



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

**"CONTROL DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL DE
ALFALFA (Medicago sativa) EN STRESS SALINO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

RAFAEL E. QUINTANAR ZUÑIGA

LOS REYES IZTACALA, MEXICO

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE
BIOQUIMICA DE LA UNIDAD DE MORFOLOGIA Y FUNCION DE LA ENEPI,
BAJO LA DIRECCION DEL M. EN C. SERGIO GONZALEZ MORENO.

AGRADECIMIENTOS:

*Gracias a las personas que me han brindado su ayuda,
de manera especial a Sergio G., Sergio V., Ramón M.
Roberto V., Martín V. y Josefina V.; cuya capacidad
y calidad humana es bien reconocida... al menos por
ellos.*

DEDICATORIA:

*Con cariño y respeto para Roberto y Mariana,
que me enseñaron a apreciar la vida, señalando las
rutas pero cediendo el timón.*

*A Marcial: hermano, "...Dios y mi canto,
saben a quien nombro tanto..."*

"...QUE LA CIENCIA ES BRUTAL
Y QUE NO SUEÑA,
ESO LO AFIRMA EL ASNO
QUE LA ENSEÑA..."

(ALMAFUERTE, poeta argentino).

"JUSTAMENTE CUANDO SABIA TODAS LAS
RESPUESTAS DE LA VIDA, CAMBIARON TODAS
LAS PREGUNTAS".

(?)

I N D I C E

<i>ABREVIATURAS</i>	1
<i>RESUMEN</i>	2
<i>INTRODUCCION</i>	3
<i>ANTECEDENTES</i>	6
<i>OBJETIVOS</i>	18
<i>MATERIALES Y METODOS</i>	19
<i>RESULTADOS</i>	23
<i>DISCUSION</i>	32
<i>CONCLUSIONES</i>	36
<i>REFERENCIAS</i>	37

A B R E V I A T U R A S

ADP ADENOSIN-DIFOSFATO.

ATP ADENOSIN-TRIFOSFATO.

BSA ALBUMINA DE SUERO BOVINO.

C_i COEFICIENTE DE CONTROL DE FLUJO.

EDTA ETILENDINITROTETRACETATO DISODICO.

PVP POLIVINIL POLIPIRROLIDONA INSOLUBLE.

Π POTENCIAL OSMOTICO.

RESUMEN: Desde el descubrimiento de las enzimas como reguladores metabólicos se ha progresado notablemente en el estudio de los procesos de regulación celular, y diversas investigaciones relacionadas con células animales y los datos obtenidos de ellas se han integrado una Nueva Teoría de Control, que permite evaluar de manera cuantitativa el grado de influencia de un paso enzimático sobre el flujo total de una vía determinada. Esto puede ser de utilidad para relacionar los procesos de adaptación a nivel bioquímico que ocurren en la célula vegetal al enfrentar situaciones de stress, como la salinidad en el medio de crecimiento.

En el presente trabajo, primero en utilizar el enfoque experimental de la Nueva Teoría en mitocondrias de plantas superiores, se investigó el control de la respiración de plántulas de alfalfa crecidas en stress salino, con el fin de evaluar posibles cambios en el grado de influencia de las enzimas involucradas en esta vía. Los resultados muestran un notable incremento en la influencia de la ATP sintetasa y el acarreador ADP/ATP en mitocondrias de las plantas salinizadas, lo que sugiere una posible relación entre el proceso de síntesis mitocondrial de ATP y los mecanismos de adecuación de la planta a la salinidad.

INTRODUCCION:

El estudio de la regulación celular involucra numerosos aspectos y ha sido abordado desde muy diversos enfoques, constituyendo una de las principales áreas de investigación bioquímica.

Desde el descubrimiento de las enzimas y de sus propiedades reguladoras se han alcanzado avances notables en la comprensión del metabolismo celular y de los mecanismos de regulación más generales.

El funcionamiento celular está determinado por una compleja red de interacciones entre las distintas vías metabólicas que la integran, ordenadas y dirigidas para mantener la estabilidad celular. Los datos originados en las diferentes investigaciones sobre regulación han dado lugar a la proposición de una Nueva Teoría de Control (10, 11, 13, 14, 18), en la que en sus postulados esenciales se expresa que el control de una vía metabólica es compartido por cada una de las enzimas que la integran. Además, se propone un fundamento teórico mediante el cual puede evaluarse la importancia relativa de cada enzima participante, a través de los *Coefficientes de Control de Flujo* (Ci's). La utilidad de los Ci's radica en que permiten evaluar de manera objetiva los cambios en el grado de influencia de las

enzimas en el control de una vía cuando un sistema biológico se enfrenta a distintas condiciones ambientales.

De manera particular, el stress salino constituye un factor limitante del funcionamiento celular. De hecho, varias enzimas modifican su actividad por efecto de alta concentración de sales (10, 20). Los Ci's pueden ser útiles en los estudios relacionados con el stress salino en plantas, contribuyendo al entendimiento de los procesos adaptativos que ocurren a nivel bioquímico bajo tales circunstancias.

En este trabajo, se pretende utilizar los fundamentos de la Nueva Teoría de Control investigando el control de la respiración de mitocondrias de alfalfa (*Medicago sativa*), aisladas de plántulas crecidas en stress salino, con el fin de evaluar posibles cambios en el grado de influencia de las enzimas que integran esta vía.

El enfoque metodológico ha sido usado con anterioridad (10, 17) en el análisis de la cadena respiratoria en mitocondrias de rata, pero en plantas no había sido aplicado.

Este trabajo constituye el primer intento de aplicar los criterios de la Nueva Teoría de Control en plantas en relación al problema del stress salino; es factible que tales criterios puedan emplearse para entender mejor los cambios en la actividad metabólica de la célula vegetal al enfrentar el stress salino y

que los Ci's puedan convertirse en una herramienta metodológica para profundizar en los mecanismos bioquímicos de adaptación en las plantas.

ANTECEDENTES:

La Nueva Teoría de Control:

A excepción de unos pocos casos en los que las reacciones son catalizadas por iones metálicos u otros factores, el control metabólico se realiza a nivel de la actividad enzimática y la actividad hormonal. La célula modula la actividad metabólica mediante ciertos mecanismos en forma tal que los cambios producidos en una o dos enzimas repercuten en el flujo total de una vía determinada.

Se ha llamado "enzima reguladora" a aquella que es capaz de ejercer un control significativo en la vía y cuyas propiedades son controladas por factores diferentes a la concentración de sustratos y productos (18).

Se han propuestos diversos criterios experimentales para definir qué enzimas determinan el flujo total de una vía dada. Ellos incluyen la identificación de reacciones alejadas del equilibrio, la determinación de las capacidades enzimáticas relativas y la identificación y análisis de enzimas alostéricas (19). Sin embargo, los criterios experimentales que se han seguido no establecen como podrían las enzimas controlar el flujo metabólico y no aclaran cual es la importancia relativa de cada etapa.

