

122
201



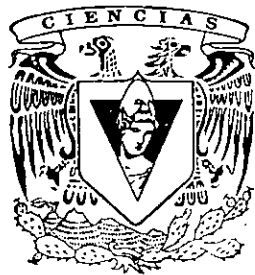
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INMUNODETECCION DE LA ATPasa DE H⁺
DE LA MEMBRANA PLASMATICA EN EJES
EMBRIONARIOS DE MAIZ EN GERMINACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
EURINDIA PATRICIA ORTEGA MACIAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARINA GAVILANES RUIZ
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

1998
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

266235



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Inmunodetección de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en ejes embrionarios de maíz en germinación".

realizado por

Eurindia Patricia Ortega Macías

con número de cuenta 6913172-7, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	Dra. Marina Gavilanes Ruiz. Profesor Titular "B" tiempo completo. Depto. Bioquímica. DEPg. Fac. Química, UNAM.	
Propietario	Dr. Fermín Pacheco Moisés. Profesor de Asignatura. Interino. Nivel "A". Facultad de Ciencias, UNAM	
Propietario	Biol. José Luis Busto Sánchez. Ayudante de Profesor de Asignatura. Nivel "B". Fac. Ciencias, UNAM.	
Suplente	QFB: Martín Bonfil Olivera. Profesor de Asignatura. Nivel "A". Fac. Ciencias UNAM:	
Suplente	Biol. Alfredo Francisco Ayala Ochoa. Profesor de Asignatura. Fac. Nivel "A". Ciencias, UNAM.	

Consejo Departamental de Biología

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Marina Gavilanes Ruiz**, por el invaluable apoyo que me ha brindado no sólo durante la elaboración y dirección de esta tesis, sino en toda mi preparación universitaria, pero sobre todo por su insuperable amistad y comprensión.

A la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** y al **M. en C. Oscar Ricardo García Rubio**, por su valiosa ayuda en la enseñanza de las técnicas en el laboratorio, aportaciones e ideas para la redacción y conformación de esta tesis. Por su valiosa y desinteresada amistad.

A la **Dra. Emma Bertha Gutiérrez Cirlos** y al **Biol. Eddi Arcia**, por la ayuda que me brindaron en el análisis densitométrico de las inmunorrélicas.

A la **Q. F. B. María Consuelo Enríquez Arredondo**, por su ayuda técnica.

A la **Q. Laurel Fabila Ibarra**, por su apoyo técnico.

A los **Proyecto de CONACYT 4836-N9406, 25131-B y IN204097 DGAPA UNAM** que financiaron este trabajo.

Esta tesis se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

**A MI MADRE CATALINA Y SU ESPOSO ALFONSO, POR SUS ENSEÑANZAS,
COMPRENSIÓN Y AMOR QUE SIEMPRE ESTÁN DISPUESTOS A
PROPORCIONAR.**

A MIS HIJOS FERNANDO Y RODRIGO, RAZÓN DE SER DE MI VIDA.

**A MIS HERMANOS: GENY, JAIME, CARLOS, LUCY, LUPITA, ARTURO,
FELIPE Y FRANCISCO.**

**A MIS AMIGOS: MARINA, PATY, LILIS, HORTE, VIC, LUPITA, CARMEN,
YOLA, OLGA, GINA, ARMANDO, CARMEN EUGENIA, MAGGIE MAE, TERE,
LULÚ, MALÚ, EDDY, OSCAR, SOBEIDA, VANESSA, REBECA, ADRIANA Y
MARY.**

OTOÑO DE 1998.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Abreviaturas	VI
Antecedentes	VII
Introducción	1
Hipótesis y Objetivos	27
Materiales Y Métodos	28
Resultados	38
Discusión	58
Conclusiones	63
Perspectivas	64
Bibliografía	66

ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4 cloro-3 indolil fosfato, sal de toluidina
BSA	Albúmina de suero bovino
CTC	Solución de cobre-tartrato-carbonato
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DES	Dietilestilbestrol
DMF	Dimetilformamida
DTE o DTT	Ditioeritritol o Ditiotrietol
E ₁ E ₂	Familia de ATPasas que presentan dos conformaciones en su mecanismo de reacción
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
Na DOC	Desoxicolato de sodio
NBT	Clorhidrato de p-Nitro-azul-tetrazolio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Buffer tris salino
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
TLCK	N-Tosil-Fenil-Alanina-Cloro-Metil Cetona
TPCK	N- α -P-Tosil-Lisina-Cloro-Metil Cetona
TTBS	Buffer tris salino tween-20
TRIS HCl	Solución amortiguadora Tris (hidroximetil) amino metano pH ajustado con HCl
TRIZMA BASE	Tris(hidroximetil)amino metano
UA	Unidades Arbitrarias

ANTECEDENTES

El primer reporte sobre la existencia de una ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de las células vegetales (48), apareció hace 20 años, a partir de ese momento se ha generado una gran cantidad de información relativa a la caracterización molecular de esta enzima aislada en diferentes tejidos vegetales en sus diferentes etapas de desarrollo (6). Se tienen datos sobre la localización de esta enzima a partir de estudios con anticuerpos, además de reconocer su participación en la hidrólisis y síntesis de ATP, así como de algunas de sus funciones tales como la elongación y nutrición celular, apertura de los estomas y control osmótico. Uno de los procesos donde todo esto puede evidenciarse es la germinación de las semillas (6).

