VOL. 10

No. 1, 2, 3 y 4

1991

EDITORIAL

EL TRABAJO DE INVESTIGACION CIENTIFICA

El trabajo de investigación representa una actividad profesional de gran relevancia que, para cualquier país en vías de desarrollo, puede significar por un lado, alcanzar un grado de crecimiento científico elevado y por otro, sentar las bases para una eventual independencia tecnológica.

Para ello se considera como necesario realizar siempre un trabajo de investigación de primera y mantenerse en la frontera del conocimiento. Con investigación de primera me refiero a aquella que surge de una pregunta y que plantea las mejores estrategias para su resolución, estrategias que son el resultado de la creatividad, de la imaginación y de la experiencia de los individuos en un campo determinado. Estrategias que generan resultados que se van tejiendo poco a poco

para generar nuevas preguntas y la necesidad de nuevas estrategias para abordarlas y eventualmente para resolverlas. Con mantenerse en la frontera del conocimiento quiero decir el disponer de un sistema de información constante, eficiente y oportuno que permita estar al tanto del avance en el campo, así como predecir sus perspectivas y potencialidades y en su caso, reorientar el trabajo que se está desarrollando.

La investigación en México no tiene muchos años de haberse iniciado, al principio solamente se dirigió a generar conocimiento sobre principios naturales pero sin visualizar en ello objetivos utilitarios. No fue sino hasta hace unos 20 años, que amplió sus horizontes e incursionó también en el desarrollo de

Pasa a la pág. 3

COMITE EDITORIAL INDICE BEB 91 Vol. 10 Núm. 1 Marzo de 1991 **ALFONSO CARABEZ TREJO** Instituto de Fisiología Celular Universidad Nacional Autónoma de México **EDITORIAL** GUILLERMO CARVAJAL SANDOVAL EL TRABAJO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Sergio Sánchez Esquivel......1 Escuela Nacional de Ciencis Biológicas Instituto Politécnico Nacional ARTICULO ALBERTO HAMABATA NISHIMUTA NODULINAS EN LA SIMBIOSIS Rhizobium -Centro de Investigación y Estudios Avanzados **LEGUMINOSA** Instituto Politécnico Nacional Jaime Padilla Acero y Raúl Arredondo Peter4 ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN BEB 91 Vol. 10 Núm. 2 Junio de 1991 Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" EDITORIAL CARLOS LARRALDE RANGEL Instituto de Investigaciones Biomédicas EL APRENDIZAJE DE LA BIOQUIMICA ENTRE LOS ESTUDIANTES Y EL PENSAMIENTO MAGICO ENTRE LOS MEDICOS Universidad Nacional Autónoma de México JESUS MANUEL LEON CAZARES Instituto de Fisiología Celular ARTICULO Universidad Nacional Autónoma de México LOS OSCILADORES CITOSOLICOS DE CALCIO ENRIQUE PIÑA GARZA Sandra Sotelo y Roger Gutiérrez14 Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México BEB 91 Vol. 10 Núm. 3 Septiembre de 1991 SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL **EDITORIAL** Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México INFORMACION INTEGRADA CONTRA INFORMACION AISLADA COORDINADOR EDITORIAL Jesús Manuel León Cázares21 ARTICULO YOLANDA SALDAÑA DE DELGADILLO Facultad de Medicina TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS Universidad Nacional Autónoma de México DE PLACENTA HUMANA A TERMINO Oscar Flores Herrera, Federico Martínez, **EDITOR ASOCIADO** Juan Pablo Pardo, Juan Luis Rendón Gómez y Ma. Teresa Espinosa García......23 **GUILLERMO ALVAREZ LLERA** Facultad de Medicina BEB 91 Vol. 10 Núm. 4 Diciembre de 1991 Universidad Nacional Autónoma de México **EDITORIAL** APOYO SECRETARIAL HISTORIA NATURAL DEL BEB **ELISA MORA** Yolanda Saldaña de Delgadillo29 Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México ARTICULO EL PAPEL DEL L-MALATO EN EL METABOLISMO VEGETAL INDICE GENERAL38 INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA 40 Facultad de Medicina. Asociación Mexicana de

Profesores de Bioquímica, A.C.

UNAM

Viene de la pág. 1

EL TRABAJO...

estudios con potencial tecnológico, los cuales de alguna manera llamaron más la atención de diversas administraciones y organismos de apoyo económico tanto nacionales como internacionales. Como resultado de ello se empezaron a acuñar términos como "ciencia básica y aplicada", "ciencia comprometida y no comprometida", producto todos ellos de principios sustancialmente políticos y administrativos. En este mismo sentido, los medios de difusión y las industrias han jugado también un papel fundamental de apoyo a la división de la investigación en "básica y aplicada". Como resultado de ello, de alguna manera se ha venido a distorsionar el concepto y la imagen de la investigación misma, ya que entre otras cosas, se ha visto una actitud de rechazo y resistencia de muchos investigadores para abordar temas de interés utilitario por considerarlos como "ciencia impura" o "investigación de segunda".

La investigación es y siempre ha sido una sola que tiene como objetivo principal la generación del conocimiento, es decir, independientemente de sus aplicaciones, el avance del conocimiento resulta en la mejor definición de los fenómenos que persigue. La investigación generalmente parte de una pregunta y con frecuencia resulta en más de una respuesta y éstas se constituyen a su vez en la base de otras preguntas. Además, la experiencia nos ha enseñado que en su

dinámica de operación, el empleo de modelos de estudio apropiados resulta en un mejor avance de la misma. En este sentido no hay una base lo suficientemente sólida para su separación en básica y aplicada como dos entes de trabajo con principios y normas diferentes. Sí habrá que distinguir entre la ciencia y la tecnología, al representar ésta una respuesta a necesidades particulares. La tecnología, que hoy en día resulta de la aplicación de la ciencia, es bastante más antigua y su desarrollo inicial giró alrededor de principios empíricos.

La realización de actividades científicas en un país en desarrollo como el nuestro, requiere de la mayor difusión y apoyo económico, ya que además de generar conocimientos, que eventualmente pueden tener una significación tecnológica, representa una alternativa atractiva y valiosa para la formación de recursos humanos de alto nivel académico. Es decir, se constituye en un excelente modelo para dotar a nuestros futuros recursos humanos de las herramientas y estructura de pensamiento dirigida a la resolución de problemas. Recursos humanos así formados representan la esperanza de nuestro pueblo, al poder llenar eventualmente y con materia prima de excelencia, los cuadros técnicos y científicos que se demandan.

Sergio Sánchez Esquivel Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA (BEB), publicación trimestral de la Asociación Mexicana de Profesores de Bioquímica, A.C. Correspondencia: Comité Editorial, Apartado Postal 70,281, Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F. Tiraje 2,000 ejemplares.

NODULINAS EN LA SIMBIOSIS Rhizobium* LEGUMINOSA

Jaime Padilla Acero1 y Raúl Arredondo Peter2

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, 62271 Cuernavaca, Mor.

²Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo. Postal 70-242, 04510 México, D.F.

RESUMEN

Los procesos morfogenéticos son el resultado de la diferenciación de grupos de células en tejidos especializados. Durante este proceso ocurre la expresión diferencial de determinados genes y como consecuencia, la síntesis de proteínas específicas. Los nódulos radicales de las plantas fijadoras del nitrógeno son un modelo interesante de estudio, ya que en ellos se ha podido esclarecer muchos procesos morfogenéticos: se han detectado proteínas específicas de estos órganos, su síntesis temporal a lo largo del desarrollo, y los factores que regulan la expresión de los genes que codifican a estas proteínas. En este trabajo los autores intentan presentar un panorama general del conocimiento actual de las proteínas específicas de los nódulos, las nodulinas, así como algunas consideraciones acerca de su función dentro de los tejidos en los que se sintetizan.

GLOSARIO

SDS-PAGE - electroforésis en un gel de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturalizantes como el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS).

2D-PAGE - electroforésis en un gel de poliacrilamida que se corre en dos dimensiones: en la primera la separación es por un gradiente de pH hasta que las proteínas alcanzan su punto isoeléctrico (también se le conoce como enfoque isoeléctrico o IEF), y en la segunda la separación es por SDS-PAGE.

cDNA - DNA copia que resulta de la transcripción inversa que utiliza como molde al RNAm, mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa.

HIDROPATIA - valor de hidrofobicidad que presenta un

residuo de aminoácido en la cadena polipeptídica, de acuerdo con su naturaleza y con la de los demás residuos que interactúan con él. Un perfil de hidropatía muestra las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de una proteína.

GENERALIDADES

Las leguminosas son una familia de plantas con flores, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno N2, al transformarlo en amonio NH4+, gracias al establecimiento de una relación simbiótica con bacterias de los géneros Rhizobium*, Bradyrhizobium, Azorhizobium y Sinorhizobium, que son quienes en realidad llevan a cabo este proceso de fijación. Como resultado de dicha simbiosis, la cual se desarrolla principalmente en el tejido radical de la planta (aunque también se presenta en el tallo), se forman unos órganos especializados que se conocen como "nódulos". Estas estructuras nodulares son el punto culminante de la interacción entre el tejido radical de la planta y el microorganismo; los fenómenos principales que conducen a la formación del nódulo se pueden resumir de la siguiente manera (1):

- a) Unión de la bacteria a la superficie externa del pelo radical.
- b) Curvamiento del pelo radical.
- c) Formación del hilo de infección, que es por donde penetran las bacterias al tejido vegetal.
- d) Rediferenciación del tejido radical en una corteza y formación de un primordio de nódulo.
- e) Liberación de las bacterias en el citoplasma de la célula vegetal y formación de una membrana peribacteroidal.

^{*} A lo largo de esta revisión se utiliza el género Rhizobium que pertenecen a la familia Rhizobiaceae, para referirse a las bacterias fijadoras del nitrógeno que forman simbiosis con especies de la familia Leguminosae.

f) Diferenciación de los *rhizobia* en bacteroides fijadores del nitrógeno.

La formación de los nódulos fijadores del nitrógeno implica la interacción compleja de una gran variedad de factores que se sintetizan, de manera coordinada, por la bacteria y la planta y que regulan la expresión de genes específicos en ambos simbiontes. Por parte de la planta, se han detectado entre 20 y 30 proteínas que se sintetizan exclusivamente en los nódulos radicales, pero no en raíces sin infectar ni en otros tejidos; se conoce como "nodulinas" a los genes, así como a los productos de su expresión, específicos del tejido nodular. Estas nodulinas se expresan de manera diferencial a lo largo del desarrollo del nódulo, por lo que se les divide en nodulinas tempranas y tardías (ENOD, de Early NODulins y LNOD, de Late NODulins respectivamente).

NOMENCLATURA. Las proteínas específicas de los nódulos pueden ser de origen bacteriano o de la planta. Se conocen como "bacteroidinas" a las que se codifican por el genoma de los *rhizobia* y "nodulinas" a las de origen vegetal; un tercer grupo son las "simbactinas" que son aquellas que se encuentran en las células de los nódulos radicales pero fuera del bacteroide; éstas se codifican por el genoma de *Rhizobium*.

Desde el punto de vista experimental, debido a que al extraer estas proteínas de los nódulos se obtienen tanto a las bacteroidinas como a las nodulinas, se han desarrollado estrategias que permiten diferenciar a unas de otras; la más importante de ellas consiste en extraer el RNAm total, y a partir de él, mediante técnicas estándar obtener el RNA poli(A+) característico de las células eucariotos, para sintetizar posteriormente in vitro las proteínas correspondientes y detectar a las nodulinas entre ellas.

Ya que la caracterización inicial de las nodulinas se realiza por electroforésis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE), se designan con la letra "N" seguida de su peso molecular, de acuerdo con su migración en estos geles. Por ejemplo, la nodulina N45 es una proteína específica de los nódulos con un peso molecular de

45 KDa; esta nomenclatura se sustituye por el nombre adecuado de la proteína, en cuanto se conoce su función. En el caso de que en el nódulo se sintetice una forma específica de alguna enzima que esté presente en algún otro tejido, el nombre se antecede con "n"; por ejemplo, la nodulina N35, que corresponde a la uricasa específica de nódulos, se designa como n-uricasa (2).

TECNICAS DE ESTUDIO

ENSAYOS INMUNOLOGICOS. Estas fueron las primeras técnicas que se utilizaron para detectar a las proteínas específicas de los nódulos y consisten en obtener anticuerpos, a partir de conejos inmunizados, con las fracciones proteicas del nódulo, para convertirlos, posteriormente, en antisueros específicos del nódulo, por titulación contra las proteínas de raíces no infectadas. El análisis de inmunodetección se realiza mediante el uso de este último suero con las proteínas del nódulo, que se separaron previamente por SDS-PAGE y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (NC).

Este método presenta las siguientes desventajas: a) la existencia de inmunorreactividad cruzada con algunos productos bacterianos que están presentes en el extracto inicial; b) la eliminación de algunas nodulinas que manifiestan isoenzimas o dominios de proteína - epítopos - similares estructuralmente en el extracto de raíces sin infectar; y c) la dificultad para detectar proteínas abundantes que exhiben una capacidad antigénica baja, o las que se encuentran en cantidades pequeñas. Algunos de estos problemas se han resuelto, al obtener anticuerpos dirigidos contra proteínas purificadas del nódulo; de esta manera, ha sido posible obtener antisueros contra la glutamina sintetasa (GS) de nódulos de frijol, la uricasa II, la leghemoglobina (LB), y otras más.

ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE TRA-DUCCIÓN in vitro. Con el fin de establecer la contribución del vegetal en la simbiosis, es necesario utilizar métodos que proporcionen información exclusiva de la expresión genética de la planta en este proceso. Así, se analizan los productos de traducción in vitro provenientes de distintas fracciones del RNAm, que se aísla del

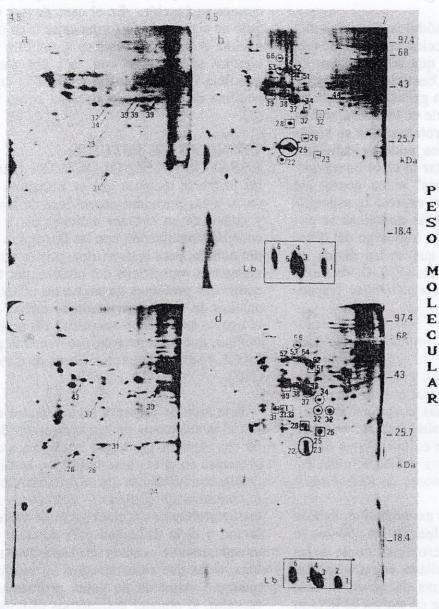


Figura 1. Autorradiografía de los productos de traducción in vitro del RNA poli(A+), aislado de diferentes tejidos de Sesbania rostrata: (a)-raíces sin infectar; (b)-nódulos radicales de 18 días de desarrollo; (c)-tallos sin infectar; y (d)-nódulos del tallo de 18 días de desarrollo. La separación de las proteínas fué por 2D-PAGE. Símbolos: cuadros, polipéptidos específicos del nódulo; círculos, polipéptidos estimulados en el nódulo; flechas, polipéptidos estimulados en la raíz o el tallo sin infec-tar, en relación con otros tejidos de la planta. (Tomado de 3).

nódulo o de la raíz. Se incuba este RNAm en presencia de un sistema reconstituído y funcional de síntesis de proteínas tipo eucarioto, por ejemplo un sistema "libre de células" - como el lisado de reticulocitos de conejo o el de germen de trigo - más aminoácidos (uno de ellos es radiactivo) y cofactores adecuados. Como resultado se obtienen polipéptidos radiactivos que son codificados por los RNAm de la planta, y que se analizan en una placa de autorradiografía, después de su separación por SDS-PAGE o mediante el corrimiento en geles bidimensionales

(2D-PAGE). De esta manera es posible detectar a las proteínas específicas de algún tejido, al comparar los patrones de corrimiento entre, por ejemplo, raíz y nódulos, o nódulos radicales y aquellos que se producen en el tallo de la planta (Fig 1) (3).