En un intento por resolver estas preguntas y mejorar los criterios previos empleados con anterioridad, Kacser y Burns (14) y Heinrich y Rappoport (11) desarrollaron de manera independiente una teoría cuantitativa de control cuyo postulado principal establece que el control del flujo total de una vía es compartido por todas las enzimas que participan en ella. Este nuevo enfoque se opone a la idea generalizada de la "enzima reguladora" única y proporciona una medida cuantitativa de la importancia relativa de cada enzima que contribuye en la dinámica de una vía metabólica.

Los fundamentos establecidos por estos autores y las sucesivas modificaciones y contribuciones constituyeron la Nueva Teoría de Control Metabólico (10, 11, 13, 14) que ha permitido un estudio más objetivo de la regulación enzimática.

En esta teoría se introdujo el concepto de *Coefficiente de Control de Flujo*, para indicar el grado de influencia de una enzima en una ruta metabólica particular en forma más precisa que en planteamientos previos.

El Coeficiente de Control de Flujo (C_i) se expresa matemáticamente así:

$$C_i = - \frac{E_i}{F} \frac{dF}{dE_i}$$

donde E_i es la actividad de la enzima y F la magnitud de flujo a través de la vía (18). Si se gráfica la intensidad de flujo v.s.

la concentración de enzima activa, el C_i puede calcularse a partir de la pendiente inicial de la curva obtenida multiplicada por el factor escalar E_1/F .

El C_i puede tomar cualquier valor entre cero y uno; así, una enzima cuyo C_i se aproxime a "1" se considera más importante en la regulación del flujo metabólico que otra con un C_i cercano a "0".

En 1982, Grøen y colaboradores utilizaron el concepto del Coeficiente de Control y lo aplicaron a una vía específica: la fosforilación oxidativa en mitocondrias de hígado de rata (10). Utilizando inhibidores específicos para cada enzima de la vía para variar la concentración de enzima activa, obtuvieron los C_i 's correspondientes encontrando que las enzimas más importantes en el control de la fosforilación oxidativa son la translocasa de adenín-nucleótidos, el acarreador de dicarboxilatos y la citocromo oxidasa, con un C_i de 0.33, 0.33 y 0.20 respectivamente.

Debido a la relativa facilidad técnica que brinda el uso de inhibidores específicos para modificar la concentración de enzima activa, este método se ha usado también en otros estudios sobre el control de la fosforilación y la arsenilación oxidativas (17, 18) en mitocondrias aisladas de tejidos de rata.

Efectos de la salinidad en plantas:

Los estudios sobre los efectos fisiológicos y bioquímicos de la salinidad en plantas son importantes por dos razones fundamentales:

- a) práctica: para tratar de prevenir daños a las cosechas, tales como la reducción de la talla y la merma en productividad, y
- b) científica: porque el conocimiento de la naturaleza del daño por salinidad y de las adaptaciones para la tolerancia a las sales proporcionan un mejor entendimiento de diversos fenómenos básicos, tales como la flexibilidad de los mecanismos de control y sus interrelaciones, o la distribución de la energía generada en los procesos metabólicos (20).

De acuerdo a estas razones, se han realizado investigaciones que han aportado numerosos datos sobre los efectos de la salinidad en plantas y las respuestas de estas al stress salino (9, 20).

La tolerancia a las sales varía ampliamente en los vegetales. Existen plantas que pueden completar sus ciclo vital en sustratos altamente salinos (más de 500 mM), mientras que otras sólo pueden desarrollarse bien por debajo de concentraciones de 50 mM.

Aunque existen categorías intermedias, de manera general se clasifica a las plantas en halófitas y no halófitas, para indicar resistencia o sensibilidad a las sales, respectivamente.

Desde la antigüedad, es un hecho conocido que las plantas de uso agrícola o los árboles de importancia comercial disminuyen su talla o su productividad cuando crecen en suelos salinos. Esta reducción puede ser causada por disturbios en el balance hídrico o por disminución de la energía requerida para el metabolismo involucrado en el crecimiento o por ambos procesos. Los disturbios pueden resultar ya sea de dificultades en la captación y el transporte de agua o por efectos tóxicos causados por el exceso de iones minerales en los tejidos.

Dada la compleja interrelación de estos factores, es difícil distinguir entre déficit hídrico y los efectos directos de los iones minerales, y por el momento sólo es posible especular entre las dos opciones. Más aún, se desconoce en que tejido ocurre el efecto principal (20).

Sin embargo, existe clara evidencia de que altas concentraciones de Na^+ y/o Cl^- reducen el crecimiento en algunas especies. En aguacate, frijol, soya y vid, la producción disminuye notablemente a concentraciones tan bajas tales como 5-10 mM como para suponer un efecto de bajo potencial hídrico.

Después de crecer durante 14 días en NaCl 10 mM ($\Pi = 0.43$ bar),

el peso seco total de plantas de 24 días fue 40% más bajo que los controles sin NaCl (20).

Por otra parte, ensayos con enzimas aisladas han mostrado que la actividad enzimática específica disminuye cuando son expuestas a cantidades crecientes de NaCl (20). Sin embargo, enzimas aisladas de plantas halófitas son tan sensibles a los efectos del NaCl como aquellas aisladas de no halófitas. *Suaeda maritima*, una halófita, crece óptimamente en sustratos salinos de hasta 500 mM, pero muchas de sus enzimas son sustancialmente inhibidas a concentraciones de 170 mM de NaCl (20).

Efectos sobre la respiración y fosforilación oxidativa:

En varias especies de plantas el NaCl estimula el consumo de oxígeno. El término "respiración por sal" (salt respiration) se ha utilizado para designar este aumento en la velocidad de respiración de plantas cuando se incrementa la salinidad en el medio de crecimiento.

En plantas de chícharo se observó un aumento en la velocidad de respiración de tejido foliar y de mitocondrias aisladas (16). Secciones foliares de distintas plantas de cultivo mostraron aumento en el consumo de oxígeno al ser tratadas con NaCl. Sin embargo, los reportes sobre los efectos de la salinidad sobre la respiración son contradictorios: en raíces de chícharo,

Porathy y Poljakoff encontraron inhibición progresiva del consumo de oxígeno al incrementarse la concentración de NaCl y en plantas de algodón el consumo de oxígeno decrece al exponerlas a NaCl (20). De cualquier manera, es un hecho que la salinidad afecta la fosforilación oxidativa y la razón ATP/ADP en plantas: la exposición de mitocondrias de raíces y de raíces enteras de pera a NaCl induce el desarrollo de algún agente degradante de ATP, aunque las mitocondrias estén adecuadamente acopladas y con un alto control respiratorio (20).

Una de las explicaciones para el crecimiento reducido causado por la salinidad puede ser la desviación de la energía que proviene de la respiración de la respiración hacia procesos distintos del crecimiento. Tales procesos se les ha considerado como acciones de "mantenimiento" de la planta, y la fracción relevante dedicada a ellos se ha denominado "respiración para mantenimiento". Entre estos procesos, puede incluirse el transporte de iones para expulsarlos de la planta o para compartamentalizarlos en vacuola o cloroplastos o la síntesis de solutos orgánicos en citoplasma (10, 20).