La germinación se inicia con la entrada de agua a las semillas y termina cuando protruye la radícula, lo cual implica una gran actividad metabólica, por lo que cabe preguntarse ¿en qué momento aparece la ATPasa de la membrana plasmática?, ¿hay residuos de actividad enzimática de la semilla en formación?, ¿cambian los niveles de actividad enzimática en las primeras horas de la germinación de las semillas?. Estas son algunas preguntas que se han planteado en nuestro laboratorio y para responder a ellas se han realizado estudios sobre la presencia y actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en embriones de maíz en germinación (6).

La proteína específica (ATPasa) se encontró presente en fracciones microsomales de embriones de maíz sin embeber y posteriormente se detectó un aumento de ATPasa a las dos horas de imbibición, para después disminuir y

mantenerse constante hasta las 7 h de imbibición (35, 49). Un patrón similar se obtuvo en vesículas de membrana plasmática de los embriones embebidos a diferentes tiempos (50).

En este marco general surge el interés por estudiar cuál es la contribución de los ejes embrionarios en este perfil de proteína, tanto en la fracción microsomal como en la de homogenados. En este último porque podría existir la posibilidad de que hubiera ATPasa que no estuviera insertada en la membrana, ya sea por el procedimiento para obtener los microsomas o por la rehidratación de los ejes embrionarios. De lo anterior se derivan la hipótesis y los objetivos del presente estudio.

INMUNODETECCIÓN DE LA ATPASA DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ EN GERMINACIÓN.

INTRODUCCIÓN.

I. Características generales de la semilla. La semilla representa la estructura que facilita la dispersión y preservación de la mayoría de las espermatofitas, ya que contiene potencialmente una planta con las estructuras y la información para realizar los procesos fisiológicos necesarios para crecer y desarrollarse hasta su establecimiento autotrófico para posteriormente transformarse en planta adulta.

Es la unidad dispersora por excelencia de las plantas, ya que puede mantenerse viva casi deshidratada, con un contenido de agua menor del 10% de su peso total. En estas condiciones, sus organelos celulares permanecen desorganizados e inactivos. Tal estado de quiescencia permite a las semillas resistir las adversidades del medio y sólo activarse cuando el ambiente es propicio para el desarrollo del vegetal (3).

En las angiospermas la semilla se deriva del óvulo fertilizado y se forma dentro de los frutos, en cambio en las gimnospermas lo hace en la superficie superior de las escamas de los conos o estróbilos. La semilla es importante no solo biológica, sino también económicamente, por ser una fuente de alimento para diversos organismos incluido el ser humano. Su tamaño, textura y color varían de una especie a otra (10).

La semilla consta de la cubierta o testa, que se origina de los tegumentos del óvulo, y el embrión, proveniente de la oosfera fecundada. La testa es una cubierta con cierto grado de impermeabilidad tanto al agua como a los gases, por presentar una cutícula externa o interna cerosa o lipídica, con una o más capas de células protectoras o sustancias mucilaginosas importantes para la retención de agua, así como para la dispersión misma de la semilla. Esto ejerce una influencia reguladora en el metabolismo y el crecimiento de la semilla (9).

El embrión puede acompañarse (o no) del endospermo, tejido en donde se almacenan fuentes de alimento, tal es el caso de las gramíneas. Está caracterizado por la presencia de una capa externa, la aleurona. Las semillas que no la presentan generalmente tienen otras estructuras con la misma función, por ejemplo los cotiledones, en las leguminosas, y el perispermo en el café (el perispermo en la mayoría de las semillas es un tejido rudimentario).

El embrión también tiene un eje corto, con una o dos hojas pegadas (los cotiledones); arriba del eje se encuentra el epicotilo o plúmula y por debajo del cotiledón se encuentra el hipocotilo (zona intermedia entre el tallo y la raíz), que se prolonga hacia la base formando la radícula, raíz primaria de la plántula (10). Estas estructuras son fácilmente reconocibles en las dicotiledóneas, pero en las monocotiledóneas, el cotiledón se ha transformado en el escutelo.

El embrión del maíz presenta una organización básica, semejante a la de otras semillas, aunque tiene algunas particularidades, por ejemplo su eje embrionario tiene un epí y un hipocotiledón, y el embrión en posición lateral sólo

tiene un cotiledón o escutelo, característica que lo ubica dentro de las monocotiledóneas (figura 1), funciona como un escudo entre el eje y el endospermo. La plúmula es pequeña y está envuelta por una vaina, el coleoptilo. La raíz embrionaria o radícula también está protegida por una vaina, la coleorriza. La radícula emerge primero y le sigue el coleoptilo. El cotiledón o escutelo aunque es carnoso, no actúa como reserva, sino como una estructura digestiva y absorbente que transfiere nutrientes desde el endospermo al embrión (3).