Las limitaciones de esta estrategia provienen de la labilidad que presenta el RNAm bajo ciertas condiciones, la escasez de ciertos RNAm y dado que la traducción se realiza generalmente en presencia de [S³⁵]-Met, el contenido de este

aminoácido en la proteína determina la intensidad de la señal en la placa fotográfica, y no refleja necesariamente su abundancia in vivo.

CLONACION DEL CDNA DE LAS NO-DULINAS. Otra aproximación para el estudio de la expresión de nodulinas es por el análisis tipo "Northern", esto es, por el reconocimiento de la identidad de los RNAm y las secuencias genéticas de nodulinas que los codifican. Este método requiere del uso de sondas de hibridización contra el RNAm que se ha sometido a electroforésis; para hacer esto, se requiere de la construcción de bancos de cDNA a partir del RNAm poli(A+) de los nódulos, raíces u otros tejidos. Estos cDNA se clonan en vehículos apropiados, como plásmidos bacterianos y se seleccionan los individuos, o clonas, que poseen una secuencia particular, integrada mediante una hibridización diferencial, es decir, se seleccionan las clonas con el cDNA que hibridiza con el cDNA de los nódulos, pero no con el cDNA de

raíces sin infectar, o con el de otros tejidos (4).

PLANTAS TRANSGENICAS. Estas técnicas son de gran ayuda en el entendimiento de la organización genética y de la regulación de los genes de las nodulinas, aunque se han estudiado con detalle otros sistemas genéticos mediante esta herramienta. Las plantas transgénicas se generan por la infección de la bacteria Agrobacterium tumefaciens en una planta huésped determinada, generalmente el tabaco (Nicotiana tabacum), en donde la bacteria puede transferir parte de su DNA a la planta receptora mediante el plásmido Ti. Este plásmido se ha manipulado genéticamente, de tal manera que, se puede utilizar como un vector general para transferir genes de interés a plantas específicas (5). Con base en este sistema ha sido posible transformar plantas de Lotus corniculatus (pata de pájaro) con genes quiméricos de las nodulinas, es decir, fusiones génicas de la secuencia de interés con genes cuya actividad se puede seguir colorimé-

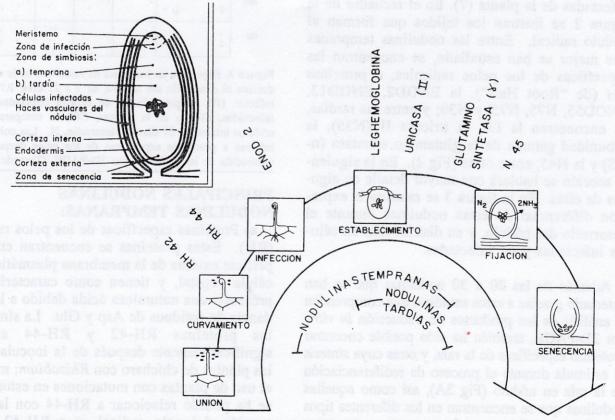
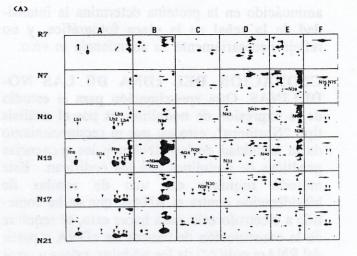


Figura 2. Representación general de los eventos que conducen a la formación del nódulo, y la expresión de algunas nodulinas tempranas y tardías. Recuadro: principales tejidos que forman al nódulo radical. (Modificado de 1).

tricamente β-Galactosidasa, (β-Gal) Cloranfeni-col Acetil Transferasa, (CAT); Glucuronidasa, (Gus), entre otros; así, ha sido posible estudiar los elementos genéticos de control que actúan en forma *cis* (sobre la misma cadena del DNA) y los factores que actúan en *trans* (proteínas que se unen al DNA) (6), y su expresión en diversos tejidos de la planta.

CLASIFICACION. Se ha observado que el programa de desarrollo del nódulo, desde el reconocimiento de la bacteria por el tejido radical, hasta su formación completa, se caracteriza claramente por la expresión de dos grupos de nodulinas (1): a)-las nodulinas tempranas o ENOD, que se expresan durante el proceso de infección, a lo largo de la morfogénesis del nódulo, y se les encuentra específicamente en la porción no infectada de este órgano, que incluye a la corteza; y b)-las nodulinas tardías o LNOD, cuya expresión se detecta alrededor del inicio del proceso de la fijación del nitrógeno, lo cual ocurre cerca del día 11 después de la inoculación de plantas como el frijol o la soya, y se les encuentra con mayor abundancia en las células infectadas de la planta (7). En el recuadro de la figura 2 se ilustran los tejidos que forman al nódulo radical. Entre las nodulinas tempranas que mejor se han estudiado, se encuentran las específicas de los pelos radicales, o proteínas RH (de "Root Hair"), la ENOD2, ENOD13, ENOD55, N75, N75' y N38; y entre las tardías, se encuentran la Lb, la uricasa II (N35), la subunidad gamma de la glutamino sintetasa (n-GS) y la N45, entre otras (Fig 2). En la siguiente sección se hablará con mayor detalle de algunas de ellas. En la figura 3 se muestra la expresión diferencial de estas nodulinas durante el desarrollo del nódulo, y su distribución en células infectadas y no infectadas.

Además de las 20 a 30 nodulinas que se han detectado gracias a estos estudios, que comprenden el análisis de los productos de traducción *in vitro* por 2D-PAGE, también ha sido posible encontrar proteínas específicas de la raíz, y otras cuya síntesis se estimula durante el proceso de rediferenciación de la raíz en nódulo (Fig 3A), así como aquellas nodulinas que se encuentran en los diferentes tipos de células y tejidos que forman estas estructuras especializadas (Fig 3B) (7).



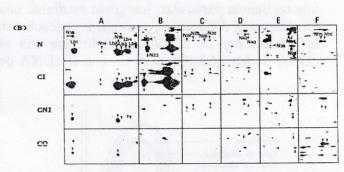


Figura 3. Expresión de los genes de nodulinas en la soya. (A), durante el desarrollo del nódulo, de 7 a 21 días; R7, raíz sin infectar. (B), en protoplastos de células infectadas, CI; no infectadas, CNI, y en la corteza, CO, en comparación con nódulos totales de 27 días de desarrollo, N. Las columnas se refieren a porciones específicas de los geles después de la separación de las proteínas por 2D-PAGE. (Tomado de 7)

PRINCIPALES NODULINAS NODULINAS TEMPRANAS:

a) Proteínas específicas de los pelos radicales (RH). Estas proteínas se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática de la célula vegetal, y tienen como característica el presentar una naturaleza ácida debido a la abundancia de residuos de Asp y Glu. La síntesis de las proteínas RH-42 y RH-44 aumenta significativamente después de la inoculación de las plantas de chícharo con *Rhizobium*; mediante el uso de plantas con mutaciones en estos genes, se ha podido relacionar a RH-44 con la deformación del pelo radical, y a RH-42 con el curvamiento de este mismo pelo (1).

b) ENOD2. Esta proteína es rica en residuos de Pro y está compuesta de dos pentapéptidos repetitivos de Pro-Pro-His-Glu-Lis y Pro-Pro-Glu-Tir-Gln, tal vez como resultado de fenómenos de duplicación genética. La secuencia de residuos de aminoácidos de ENOD2 es similar en alto grado a la de la proteína 1A10 de la soya, que se encuentra en la pared celular; como característica importante, los residuos de Pro están hidroxilados a hidroxiprolina en ambas proteínas, por lo que se ha sugerido que ENOD2 corresponde a una proteína de la pared celular (8). De manera análoga, algunas proteínas de origen animal, como la colágena, también son hidroxiladas en los residuos de Pro, entre otros procesos de modificación post-traduccional; sin embargo, a diferencia del grupo de las plantas, la prolil hidroxilasa de los tejidos animales es específica hacia el triplete -X-Pro-Gli- cuando hidroxila al residuo de Pro (9).

Como resultado de los estudios de hibridización in situ de las preparaciones de nódulos con [S35]-RNA antisentido que contiene al gen de ENOD2, fue posible detectar con detalle el tejido donde se expresan los genes que codifican para esta proteína (Fig 4), además de poder estudiar su expresión a lo largo del desarrollo del nódulo. En la corteza interna del nódulo, ENOD2 se encuentra a partir de estados tempranos del desarrollo: los días 6 y 7 después de inocular plantas de soya y de chícharo, respectivamente. Además, ENOD2 se expresa en "nódulos vacíos", es decir, algunas cepas mutantes de Rhizobium inducen la rediferenciación de la raíz en nódulos sin que exista infección en el interior del tejido; esto sugiere que los genes ENOD2 se expresan específicamente a lo largo de la diferenciación del meristemo nodular en la formación de una corteza interna (8).

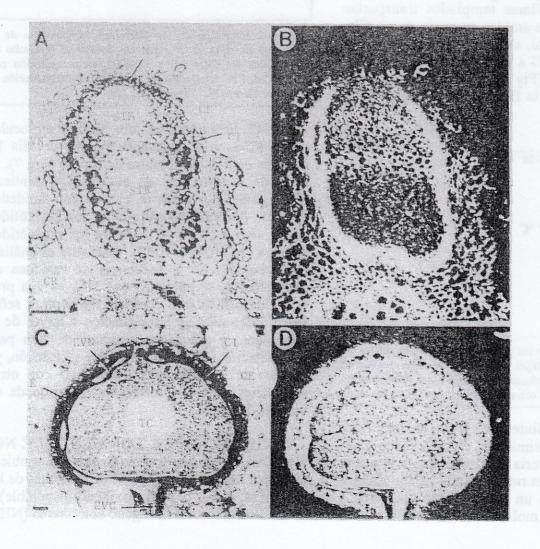


Figura 4. Localización de ENOD2 en nódulos radicales del chícharo (A y B) y de la soya (C y D) por hibridización in situ con una sonda de [S35]-RNA antisentido (pGmENOD2). En las micrografías de campo claro (A y C) la marca radioactiva se detecta como regiones obscuras, y en las de campo obscuro (B y D) como regiones claras. M, meristemo apical; STM, tejido simbiótico temprano; STR, tejido simbiótico tardío; CI, corteza interna: CE, corteza externa; HVN, haces vasculares del nódulo; HVC, haces vasculares centrales; CR, corteza de la raíz; y E, endodermis. (Tomado de 8).

NODULINAS TARDIAS:

- a) Leghemoglobina (Lb). Esta es la nodulina mejor caracterizada, sin embargo, debido a que recientemente se le ha detectado en tejido radical no infectado, los autores prefieren considerarla como una proteína "nódulo estimulada", ya que no cumple con los postulados que definen a una nodulina sensu strictu.
- b) Uricasa II. Durante mucho tiempo se le conoció como N35, la que corresponde a la subunidad II de la uricasa específica de los nódulos. Su actividad se relaciona con el metabolismo de los ureidos, ya que cataliza la formación de la alantoina a partir del ácido úrico; las Leguminosas tropicales, como el frijol, transportan principalmente ureidos como la alantoína y el ácido alantoico, que son algunos de los productos iniciales del proceso de aminación primaria del nitrógeno fijado; en contraste, las leguminosas de climas templados transportan predominantemente amidas, como la Asn o Gln. En nódulos de frijol, se puede detectar la actividad de la uricasa II a partir del día 11 después de la inoculación (Fig 5), unos 3 a 4 días antes de que se detecte la fijación de nitrógeno (9).

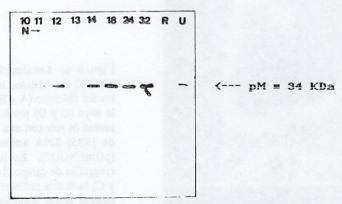


Figura 5. Expresión de los genes de uricasa II durante el desarrollo de nódulos del frijol. N, nódulos de diferentes días de desarrollo; R, raíz sin infectar; U, uricasa pura. Detección específica en filtros de NC con suero anti-uricasa. (Tomado de 9).

c) Glutamino Sintetasa. Esta enzima tiene como función el asimilar el amonio fijado y secretado por la bacteria al citoplasma de la célula vegetal, mediante la ruta glutamino sintetasa/glutamato sintasa; es un octámero de unos 320 a 380 KDa de peso molecular. Se ha encontrado

una isoforma específica en los nódulos radicales, la GSn-1, que contiene un monómero específico de este tejido; la GS-gamma se detecta a partir del día 10 después de la inoculación, en plantas del frijol, y su concentración aumenta hasta el día 32 (Fig 6).

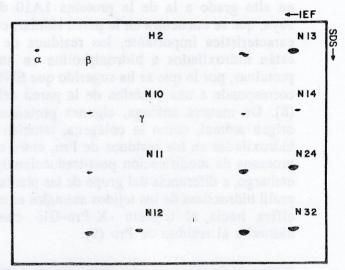
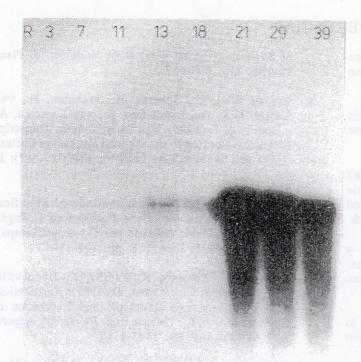


Figura 6. Expresión de los diferentes componentes de la glutamino sintetasa -α, β y gamma- durante el desarrollo de los nódulos del frijol (10 a 32 días), en comparación con hipocótilos, H2. Separación de los productos de traducción *in vitro* por 2D-PAGE. (Tomado de 10).

d) N45. Esta nodulina tiene un peso molecular de 45 KDa, y se le detecta a partir del dia 11 después de inocular plantas de lupino (Fig 7). A nivel de la secuencia de nucleótidos, contiene dos regiones que están reiteradas, con alrededor del 80% de similitud entre ellas: los nucleótidos 424 a 484, y 542 a 731, contra los nucleótidos 757 a 817, y 878 a 1067. Mediante el análisis de hidropatía de la secuencia de residuos de aminoácidos, se encontró que N45 es una proteína hidrofílica que contiene un péptido señal hidrofóbico para su translocación a través de la membrana, v sitios con residuos de Asn para glucosilación (11). Se desconoce su función, ya que no se ha encontrado similitud con otras secuencias proteicas, mediante la búsqueda en bancos de datos.

REGULACION DE LOS GENES DE NO-DULINAS. Se han detectado factores ambientales que regulan la expresión de los genes de las nodulinas, como la ppO₂ (oxígeno disponible) o la concentración del nitrógeno combinado (NH₄⁺,



En el caso de Lbc₃ de la soya, se han detectado varios elementos reguladores: -1,100 a -950, en donde se encuentra un elemento positivo fuerte; -230 a -170, un elemento positivo débil; -139 a -102, un elemento órgano específico; y -102 a -149, un elemento negativo (Fig 8) (6).

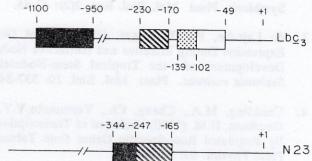


Figura 7. Expresión de N45 durante el desarrollo de nódulos del lupino (3 a 39 días); R, raíz sin infectar. Detección tipo "Northern": la población del RNA poli(A+) se separa por electroforesis y se hibridiza contra la sonda de cDNA que contiene genes de N45. (Tomado de 11).