Parece, por tanto, que la salinidad puede tener un efecto dual sobre el mecanismo respiratorio de una planta:

a) puede interferir con las vías metabólicas normales alterando las propiedades de algunas enzimas y reduciendo así la

carga de energía de los procesos biológicos usuales.

b) puede causar una desviación de la energía de los procesos metabólicos normales y de los procesos de crecimiento para mantener necesidades tales como la síntesis de osmóticos o la compartimentalización o cualquier otro mecanismo de tolerancia.

Respuestas de las plantas a la salinidad:

El exceso de iones implica un serio problema para el desarrollo óptimo de la planta. Los mecanismos de tolerancia a el stress salino incluyen:

- a) Control de la absorción iónica.
- b) Compartimentalización iónica.
- c) Síntesis de solutos orgánicos.

a) Control de la absorción iónica.

La selectividad inherente de las membranas celulares posibilita la absorción diferencial de las sustancias del medio externo al interior celular. A través de la absorción controlada de iones y el transporte de la raíz o de las hojas al tallo algunas plantas pueden impedir el exceso de iones en el citoplasma (9). Asimismo, los iones pueden expulsarse del tallo a través de glándulas salinas y el exporte al floema. En plantas de alfalfa se ha reportado expulsión de sales a través de las hojas (15).

b) Compartimentalización de iones.

Este proceso es característico de plantas halófilas, las cuales generan turgencia manteniendo una alta concentración interna de Na^+ y Cl^- . Se ha sugerido que estos altos niveles pueden ser tolerados por la planta porque las concentraciones de Na^+ y Cl^- son relativamente bajas en el citoplasma comparadas con las de la vacuola al mismo tiempo que solutos orgánicos contribuyen al potencial osmótico del citoplasma (9).

c) Síntesis de solutos orgánicos.

En las plantas la síntesis de solutos orgánicos neutros (glicina, betaina, prolina, sacarosa) puede impedir el déficit hídrico. De acuerdo a las características estructurales de la célula, este proceso puede ser muy costoso para la economía celular, pues puede involucrar una gran proporción de fotosintatos. Algunas células poseen vacuolas que ocupan el 95% del volumen celular; la cantidad de hexosa necesaria para balancear un incremento de 100 mM de NaCl podría llegar hasta 20-30% del total del peso seco para células con grandes vacuolas, comparadas, comparadas con un 3-7% para células sin tales vacuolas (20).

Respiración y transporte de iones:

Se ha postulado la existencia de dos entidades para el transporte de iones a través de las membranas celulares (1, 21). En una gran variedad de plantas la velocidad de absorción de iones se ha caracterizado por la existencia de dos respuestas cinéticas sobre un amplio margen de concentraciones, con un mecanismo que opera debajo de 1 mM y un segundo mecanismo operando en un rango de 1 mM a 50 mM (21). Al mecanismo de baja concentración se le ha denominado *Mecanismo 1* y al de alta concentración *Mecanismo 2*. El mecanismo 1 se caracteriza por una alta afinidad y especificidad por K^+ ; el mecanismo 2 muestra baja afinidad por K^+ y alta afinidad por Na^+ a concentraciones elevadas.

La relación entre la "respiración estimulada por sal" y el mecanismo dual de transporte de iones fue investigada por Lüttge y colaboradores (21). Estudiando la captación de iones y la respiración de discos de zanahoria sobre un amplio rango de concentraciones, encontraron que la respiración se estimulaba más en el rango del mecanismo 2, y cuando la respiración era totalmente desacoplada no había cambios en la actividad respiratoria en función de incrementos en la concentración de sal. Concluyeron que el transporte de sal no está directamente

relacionado con el flujo electrónico de la cadena respiratoria si no que está relacionado indirectamente a través del consumo de ATP o de intermediarios de alta energía durante el transporte de sal.

En otro trabajo, se estudió la absorción de K^+ , Na^+ y Cl^- por discos de betabel (21) en función del tiempo y antimetabolitos, manteniendo la concentración de iones en 0.5 mM (el rango del mecanismo 1). Relacionando los niveles de ATP con los flujos de iones y estudiando el efecto de varios antimetabolitos, se concluyó que en betabel el transporte por el mecanismo 1 depende del transporte electrónico y no de la utilización de ATP o de intermediarios de alta energía.

Otros investigadores compararon el efecto del dinitrofenol (DNP, un desacoplante de la fosforilación oxidativa) con el efecto de condiciones anaeróbicas, en los rangos de concentración de los mecanismos 1 y 2. Encontraron que el DNP tenía efectos más notables que la anaerobiosis sobre la captación de iones por ambos mecanismos. Concluyeron que la energía utilizada en forma de ATP en el transporte para los dos mecanismos no era significativamente diferente ni en origen ni en cantidad (21).

La ubicación de los mecanismos 1 y 2 aun no ha sido establecida, y tampoco se ha aclarado concluyentemente la causa de la "respiración estimulada por sal"; sin embargo.

es posible que este fenómeno esté involucrado con mecanismos de ajuste al stress, donde la energía producida se desvía de los procesos normales de funcionamiento. Esto podría ser una explicación de la reducción en el crecimiento y/o de la productividad de plantas en medios salinos.

La implicación del ATP en el transporte de iones, junto con la existencia de distintas ATPasas en tejidos vegetales, ha propiciado numerosas investigaciones para establecer la correlación entre la síntesis de ATP y el transporte de iones. Se ha caracterizado una ATPasa estimulada por iones monovalentes en raíces de avena, y la actividad de la enzima está positivamente correlacionada con el transporte de K^+ . En otros estudios se localizó una ATPasa en *Avicennia nitida*, Jacq, cuya actividad es dependiente de la proporción Na^+/K^+ y de la concentración total de ambos cationes (4,6).

A medida que se profundice en los aspectos bioquímicos del transporte iónico, se podrá avanzar en el entendimiento del funcionamiento de la planta en un medio salino, donde el control del ambiente iónico e hídrico interno se enfrenta a una dura prueba.

OBJETIVOS:

A) Objetivo general:

Evaluar posibles cambios en los coeficientes de control de flujo de las enzimas participantes en la respiración y la fosforilación oxidativa de mitocondrias de alfalfa, aisladas de plántulas expuestas a una alta concentración de NaCl (75 mM) en el medio de crecimiento.

B) Objetivos particulares. -

1. Probar la aplicabilidad del enfoque de la Nueva Teoría en el análisis de la cadena respiratoria en plantas.
2. Probar la utilidad de los Coeficientes de Control de Flujo como herramienta para un mejor entendimiento de los procesos bioquímicos de adaptación a la salinidad.

MATERIALES Y METODOS:

Para realizar esta investigación se realizaron diversos pasos experimentales, los cuales se muestran en la fig. 1.