Existen unos cuantos casos en los que las semillas no presentan reserva alimenticia, por ejemplo el caso de las especies de Orquidaceae, en las cuales la germinación y el crecimiento dependen de las asociaciones que se establecen con hongos saprofitos. (3).

Las reservas alimenticias que poseen las semillas incluyen lípidos, proteínas y carbohidratos, (su proporción varía de una semilla a otra, y las clasifica en harinosas, proteínicas y oleaginosas) (4), además de fosfatos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos (la mezcla insoluble de sales de potasio, magnesio y calcio del ácido mioinositol hexafosfórico (ácido fítico) es la mayor fuente de fosfatos y elementos macronutrientes de las semillas) (3).

II. Germinación de la semilla. La germinación abarca aquellos procesos que se inician con la toma de agua y terminan con la emergencia de la radícula o epicotilo. Todos los eventos subsecuentes están asociados con el crecimiento de la plántula, que ha sido promovido por la capacidad fotosintética de la nueva planta.

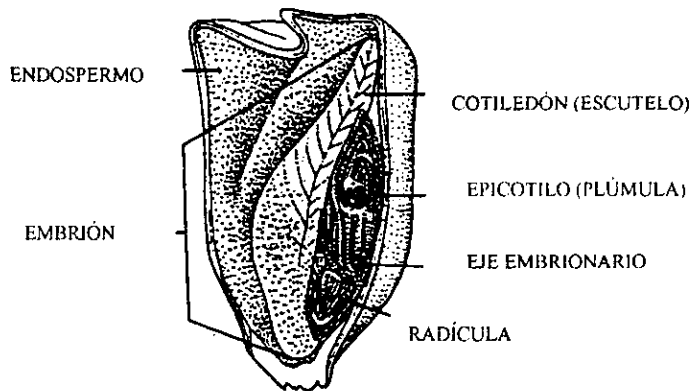


Figura 1. Corte longitudinal de una semilla de maíz (39).

Paralelamente a la toma de agua, la semilla requiere de un aporte de oxígeno y de una temperatura adecuados para llevar a cabo el proceso de germinación. Si aún cumpliéndose estos requisitos la semilla no germina, puede ser que se encuentre en período de latencia o bien no sea viable (21).

Sustentado por la movilización de alimentos, el crecimiento de la plántula germinada continúa hasta que la plúmula emerge de la tierra y se establece, siguiendo su desarrollo por la vía autotrófica y completando el ciclo vital de la planta. (3).

1. Toma de Agua. El agua es imprescindible para que la semilla al rehidratarse pueda germinar. En este proceso de rehidratación o toma de agua de las semillas influyen varios factores, tales como el tamaño de la semilla, la naturaleza de los componentes de reserva, la cantidad de mucílago, el tipo de testa, la humedad relativa del medio, etcétera. Las semillas en proceso de

imbibición llegan a aumentar de dos a tres veces su peso inicial y una vez establecida la plántula, los requerimientos de agua son mucho mayores (3).

Durante la toma de agua de las semillas es necesario considerar el contenido inicial de agua de la semilla así como el del sustrato, pues de ello dependerá el flujo de agua del medio hacia la semilla. Generalmente la difusión del agua va de un potencial alto hacia uno bajo y se ve afectada por el potencial osmótico, el potencial hídrico, la presión de turgencia y la capacidad de hidratación de los componentes celulares. También la fuerza con la cual el agua se adhiere al sustrato y el trabajo que realiza la semilla para removerla son importantes en su rehidratación (21).

La diferencia entre el potencial hídrico de la semilla y el del sustrato es uno de los factores que determinan el flujo de agua del medio hacia la semilla. Al inicio de la imbibición la diferencia del potencial hídrico es considerable, pero a medida que la semilla va tomando agua, el potencial hídrico de ésta crece y el del medio disminuye. De este movimiento de agua ambiente-semilla, depende el éxito de la germinación, determinado por el potencial hídrico de las zonas aledañas a la semilla en proceso de imbibición, así como de la conductividad hídrica del sustrato y del área de contacto entre la semilla y el sustrato. En general, las semillas pequeñas con cubierta delgada germinan más rápidamente que las grandes con cubierta gruesa, esto refuerza la importancia de la superficie de contacto semilla-sustrato en el proceso de germinación. En las semillas grandes como las del género Vicia, la pérdida de agua es considerable debido a la mayor

superficie de contacto entre la semilla y el sustrato (mayor superficie de evaporación) (17).

Generalmente, la distancia a la cual fluye el agua del suelo a la semilla no excede los 10 mm, por lo que la toma de agua depende del contenido de agua del sustrato que le rodea. Cuando éste aumenta, también la toma de agua y la velocidad de la germinación aumentan, siguiendo un patrón específico de acuerdo con la especie. Solo algunas especies como el trigo germinan en suelos con un bajo porcentaje de humedad relativa.