NO₃), así como factores intrínsecos del tejido vegetal, como elementos que actúan en *cis* o factores que actúan en *trans*. El caso mejor estudiado es el de la Lb, pero recientemente ha llamado mucho la atención otra familia de genes que codifica para N20, N22, N23 y N44.

Mediante la construcción de genes quiméricos, que consisten en la fusión de las regiones 5' y 3' que flanquean al gen de Lbc, de la soya, con el gen de CAT, y la transferencia a la planta heteróloga Lotus corniculatus, se encontró que el gen se expresa únicamente en los nódulos de las plantas regeneradas y no en otros tejidos; la secuencia que confiere la especificidad en la expresión se encuentra en el segmento 5'. En el caso de N23, las deleciones en la región 5' flanqueante con la enzima Bal31 de 97 pares de bases (pb) en la posición -247, reduce la actividad de CAT en un 15%, y la eliminación de otras 82 pb en -165 nulifica la actividad de CAT. De esta manera, se reconocen dos secuencias que se requieren para la expresión específica de N23 en los nódulos: -344 a -247, y -247 a -165.

ELEMENTO POSITIVO FUERTE SELEMENTO POSITIVO DEBIL

ELEMENTO ORGANO-ESPECIFICO ___ ELEMENTO NEGATIVO

Figura 8. Secuencias reguladoras y regiones promotoras de los genes N23 y Lbc3 de la soya. (Tomado de 6).

Además, mediante ensayos por deleciones con Bal31 y experimentos por retardamiento en geles, en donde se incuba la secuencia de interés con extractos del tejido y se determina la alteración en la migración electroforética por la posible interacción DNA-proteína, se han detectado factores que actúan en trans y las regiones promotoras de Lbc, de la soya que reconocen: -342 a -191, y -190 a -125. Estas regiones contienen secuencias ricas en A y T, de 24 y 16 pb para la primera y la segunda, respectivamente. El factor que actúa en trans para la Lbc₃ de la soya también se ha encontrado en extractos de nódulos de Sesbania rostrata (dormilona) y de Medicago saltiva (alfalfa), éstos con la capacidad de reconocer a las regiones reguladoras de Lbc₃ de la soya (6), por lo que se piensa que las señales que regulan la actividad de estos genes están conservadas en las leguminosas y responden a lo que pudiera ser un factor universal.

AGRADECIMIENTOS. Los autores desean agradecer al Sr Arturo Franco T. el trabajo de ilustración y fotografía.

REFERENCIAS

- Gloudemans, T. y T. Bisseling. (1989): Plant Gene Expression in Early Stages of Rhizobium-Legume Symbiosis. Plant Sci. 65: 1-4.
- van Kammen, A. (1984): Suggested Nomenclature for Plant Genes Involved in Nodulation and Symbiosis. Plant Mol. Biol. Rep. 2(2): 43-45.
- de Lajudie, P.y T. Huget. (1988): Plant Gene Expression During Effective and Ineffective Nodule Development of the Tropical Stem-Nodulated Sesbania rostrata. Plant Mol. Biol. 10: 537-548.
- Conkling, M.A., Cheng, Ch., Yamamoto, Y.T. y Goodman, H.M. (1990): Isolation of Transcriptionally Regulated Root-Specific Genes from Tobacco. Plant Physiol. 93: 1203-1211.
- 5. Schell, J.S. (1987): Transgenic Plants as Tools to Study the Molecular Organization of Plant Genes. Science 237: 1176-1182.
- Jensen, E.O., Stougaard, J.S., Jorgersen, J.E. Sandal, N., de Bruijn, F.J., Schell, J y Marker, K.A. (1988): Regulation of Nodule-Specific Plant Genes. En: Nitrogen Fixation, Hundred Years After (editado por Bothe/Newton). Gustav Fisher, NY. pp. 605-609.
- 7. Kouchi, H., Tsukamoto, M. y Tajima, S. (1989): Differential Expression of Nodule-Specific (Nodulin) Genes in the Infected, Uninfected and Cortical Cells

- of Soybean (Glycine max) Root Nodules. J. Plant Physiol. 135: 608-617.
- 8. van de Wiel, C., Scheres, B., Franssen, H., van Lierop, M.J., van Lammeren, A., van Kammen, A. y Bisseling, T. (1990): The Early Nodulin Transcript ENOD2 is Located in the Parenchyma (Inner Cortex) of Pea and Soybean Root Nodules. EMBO J. 9(1): 1-7.
- 9. Kivirikko, K.I. (1980): Post-translational Modifications of Collagen. En: Gene Families of Collagen and Other Proteins (editado por Prockop/Champe). Elsevier North Holand, NY. pp. 107-119.
- Sánchez, F., Campos, F., Padilla, J., Bonneville, J.M., Enríquez, C. y Caput, D.(1987): Purification, cDNA Cloning, and Developmental Expression of the Nodule-Specific Uricase from *Phaseolus vulgaris* L. Plant. Physiol. 84: 1143-1147.
- Padilla, J.E., Campos, F., Conde, V., Lara, M. y Sánchez, F. (1987): Nodule-Specific Glutamine Synthetase is Expressed Before the Onset of Nitrogen Fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Mol. Biol. 9: 65-74.
- 12. Szczyglowski, K., Boron, L., Szybiak-Strozycka, U. y Legocki, A.B. (1989): Characterization of cDNA Clone Coding for Nodulin-45 from Yellow Lupine (Lupinus luteus). Plant Sci. 65: 87-95.

flauducante con la carina Rel31 de 97 name de

EDITORIAL

EL APRENDIZAJE DE LA BIOQUIMICA ENTRE LOS ESTUDIANTES Y EL PENSAMIENTO MAGICO ENTRE LOS MEDICOS

Los conocimientos científicos permiten identificar y explicar los mecanismos de acción de los fenómenos biológicos. Cuando este tipo de conocimientos está ausente o es deficiente, puede desarrollarse el pensamiento mágico, entendido éste como la "atribución infundada de propiedades especiales o extraordinarias a determinados fenómenos" v que en realidad es una forma de ignorancia. Este pensamiento mágico de amplia difusión entre la población, ¿es posible que también se presente entre algunos médicos?. Aunque en principio parecería que tal situación es inadmisible por la formación científica de los médicos, datos anecdóticos u observaciones personales parecen inducir a pensar que tal situación efectivamente puede presentarse, lo cual ayudaría a explicar, al menos parcialmente, porqué algunos médicos ejercen prácticas con dudosos fundamentos científicos. El aprendizaje de las ciencias básicas y en particular de la bioquímica, pueden contribuir a la explicación científica de los fenómenos biológicos y consecuentemente se oponen al pensamiento mágico. Para que tal situación ocurra es indispensable que la enseñanza de la bioquímica no se limite a la memorización o repetición de contenidos, sino que requiere que se enfoque primordialmente a la explicación de procesos y mecanismos de acción. Aunque los procedimientos habituales

para la aprobación de la asignatura se concentran en la capacidad de repetir con acierto un determinado número de contenidos, es necesario poner en práctica procedimientos docentes, que incentiven el aprendizaje activo, sobre todo la metodología de solución de problemas. La enseñanza pasiva, simplemente memorista de disciplinas científicas no significa que los alumnos adopten una actitud científica.

La importancia de utilizar este enfoque es que al final de la carrera y seguramente durante el ejercicio profesional, la capacidad de recordar y menos de aplicar conocimientos de bioquímica es muy reducida, de allí la importancia de que durante la enseñanza de la bioquímica los estudiantes además de adquirir información, desarrollen la habilidad para la búsqueda de la explicación científica de los fenómenos que afectan la salud humana. Este es un aspecto fundamental de la formación médica respecto al cual la enseñenza de la bioquímica puede prestar una importante contribución.

J. Héctor Gutiérrez Avila Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

LOS OSCILADORES CITOSOLICOS DE CALCIO

Sandra Sotelo y Roger Gutiérrez. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM México D.F. 04510.

Los organismos pluricelulares dada su compleja organización estructural y funcional deben mantener una estricta coordinación entre sus células que les permita integrarse funcionalmente como una unidad. Para lograr lo anterior, los mamíferos cuentan con un intrincado sistema celular que se denomina sistema neuro-endócrino en el que sobresale el papel de control maestro ejercido por el eje hipotálamo-hipófisis. La base de todos los fenómenos de coordinación entre las células es la comunicación celular.

Existen tres estrategias generales para la comunicación entre células (1): 1)- la comunicación a distancia mediante moléculas secretadas, 2)- la comunicación por contacto mediante moléculas unidas a la membrana plasmática y 3)- la comunicación por contacto a través de las uniones gap. Aquí se considerará solamente la primera forma, también denominada comunicación química, en la cual el mensaje de una célula es enviado a otra a través de substancias (hormonas, autacoides y neurotransmisores) capaces de modificar su funcionamiento. La célula receptora o célula blanco posee en su membrana proteínas que reconocen e interaccionan específicamente con la substancia mensajera, dichas proteínas se denominan receptores. La serie de fenómenos que se desarrollan en la célula blanco desde la unión hormona-receptor hasta el efecto final constituyen la señal hormonal (2), que puede ser dividida en dos etapas fundamentales: 1)- la transducción, que comprende desde la unión hormona-receptor hasta la generación del segundo mensajero y 2)- la propagación de la señal que inicia con la generación del(los) segundo(s) mensajero(s) y culmina con el efecto final.

En los últimos años se han realizado avances importantes en la comprensión de los fenómenos de la comunicación celular, pero falta definir con mucho mayor precisión las bases moleculares de la comunicación química. Entre los sistemas de transducción, que se conocen en la actualidad destacan los tres siguientes: el de la adenilato ciclasa, el de la GMPc fosfodiesterasa y el sistema de los fosfoinosítidos-calcio (IP₃/Ca²⁺). En los tres casos el receptor de membrana se halla unido funcionalmente al sistema transductor por una de varias proteínas membranales capaces de unir nucleótidos de guanina (GTP y GDP), llamadas proteínas G. Este trabajo se ocupará exclusivamente del sistema IP₃/Ca²⁺.

El sistema IP /Ca2+, está involucrado en diversos procesos celulares que comprenden desde la modulación del metabolismo hasta la transformación y proliferación celular; incluso, se ha propuesto que algunos de los productos de ciertos oncogenes pudieran ser moduladores del recambio de fosfoinosítidos o de algunas de las proteínas que participan en el mecanismo transduccional (2). La unión de un ligando a los receptores acoplados a este sistema provoca la activación de una proteína G, la cual estimula la actividad de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), produciendo de esta manera dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5trifosfato (IP2). El DAG es activador de la proteína cinasa Č (PKC), dependiente de calcio, que participa en la propagación de la señal hormonal y aparentemente regula la respuesta hormonal en muchas células. Por su parte, el IP, tiene la capacidad de liberar calcio por activación de receptores localizados probablemente en el retículo endoplásmico liso (REL); además se ha demostrado que el IP, es fosforilado por una cinasa para formar inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP₄), el cual se ha involucrado en la entrada de calcio a la célula. El calcio así liberado es un factor de acoplamiento muy importante que activa múltiples enzimas y proteínas cinasas en forma directa o a través del complejo calciocalmodulina (Ca²⁺-Calm). La Tabla I muestra algunos ejemplos de comunicación química con participación del sistema IP₄/Ca²⁺.

TABLA I

ALGUNAS RESPUESTAS CELULARES MEDIADAS POR EL SISTEMA IP₃/Ca²⁺.

TEJIDO BLANCO	LIGANDO	RESPUESTA PRINCIPAL
Hígado	Vasopresina	Degradación de glucógeno
Páncreas	Acetilcolina	Secreción de amilasa
Músculo liso	Acetilcolina	Contracción
Células Beta	Acetilcolina	Secreción de insulina del páncreas
Células cebadas	Antígeno	Secreción de histamina
Plaquetas	Trombina	Secreción de serotonina y PDGF*

^{*} PDGF = Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

A pesar de ser un importante modulador funcional, el calcio debe ser mantenido a concentraciones muy bajas, del orden de 0.1 a 0.2 µM, puesto que concentraciones mayores son tóxicas para la célula. El control de las concentraciones de calcio se logra mediante bombas de calcio dependientes de ATP localizadas en la membrana celular y en la membrana de los reservorios intracelulares de calcio (REL y mitocondria), bombeando calcio hacia el exterior de la célula y hacia dentro de los reservorios, respectivamente (1). Tradicionalmente, se ha considerado que los efectos de las hormonas que utilizan calcio como mensajero intracelular están mediados por un mecanismo dependiente de la amplidecir, que las concentraciones intracelulares de calcio se elevan de manera neta, sostenida y proporcional a la concentración del agonista; la señal hormonal es pues analógica. El funcionamiento de una señal de este tipo plantea problemas de control para la célula. Por un lado, deben mantenerse bajos los niveles citosólicos de calcio y por otro, cuando se recibe un estímulo hormonal la célula debe responder aumentando los niveles de calcio en la forma descrita

exponiéndose así a la toxicidad que conllevan las altas concentraciones del ión. Entonces, una señal hormonal de tipo analógico resulta no sólo ambigua sino peligrosa, ya que la célula debe discriminar entre una pequeña elevación inespecífica de calcio y el aumento en la concentración producida por un estímulo hormonal. Pero ¿es posible que la señal opere de otra forma?

Desde hace tiempo se han observado en células excitables oscilaciones en las concentraciones de calcio como consecuencia de la actividad eléctrica de sus membranas por apertura y cierre de canales de calcio y potasio dependientes de voltaje, en donde las oscilaciones de calcio se originan por influjo de calcio extracelular. A estos sistemas que dependen de mecanismos localizados en la membrana celular se les ha denominado osciladores de membrana (3). Eventualmente se vió que los osciladores de calcio eran una característica común de las células excitables.

TABLA II

DISTRIBUCION DE LAS OSCILACIONES CITOSOLICAS DE CALCIO

CELULA SISTEMA DE DETECCION		ESTIMULO		
Miocito de rata Glándula parótida Células gonadotropas	Contracción Fura 2 Fura 2	Cafeína Carbacol GnRH*		
Células Beta pancreáticas	Fura 2	Carbamilcolina		
Ovocitos de ratón	Aequorina	TPA**		
Hepatocitos de rata	Aequorina	Vasopresina		
Macrófagos	Fura 2	Dispersión celular		
Células L	Electrodo de Ca ²⁺			
Músculo liso	Fura 2	Fenilefrina o histamina		
Fibroblastos	Fura 2	Gramicidina + vasopresina		
Células endoteliales	Fura 2	Histamina		
Linfocitos B	Fura 2	Antígeno		
Huevos de hamster	Aequorina	Fecundación		
Neuronas simpáticas	Fura 2	K+ + cafeína		
Ganglio simpático	Corriente de K+	cafeína		

^{*} GnRH = Hormona liberadora de gonadotropina.

^{**} TPA = Tetradecanoato forbol acetato.

Sin embargo, desde 1983 se describió la aparición de oscilaciones en las concentraciones de calcio en células no excitables (hepatocitos) en respuesta a hormonas (3); tales oscilaciones se originan a partir de la liberación de calcio de los reservorios intracelulares y se les ha denominado osciladores citosólicos (3). Las oscilaciones de este tipo se han observado tanto en células indiferenciadas como en células especializadas (Tabla II) al estudiarlas individualmente mediante técnicas de microscopía de fluorescencia y procesamiento digital de imágenes, ya que el estudio de las poblaciones celulares oculta este fenómeno y muestra un efecto sumatorio que se revela como una elevación amplia y sostenida en la concentración de calcio (3,4).