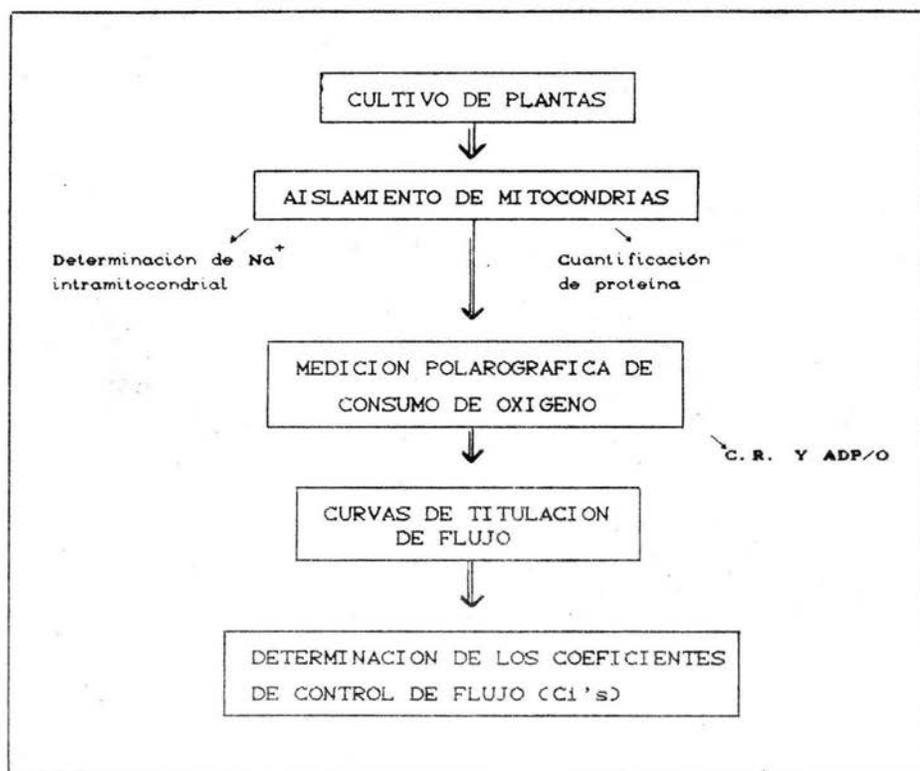


Fig. 1. Secuencia de pasos metodológicos.

Cultivo de plántulas:

Se cultivaron plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*, var. Moapa) mediante un sistema hidropónico: se construyeron bastidores rectangulares de 30 x 25 cm con malla de plástico de 2 mm de abertura. Sobre cada bastidor se colocaron 30 g de semillas previamente desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio al 4%. Los bastidores se colocaron en una cámara de germinación con goteo continuo durante 72 hrs. Los bastidores con las plántulas se transfirieron a charolas de plástico conteniendo 2 litros de solución nutritiva Hoagland (7) para el lote control y 2 litros de Hoagland + NaCl 75mM para el lote salinizado. Las plántulas se dejaron crecer durante 72 hrs. a temperatura de 20 °C en condiciones de obscuridad para evitar la formación de cloroplastos y facilitar el aislamiento de mitocondrias.

Aislamiento de mitocondrias:

Se realizó según el método de Bonner (2) con ligeras modificaciones. Las plántulas se retiraron de los bastidores, se lavaron 3 veces con agua corriente y 2 con agua destilada. Desechando las raíces, se homogeneizaron 70 g de tejido fresco en 130 ml de medio 1 (Manitol 0.3 M; EDTA 2 mM; cisteína 4 mM; BSA 0.1% y PVP insoluble 0.1 % a pH 7.4) durante 7 seg en una

licuadora Moulinex. El extracto se filtró a través de 8 capas de gasa, se ajustó el pH a 7.4 con TRIS y se centrifugó a 1000 g durante 12 min. en una centrifuga Damon IEC-20A. Se desechó la pastilla; el sobrenadante se centrifugó a 9000 g 12 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con Medio 2 (Manitol 0.3 M; EDTA 1 mM ; BSA 0.1%) centrifugando después a 8500 g 10 min. Finalmente, las pastillas se resuspendieron en un volumen total de 1.5 ml de Medio 2, constituyendo la fracción mitocondrial.

- Cuantificación de proteína mitocondrial.- Se siguió el método de Bradford (3).

- Determinación de Na^+ intramitocondrial.- Una vez aisladas las mitocondrias se lisaron agregando agua destilada en vez de Medio 2 y agitando vigorosamente en vórtex 2 min. La medición se realizó en un flamómetro Corning.

Medición polarográfica de consumo de oxígeno:

Se empleó un oxímetro tipo Clark "Gilson" con celda de reacción de 1 ml. El medio de reacción contenía Manitol 0.3 M; KH_2PO_4 10 mM; MgCl_2 5 mM y KCl 10 mM. Se usó succinato 5 mM como sustrato y un sistema glucosa-hexocinasa para regenerar ADP y mantener la concentración inicial en cada trazo (10, 18). Los registros se efectuaron a 25 °C, considerando una concentración

de oxígeno de 235 $\mu\text{m}/\text{ml}$ en la celda .

- Cálculo del cociente respiratorio y la razón ADP/O. - Se calcularon de acuerdo al método de Chance y Williams (5).

Curvas de titulación de flujo:

Se obtuvieron graficando la magnitud de flujo de la vía, es decir, la velocidad de consumo de oxígeno vs. la concentración del inhibidor específico (10, 21).

Determinación de los Coeficientes de Control de Flujo:

Se calcularon utilizando la pendiente inicial del gráfico de titulación junto con los parámetros cinéticos respectivos de acuerdo a la referencia (21) Se muestra a continuación las enzimas evaluadas y los inhibidores utilizados:

ENZIMA	INHIBIDOR
Complejo b-c ₁	antimicina
Acarreador ADP/ATP	carboxiatractilósido
ATP sintetasa	oligomicina
Citocromo oxidasa	cianuro de potasio
Acarreador de fosfatos	n-etilmaleimida
Acarreador de dicarboxilatos	butilmalonato

Cuadro 1. Pasos enzimáticos de la respiración a los que se calcularon Ci's.

Los inhibidores específicos se utilizaron para variar la cantidad de enzima activa (10).

RESULTADOS:

Velocidad de respiración:

La velocidad de respiración fue prácticamente la misma tanto en lote control como en el salinizado (Cuadro 2), lo que se contrapone a reportes previos en los que se observó "respiración por sal" (12, 16, 20, 21).

		PL. CONTROL	PL. SALINIZADAS
VELOCIDAD DE CONSUMO DE OXIGENO (η moles $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	ST 4	41.0 \pm 4.0	44.0 \pm 5.0
	ST 3	107.0 \pm 5.0	99.0 \pm 5.0
RELACION ADP/O		1.39 \pm 0.06	1.50 \pm 0.08
COCIENTE RESPIRATORIO		2.62 \pm 0.14	2.26 \pm 0.13

Cuadro 2. Velocidad de respiración, relación ADP/O y cociente respiratorio de mitocondrias de alfalfa.

Los valores mostrados fueron calculados de acuerdo a la ref (5) a partir de los datos de 5 experimentos. El aislamiento de mitocondrias y la medición polarográfica se describen en Materiales y Métodos.