Si bien la germinación de semillas embebidas en condiciones de laboratorio (en cajas de Petri con una o dos capas de papel filtro y agua destilada), está más favorecida que la que ocurre directamente en el suelo, requiere una cantidad óptima de agua, de lo contrario si es menor se incrementan las impedancias interna y externa, y si es excesiva se obstaculiza la adecuada difusión de oxígeno dentro de las semillas, teniendo como resultado en ambos casos un bajo porcentaje de germinación (3).

2. Cinética de la toma de agua de las semillas. Normalmente el potencial de agua de una semilla seca es considerablemente más bajo que el de los alrededores del sustrato y por lo tanto el agua se desplaza del suelo a la semilla debido a que tiene un elevado potencial de sus componentes, conocido como potencial mátrico (Ψ_m). Cuando las semillas inician la toma de agua ejercen una fuerte presión de turgencia y duplican su tamaño (período de imbibición). Después, las fuerzas de turgencia decrecen repentinamente y el

potencial de agua se incrementa. Finalmente, a medida que las semillas absorben más agua, el potencial de agua baja, y la semilla germina. El potencial ejercido por la raíz después de su emergencia es probablemente más alto (21).

Estudios con semillas de chícharo han demostrado que se forma una barrera húmeda cuando el agua permea la semilla y que hay un abrupto límite del contenido de agua entre las células humedecidas y aquellas por humedecer. El promedio de contenido de agua del área húmeda se incrementa en función del tiempo. Este patrón inicial parece ser común a la mayoría de las semillas y está caracterizado por tres eventos: 1) una zona que separa porciones húmedas y secas de la semilla; 2) turgencia continua a medida que el agua penetra nuevas regiones; 3) un incremento en el contenido de agua de las áreas húmedas (3).

Generalmente la toma de agua no sucede de igual manera en todas las zonas de la semilla. Sin embargo, en condiciones de laboratorio las semillas exhiben un patrón de absorción de agua en tres fases (figura 2). La fase I, inicial o de imbibición es consecuencia de las fuerzas mátricas de las paredes y de los contenidos celulares de las semillas. La imbibición sucede independientemente de que la semilla se encuentre en periodo de latencia, viable o muerta. La fase I es muy rápida en el escaso tejido radicular, sin embargo muchos eventos metabólicos se desencadenan poco después de la rehidratación de enzimas y sus sustratos (9).

La segunda fase es un periodo lento de toma de agua, cuando el potencial de agua mátrico es alto respecto del potencial osmótico o de soluto. Tanto las

semillas latentes como las muertas mantienen este patrón de hidratación típico de la fase II, pero obviamente estas últimas no entran a la fase III de germinación, iniciada por la protrusión de la radícula. Los procesos metabólicos más importantes suceden en la fase II, en donde se ha observado que empieza a ocurrir, por ejemplo, la síntesis de proteínas, la reparación de DNA y la respiración celular. El incremento de la toma de agua en la fase III se asocia con los decrementos del potencial de agua y el potencial del soluto, debidos a la hidrólisis de reservas posteriores a la germinación. La fase III se asocia únicamente con la germinación y consecuente crecimiento de la plántula. Se incluyen en ella la actividad metabólica y la movilización de reservas (3).

La duración de las fases depende de las características de cada especie (talla, contenidos de reserva, tipo de testa, toma de oxígeno, etcétera), así como de las condiciones ambientales durante la exposición de las semillas al agua (niveles de humedad, temperatura, tipo de sustrato, etc.) (9). Cada parte de la semilla pasa por estas fases en diferente rango de tiempo, por ejemplo los embriones y los ejes embrionarios pueden iniciar la elongación antes de que las reservas sean completamente hidratadas.

El inicio de la toma de agua se caracteriza por la liberación de una apreciable cantidad de gases y por la rápida pérdida de sustancias como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. En condiciones naturales estas sustancias pueden estimular el crecimiento de hongos patógenos del suelo (por

ejemplo, los exudados del frijol *Phaseolus vulgaris* estimulan la proliferación de clamidosporas de *Fusarium* (3).

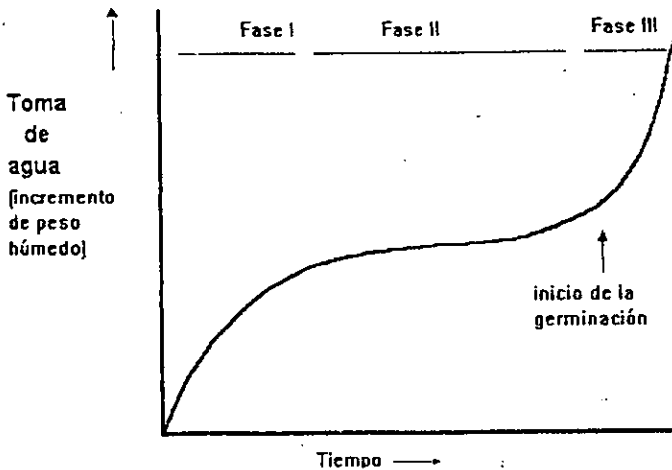


Figura 2. Cinética de toma de agua (3)

Cuando las semillas son expuestas a cambios continuos de imbibición-secado-imbibición, también pierden una gran cantidad de solutos. Esto se acentúa si estos ciclos se inician con semillas secas; pero no si se utilizan semillas maduras que permanecen húmedas, en las que la pérdida de solutos es mucho menor. Estas observaciones sugieren que las membranas selectivamente permeables del tonoplasto y del plasmalema pierden su integridad durante el secado y por lo tanto pierden su función de barreras de retención cuando las semillas son rehidratadas.

