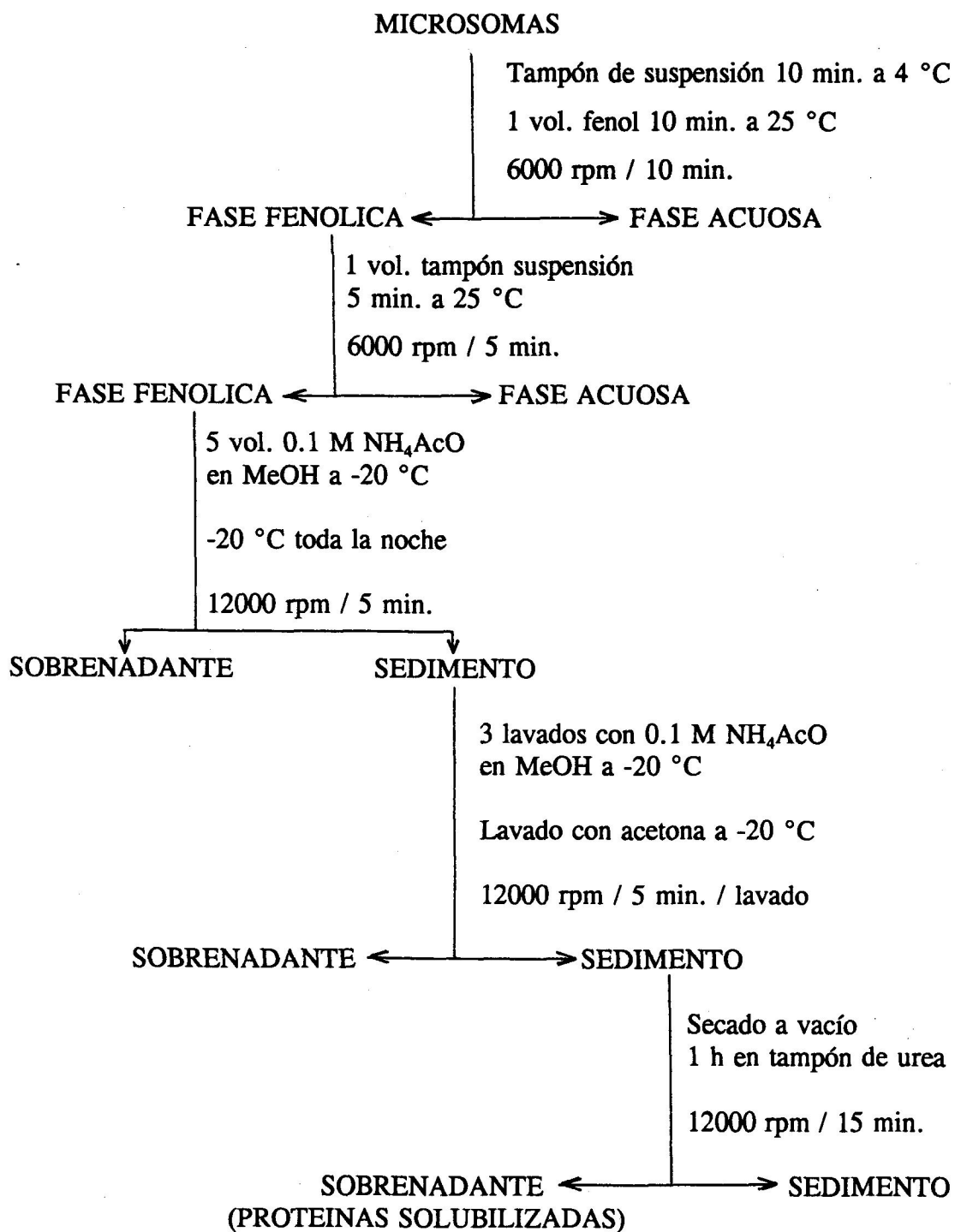
- Extinción máxima ( $O_{max}$ ): Representa la proporción de emisión extinguida respecto a la emisión inicial.

### 3.5. ANALISIS Y SINTESIS DE PROTEINAS MICROSOMALES

El análisis proteico de la fracción microsomal se ha llevado a cabo mediante la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional y tinción con plata (contenido) o fluorografía tras el marcaje *in vivo* de 10 gramos de células durante 3 horas en 20 ml del medio de cultivo al que se le adicionaron 250  $\mu Ci$  de L-metionina marcada con  $^{35}S$  (síntesis).

#### 3.5.1. Solubilización de las proteínas microsomales

Una vez aislada la fracción microsomal, las proteínas fueron extraídas con fenol según el método descrito por SCHUSTER y DAVIES (1983) (Figura X). 300  $\mu g$  de proteínas microsomales (para tinción con plata) o 2-2.5 cpm de proteínas insolubles en ácido tricloroacético (para fluorografía) fueron incubadas durante 10 minutos a 4 °C en 400  $\mu l$  de un tampón conteniendo 0.5 M Tris, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 2 % mercaptoetanol, 4 mM PMSF y 0.7 M sacarosa



**Figura 6.** Solubilización de proteínas microsomales según SCHUSTER y DAVIS (1983)