La relación ADP/O tiende a 2, lo que era lo esperado dado que los electrones provenientes del succinato pasan sólo por dos de los tres sitios de fosforilación. El grado de acople de las

mitocondrias de ambos lotes es aceptable (cociente respiratorio entre 2.62 y 2.26) aunque menor al observado en mitocondrias de rata (5).

Contenido de Na^+ intramitocondrial:

El contenido intramitocondrial de Na^+ fue encontrado similar tanto en mitocondrias de plántulas salinizadas como en las de plantas control (Cuadro 3). Stavarek y Rains (23) reportan acumulación de Na^+ en mitocondrias vegetales, pero no se ha establecido con precisión como influye en la dinámica mitocondrial.

	PL. CONTROL	PL. SALINIZADAS
Na^+ ($\mu\text{moles. mg prot}^{-1}$)	0.26 ± 0.08	0.32 ± 0.08

Cuadro 3. Contenido intramitocondrial de Na^+ en mitocondrias de alfalfa. No hay diferencias significativas entre las mitocondrias control y las salinizadas. Los valores mostrados se obtuvieron de dos experimentos.

Curvas de titulación de flujo:

Se muestran las curvas de titulación de flujo obtenidas para cada una de las enzimas, tanto de mitocondrias de plántulas control como de plántulas salinizadas.

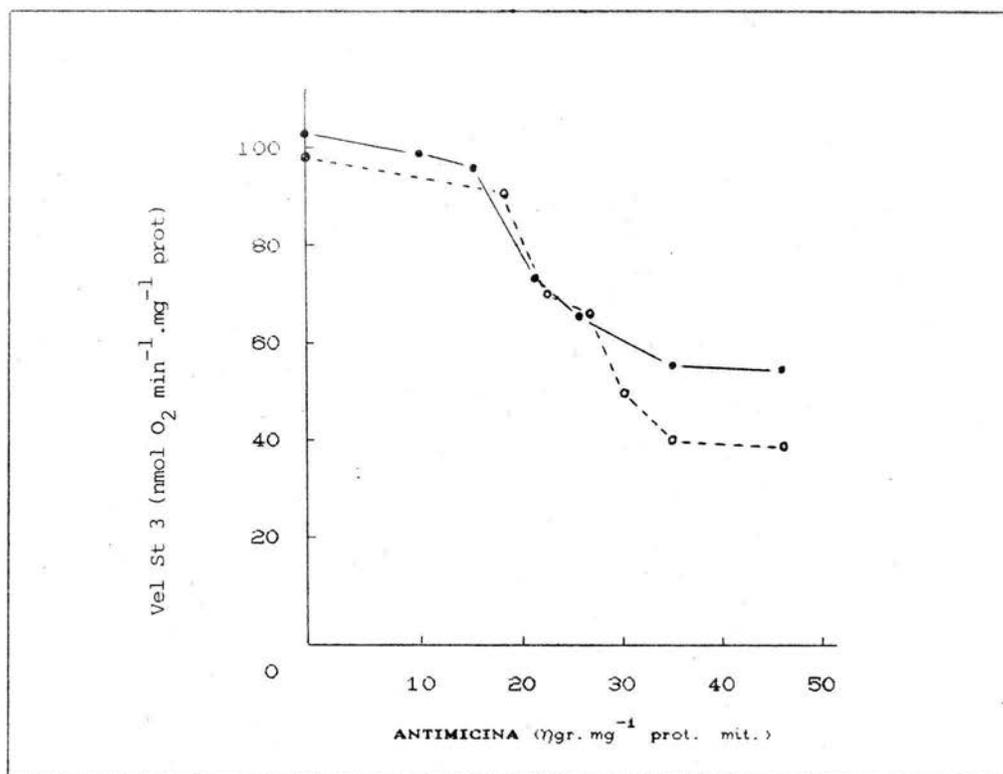


Fig. 2. Curva de titulación de flujo para el complejo $b-c_1$ con antimicina.

(- - - - -) mitocondrias de plántulas control, $C_i = 0.19$

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, $C_i = 0.13$

Los C_i 's fueron calculados según la ref. (10).

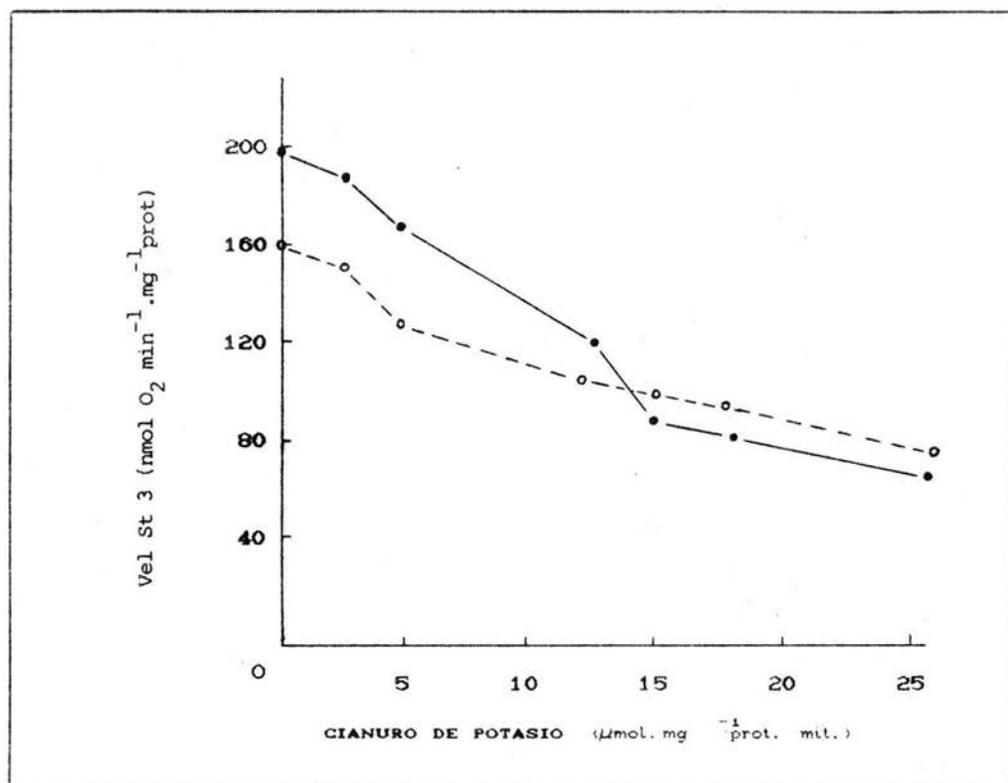


Fig. 3. Curva de titulación de flujo para la citocromo oxidasa con cianuro de potasio.

(- - - -) mitocondrias de plántulas control, Ci = 0.15

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, Ci = 0.13

Los Ci's fueron calculados según la ref. (10).