También al eliminar la testa se provoca una pérdida de solutos, disminución en el crecimiento de la plántula y de la radícula. Todo esto parece indicar que la cubierta de la semilla regula la toma de agua, al actuar como barrera para la difusión, y su ausencia puede causar daños irreversibles por la pérdida de solutos en la mayoría de sus células, con adversos efectos en el proceso de germinación y el crecimiento posterior de la plántula.

La temperatura es uno de los factores del ambiente con mayor importancia en los procesos de imbibición, germinación y crecimiento. Por ejemplo en un intervalo de 3 a 15 °C, se produce una reducción del crecimiento y desarrollo posteriores. A bajas temperaturas también se pierden aminoácidos y nucleótidos.

Si bien la mayoría de las semillas sufren daños a baja temperatura, existen algunas cuyo proceso de germinación se alcanza sólo con un tratamiento previo de enfriamiento, el cual interrumpe el periodo de latencia (3).

Todavía se tienen muchas dudas acerca del control de la germinación, así como sobre los eventos que son indispensables para ella. Se parte del hecho ya mencionado de que la germinación termina con la protrusión de la radícula, sea ésta por elongación celular, con o sin mitosis. La toma de agua es un requisito para este proceso. Sin embargo, se cree que la expansión de la radícula o del hipocotilo produce crecimiento de otros órganos, especialmente los coleóptilos, lo cual supondría un aflojamiento de las paredes celulares como componente crítico. Se sugiere que ello se debe a la liberación de iones hidrógeno. Los protones son liberados al interior de la pared, probablemente en intercambio con cationes,

provocando una acidificación que rompe los puentes de hidrógeno entre las cadenas de carbohidratos de la pared celular. Al hacerse más elástica la pared, se permite la elongación celular (11, 13).

El control del crecimiento y la extrusión de iones hidrógeno en coleoptilos y tallos, parece estar estimulado por auxinas, y podría estar influenciado por otras sustancias tales como la fusicoccina fúngica. Ante estas sustancias, la tasa de crecimiento de los tejidos vegetales es mayor y se estimula la liberación de iones hidrógeno, que no sólo acidifican las paredes celulares, sino que además modifican el pH del medio. La fusicoccina también incrementa la germinación al mismo tiempo que acidifica el ambiente circundante. Esto sugiere que la emergencia de la radícula es estimulada por la acidificación, como se mencionó anteriormente y plantea la posibilidad de que la extrusión de los protones sea el prelude para la germinación evidente, continuando la síntesis de proteínas (probablemente de enzimas o componentes esenciales de la pared celular). También se sabe que es necesaria la respiración para la expansión celular en tallos y coleoptilos. Lo anterior corrobora que el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos y el proceso de respiración son procesos que anteceden a la emergencia de la radícula (12).

Aún cuando se sabe que el crecimiento celular en los tejidos vegetales generalmente está regulado por hormonas, específicamente auxinas y giberelinas, no se conoce a fondo el papel que éstas juegan en la emergencia de

la radícula, pero la aplicación de estos reguladores del crecimiento en las semillas produce su germinación.

La toma de agua , el incremento de la respiración y otros eventos bioquímicos que culminan con el crecimiento del embrión y el desarrollo de plántula, ponen de manifiesto que la semilla no está latente, pero que los primeros signos visibles y cuantificables de la germinación son la elongación celular y el incremento en el peso húmedo de la radícula (14).

III. La membrana plasmática

1. Estructura. Todos los seres están protegidos por una cubierta que sirve como aislante del medio, como protección y para evitar la pérdida de materiales, tanto a nivel macro como microscópico. En las células esta frontera es la membrana plasmática (16).

La membrana es una barrera activa pues además de proteger, permite el intercambio de moléculas entre el medio interno y el exterior (16).

La membrana plasmática o plasmalema en las células de las plantas, al igual que en otros organismos, cumple varias funciones: contener el interior de la célula, transportar solutos dentro y fuera de ella, detectar los cambios ambientales (22) y marcar los límites de las células entre sí; además están rodeadas por una pared celular (23), segregada y mantenida por el protoplasto (4) y cuyo componente estructural predominante es la celulosa, le siguen algunos componentes pécticos, hemicelulosas, lignina, suberina y cutina, que forman capas de microfibrillas, que adquieren una apariencia final de cubierta laminada

fuerte y porosa sobre la membrana, que envuelve y protege a la célula dándole firmeza, pero restringiendo su movilidad.