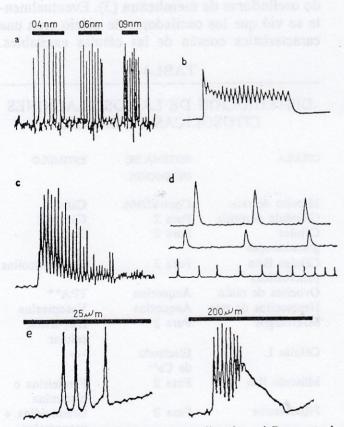


Figura 1. Ejemplos de patrones oscilatorios. a) Respuesta de hepatocitos a tres diferentes concentraciones de vasopresina. b) Glándula parótida de la rata estimulada con carbacol. c) Patrón oscilatorio de células gonadotropas estimuladas con hormona liberadora de gonadotropina. d) Oscilaciones en el huevo de Hamster después de la fertilización (flecha); los tres trazos corresponden a un mismo registro pero a diferente velocidad del papel. e) Células de insulinoma respondiendo a dos diferentes concentraciones de carbacol.

Las oscilaciones en las concentraciones de calcio son consecuencia del estímulo por agentes movilizadores de calcio (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento); es decir, agentes que actúan a través del sistema IP₃/Ca²⁺. La detección de las ondas de calcio puede hacerse a través de medios directos como la colocación de un microelectrodo o con substancias fluorescentes como el quelante Fura 2 y la proteína aquorina, o bien, con medios indirectos, en donde se registran eventos celulares dependientes de calcio (contracción) (3). En la Figura 1 se muestran algunos ejemplos de patrones oscilatorios medidos a través de Fura 2 o aquorina.

En la parte a de la figura 1 se observa cómo en hepatocitos de rata una concentración 0.4 nM de vasopresina produce oscilaciones con una frecuencia de 24/min; luego, al aumentarse la concentración de vasopresina a 0.9 nM la frecuencia aumenta a 60 oscilaciones/min; por su

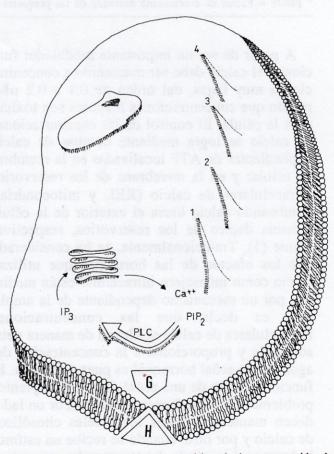


Figura 2. Representación esquemática de la propagación de los picos de calcio.

parte, los trazos e y f muestran la respuesta oscilatoria de células de insulinoma a dos concentraciones crecientes de carbacol. Pero además, dos hormonas diferentes a la misma concentración producen una frecuencia de oscilación distinta de forma que hay discrimincación según el agonista actuante (4). Por otro lado, la oscilación de calcio nace en un punto específico de la célula, adyacente a la membrana celular a partir del cual se propaga en forma de onda por todo el citosol hasta que desaparece (Fig 2).

Es necesario enfatizar que no se trata de un mecanismo de difusión sino de autopropagación, puesto que se ha demostrado (4) que no hay gradientes de calcio en el citosol durante la oscilación y que la onda de calcio que nace primero se mantiene todavía cuando ya empezó a generarse una segunda y así sucesivamente; al final desaparecen todas la ondas conforme fueron apareciendo (4). Las oscilaciones o picos de calcio tienen una morfología específica para cada célula, tan es así que se han comparado con una firma o huella digital de la célula (3). El estudio de las ondas de calcio debe considerar la frecuencia, la amplitud, la velocidad de propagación y las características de la fase de ascenso y descenso. La frecuencia de las oscilaciones varía en función de a) la concentración del agonista, b) el agonista particular de que se trate y c) las concentraciones extracelulares de calcio; en cambio, la amplitud y la velocidad de propagación no se modifican por estos factores (3,4).

¿Cómo se explican las oscilaciones del calcio citosólico?. Existen a la fecha dos grandes modelos para explicar las oscilaciones en las concentraciones de calcio intracelular, divididos a su vez cada uno en dos submodelos (Fig 3) (3). Un primer modelo pretende explicar las oscilaciones de calcio por formación intermitente del segundo mensajero (IP₂), postulando que el receptor controla las oscilaciones (modelo de oscilador controlado por el receptor, Figura 3 A y B). El segundo gran modelo intenta explicar las oscilaciones de calcio en presencia continua del segundo mensajero, proponiendo que es éste quien controla las oscilaciones (modelo del oscilador controlado por el segundo mensajero, Figura 3 C y D). Los submodelos se refieren al mecanismo de regulación (retroalimentación positiva o negativa) que propone cada uno de los dos grandes modelos.

El modelo del oscilador controlado por el receptor operando por un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 3 A), postula que una vez iniciada la activación del receptor se generan por estimulación de la PLC los dos segundos mensajeros: IP, y DAG. Este último a su vez activa a la PKC la cual fosforila reversiblemente a la proteína G responsable de la estimulación de la PLC, lo cual inhibe la ulterior formación de los segundos mensajeros. Este mismo modelo, pero operando por un mecanismo de retroalimentación positiva (Figura 3 B), sugiere que el agonista produce un incremento inicial de IP, que ocasiona una rápida liberación de calcio, un pequeño incremento del ión provoca la estimulación de la PLC, amplificando con ello la producción de IP₂. Este mecanismo se autolimita cuando la señal de calcio declina por depleción del ión en el REL y por secuestro a los reservorios intracelulares, uno de los cuales sería la mitocondria.

El modelo de oscilador controlado por el segundo mensajero a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 3 C) propone que la acción del IP, libera calcio para iniciar las oscilaciones; el incremento progresivo de calcio origina la inhibición de su propia liberación. Esta inhibición se suspende cuando el calcio es recapturado por los reservorios internos, permitiendo así que el IP, inicie otra oscilación. Cuando opera un mecanismo de retroalimentación positiva en este modelo (Figura 3 D), se propone que el calcio induce su propia liberación (calcium-induced calcium release, CICR). El IP, liberaría calcio de los llamados reservorios intracelulares sensibles a IP, este incremento inicial de calcio es un estímulo para la ulterior liberación del catión de los reservorios no sensibles a IP₃; además la entrada simultánea de calcio a la célula es un evento que colabora para incrementar las concentraciones del ión. El aumento gradual de la concentración de calcio precede a la iniciación de las ondas. Posteriormente, ocurre la recaptura del calcio por los reservorios citosólicos; El descenso en su con-

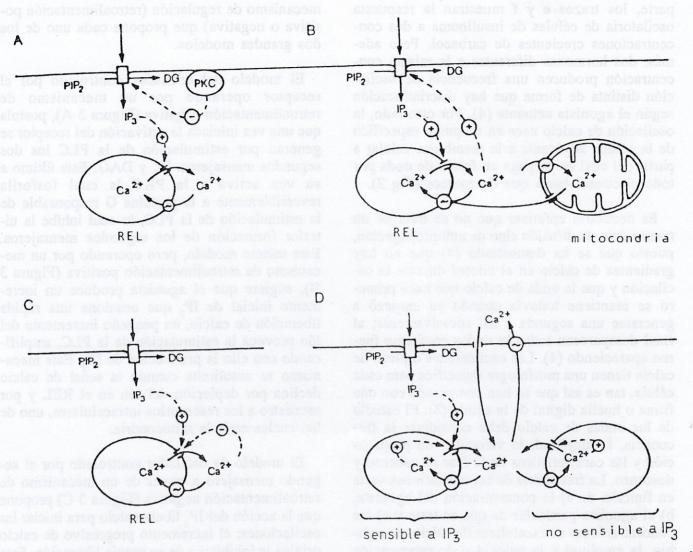


Figura 3. Modelos de los osciladores de calcio. A)- y B)- Modelo de oscilador controlado por el receptor (mecanismo de retroalimentación negativa y positiva, respectivamente). C)- y D)- Modelo de oscilador controlado por el segundo mensajero (mecanismo de retroalimentación negativa y positiva, respectivamente). PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, DG: diacilglicerol, IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato, PKC: proteína cinasa C, REL: retículo endolplásmico liso.

centración representa el estímulo para la liberación de calcio y por lo tanto para la iniciación de una nueva oscilación. El intervalo entre una nueva oscilación y otra es el tiempo que se requiere para recargar los reservorios de calcio al punto en el que puedan descargar otra vez. Los reservorios de calcio que participan en este mecanismo no están aún estructuralmente definidos con precisión; los reservorios sensibles a IP₃ podrían estar representados por los calciosomas y los no sensibles a IP₃ podrían corresponder a algunos componentes del REL.

La función de las oscilaciones en las

concetraciones de calcio no ha sido completamente definida (3,5); posiblemente sea sólo una manifestación del complejo mecanismo con que cuentan las células para mantener la homeostasis del calcio. Sin embargo, la información recabada hasta el momento es lo suficientemente importante y contudente como para pensar en otras alternativas, aun inexploradas, que modificarían significativamente las ideas corrientes sobre las señales hormonales. En principio, podemos suponer que las oscilaciones en las concentraciones de calcio son parte del mecanismo de la señal hormonal; además, como la intensidad de la señal hormonal se refleja en la frecuencia de

las oscilaciones y no en la amplitud de la elevación del calcio, la señal hormonal no es analógica sino digital (3,5). Una señal digitalizada posibilita, por un lado, una información más precisa, puesto que los incrementos de calcio en forma oscilatoria permiten que el mensaje se transmita por oscilaciones en la frecuencia, hecho que coincide con las observaciones experimentales de variación en la frecuencia oscilatoria por cambios en la concentración del agonista.

Por otro lado, al utilizar concentraciones elevadas de calcio en forma intermitente disminuye el tiempo y el área de exposición a los efectos tóxicos del ión y se concilian dos eventos: la inevitable elevación de las concentraciones de calcio por estímulo hormonal y la necesidad de mantener bajas concentraciones del ión durante la mayor parte del tiempo para la protección celular. El hecho de que las ondas de calcio tengan una orientación espacial (es decir, que viajen por autopropagación por todo el citosol) inmediatamente sugiere que debe existir una compleja estructura celular que permita esa forma de propagación. Probablemente esa orientación espacial tenga importancia en la regulación de ciertas funciones metabólicas asimétricas de la célula (4).

Las investigaciones en el campo de los osciladores citosólicos de calcio se encuentran actualmente en una etapa muy activa. Recientemente se ha propuesto un modelo matemático para explicar los osciladores citosólicos de calcio (Fig 4) (6). Dicho modelo analiza la homeostasis del calcio mantenida por el equilibrio entre las bombas de calcio que remueven el calcio citosólico tanto hacia el exterior de la célula como hacia el interior de los reservorios intracelulares y los flujos pasivos de calcio hacia el citoplasma provenientes de los reservorios intracelulares y del espacio extracelular. El modelo plantea además la existencia de un canal de calcio localizado en la interfase de la membrana del REL con el citoplasma controlado por IP, por Calm y por calcio, junto con la participación de un solo reservorio de calcio del tipo sensible a IP₃. La salida de calcio a través del canal es función directa del IP3 pero el calcio por sí mis-

mo es capaz de controlar el canal por una función autocatalítica de la concentración citosólica de calcio (CICR); se sugiere que la Calm media este mecanismo de retroalimentación. La acción de la Calm sobre el canal de calcio podría estar dada por una acción directa de esta proteína sobre el canal o podría ser que el complejo Ca2+-Calm activara a una proteína cinasa o a otro mediador que fuera entonces el encargado directo de controlar el canal de calcio. La mayor parte de los datos incluyendo los de este último modelo favorecen la hipótesis de que el oscilador es controlado por el segundo mensajero mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, en el que el calcio induce su propia liberación, llamado CICR (calcium-induced calcium release). En apoyo de esto último, recientemente se encontró que la fase de liberación de calcio puede ocurrir sin la participación del IP,, es decir, ser independiente de la naturaleza del estímulo (7). Sin embargo existen tra-

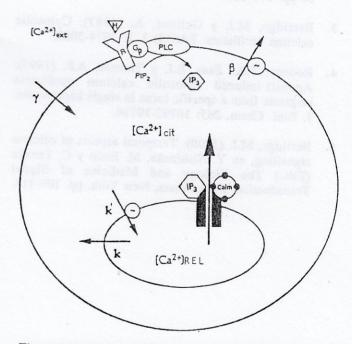


Figura 4. Modelo matemático de un solo reservorio. Las flechas que cruzan los compartimentos siguen la dirección de los flujos de calcio; los círculos representan las bombas de calcio: β: bombeo de calcio hacia el exterior de la célula. K': bombeo de calcio hacia el interior de los reservorios intracelulares. γ: influjo de calcio hacia el citosol proveniente del espacio extracelular. K: flujo de calcio hacia el citosol proveniente del reservorio. Se representa esquemáticamente el canal de calcio controlado por IP₃: calcio y calmodulina. H: hormona; R: receptor; Gp: proteína G; PLC: fosfolipasa C; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; IP₃: inositol 1, 4, 5-trifosfato.

bajos que cuestionan el modelo de CICR y en cambio apoyan el modelo de oscilador controlado por el receptor (8,9).

El descubrimiento de los osciladores citosólicos de calcio invita a reconsiderar los conceptos establecidos sobre señales hormonales y se avanza en la penetración y disección de las bases moleculares de este fenómeno y, en general, en la comprensión de la comunicación celu-

lar. Sin embargo, muchas interrogantes están aún sin respuesta; es necesario definir en primer lugar la función de las oscilaciones de calcio, establecer planteamiento de cómo descodifica la célula una señal digitalizada en forma de oscilaciones de calcio, penetrar en la estructura celular que favorece el viaje de estas oscilaciones en forma de ondas y definir posibles relaciones con otros mecanismos de transducción.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lews, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1989): Molecular Biology of the Cell. 2nd edition, Garland, New York. pp. 681-726.
- García Sáinz, J.A. (1987): Receptores membranales y transducción de la señal hormonal. En Mensaje Bioquímico X, Editores: L. Fernández Rivera-Río, Y. Saldaña de Delgadillo, S. Jiménez Thomas y S. Morales López. Facultad de Medicina, UNAM, México pp. 177-210.
- 3. Berridge, M.J. y Galione, A. (1987): Cytosolic calcium oscillators. FASEB J. 2: 3074-3082.
- Rooney, T.A., Sass, E.J. y Thomas, A.P. (1990): Agonist-induced cytosolic calcium oscillators originate from a specific locus in single hepatocytes.
 J. Biol. Chem. 265: 10792-10796.
- Berridge, M.J. (1990): Temporal aspects of calcium signalling, en Y. Nishizuka, M. Endo y C. Tanaka (Eds.) The Biology and Medicine of Signal Transduction. Raven Press, New York. pp. 108-114.