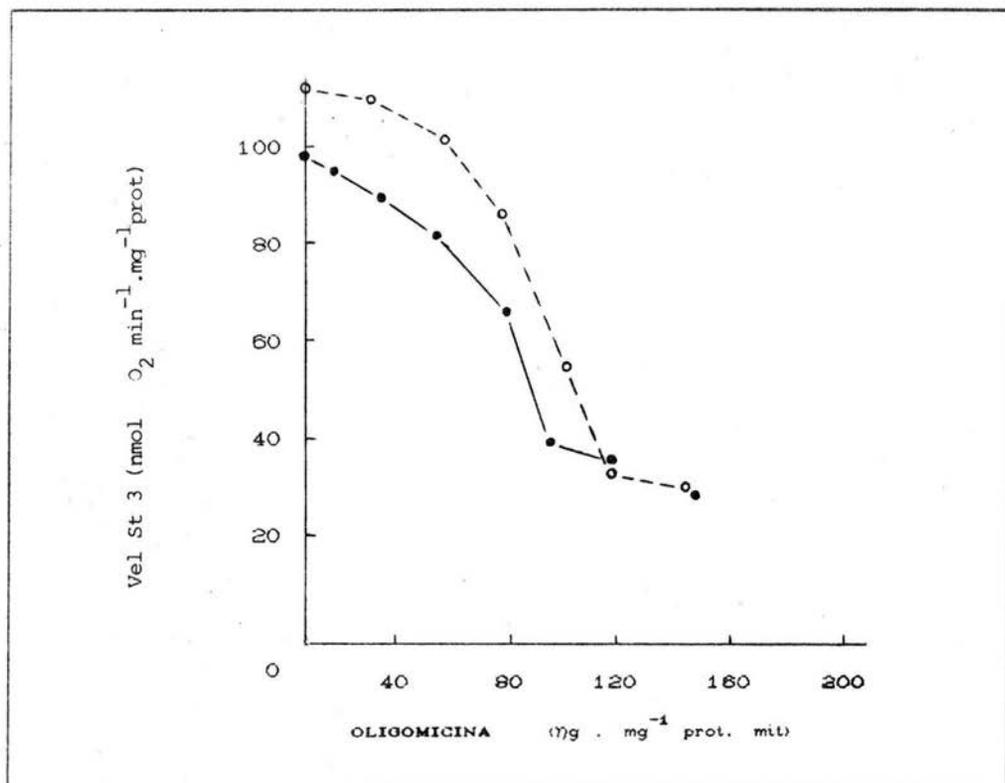


Fig. 4. Curva de titulación de flujo para la ATP sintetasa con oligomícina.

(- - - - -) mitocondrias de plántulas control, $C_i = 0.13$

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, $C_i = 0.31$

Los C_i 's fueron calculados según la ref. (10).

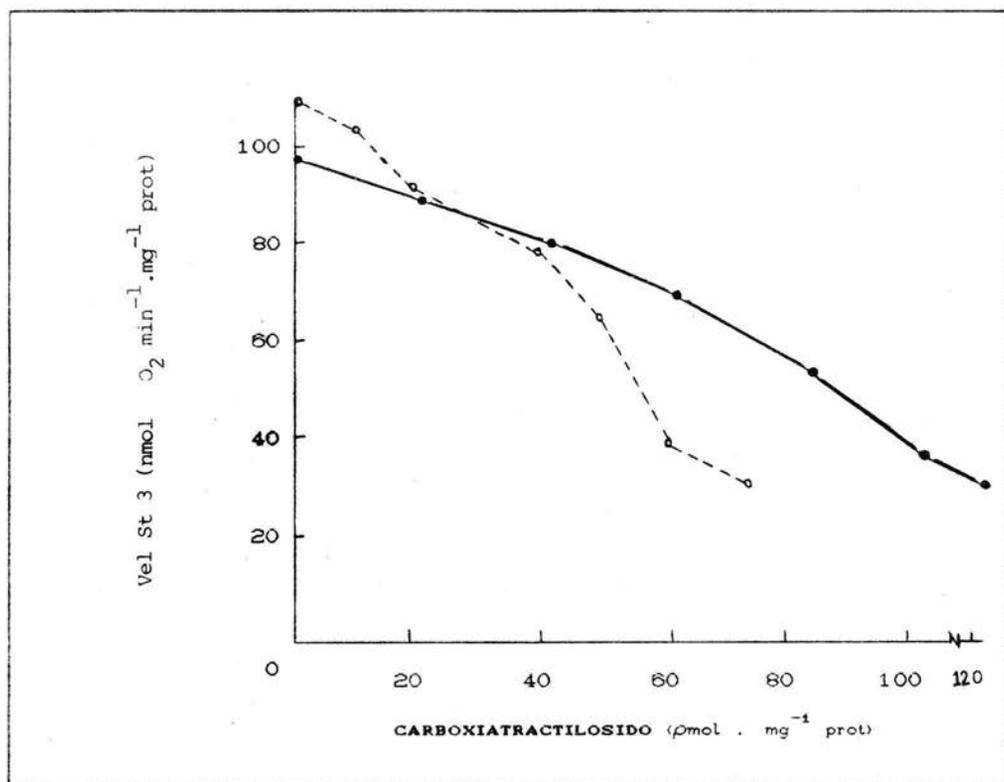


Fig. 5. Curva de titulación de flujo para el acarreador de ADP/ATP con carboxiatractilósido.

(- - - - -) mitocondrias de plántulas control, $C_i = 0.18$

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, $C_i = 0.31$

Los C_i 's fueron calculados según la ref. (10).

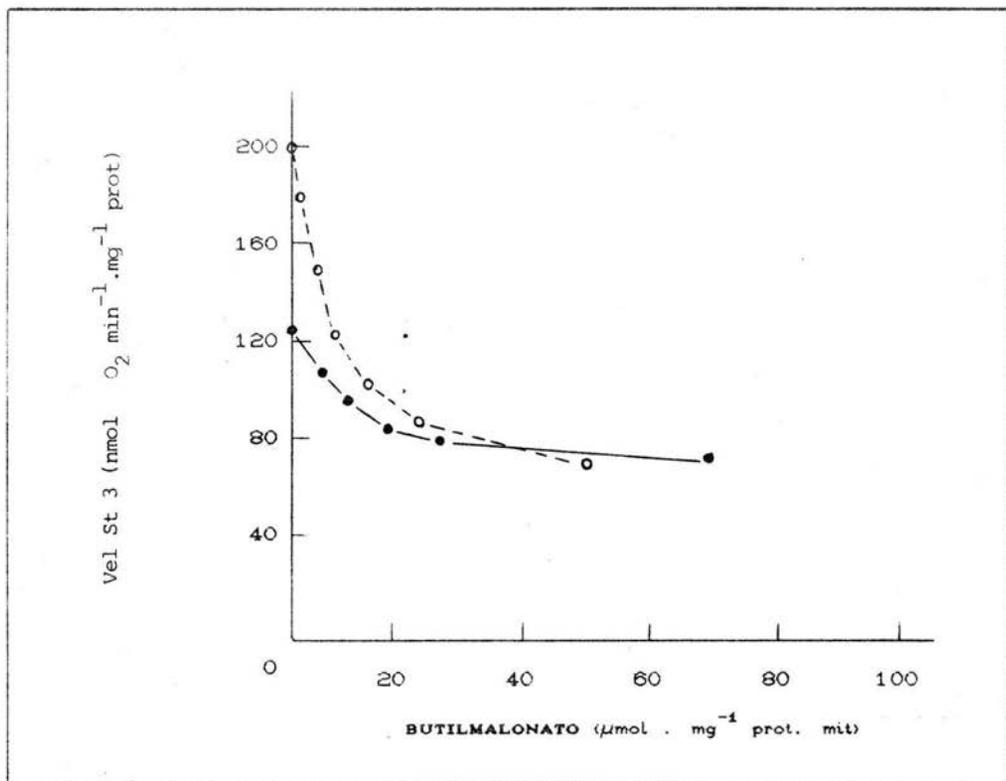


Fig. 6. Curva de titulación de flujo para el acarreador de dicarboxilatos con butilmalonato.