La membrana plasmática es vital para la integridad de la célula. Tiene una compleja estructura semipermeable que impide el intercambio de algunos materiales con el medio y permite el paso de otros mediante ciertas proteínas (23). (figura 3).

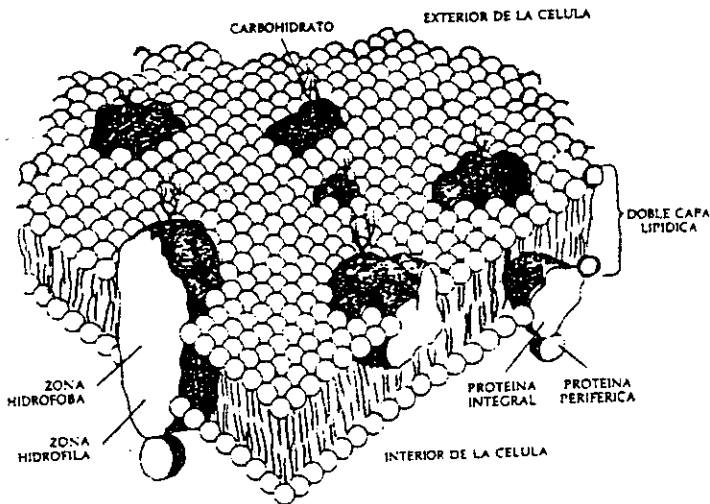


Figura 3. Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática. (17).

La membrana es asimétrica. La composición de las capas de lípidos es diferente en una y otra cara, lo mismo que las proteínas asociadas a ellas. Sólo una de las capas presenta glicoproteínas y glicolípidos (17). Esto se ha podido

detectar por técnicas avanzadas tales como la fractura por congelación o criofractura y el marcaje, con lo cual es posible revelar la topografía de la superficie interior hidrófoba e hidrofílica de las dos caras expuestas de la membrana. Para detectar glucoproteínas se utilizan lectinas o ligantes, un tipo especial de proteínas vegetales, por ejemplo concavalina y ferritina (23).

La membrana tiene componentes adicionales en la superficie, los glicolípidos y las glucoproteínas. Estas últimas forman una capa llamada glucocálix, la cual parece ser medular en el reconocimiento celular, así como en los procesos de desarrollo embrionario y en la respuesta inmunitaria.

La fina membrana plasmática es por tanto una estructura delicada pero muy compleja, cuyos componentes lipídicos, proteínas y carbohidratos, cumplen papeles precisos en las funciones membranales: barrera, transporte y reconocimiento.

La membrana es selectivamente permeable al transporte de solutos (16). El rechazo o admisión de moléculas depende de su tamaño, polaridad y carga eléctrica. Por ejemplo, las apolares pequeñas como O_2 y N_2 y las polares sin carga y pequeñas como el agua, CO_2 , glicerol y urea pasan rápidamente. Las mayores como la glucosa y sacarosa lo hacen con dificultad, pero se transportan pasivamente por procesos de difusión, flujo dependiente masa/volumen, ósmosis y difusión facilitada. Todas ellas utilizan fuentes externas de energía libre, particularmente de tipo químico; en otros casos se requiere de grandes porciones

de membrana para la entrada y salida de sustancias a través de la formación y fusión de vacuolas. Pero las partículas cargadas como los iones de Na^+ , K^+ y Ca^{+2} , normalmente son rechazadas y para atravesar la membrana requieren de un impulso activo por parte de la célula, con gasto de energía (ATP), mediante canales, bombas membranales (proteínas acarreadoras o transportadores secundarios) y bombas primarias (2, 8). Cada tipo de membrana tiene proteínas particulares dependiendo del papel fisiológico que desempeña.

2. Proteínas de la membrana plasmática. Los mecanismos de transporte implican la participación de proteínas intrínsecas de la membrana, las cuales interactúan con las sustancias por transportar de manera semejante al modelo de enzima- sustrato (4). Estos sistemas proteicos de transporte se conocen como acarreadores y canales según su obtención de energía y velocidad de transportación (22, 41).

Se han propuesto los modelos de simporte, antiporte y uniporte para el transporte de solutos a través de la membrana (4).

Estas proteínas globulares con canales permiten el paso de sustancias solubles en agua, uniéndose a los fosfolípidos a través de sus aminoácidos estructurales, que interactúan con las cabezas polares o con los ácidos grasos apolares; a través de criofractura, se ha podido comprobar que pueden adquirir tres conformaciones espaciales: 1) proteínas transmembranales, atraviesan la membrana, su región intermedia es hidrofóbica, pero sus extremos de la superficie en ambas caras de la membrana son hidrofílicas; 2) proteínas

periféricas, son más pequeñas, y se encuentran parcialmente embebidas en la bicapa lipídica interactuando a través de enlaces iónicos y 3) proteínas superficiales, son cien por ciento hidrofílicas, no penetran en la región hidrofóbica (17).

Las proteínas membranales, dentro de las cuales destacan las ATPasas, cumplen otras funciones celulares como la interacción hormonal, el reconocimiento de células de la misma especie, además del acarreo de sustancias y la actividad enzimática en la membrana (40).