- Somogyi, R. y Stucki, J.W. (1991): Hormone-induced calcium oscillations in liver cells can be explained by a simple one pool model. J. Biol. Chem. 266: 11068-11077.
- 7. Rooney, T.A., Renards, D.C., Sass, E.J. y Thomas, A.P. (1991): Oscillatory cytosolic calcium waves independent of stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate formation in hepatocytes. J. Biol. Chem. 266: 12272-12282.
- Sánchez Bueno, A., Dixon, C.J., Woods, N.M., Cuthberson, K.S.R. y Cobbold, P.H. (1990): Inhibitors of protein kinase C prolong the falling of each free-calcium transient in a hormone-stimulated hepatocyte. Biochem. J. 268: 627-632.
- Sánchez Bueno, A., Dixon, C.J., Woods, N.M. Cuthberson, K.S.R. y Cobbold, P.H. (1990): The hepatocyte calcium oscillator, en The Biology and Medicine of Signal Transduction, Editores: Y. Nishizuka, M. Endo y C. Tanaka. Raven Press, New York pp. 115-121.

calcio localizado en la intefase de la membrana

EDITORIAL

INFORMACION INTEGRADA CONTRA INFORMACION AISLADA

¿Qué tipo de información deberá incluirse en el curriculum del estudiante de una carrera biológica para una formación adecuada en el área de la Biología Celular?

Al considerar que la Biología moderna se basa en tres grandes generalizaciones, la Teoría Celular, Las Leyes de la Herencia y la Teoría de la Evolución, resulta obvio el sitio que la Biología Celular deba tener en el curriculum de una carrera que intenta preparar personal especializado en la comprensión, el análisis, y el manejo de los diversos tipos de fenómenos biológicos.

Para lograr esa preparación, se hace necesario el desarrollo de un criterio celular, que permita dar sentido, localización y bases a las posibles interpretaciones que se puedan proponer sobre los distintos aspectos del fenómeno de la vida.

La formación del criterio requiere no sólo de la acumulación de grandes cantidades de datos, sino de que el alumno se desarrolle intelectualmente y se capacite en el uso de los acervos de información, para que pueda plantear soluciones a los problemas a que habrá de enfrentarse. Esto hace necesario que, idealmente desde el inicio de su formación, intervenga activa y seriamente en la investigación, lo que en principio puede hacerse a través de la "duplicación" de los diversos experimentos clásicos, que generaron algunos de los conceptos más sobresalientes en la Biología Celular y más tarde por medio de su participación en provectos formales, de tal manera que llegue a ser capaz de llevar a cabo el análisis de cómo es que han surgido los conocimientos en diversas

áreas, desde las ideas más incipientes hasta el desarrollo de modelos más complejos, con los que se han tratado de explicar distintos aspectos relacionados con las manifestaciones de los organismos vivos.

Para esto se necesita del conocimiento de los antecedentes sobre las circunstancias, los personajes y las ideas que han hecho posible el paso de la mera descripción de la forma de las células, a la comprensión, más o menos detallada, de su papel como unidades estructurales, de funcionamiento, de reproducción e incluso de patología, del total de los organismos vivos.

Como requisito para instrumentar un sistema que permita que los alumnos se integren a las tareas de investigación, se deberá tener en cuenta la necesidad de descubrir, fomentar y reforzar, las actitudes congruentes con lo que Weisskkopf en 1972 (The Significance of Science, en Science, 176: 138-146) definió como las razones principales por las que se lleva a cabo la investigación científica, que son: a) El interés por entender a la naturaleza. b) El impulso de observar, clasificar y continuar con la observación de los fenómenos por los fenómenos mismos y c) La necesidad de profundizar sobre un problema mediante la experimentación con la naturaleza, por medio del uso del ingenio para estudiar el fenómeno en condiciones especiales y aún poco comunes. Todo esto con el objeto de encontrar relaciones y dependencias, causas y efectos, leyes y principios.

Otro aspecto importante que le permitirá capacitarse en el estudio de los fenómenos biológicos, es el desarrollo de su actitud crítica, la

que se supone que se forma en un medio donde a las explicaciones de los fenómenos y sobre todo de los fenómenos biológicos, se les da el valor de interpretaciones conceptuales, es decir, de hipótesis de trabajo, de modelos y no de dogmas. Esta actidud debe generar en el estudiante una opinión propia sobre esas explicaciones, que desde luego no puede ser gratuita, sino que estará formada con base en los conocimientos antecedentes, que son los que le permitirán formarse un criterio acerca de esas concepciones y necesariamente le producirán una sensación de que puede haber, dentro del mismo marco de referencia, más de una explicación para cualquier fenómeno, lo que aumentará su habilidad para analizar críticamente la información.

Uno de los métodos más eficientes que permiten el análisis de la información, de una manera crítica y profunda, es el de conocer de primera mano como fue que se llegó a las conclusiones que soportan los conceptos que se manejan y para esto se requiere estudiar los reportes originales, es decir el testimonio de aquellos expertos que participaron directamente en la generación de las preguntas, en el diseño de los métodos para tratar de contestarlas y en las aplicaciones de estos a la obtención de las evidencias, que forman la base de las posibles respuestas, que una vez sometidas a la opinión de las comunidades de intereses de los expertos en el campo e incluso a la opinión pública, permiten plantear las nuevas interrogantes, que son realmente la materia prima del avance de cualquier conocimiento y que por lo general son el producto más valioso de la investigación.

De esta manera, el desarrollo de la Biología Celular se entiende, no como el resultado de la casualidad, sino de la integración, siempre sobre la base de los antecedentes, de nuevas concepciones que han originado los enfoques novedosos a las interpretaciones que el sentido común, la experiencia y la investigación, señalaron desde un principio como las más adecuadas, sin olvidar que, como ya se dijo antes, en muchas ocasiones se hará necesario tomar en cuenta que para un mismo fenómeno existen interpretaciones

diferentes e incluso contradictorias, que deberán ser consideradas como elementos de juicio, como meras hipótesis de trabajo o modelos, de manera que cada alumno deberá, sobre la base de su criterio y sus propios antecedentes, poder elegir entre las opciones e incluso ser capaz de proponer alternativas diferentes con bases lógicas y argumentos sólidos.

Una parte fundamental del criterio que se forme, como resultado del estudio de la Biología Celular, será el del origen de las primeras células, que necesariamente llevará a la consideración de las condiciones ambientales primitivas en el planeta, que a su vez son parte de otros fenómenos que también tienen antecedentes y que definen las características que hicieron posibles las grandes etapas del proceso que llevó, por ejemplo, de los monómeros a los polímeros y por último a las protocélulas, así como a la definición de diversos escenarios para estos acontecimientos.

A partir de aquí se hará necesario no perder en ningún momento el enfoque evolutivo, que permite el entendimiento de la estructuración de diversos mecanismos, que hacen posible que se definan las propiedades fundamentales de las células, como unidades capaces de interactuar de manera continua, recíproca e inevitable con el medio, de una forma por demás íntima que Carrel en 1931 denominó continuidad fisiológica, tan estricta como la que se puede observar entre el núcleo y el citoplasma de los eucitos y que lo llevó a definir como sujeto del estudio de la Biología Celular, a lo que denominó sistema "célula-ambiente".

El enfoque de cambios en el tiempo, permitirá el entendimiento de las relaciones de origen y descendencia que emparentan a todos los organismos vivos y la ubicación de los diferentes niveles de complejidad celular, desde los protocitos más primitivos hasta los conjuntos de eucitos más complicados. Esto originará un criterio de continuidad del fenómeno de la vida, que ha producido un gigantesco espectro de variabilidad, que en la actualidad se organiza en los cinco Reinos, que sin embargo mantiene

características importantes de unidad, es decir de comunes denominadores, que hacen posible el estudio de los fenómenos integrados en mecanismos básicos, como los de obtención y manejo de la energía, la biosíntesis, la reproducción, que se encuentran representados de manera similar, en cuantos ejemplos se quieran utilizar para ilustrarlos.

Es precisamente debido a esa aparente diversidad de las unidades celulares, que es necesario llevar a cabo el estudio de las diferencias y semejanzas entre los principales niveles de complejidad celular, desde un punto de vista no de la mera descripción de sus constituyentes, sino de su papel dentro de los patrones de funcionamiento del conjunto. Para esto es recomendable que en lugar de la descripción de los componentes aislados de una célula, el estudio se realice con base en fenómenos celulares, como por ejemplo el circuito endo-exocitosis en una célula especializada, como un modelo que permita establecer una forma integrada de comprender la relación denominada estructura/función, en que se implican a diversas "partes" que al considerarse

por separado y como compartimentos aislados y sin relación en su origen y evolución, pierden su contexto y resultan en explicaciones o descripciones áridas, más propicias para la memorización que para la reflexión, comprensión y aprendizaje.

En conclusión, en los cursos modernos de Biología Celular se recomienda cubrir los diversos aspectos de la dinámica celular de una forma integrativa, que permita evaluar lo que se conoce, lo que está aún en duda y lo que todavía espera por la aplicación de nuevas ideas y técnicas, para seguir en la construcción del conocimiento de la célula, tarea por demás importante, pues como lo escribió Brachet: "Después de todo, los límites de la comprensión del fenómeno de la vida coinciden casi a la perfección, con los límites del entendimiento de la célula".

Jesús Manuel León Cázares Instituto de Fisiología Celular y Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México

TRANSPORTE DE CALCIO EN MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO

Oscar Flores Herrera, Federico Martínez, Juan Pablo Pardo, Juan Luis Rendón Gómez y Ma. Teresa Espinosa García. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, Coyoacán 04510, México, D.F., MEXICO.

RESUMEN

La concentración de calcio en las mitocondrias de placenta humana a término es elevado y parece tener un papel regulador en varias de sus funciones. El calcio es transportado por medio de un uniportador sensible al rojo de rutenio y al colapso del potencial de membrana (DELTA psi), que muestra una baja actividad tanto para la afinidad por el calcio (Km), como para la velocidad de transporte (Vmax). Los valores de es-

tos parámetros cinéticos pueden deberse a la alta concentración de colesterol que tienen las mitocondrias de placenta. Sin embargo, estas características cinéticas podrían estar relacionadas a una necesidad fisiológica de la placenta para evitar daño a las mitocondrias.

PALABRAS CLAVE: Mitocondria, placenta, transporte, calcio, respiración.

INTRODUCCION

Desde hace varios años, la fisiología de los orgánulos celulares ha sido estudiada para entender su función dentro del metabolismo celular y su posible mecanismo de regulación. Se conoce, por ejemplo, que la mitocondria tiene como función la producción de energía en forma de ATP, además de sintetizar moléculas exclusivas del órgano al que éstas pertenecen. Para el caso de las mitocondrias de placenta humana a término (MPH), éstas son capacez de sintetizar progesterona, hormona esteroidea necesaria para el mantenimiento del embarazo en mamíferos eurotélicos.

Por otra parte, se han determinado algunos mecanismos de regulación de la actividad mitocondrial, como por ejemplo, el efecto que tiene el calcio (Ca²⁺) sobre enzimas exclusivas de la mitocondria, como se puede observar para algunas deshidrogenasas del ciclo de Krebs. En las MPH la regulación de la actividad de síntesis de la progesterona, se ha relacionado a la presencia del ión calcio (Ca²⁺). Se ha observado que el transporte de Ca²⁺ inhibe el consumo de oxígeno a través de la regulación de la succinato deshidrogenasa, al mismo tiempo que se estimula la síntesis de progesterona; sin embargo, otras enzimas podrían participar en el efecto del Ca²⁺.

La placenta tiene como una de sus funciones proporcionar el Ca²⁺ necesario para el desarrollo óseo del feto, lo que sugiere que la cantidad de Ca²⁺ que atraviesa la placenta es elevado y constante (1). En este trabajo se determinaron las características cinéticas del transporte de Ca²⁺ para conocer el funcionamiento de la mitocondria bajo estas condiciones fisiológicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para cumplir nuestro objetivo, se aislaron mitocondrias de placenta humana a término por centrifugación diferencial en una solución que contenía 0.25 M sacarosa y 1 mM EGTA. Se obtuvo polarográficamente el control respiratorio determinando así el grado de acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Los estudios del transporte de Ca²⁺ se realizaron en mitocondrias semivacías del catión, las cuales se obtuvieron después de incubar a las

MPH en presencia de EGTA, BSA, Mg2+, y ATP o ADP, ya que se ha demostrado que el EGTA quela o secuestra Ca2+ con una alta afinidad y produce la disminución del contenido de Ca²⁺ intramitocondrial: la albúmina sérica de bovino (BSA) elimina a los desacoplantes naturales de la cadena respiratoria, como son los ácidos grasos libres y las hormonas esteroideas (2); el Mg²⁺, ATP y ADP son factores que han sido relacionados con la protección contra el daño estructural de la membrana interna mitocondrial, además de promover la recuperación del potencial de membrana (DELTA psi) de la mitocondria (3). La concentración remanente del Ca²⁺ intramitocondrial se cuantificó con murexida, y los resultados mostraron una disminución del contenido mitocondrial del Ca2+ de aproximadamente 50%. A las mitocondrias así obtenidas, se les determinó el control respiratorio con el fin de establecer la calidad fisiológica de la mitocondria y se encontró que la disminución del contenido intramitocondrial de Ca2+ (tabla I) incrementó el control respiratorio (CR), lo que sugiere un mejor estado de acoplamiento mitocondrial, y por consiguiente, del estado de la membrana interna. El CR de las MPH obtenido (5,7), es superior al valor de 2.7 reportado para las mismas mitocondrias en condiciones similares (2), lo que sugiere que la preparación mitocondrial tiene una función adecuada a pesar del tratamiento. Por otra parte, se puede observar que hay un incremento en el consumo total de oxígeno, que al reducir de tal manera la relación P:O, sugiere que existe algún otro sitio de consumo de oxígeno que aún no se ha determinado, ya que se ha demostrado que estructuralmente la membrana interna, no está dañada, debido a que las mitocondrias tuvieron un elevado CR; por otro lado, la baja concentración de Ca²⁺ intramitocondrial permitió estudiar la cinética del transporte del ión.

Se determinó el efecto del oxalato, Pi y ADP sobre el transporte de Ca²⁺, ya que se ha reportado que el Pi y oxalato son capaces de quelar el Ca²⁺ en el interior mitocondrial, así se puede determinar el transporte de Ca²⁺ sin que intervengan factores limitantes que modifiquen los resultados cinéticos, además de que se ha reportado que el Pi está relacionado con la recupera-

ción del *DELTA* pH (4); mientras que se ha asociado el efecto del ADP con la precipitación del complejo Pi-Ca²⁺ intramitocondrial y a la estimulación del consumo de oxígeno a través de la cadena respiratoria, provocando que se genere la fuerza protón motríz encargada de mantener el transporte de Ca²⁺ (4).

Los resultados mostraron que el transporte del Ca²⁺ se estimula en presencia de ADP o Pi en comparación con el control (figura 1, trazos b, c y a respectivamente); sin embargo, en presencia de ADP y Pi el transporte de Ca²⁺ presen-

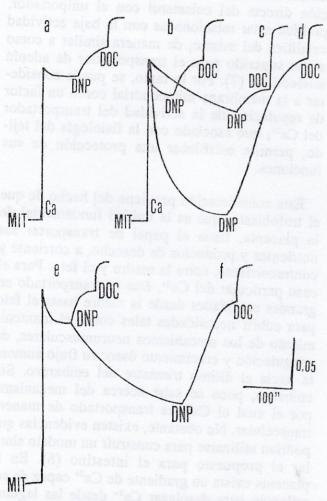


Figura 1. Efecto del Pi, ADP y oxalato sobre el transporte de calcio en MPH. a)- Control. Las MPH fueron incubadas en un medio que contenía 125 mM KCl, 10 mM succinato-TRIS, 10 mM acetato-TRIS, 10 mM HCl-TRIS y 10 mg de rotenona, con un pH final de 7.3; los trazos se realizaron en presencia de b)-0.2 mM de ADP, c)-3.3 mM de Pi, d)-0.2 mM de ADP/3.3 mM Pi, e)-3 mM de oxalato, f)-0.2 mM ADP/3.3 mM Pi/3 mM de oxalato. MIT, mitocondrias; DNP, 2',4'-dinitrofenol; DOC, desoxicolato.

tó la mayor estimulación (figura 1, trazo d). Por otra parte, el oxalato no modificó la cinética del transporte (figura 1, trazo e), lo que sugiere que posiblemente no es capaz de atravesar la membrana interna de la mitocondria. El efecto del desacoplante 2',4'-dinitrofenol (DNP) sugiere que el transporte observado no es resultado de la fijación inespecífica del ión a la mitocondria, sino que se trata de un transporte dependiente del DELTA psi. Estos resultados permitieron determinar las condiciones óptimas para estudiar el transporte de Ca²⁺ radiactivo, y obtener las constantes cinéticas.