(- - - - -) mitocondrias de plántulas control, $C_i = 0.11$

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, $C_i = 0.03$

Los C_i 's fueron calculados según la ref. (10).

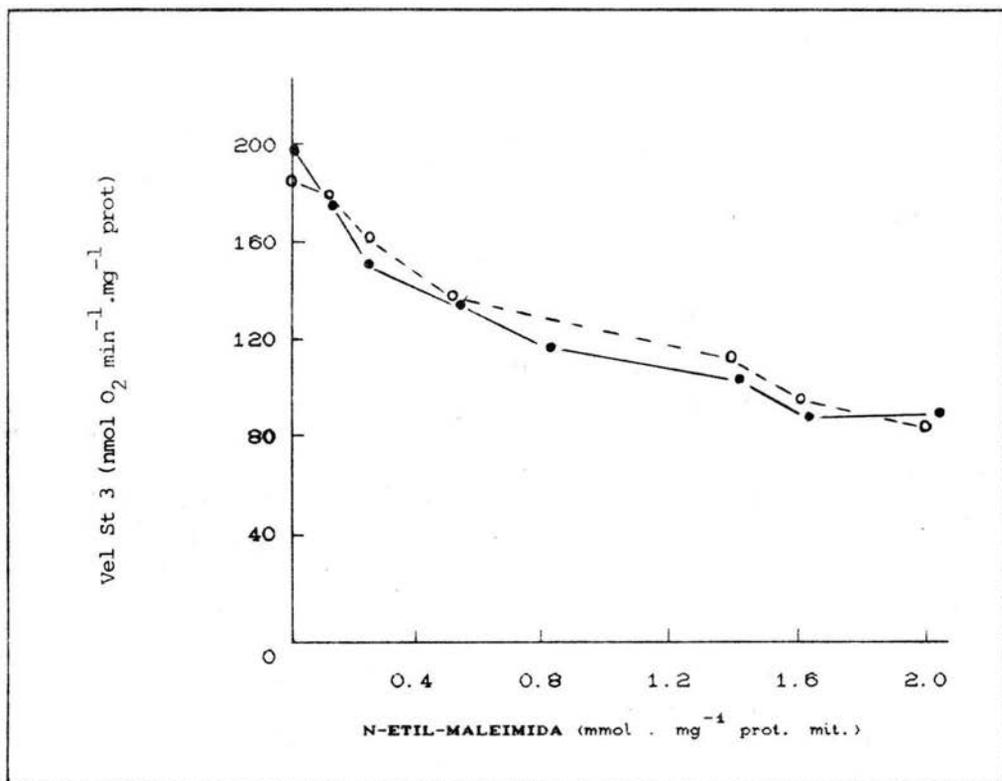


Fig.7. Curva de titulación de flujo para el acarreador de fosfatos con n-etil-maleimida.

(- - - - -) mitocondrias de plántulas control, Ci = 0.04

(———) mitocondrias de pl. salinizadas, Ci = 0.06

Los Ci's fueron calculados según la ref. (10).

Coefficientes de control de flujo:

Los coeficientes de control de flujo evaluados a partir de las curvas de inhibición, son los siguientes:

	PL. CONTROL	PL SALINIZADAS
NADH-CoQ oxidorreductasa	0.00	0.00
Complejo b-c ₁	0.19	0.13
Citocromo oxidasa	0.15	0.13
ATP sintetasa	0.13	0.31
Acarreador de ATP/ADP	0.18	0.31
Acarreador de dicarboxilatos	0.11	0.03
Acarreador de fosfatos	0.04	0.06
TOTAL	0.80	0.97

Cuadro 4. Coeficientes de control de flujo de las enzimas de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa de mitocondrias de alfalfa.

Tal como se apuntó en los antecedentes, una enzima tiene mayor influencia en el control de la vía cuando su C_i tiende a 1; así, las enzimas más importantes son la ATP sintetasa y el acarreador ATP/ADP en las mitocondrias aisladas de plantas salinizadas. Reportes previos (10, 17) también señalan al acarreador de ATP/ADP como etapa importante en la regulación del

flujo de la respiración y la fosforilación oxidativa (en mitocondrias de tejidos de rata), junto con el acarreador de dicarboxilatos y la citocromo oxidasa.

DISCUSION:

Velocidad de respiración:

Reportes previos indican un aumento en la velocidad de respiración en las plantas sometidas a stress salino (12, 20, 21). En contraste, las mitocondrias de plántulas salinizadas de alfalfa no mostraron incremento en la velocidad de respiración. Aunque la respiración estimulada por sal se ha observado en muchas especies, no es un hecho generalizado (20) y parece depender del tipo de planta, su estado de desarrollo y las condiciones del sistema experimental.

Algunos autores sugieren que el aumento de la velocidad de respiración por sal es debido a que la planta necesita un aporte adicional de energía para llevar a cabo "procesos de mantenimiento" o estrategias adaptativas para contrarrestar los efectos del exceso de iones. No obstante al hecho de que no se observó incremento en la velocidad de las plántulas salinizadas, no se puede descartar que ocurrieron modificaciones en la

dinámica de influencia de las enzimas respiratorias, y es precisamente aquí donde los coeficientes de control de flujo pueden ser de utilidad para mostrar la importancia relativa de cada etapa enzimática de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa y las modificaciones que ocurren ante la exposición a un alto nivel de salinidad.

Contenido de Na^+ Intramitocondrial:

Reportes previos indican que en la mitocondria vegetal ocurre acumulación de sodio cuando la planta experimenta stress salino con NaCl (23). En los resultados obtenidos en este trabajo se encontró que las mitocondrias de plántulas salinizadas contenían una cantidad de Na^+ similar a las de plántulas control (Cuadro 3). Sin embargo la fuerza de control de las enzimas de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa se modifica en la condición de salinidad (Cuadro 4). Aunque se han realizado intentos para aclarar la relación entre respiración y el transporte de iones (21) en la célula vegetal, aún no es posible explicar con precisión como podría el Na^+ modificar las propiedades de las enzimas respiratorias.