3. ATPasas de la membrana plasmática

El transporte de sustancias a través de la membrana puede o no requerir de energía. Esto depende de la concentración de solutos entre las fases separadas por la membrana y de la dirección de flujo del soluto. Si éste se mueve de una zona de baja concentración a otra de mayor concentración, se requiere invertir energía, la cual se obtiene por la hidrólisis del ATP, que a su vez se produce por el acoplamiento energético de las reacciones realizadas por las ATPasas de la membrana plasmática o bombas primarias cuyo bombeo de iones provoca un desbalance eléctrico y/o de pH, mismo que utilizan las proteínas acarreadoras de transporte secundario (15, 42).

Debido a la característica de las ATPasas de catalizar la síntesis e hidrólisis del ATP se les clasifica en ATPsintetasas y ATPhidrolasas. Las primeras son aquellas que aprovechan el $\Delta\mu H^+$ que generan las moléculas que transfieren H^+ y electrones durante la fotofosforilación y fosforilación oxidativa para la síntesis

de ATP en cloroplastos y mitocondrias respectivamente (24). Las ATPasas del segundo grupo hidrolizan ATP cuya reacción global considera la hidrólisis del fosfato γ y terminal del ATP para generar ADP y ortofosfato lo que a su vez ocasiona la expulsión electrogénica de protones u otros iones (24). Estas enzimas no sólo se presentan en la membrana plasmática, sino también se encuentran embebidas en otros organelos celulares membranosos como mitocondrias, cloroplastos, aparato de Golgi, vacuolas y lisosomas (24, 25).

Las ATPasas se agrupan en tres clases:

1. P (fosforiladas), también conocidas como E_1-E_2 . Se caracterizan por tener un intermediario fosforilado covalente cuya formación es inhibida por vanadato. Tiene una cadena polipeptídica de 100 kDa. Translocan cationes como H^+ , Ca^{+2} , K^+ y Na^+ . Participan en el balance iónico intracelular, la relajación muscular, el reciclado de receptores, el almacenamiento de hormonas, la digestión de nutrientes y la síntesis de ATP.

2. V (vacuolares), normalmente asociadas a los organelos membranosos como mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas (en *Neurospora*), tonoplasto (en plantas), lisosomas y aparato de Golgi. Sólo translocan H^+ . Tienen varias subunidades. Sus funciones de hidrólisis de ATP y translocación de H^+ residen en diferentes polipéptidos. Su peso molecular puede ser superior a los 400kDa.

3. F (F_0F_1), propias de bacterias, cloroplastos y mitocondrias. Son las más complejas debido a que presentan dos subunidades, la F_1 soluble en agua y relacionada con el ciclo de síntesis-hidrólisis del ATP, y la F_0 asociada a la

membrana y a la translocación de H^+ . Su masa molecular oscila alrededor de los 450 kDa. Puede presentar 8 o más cadenas de polipéptidos (15).

Todos los tipos de ATPasas tienen en común un polipéptido α de entre 70 y 100 kDa que posee los sitios de fosforilación y de enlace del ATP (45).

Entre los acarreadores membranales más comunes se encuentra la bomba de intercambio iónico de Na^+/K^+ . Pertenece al grupo de ATPasas tipo P (15, 17). Ésta es la bomba primaria más importante de la membrana plasmática de células animales y consiste en una proteína transmembranal que puede cambiar su conformación (E_1 - E_2) (15) (figura 4).

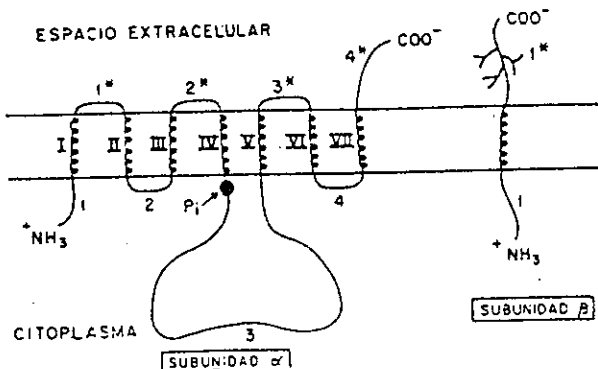


Figura 4. ATPasa de Na^+/K^+ . Modelo de las regiones hidrofílicas y transmembranales de las subunidades α y β de la ATPasa de Na^+/K^+ . La numeración romana indica las hélices α transmembranales; la arábica con una estrella, las regiones hidrofílicas extracelulares y sin estrella, las intracelulares. El punto negro indica el sitio de unión fosforilable durante la catálisis (7).

Los iones de sodio se unen a la proteína, la que interactúa con el ATP y dispara el cambio conformacional, movilizándolo al ión Na^+ al exterior. En una segunda fase los iones K^+ del exterior ocupan su lugar en la proteína, la que pierde un fosfato, provocando un segundo cambio y la transferencia de los iones K^+ al interior de la célula. Por cada ATP hidrolizado se transportan tres Na^+ y dos K^+ (47). Esta ATPasa fue descubierta por Skou en 1957 y se le ha podido identificar en casi todas las membranas plasmáticas de diferentes tejidos y órganos. Posee dos subunidades proteicas membranales α y β , de 100 y 40 kDa respectivamente (7, 3).