El transporte de Ca2+ radiactivo se ensavó en un sistema de filtración Millipore, el cual permite detener la reacción en segundos y obtener las muestras radiactivas con el contenido real de Ca2+ intramitocondrial. Con este método se obtuvieron las velocidades iniciales del transporte que permitieron calcular posteriormente las constantes cinéticas por medio del programa Symplex. Como se puede observar en la figura 2, el transporte de Ca2+ muestra una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten, donde la ${\rm Km}_{\rm app}$ es de 111.83 $\mu{\rm M}$ y la ${\rm Vmax}_{\rm app}$ de 61.23 nmolas/mg/minuto. Estas constantes muestran que la afinidad y actividad del transportador de Ca2+ son bajas en comparación con lo reportado para mitocondrias de otros tejidos de mamíferos, por ejemplo para hígado de rata la Km es de 1 a 13 μ M y Vmax de 100 a 700 nmolås/mg/ minuto (5). Sin embargo, algunos reportes de la literatura indican que la naturaleza del transportador del Ca2+ presente en diversos sistemas mitocondriales de mamíferos es la de un uniportador sensible a la inhibición por rojo de rutenio (6) y al colapso del DELTA psi. Para descartar la posibilidad de que el transportador presente en las MPH fuera diferente al reportado, éstas se incubaron en presencia de concentraciones crecientes del rojo de rutenio con una concentración fija de Ca2+ radiactivo. Los resultados (figura 3) muestran una marcada sensibilidad del transportador del Ca2+ presente en las MPH a la acción del rojo de rutenio; el cual mostró una disminución del 97% de su actividad con $0.5 \mu M$ del inhibidor, lo que sugiere que la naturaleza del transportador de Ca²⁺ de las MPH es la de un uniportador sensible al rojo de rutenio similar a lo reportado para otros sistemas mitocondriales de mamíferos.

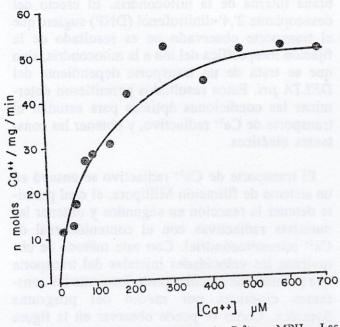


Figura 2. Cinética del transporte de Ca²⁺ en MPH. Las mitocondrias fueron incubadas en el medio descrito en la figura 1. Los parámetros cinéticos son: Km aparente de 111.83 μM y Vmax aparente de 61.23 nmolas Ca²⁺ por miligramo por minuto.

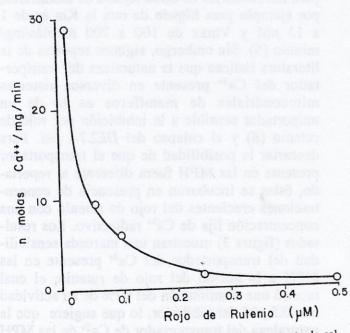


Figura 3. Efecto del rojo de rutenio sobre el transporte de calcio. Las MPH se incubaron en el medio descrito en la figura 1.

Ahora bien, si la naturaleza del transportador es la de un uniportador sensible al rojo de rutenio y al colapso del DELTA psi, ¿por qué presenta constantes cinéticas bajas de afinidad y transporte en relación a lo reportado en otros sistemas mitocondriales? Una posible explicación es que la actividad del transportador de Ca2+ está íntimamente ligada a la composición lipídica de la misma membrana. Las MPH presentan una alta concentración de colesterol (30 µg/mg de proteína) cuando se comparan a las de hígado de rata (3 a 5 μg/mg de proteína), lo que podría conferirle mayor rigidez que a otras membranas mitocondriales in situ. Esta rigidez, o la interacción directa del colesterol con el uniportador, podrían estar relacionadas con la baja actividad catalítica del mismo, de manera similar a como se ha sugerido para el transportador de adenín nucleótidos (7). Por lo tanto, se puede considerar a la membrana mitocondrial como un factor de regulación de la actividad del transportador del Ca2+, que asociado con la fisiología del tejido, permite establecer una protección de sus funciones.

Esta consideración proviene del hecho de que el trofoblasto, que es la unidad fundamental de la placenta, tiene el papel de transportar los nutrientes y productos de desecho, a corriente y contracorriente, entre la madre y el feto. Para el caso particular del Ca2+, éste es transportado en grandes cantidades desde la madre hasta el feto para cubrir necesidades tales como el mantenimiento de los mecanismos neuromusculares, de coagulación y crecimiento óseo; su flujo aumenta hacia el último trimestre del embarazo. Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo por el cual el Ca2+ es transportado de manera transcelular. No obstante, existen evidencias que podrían utilizarse para construír un modelo similar al propuesto para el intestino (8). En la placenta existe un gradiente de Ca2+ capaz de ser utilizado para desplazar Ca2+ desde las lagunas maternas hasta el interior de la célula del trofoblasto; también hay evidencias que sugieren la existencia de una proteína denominada HCaBP, con 10 sitios afines al Ca2+, cada uno con una Kd de 5 μ M y que se localiza en las vellosidades coriónicas y en las células del trofoblasto (9). La actividad de la HCaBP con-

sistiría en atrapar inmediatamente al Ca2+ que ingresa a la placenta, para llevarlo hasta la zona donde la concentración de Ca2+ es baja, para transportarlo hacia el feto. Para la salida del Ca²⁺ de la célula del trofoblasto, se ha reportado la existencia de una ATPasa de Ca2+ que presenta una Km de 99.7 µM y una Vmax de 1.540 nmolas/mg/minuto (10). Su localización es en la membrana basal del sinsicio y el citotrofoblasto, y se propone que es la encargada de mantener el flujo del Ca²⁺ de la madre hacia el feto. Dentro de este modelo (Fig 4), las constantes cinéticas del transporte de Ca2+ en la mitocondria responden a una necesidad fisiológica del trofoblasto y de la misma mitocondria. Si la mitocondria tuviera unos parámetros de transporte que reflejaran una mayor afinidad y actividad cinética, ésta podría ser capaz de formar a su alrededor un microambiente de menor concentración de Ca2+,

lo que originaría que la HCaBP liberara en esta zona al Ca2+ unido y no en la vecindad de la ATPasa de Ca2+, entonces el Ca2+ será capturado por la mitocondria. Esto daría lugar a dos fenómenos: por una parte el flujo de Ca2+ a través de la célula se vería afectado, y con éste, el aporte de Ca2+ requerido por el feto; por otra, el ingreso masivo de Ca2+ a la mitocondria pondría en peligro su propia integridad fisiológica, afectando su metabolismo y posteriormente el buen funcionamiento de la célula del trofoblasto. Así pues, las características del transporte de Ca²⁺ en las mitocondrias están en armonía con la fisiología del órgano al que pertenecen. Sin embargo, esto no niega la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación de la HCaBP que asegure que la liberación del Ca2+ sea en las cercanías de la ATPasa de Ca2+ y no en otra zona del citoplasma

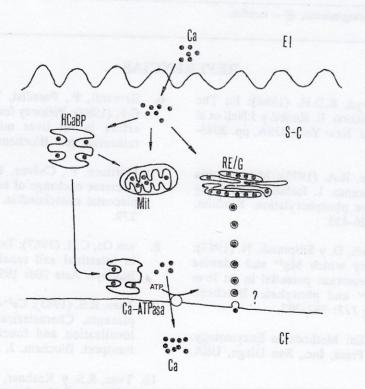


Figura 4. Modelo propuesto para el transporte transcelular de calcio en las células trofoblásticas. Ca, calcio; HCaBP, proteína fijadora de calcio -por simplicidad sólo se muestra con 4 sitios afines por calcio-; Mit, mitocondrias; RE/G, retículo endoplásmico y Aparato de Golgi; Ca-ATPasa de calcio; EI, espacio intervelloso; S-C, sincicio y citotrofoblasto; CF, capilar fetal.

TABLA I.

EFECTO DE LA PRESENCIA EGTA, BSA, ATP, ADP y Mg2+ EN EL CONTENIDO DE Ca2+ INTRAMITOCONDRIAL Y EN LOS PARAMETROS BIOENERGETICOS DE LAS MPH.

MEDIO\PARAMETRO.	EDO 3	EDO 4 @	CR	CONS.O	P:O	[Ca]
Control	49.30	12.86	3.83	116.0	1.81	52.50
0.2% BSA,2mM EGTA	60.00	12.44	4.82	374.0	0.66	46.01
0.2% BSA,2mM EGTA 4 mM Mg ²⁺	106.67	22.65	4.71	468.0	0.64	64.6
0.2% BSA,2mM EGTA 2mM ADP	80.95	21.65	3.74	255.0	1.18	43.89
0.2 % BSA, 2mM EGTA, 2mM ATP	97.67	24.33	4.01	492.0	0.51	43.2
0.2% BSA,2mM EGTA 2mM ATP, 4mM Mg ²⁺	104.67	26.00	4.03	420.0	0.72	39.6
0.2% BSA,2mM EGTA 2mM ATP, 2mM Mg ²⁺	53.30	9.33	5.70	462.0	0.65	23.0

REFERENCIAS

- 1. Morriss, F.H.Jr. y Boyd, R.D.H. (1988): En The Physiology of Reproduction. E. Knobil y J.Neil et al (Eds.) Raven Press, Ltd. New York, USA, pp. 2043-2083.
- 2. Olivera, A.A. y Meigs, R.A. (1975): Mitochondria from human term placenta. I. Isolation and assay condition for oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 376: 426-435.
- 3. Toninello, A., Siliprandi, D. y Siliprandi, N. (1983): On the mechanism by which Mg2+ and adenine nucleotides restore membrane potential in rat liver mitochondria by Ca2+ and phosphate. Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 792-797.
- 4. Carafoli, E. (1988): En: Methods in Enzymology. Vol. 157, Academic Press, Inc., San Diego, USA. pp. 3-11.
- 5. Nicholls, D. y Akerman, K. (1982): Mitochondrial calcium transport. Biochim. Biophys. Acta 683: 57-88.

- 6. Bernardi, P., Paradisi, V., Pozzani, T. y Azzone, G.F. (1984): Pathway for uncoupler-induced calcium efflux in rat liver mitochondria: inhibition by ruthenium red. Biochemistry 23: 1645-1651.
- Martínez, F., Chávez, E. y Echegoyen, S. (1987): Decrease exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. Int. J. Biochem. 19: 275-279.
- 8. van Os, C.H. (1987): Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta 906: 195-222.
- 9. Tuan, R.S. (1985): Ca2+-binding protein of the human placenta. Characterization, immunohistochemical localization and functional involvement in Ca2+ transport. Biochem. J. 227: 317-326.
- 10. Tvan, R.S. y Kushner, T. (1987): Calcium-activated ATPase of the human placenta: identification, characterization, and functional involvement in calcium transport. Placenta 8: 53-64

EDITORIAL

HISTORIA NATURAL DEL BEB

La Bioquímica es una ciencia joven, todavía inacabada, en donde constantemente se obtienen hallazgos que son publicados en libros y revistas especializadas, es una ciencia sumamente celosa pues reclama atención, dedicación, estudio y de esta manera sus seguidores se mantienen en un proceso dinámico, de adquisición constante de información para poder integrar el conocimiento.

En nuestro país, como en otros análogos, este proceso sólo es posible para unos cuantos de la gran cantidad de aquellos que nos dedicamos a esta ciencia, pues por falta: de recursos económicos para la adquisición de textos adecuados, de formación académica a veces, de interés en algunos casos, de manejo de otros idiomas, etc., esta posibilidad en el enriquecimiento se ve limitada.

Ya que la Universidad Nacional Autónoma de México tiene implícito en su nombre un compromiso para con todo el país y consciente de ello en la Facultad de Medicina hace casi 20 años se iniciaron algunas acciones para tratar de impedir que la brecha existente ante esas dos realidades -el incremento en la información, por un lado y la dificultad para la actualización por otro- se hiciera tan grande que se rompiera totalmente la comunicación entre los avances y aquellos que en los salones de clase de las universidades de nuestro amplio territorio ayudan a miles de estudiantes a la adquisición del conocimiento. De esta manera el Departamento de Bioquímica aceptó su papel en la historia y se echó a cuestas el compromiso de un programa que ha persistido

a través del tiempo, en el que anualmente, cita por una semana, para actualizar en algunos tópicos de nuestra materia a cerca de 1,000 profesores, llamado al que acude aproximadamente el 10% y que conforme a las leyes del azar, ese 10% está constituído de uno a otro año por diferentes profesores.

La colección Mensaje Bioquímico ha retenido en sus páginas, desde el quinto año del inicio del programa mencionado hasta la fecha, todos aquellos avances que en su momento fueron puestos al alcance de los inquietos en esta actualización.

Pero pasados unos años no era suficiente sólo eso: la reunión y el libro, pues ambos eran ya una realidad, con esto se habían cubierto dos etapas de este proceso evolutivo, entonces surgió otra necesidad pues aquel que recibe, reclama y siente tener derecho a seguir recibiendo más y mejor y así como una etapa más en este proceso evolutivo en marzo de 1982 a solicitud de varios grupos de profesores aparece el Boletín de Educación Bioquímica (BEB), un órgano de comunicación, difusión y servicio entre todos los que cultivamos la Bioquímica, de aquellos que pueden dar a los que reciben, de aquel que necesita un servicio a aquel que puede dar información, del que sabe más de un tema a aquel que completa con esto su información anterior; en fín establece una red en que todos los intersados podemos estar conectados.

El BEB sin entrar en competencia con revistas internacionales de investigación, es una

publicación especializada con artículos originales y con ello cumple su aspiración de ser órgano de difusión y comunicación; función que por 10 años ha venido desarrollando entre aquellos que han respondido al llamado y todos los que hemos trabajado en este proceso en el cual creemos, al cual queremos y que sabemos, sirve.

Con esta labor de todos, creo que estamos contribuyendo a que la Bioquímica no se

quede en un pedestal lejos de la mayoría, sino que se torne familiar y alcanzable para todo aquel que tome la decisión de comprometerse con ella.

> Yolanda Saldaña de Delgadillo Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México

EL PAPEL DEL L-MALATO EN EL METABOLISMO VEGETAL

Gilda Flores Rosales. Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-IPN. Departamento de Ciencias Biológicas, FES-C, UNAM.

RESUMEN

El L-malato es el ácido orgánico más abundante en los tejidos vegetales. Su concentración puede permanecer constante por largo tiempo o variar como resultado de cambios en el medio ambiente de la planta. El L-malato está sujeto a transformaciones en todos los compartimentos celulares debido a la amplia distribución de las enzimas que favorecen su formación o utilización y a la presencia de acarreadores específicos membranales que facilitan su movimiento dentro y fuera de la célula.