Coefficientes de control de flujo:

Observando los resultados (Cuadro 4) se encuentra que los cambios más notables en los coeficientes corresponden a la ATP sintetasa y al acarreador de ATP/ADP en las mitocondrias de plántulas salinizadas. La influencia de estas enzimas casi se duplica en la condición de salinidad; esto es interesante debido a la participación de estas enzimas en la producción de energía en forma de ATP. Es probable que el aumento en la influencia de estas dos enzimas esté relacionado con las exigencias energéticas derivadas del stress salino. Una de las explicaciones para el crecimiento reducido en la plantas que crecen en medios salinos es que la energía obtenida en la respiración es desviada de los procesos de crecimiento para utilizarse en mecanismos de "mantenimiento" entre los que se puede incluir la compartamentalización de iones y la síntesis de solutos orgánicos (20). En alfalfa se ha reportado exclusión de Na^+ a través de las hojas (15), como un mecanismo de tolerancia al stress salino; el aumento en la fuerza de control de la ATP sintetasa y del acarreador de ADP/ATP pudiera estar relacionado con la exigencia energética para el transporte y exclusión de iones u otros procesos de mantenimiento. Sin embargo, obviamente se impone la necesidad de realizar estudios adicionales que confirmen o rechacen esta hipótesis.

De cualquier forma, el empleo de los coeficientes de control de flujo permite apreciar en forma directa los cambios en la distribución de la fuerza de control entre las enzimas respiratorias y proporciona datos objetivos del reajuste de la actividad metabólica celular ante las presiones ambientales. Con el apoyo de otros medios experimentales, el empleo de los coeficientes puede ser un método adecuado para entender con mayor claridad lo que ocurre a nivel bioquímico en el interior celular para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio. Esto es importante en los estudios de stress salino, pues a pesar de las múltiples investigaciones sobre los efectos y la tolerancia a la salinidad en los vegetales aun no se sabe con precisión las causas de la reducción de la talla y/o la producción en plantas agrícolas.

En la medida en que se progrese en ese terreno, se podrán implementar procedimientos que permitan enfrentar con éxito el problema de la salinidad en el suelo y aprovechar entonces enormes extensiones territoriales para el cultivo generando mayor producción de alimentos para la población humana.

CONCLUSIONES:

1. La estimulación de la respiración por salinidad , reportado en varias especies vegetales, no es un hecho generalizado, como lo demuestran los resultados de este estudio.
2. La exposición de plántulas de alfalfa a NaCl 75 mM en el medio de crecimiento da origen a modificaciones en la distribución de la fuerza de control de las enzimas que participan en la respiración y la fosforilación oxidativa .
3. Las enzimas con cambios más notables fueron la ATP sintetasa y el transportador de ADP/ATP, reflejando una estrecha relación de el proceso de síntesis mitocondrial de ATP con las respuestas de la planta al stress salino.
4. Los coeficientes de control de flujo pueden convertirse en un procedimiento metodológico eficaz para contribuir al estudio de los procesos bioquímicos de adaptación al stress, al proveer de una medida directa de la influencia de cada enzima de una vía determinada.

REFERENCIAS:

1. Anderson, P. W. 1972. "Ion transport in the cells of higher plant tissues". Ann. Rev. Plant Physiol. 23:51-72.
2. Bonner, J. 1967. "A general method for the preparation of plant mitochondria". En Methods in Enzymology (Estabrook y Pullman, eds.). Academic Press. Vol IX, cap 10; 126-130.
3. Bradford, M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein" Anal. Biochem. 72:248-258.
4. Braun, Y., Hassidim, M., Lerner, H. y Reinhold, L. 1986. "Studies on H^+ translocating ATPases in Plant of Varying resistance to salinity" I. Plant Physiol. 81:1050-1056.
5. Chance y Williams. 1956. Advances in Enzymology. 17:65-134.

6. Charnock, J., Cook, D. y Casey, R. (1971). "The role of cations and other factors on the apparent energy of activation of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ ". Arch. of Biochem and Biophys. 147:323-329.
7. Dunn, A. y J. Arditti. 1968. "Experimental Physiology". Holt, Rinehart y Winston, New York. p. 265-266.
8. Epstein, E., Rains, D. y Elzam, O. 1963. "Resolution of the dual mechanisms of potassium absorption by barley roots". Proc. Natl. Acad. Sci. 49: 684-692.
9. Greenway, H. y Munns, R. 1980. "Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes". Ann. Rev. Plant Physiol. 31:149-190.
10. Groen, A. et al. 1982. "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration". J. Biol. Chem. 357:2754-2757.
11. Heinrich, R. y Rapoport, S. 1977. "Metabolic regulation and mathematical models". Prog. Biophys. Molec. Biol. 32:1-82.
12. Honda, S. 1965. "The salt respiration and phosphate contents of barley roots". Plant Physiol 31:62-70.

13. Kacser, H. 1983. "The control of enzyme systems in vivo " *Biochem. Soc. Trans.* 11:35-40.
14. Kacser, H. y J, Burns. 1979. "Molecular democracy: who shares the controls? *Biochem. Soc. Trans.* 11:
15. Lauchli, H. "Salt exclusion, an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions". En *Salinity tolerance in Plants*. Staples y Toenniessen, eds. J. Wiley & Sons, New York. p. 171-187.
16. Livne, A. y N. Levin. 1967. "Tissue respiration and mitochondrial oxidation and phosphorylation of NaCl-treated pea seedling". *Plant Physiol* 42:407-414.
17. Moreno, R. 1985. "Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria". *J. Biol. Chem.* 26:12554-12560.
18. Moreno, R. 1985. "Teoría de Control Metabólico". En *Mensaje Bioquímico*, Depto de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM. VIII.

19. Newsholme, A. y C. Start. 1973. "Regulation in Metabolism". J. Wiley and Sons. London. pp 349.
20. Poljakoff, A. 1982. "Biochemical and Physiological responses of higher plants to salinity stress". En Biosaline Research... San Pietro, ed. Plenum, N.Y. pp 245.
21. Rains, W. 1972. "Salt transport by plants in relation to salinity" Ann. Rev. Plant Physiol. 23:367-388.
22. Sacher, F. y Staples, R. 1984. "Chemical microscopy for the study of plants in saline environments". En Salinity tolerance in plants. Staples y Toenniessen, eds. John Wiley & Sons. New York.
p. 17-33.
23. Stavarek, R. y Rains, D. 1984. "Cel culture techniques selection and physiological studies of salt tolerance". En Salinity tolerance in Plants. Staples y Toenniessen eds. John Wiley & Sons, New. York.
24. Wanders, J. et al. 1984. "Factores determining the relative contribution of the adenine nucleotide translocator and the

ADP-regenerating system to the control of the oxidative phosphorylation". *Eur. J. Biochem.* 142:417-424.

25. Williamson, J. y Cooper, R. 1980. "Regulating of Citric Acid Cycle in Mammalian systems" *FEBS Lett.* 117 suppl K73-k85.