El L-malato está implicado en una extensa variedad de procesos como son: ciclo de Krebs, ciclo del glioxalato, fotosíntesis de plantas C4 y CAM, control del pH del citosol, almacén de CO₂ y de equivalentes reductores, mantenimiento del balance eléctrico celular y en movimientos estomáticos. Se considera que tiene un papel central en el metabolismo vegetal.

PALABRAS CLAVE: fosfoenolpiruvato, L-malato, oxaloacetato.

INTRODUCCION

El propósito de esta revisión es llamar la atención sobre los variados y específicos papeles que el L-malato juega en la bioquímica de las plantas.

Su nombre se origina del latín *malum* (manzana) y fue descubierto por Schelle en 1785. El Lmalato se encuentra en casi todos los tejidos vegetales y puede ser acumulado en cantidades considerables, porque al contrario de las células animales, las células vegetales tienen vacuolas que se lo permiten; las cantidades de malato acumuladas son variables y dependen del tipo de vegetal y de las condiciones ambientales, pueden llegar a 100 µM.

La mayor cantidad de malato en vegetales se obtiene a través de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la subsecuente reducción del oxaloacetato (OAA) por la enzima malato deshidrogenasa (MDH) y NADH (Fig 1); es evidente entonces que en plantas el malato y

el fosfoenolpiruvato, están muy relacionados y que sus papeles no se pueden disociar, ya que el fosfoenolpiruvato es la fuente principal de malato, así como el malato es el producto natural del fosfoenolpiruvato.

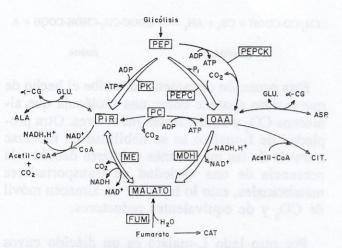


Figura 1. El metabolismo del L-malato en plantas (4).

El malato está implicado en una extensa variedad de procesos fisiológicos en tejidos vegetales, lo que no acontece en los animales; Latzko y Kelly en 1983 (1) enlistaron once funciones fisiológicas dependientes de la actividad acoplada de las enzimas relacionadas con la concentración de malato PEPC-MDH; por ejemplo, el malato abastece al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, puede generar NADPH a través de la enzima málica (ME) dependiente de NADP, actúa como un almacén de CO₂ en la fotosíntesis de algunas plantas, es un producto de fermentación, puede acarrear equivalentes reductores, contribuye al mantenimiento del pH y del balance eléctrico celular, etc.

CONCENTRACION CELULAR DE MALATO.

La concentración de L-malato varía entre 1 y 10 mM y bajo circunstancias específicas, como la fijación nocturna de CO₂ por plantas CAM puede exceder a 100 mM, almacenado en una vacuola gigante. La concentración interna puede permanecer constante o variar como resultado de cambios en el medio ambiente, como ciclos de luz-oscuridad y variaciones en temperatura. Las condiciones de estrés ya sea salino o hídrico, por contaminación con productos químicos o por

la presencia de herbicidas y pesticidas, o bien por condiciones de anoxia o por ataque de parásitos (2), tienen una fuerte influencia sobre el balance de las enzimas que actúan sobre el malato y modifican su distribución celular, dando generalmente como resultado un incremento en la síntesis de malato.

REACCIONES EN LAS QUE PARTICIPA EL MALATO

La participación mas conocida tanto en animales como en plantas del L-malato en el metabolismo, es como intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Además, sus propiedades químicas le confieren funciones esenciales dentro del metabolismo de las plantas; una de estas propiedades es su facilidad de transformarse en todos los compartimentos celulares, debido a la ubicuidad de las enzimas que favorecen su formación o utilización.

En la figura 1 y Tabla I se muestran algunas de las principales reacciones y características de las enzimas, relacionadas con el metabolismo del malato en vegetales. Es notorio que el malato ocupa una posición central entre la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con vías ligadas al metabolismo de aminoácidos mediante reacciones de transaminación. Tres de estas reacciones son fuertemente exergónicas, y desde un punto de vista termodinámico, el malato es más favorable de producirse por medio de la carboxilación de fosfoenolpiruvato (PEP) con la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la posterior reducción del oxaloacetato con la enzima malato deshidrogenasa (ΔG° = -50 KJ) que la síntesis de piruvato a partir de fosfoenolpiruvato vía la enzima piruvato cinasa (PK) (ΔGo' = -31.4 KJ).

Si se considera a los 4 sustratos más importantes interrelacionados con el metabolismo de malato (PEP, OAA, malato y piruvato) se verá que sus interrelaciones están gobernadas por pocas enzimas, algunas veces existen como isoenzimas y distribuidas en la mayoría de los compartimentos celulares. En la Tabla I se puede ver que PEPC es una enzima citosólica, que PK se encuentra tanto en citoplasma como en cloroplasto. La enzima málica (ME) está presen-

TABLA I.

LOCALIZACION DE ALGUNAS ENZIMAS QUE PARTICIPAN EN EL METABOLISMO DE MALATO.

NOMBRE DE LA ENZIMA	LOCALIZACION
fosfoenolpiruvato carboxilasa (pepc) (4.1.1.31)	CITOSOL
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXICINASA (PEPCK) (4.1.1.49)	CITOSOL
PIRUVATO CINASA (PK)(2.7.1.40)	CITOSOL Y CLOROPLASTO
PIRUVATO CARBOXILASA (PC)(6.4.1.1)	CITOSOL
ENZIMA MALICA (ME)(1.1.1.39)	CITOSOL Y CLOROPLASTO DEPENDIENTE DE NADP MITOCONDRIA DEPENDIENTE DE NAD
MALATO DESHIDROGENASA (MDH)(1.1.1.37)	CLOROPLASTO DEPENDIENTE DE NADP CITOSOL MITOCONDRIA GLIOXISOMAS Y PEROXISOMAS DEPENDIENTE DE NAD

te en tres compartimentos celulares y muestra diferente especificidad por su coenzima. Las enzimas citosólica y de cloroplasto son específicas para NADP, mientras que la enzima mitocondrial es específica para NAD. Lo mismo sucede con las isoenzimas de MDH, la cloroplástica es específica para NADP, la mitocondrial y la citosólica son específicas para NAD. La enzima MDH se encuentra también en microcuerpos (glioxisomas y peroxisomas) y ahí muestra especificidad para NAD (3).

ALMACENAMIENTO DE CO,

La importancia del malato como un sustrato puede ser ejemplificada por la comparación de sus propiedades con las de sus precursores o productos (fosfoenolpiruvato, fumarato, oxaloacetato, piruvato). Si se considera al fosfoenolpiruvato como equivalente energético de piruvato, se puede considerar que algunas enzimas catalizan parcial o totalmente en una u otra dirección la reacción general:

$$CH_3$$
-CO-COOH + CO_2 + AH_2 \longrightarrow HOOC- CH_2 -CHOH-COOH + A piruvato malato

Esta ecuación claramente describe el hecho de que malato aparece como una molécula que almacena CO₂ y equivalentes reductores. Otra propiedad de L-malato es su habilidad de moverse a través de las membranas celulares debido a la presencia de una variedad de transportadores membranales, esto lo hace ser un almacén móvil de CO₂ y de equivalentes reductores.

Por otro lado L-malato es un diácido cuyos pK son: pKa = 3.4 y pKb = 5.26 o sea que al pH fisiológico puede generar protones que intercambia con cationes del citoplasma transportándolos a una vacuola con lo cual mantiene el balance eléctrico de la célula (4).

MOVILIZACION DE EQUIVALENTES REDUCTORES

La distribución ubícua de las enzimas relacionadas con el metabolismo del malato que catalizan en conjunto la reacción general:

$$HOOC-CH_2-CHOH-COOH + A \longrightarrow CH_3-CO-COOH + CO_2 + AH_2$$

malato piruvato

tiene dos consecuencias importantes: a) los equivalentes reductores generados pueden ser movidos de un compartimento celular a otro por las lanzaderas que involucran malato-oxaloacetato y aspartato-glutamato y b) con la especificidad de las isoenzimas por NAD o NADP, sus equivalentes reducidos, NADH y NADPH pueden fácilmente interconvertirse por reacciones de transhidrogenación (5). Por otro lado la mitocondria de los vegetales en contraste con la mitocondria de los animales tiene un sistema muy eficiente de transporte de oxaloacetato en ambos sentidos, regulado por la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH). Todos estos

mecanismos de lanzadera son dependientes de que existan los acarreadores apropiados en las membranas de los orgánulos, que facilitan así el movimiento de malato en los compartimentos celulares (6), esta propiedad del L-malato le permite acarrear equivalentes reductores de un compartimento celular a otro sobre el hecho de que las membranas celulares son impermeables a los nucleótidos reducidos de piridina (NADH, NADPH).

REGULACION DEL pH CELULAR.

El L-malato contribuye a la regulación del pH celular, como otra de sus funciones, no por los protones de sus grupos carboxilo, sino por la consideración de que se origina fijando CO, en forma de HCO₃ al fosfoenolpiruvato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, la cual es activa a un pH de 7.7; la reacción catalizada por las actividades acopladas de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa contribuyen a disminuir el pH celular, cuando el pH se acerca a 6.8 se activa la enzima málica catalizando la reacción de descarboxilación de malato, esta reacción incrementa el pH; así el pH citoplásmico puede ser mantenido entre los pH óptimos de las dos enzimas y Davies los propuso como pH stat (Fig 2) (7).

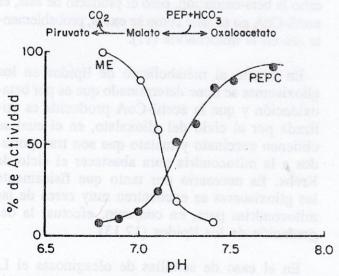
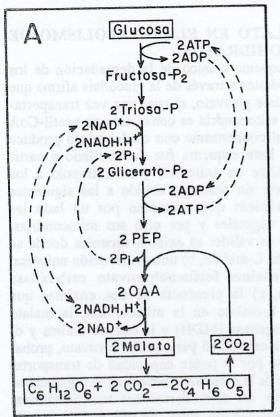


Figura 2. El pH stat metabólico de vegetales ejemplificado con la enzima málica (ME) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (7).

L-MALATO EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

El esquema clásico de la degradación de los carbohidratos a través de la glucólisis afirma que se produce piruvato, el cual una vez transportado a la mitocondria es convertido en acetil-CoA y éste al condensarse con oxaloacetato produce citrato. Este esquema fue desarrollado a partir de estudios en animales, y se extrapoló a los vegetales; sin embargo debido a las siguientes características que presentan por un lado las células vegetales y por otro sus mitocondrias, esto no es válido: a) existen vacuolas donde se almacena L-malato, b) una distribución universal de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), c) la presencia de dos enzimas que oxidan L-malato en la mitocondria, la malato deshidrogenasa (MDH) y la enzima málica y d) una baja capacidad para oxidar piruvato, probablemente por la pobre capacidad de transportar piruvato de la membrana interna de la mitocondria. Junto con las consi-deraciones termodinámicas que se expusieron antes, de que malato es más fácilmente producido a partir de fosfoenolpiruvato, se llegó a la conclusión de que en plantas, el malato y no el piruvato es el producto terminal de la glucólisis y el sustrato inicial del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El L-malato puede entrar al ciclo de Krebs por dos mecanismos: uno por su oxidación a través de la enzima málica (ME) la cual produce piruvato, éste a su vez produciría acetil-CoA vía piruvato deshidrogena-sa, mecanismo ya conocido en animales y otro por la entrada directa del malato para reciclar el oxaloacetato mediante la malato deshidrogenasa (5,8,9) (Fig 3).

La idea de que L-malato pueda ser el producto natural de la glucólisis fue sugerida cerca de los años 30 por Mazelis y Vennesland, basados en la gran acumulación de este metabolito y a que se encontraba en todos los tejidos vegetales. Al final de los 70 se propuso que dicha acumulación se debía a una fermentación málica, que acontecía en situaciones de estrés. Actualmente se considera al malato como un producto regular de la degradación anaeróbica de cabohidratos y es muy probable que este mecanismo degradativo exista en todos los tejidos vegetales proponiéndose como la vía del malato, sin embargo este proceso fermentativo como se observa en la fi-



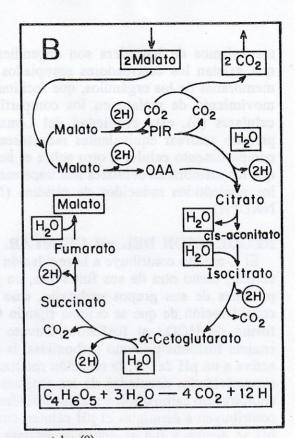


Figura 3. La participación del L-malato en la degradación de carbohidratos en vegetales (9).

ra 4 no es fosforilante como lo son las fermentaciones alcohólica y láctica y por lo tanto aporta menos energía para efectuar procesos celulares, por lo que se puede considerar que la fermentación málica es un mecanismo de almacenamiento de equivalentes reductores que la célula no puede oxidar en un momento dado (10).

L-MALATO EN EL METABOLISMO DE LIPIDOS.

El problema de la degradación de lípidos en tejidos vegetales es una de las situaciones más complicadas, probablemente porque los esquemas de las células animales han sido impuestos a las células

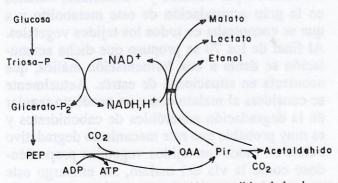


Figura 4. Esquema de la degradación anaeróbica de la glucosa y la fermentación málica (4).

vegetales. Esto es un gran error. La mitocondria vegetal al contrario de la animal no degrada ácidos grasos a través de beta-oxidación. Los ácidos grasos en vegetales son metabolizados en orgánulos especializados como son los glioxisomas y los peroxisomas. En el caso de los peroxisomas no se tiene claro el proceso, sólo se conoce que lleva a cabo la beta-oxidación, pero el producto de ésta, el acetil-CoA no se sabe como se oxida, probablemente sea en la mitocondria (11).

En cuanto al metabolismo de lípidos en los glioxisomas se tiene determinado que es por betaoxidación y que la acetil-CoA producida es utilizada por el ciclo del glioxalato, en el cual se obtienen succinato y malato que son transportados a la mitocondria para abastecer el ciclo de Krebs. Es necesario por tanto que físicamente los glioxisomas se encuentren muy cerca de las mitocondrias para, en conjunto, efectuar la degradación de los lípidos (12,13).

En el caso de semillas de oleaginosas el L-malato producido en el glioxisoma es exportado al citoplasma y realiza gluconeogénesis por la reversa de la glucólisis (Fig 5).

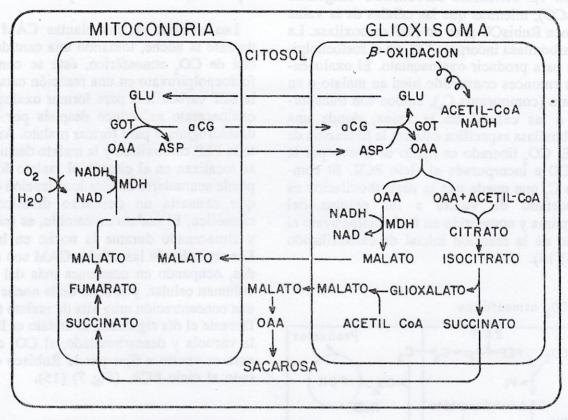


Figura 5. La degradación de lipidos en plantas produce L-malato (12).

EL L-MALATO EN LA FOTOSINTESIS.

Las plantas terrestres han sido clasificadas como C₃, C₄ y CAM (metabolismo ácido tipo crasuláceas); con base en los diferentes metabolitos fotosintéticos del carbono, todas las plantas quedan en estas clasificaciones salvo algunas que son C₃-C₄ y C₄-CAM.

Las reacciones obscuras de la fotosíntesis cubren la fijación neta de CO₂ y la reducción de carbono a carbohidratos. Esta asimilación de carbono ocurre a través de una ruta conocida como ciclo de reducción fotosintética del carbono (ciclo PCR). El ciclo PCR es también denominado algunas veces ciclo de Calvin-Benson en honor a los dos científicos que hicieron las más importantes contribuciones a la clarificación de la secuencia de reacciones del ciclo. Dado que el primer producto de fijación del CO₂ es un intermediario C₃ (3-fosfoglicerato) el ciclo PCR se llama frecuentemente ruta C₃, es decir, la ruta se

nombra según el número de carbonos del primer metabolito que se forma.

Algunas plantas poseen la ruta C₄ de asimilación de carbono, denominada así porque el producto inicial de la fijación de carbono es un ácido tetracarbonado (oxaloacetato). Hay que señalar que el ciclo C, no sustituye al ciclo PCR en las plantas C3, sino más bien es un preludio al ciclo PCR. Las plantas que poseen la ruta C llevan a cabo sus reacciones asimiladoras de carbono en dos tipos de células, las células del parénquima y las células de la vaina, mientras que las plantas que poseen únicamente el ciclo PCR llevan a cabo sus reacciones sólo en las células del parénquima. Las células de la vaina en las plantas C₄, al contrario de las células del parénquima en las plantas C3, contienen cloroplastos. Estas células de la vaina están rodeadas por las células del parénquima. Las células del parénquima contienen la enzima carboxilante fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en su citosol, pero no poseen la enzima ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/ oxigenasa (RubisCO), mientras que las células de la vaina contienen RubisCO pero no PEP carboxilasa. La PEP carboxilasa incorpora CO, en el fosfoenolpiruvato para producir oxaloacetato. El oxaloacetato es entonces convertido bien en malato o en aspartato (compuestos C₄), ambos son transportados a las células de la vaina, donde una descarboxilasa específica cataliza la liberación de CO2. El CO2 liberado es fijado de nuevo por la RubisCO e incorporado al ciclo PCR. El compuesto C, que queda tras la descarboxilación es transportado de vuelta a las células del parénquima y convertido en fosfoenolpiruvato el sustrato de la reacción inicial de carboxilación (Fig 6)(14).

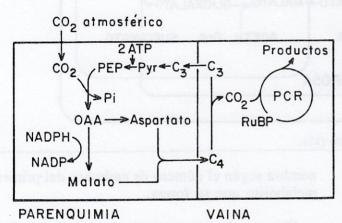


Figura 6. La participación del L-malato en la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis de plantas C₄ (14) RUBP = Rubisco.

Hay otra ruta secundaria de fijación del carbono llamada metabolismo ácido tipo crasuláceas
(CAM), que se cree es una adaptación de la
fotosíntesis al estrés hídrico. Por esta razón, las
plantas CAM son las más extendidas en ambientes áridos y microclimas secos. El CAM es análogo al ciclo C₄ en el sentido de que hay una
carboxilación inicial vía PEP carboxilasa, seguida de una descarboxilación de los ácidos C₄ que
resulta en un aporte interno de CO₂. Sin embargo, al contrario que en la ruta C₄, el CAM ocurre sólo dentro de las células del parénquima,
dándose la carboxilación y la descarboxilación
en momentos diferentes a lo largo del ciclo díanoche. Así la carboxilación y la descarboxilación

están separadas en el tiempo en el CAM, mientras que estos acontecimientos están separados espacialmente en la ruta C_4 .

Los estomas de las plantas CAM se abren durante la noche, tomando una cantidad sustancial de CO, atmosférico, éste se combina con fosfoenolpiruvato en una reacción catalizada por la PEP carboxilasa para formar oxaloacetato. El oxaloacetato se reduce después por la malato deshidrogenasa para formar malato. Aunque tanto la PEP carboxilasa y la malato deshidrogenasa se localizan en el citosol, el malato formado no puede acumularse en esta localización celular, ya que causaría un descenso drástico del pH citosólico. El malato en cambio, es transportado y almacenado durante la noche en la vacuola. Las vacuolas de las células CAM son muy grandes, ocupando en ocasiones más del 95 % del volumen celular, y al final de la noche contienen una concentración muy alta de malato (100 mM). Durante el día siguiente, el malato es liberado de la vacuola y descarboxilado, el CO, que se genera es vuelto a fijar por la Rubisco e incorporado al ciclo PCR. (Fig 7) (15).

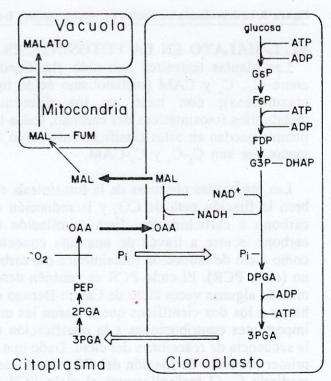


Figura 7. La fotosíntesis de plantas CAM involucra la síntesis y el almacenamiento de L-malato.

EL L-MALATO EN CEREALES

Se ha encontrado que durante la germinación de cereales, específicamente en cebada y trigo, el endospermo amiláceo tiene un pH alrededor de 5.0, mientras que la célula de la capa de aleurona tiene valores de pH cercanos a la neutralidad. La diferencia de pH es atribuida a la capacidad de la capa de aleurona de acidificar su entorno, esta acidificación fue correlacionada con secreción de L-malato (16). Se ha postulado que la acidificación del endospermo amiláceo durante la germinación de la semilla es una función fisiológica de la capa de aleurona, la cual, por esta vía solubiliza proteínas, iones Ca2+ y almidón del endospermo, favorece la actividad de las hidrolasas y activa el sistema de transporte en el escutelo (17), sin embargo a la síntesis y secreción de malato que se da en forma concomitante a la acidificación no se le ha asignado específicamente un papel bioquímico o fisiológico.

La participación del L-malato en la germinación de cereales como la cebada y trigo todavía no se conoce; el estudio de las vías metabólicas de su síntesis, así como su utilidad en la semilla plantean un reto muy interesante de investigar, puesto que aportaría los datos faltantes para completar el panorama del papel del L-malato en el metabolismo vegetal, ya que hasta ahora todas las funciones que desempeña el L-malato se han visto en tejidos fotosintéticos y este no es el caso de las semillas de cereales, es por eso que posiblemente la participación del L-malato en este sistema sea diferente a todo lo anteriormente descrito.

REFERENCIAS

- Latzko, J. y Kelly, G. (1983): The many faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. Physiol. Veg. 21: 805-815.
- 2. Lewit, J.L. (1980): Responses of plants to environmental stresses. 1 y 2, Academic Press, New York.
- 3. Sautter, G. y Hock, B. (1982): Fluorescence inmunochemical localization of malate dehydrogenase isoenzyme in watermelon cotyledons. Plant Physiol. 70: 1162-1168.
- 4. Davies, D. (1980): Anaerobic metabolism and the production of organic acids. En The Biochemistry of plants, 2. Academic Press, New York. 581-611.
- 5. Day, D.A. y Wiskich, J.T. (1984): Transport processes of isolated plant mitochondria. Physiol. Veg. 22: 241-261.
- 6. Wiskich, J.T. (1977): Mitochondrial metabolite transport. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 45-69.
- 7. Smith, F.A. y Raven, J.A. (1979): Intracellular pH and its regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 289-311.
 - 8. Palmer, J.M. (1984): Oxidation of malate and NADH by plant mitochondria. Physiol. Veg. 24: 1000-1010.
 - 9. Wiskich, J.T. (1980): Control of the Krebs cycle. En The Biochemistry of Plants, 2. Academic Press, New York. 243-278.

- 10. Ugochukwu, E.N. y Anosike, E.O. (1979): Effect of storage on ethanol, lactate, malate and their dehydrogenases in yam tuber. Phytochemistry 18: 1621-1624.
- 11. Beers, H. (1979): Microbodies in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 65: 159-193.
- 12. Tolbert, N.E. (1980): Microbodies: Peroxisomes and glioxisomes. En The Biochemistry of plants, 1. Academic Press, New York. 283-328.
- 13. Galliard, T. (1980): Degradation of acyl lipids: Hidrolytic and oxidative enzymes. En The Biochemistry of Plants, 4. Academic Press, New York. 85-116.
- Ohnishi, J. y Kanai, R. (1983): Differentiation of photorespiratory activity between mesophyl and bundle sheat cells of C₄ plants. Glycine oxidation by mitochondria. Plant Cell. Physiol. 24: 1411-1420.
- 15. Osmond, C.B. y Holtum, J.A. (1981): Crassulacean acid metabolism. En The Biochemistry of Plants, 8. Academic Press, New York. 283-328.
- Mikola, J. y Virtanen, M. (1981): Secretion of L-malic acid by barley aleurone layers. Plant Physiol. 66: 5-142.
- 17. Hamabata, A. y García, M.M. (1988): Kinetics of the acidification capacity of aleurone layer and its effect upon solubilization of reserve substances from starchy endosperm of wheat. Plant Physiol. 86: 643-644.

INDICE GENERAL ANUAL DEL BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

AUTORES DE EDITORIALES

Gutiérrez Avila, J H. El aprendizaje de la bioquímica entre los estudiantes y el pensamiento mágico entre los médicos. 10 (2), 13.

León Cázares, J.M. Información integrada contra información aislada. 10 (3), 21-23.

Saldaña de Delgadillo, Yolanda. Historia natural del BEB. 10 (4), 29-30.

Sánchez Esquivel, S. El trabajo de investigación científica. 10 (1), 1-3.

AUTORES DE ARTICULOS

Flores Herrera, O, Martínez, F, Pardo, J P, Rendón Gómez, J L, y Espinoza García, M T. Transporte de calcio en mitocondrias de placenta humana a término. 10 (3) 23-28.

Flores Rosales, G. El papel del L-malato en el metabolismo vegetal. 10 (4) 30-37.

Padilla Acero, J y Arredondo Peter, Raúl. Nodulinas en la simbiosis Rhizobium - leguminosa. 10 (1), 4-12.

Sotelo, S y Gutiérrez, R. Los osciladores citosólicos de calcio. 10 (2) 14-20.

TITULOS DE EDITORIALES

Aprendizaje de la bioquímica entre los estudiantes y el pensamiento mágico entre los médicos. El. Gutiérrez Avila, J H. (1991): 10 (2), 13.

Historia natural del BEB. Saldaña de Delgadillo, Y. (1991): 10 (4), 29-30.

Información integrada contra información aislada. León Cázares, J.M. (1991): 10 (3), 21-23.

Trabajo de investigación científica. El. Sánchez Esquivel, S. (1991): 10 (1), 1-3.

TITULOS DE ARTICULOS

L-malato en el meiabolismo vegetal. El papel del. Flores Rosales, G. (1991): 10 (4), 30-37.

Nodulinas en la simbiosis Rhizobium - leguminosa. Padilla Acero, J y Arredondo Peter, R. (1991): 10 (1), 4-12.

Osciladores citosólicos de calcio. Los. Sotelo, S y Gutiérrez, R. (1991): 10 (2), 14-20.

Transporte de calcio en mitocondrias de placenta humana a término. Flores Herrera, O, Martínez, F, Pardo, J P, Rendón Gómez, J L, y Espinoza García, M T. (1991): 10 (3), 23-28.

INSTRUCCIONES PARA LOS COLABORADORES DEL

BOLETIN DE EDUCACION BIOQUIMICA

El BEB es una revista dedicada a la divulgación de temas interesantes y relevantes en el campo de la Bioquímica y de áreas afines. Está dirigido a profesores y estudiantes, por lo que se sugiere que la presentación de los trabajos se ajuste a sus lectores y sea clara y explícita. Serán bienvenidas las contribuciones en forma de artículos de revisión y otras comunicaciones. Se solicita a los autores se ajusten a los siguientes lineamientos para facilitar la labor editorial:

I. ARTICULOS DE REVISION

- 1) El artículo deberá enviarse en un disco flexible de 5 1/4 pulgadas de 365 KB de capacidad, escrito en los procesadores de textos "Word 5" o Write, sin ningún formato y con una extensión máxima de 18,000 caracteres. Este deberá ir acompañado de dos impresiones del artículo en el que se marcarán en color las palabras o líneas que deban ir en cursivas o negritas, así como todas las anotaciones necesarias. En el caso de no tener acceso a este procesador, el manuscrito podrá enviarse mecanografiado, con una extensión que no exceda de 12 cuartillas escritas a doble espacio (27 renglones por cuartilla y 70 golpes por renglón).
- Se deberá incluir un resumen en idioma español y un abstract en inglés, de más o menos diez renglones, que irán seguidos por conjuntos de tres a seis palabras clave.
- 3) Se sugiere un máximo de quince referencias, tanto específicas como de lecturas recomendadas, numeradas en el texto de forma progresiva conforme vayan apareciendo. Cada una debe contener: nombres de los autores, año de publicación entre paréntesis, título del artículo, nombre de la revista, número del volumen en cursivas y antecedido por dos puntos el número de la primera y última páginas, de acuerdo con lo que se muestra en el siguiente ejemplo:

Miller, C O (1982) Cytokinin Modification of Mitochondrial Function. Plant Physiol 69: 1274-1277.

Los libros deberán citarse de la siguiente forma:

Larckins, B A, Pearlmutter, N L y Hukman, W J (1979). The mechanism of zein synthesis and deposition in protein bodies of maize endosperm. En The Plant Seed. Development, Preservation and Germination, Editores: Rubenstein, I; Phillips, R L; Green, C E y Gengenbach, B G. Academic Press. New York. pp 49-55

4) Se aceptarán como máximo seis figuras o tablas, las cuales deberán estar dibujadas sobre papel albanene con tinta china o presentarse como fotografías en blanco y negro sobre papel brillante, cuya localización deberá estar señalada en el texto. La limitación en el número de figuras, de tablas y de referencias, obliga a los autores a que se seleccionen aquellas que sean realmente importantes e informativas. Las figuras se deberán numerar con arábigos y las tablas con romanos. Las leyendas y los pies de figuras se deberán adicionar en una hoja aparte. Se deberá considerar que las figuras y las tablas se reducirán de tamaño, aproximadamente a la mitad o a un cuarto de las dimensiones de una hoja carta, las letras y números más pequeños no deben ser menores a los dos milímetros.

5) Se deberá evitar hasta donde sea posible los pies de página. Las abreviaturas poco comunes que se utilicen en el texto deberán enlistarse en la primera página.

II. OTRAS COMUNICACIONES

- El tema de las otras comunicaciones puede ser muy variado; desde resúmenes de artículos interesantes, relevantes o significativos, información de tipo general, avisos de reuniones académicas y cursos, bolsa de trabajo, etc.
- El contenido deberá ser desarrollado en forma resumida y de una manera explícita.
- 3) El trabajo deberá enviarse igual que como se especifica en el inciso I-1.
- 4) Se aceptarán un máximo de dos referencias incluidas entre paréntesis en el texto. En casos de que se juzgue necesario se podrá incluir una figura o una tabla.

Los manuscritos serán leídos por dos revisores, uno de ellos familiarizado con el tema y el otro ajeno al mismo. Las correcciones y sugerencias así como las pruebas de página se comunicarán al primer autor.

Los discos y las dos copias de los manuscritos se deberán enviar al Boletín de Educación Bioquímica, Apdo Postal 70-281, México 04510, DF, o bien a través del corresponsal del BEB en su localidad.