Esta enzima requiere tanto de los iones Na^+ como K^+ y Mg^{+2} para llevar a cabo el intercambio iónico (4, 47). Es inhibida por esteroides cardiotónicos como el digital y la oubaína, este último la inhibe sólo si se encuentra fuera de la célula. Mediante el uso de membranas de eritrocitos conocidos como *fantasmas* se ha observado que el movimiento de Na^+ y K^+ es un proceso vectorial de cotransporte antiparalelo, en el cual el Na^+ sale de la célula y el K^+ entra a ella. El sitio de fijación del ATP se encuentra sobre la proteína ubicada en la cara interna de la membrana (3, 47) (figura 5).

En las células vegetales la ATPasa de la membrana plasmática más importante en diferentes procesos metabólicos es la acarreadora de H^+ (43). Esta enzima se ha detectado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, en casi todos los tejidos y etapas de desarrollo de las plantas (2, 8). Su

caracterización molecular data de los años setenta (6, 19, 26). La acción de bombeo de la enzima se ha observado en vesículas de membranas plasmáticas aisladas. Ha sido parcialmente purificada y reconstituida en liposomas (6). También se han encontrado fuertes semejanzas entre las ATPasas de H^+ .

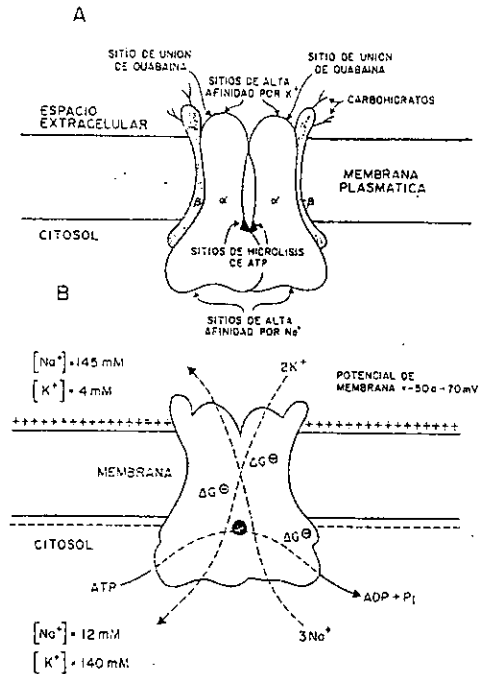


Figura 5. A Modelo del par de dímeros funcionales de la ATPasa de Na^+/K^+ postulados para la unión de los ligantes. B. Vectorialidad energética de las reacciones de transporte de cationes y de hidrólisis del nucleótido respecto a las concentraciones internas y externas de los iones y sus consecuencias en el potencial de membrana (7).

La estructura primaria de las ATPasas de H^+ de la membrana plasmática de células vegetales se dedujo de la secuenciación y clonación de genes aislados de *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Nicotiana plumbaginifolia* (tabaco), *Oriza sativa* (arroz), *Solanum tuberosum* (papa) y maíz (*Zea mays*) (22).

Se conoce que están codificadas por varios genes, lo que implica la existencia de isoformas para la enzima. Las secuencias predicen proteínas de 948 a 957 aminoácidos, según la especie y la isoenzima, lo cual equivale a 100 kDa de peso molecular detectado en geles desnaturalizantes (8). Asimismo, estas secuencias sugieren una estructura secundaria de la proteína de 8 a 12 tramos transmembranales y varias asas hidrofílicas de ambos lados de la membrana. Una de ellas (del lado citoplásmico) es muy grande, contiene aproximadamente 315 aminoácidos (2, 8) (figura 6). En esta última sección se localiza el sitio de hidrólisis del ATP en el residuo de ácido aspártico 329 en la secuencia de *Arabidopsis thaliana*, fosforilable (7,18). A lo largo de ocho segmentos transmembranales pueden encontrarse 52 residuos polares, probablemente relacionados con el transporte de H^+ a través de la membrana. El balance estequiométrico ATP/ H^+ en condiciones de laboratorio es cercano a 1:1 en plantas, en tanto que en algas es de $2H^+/ATP$ (7, 8, 26).

La ATPasa de la membrana plasmática está clasificada en el grupo E_1-E_2 o P de las ATPasas, ya que forma un compuesto intermediario fosforilado covalente durante el ciclo de catálisis (15). Se han identificado los intermediarios E_1 y E_2 , pero falta describir detalladamente las reacciones parciales del ciclo catalítico. Aparentemente se encuentra en la membrana como dímero, pero se desconocen las implicaciones de esta conformación en la acción de la enzima. Su actividad parece estar regulada por auxinas y lípidos membranales (7, 20). Una manera de

modificar la actividad de las enzimas es modificando a la enzima misma, promoviendo la expresión de diferentes isoenzimas (8).

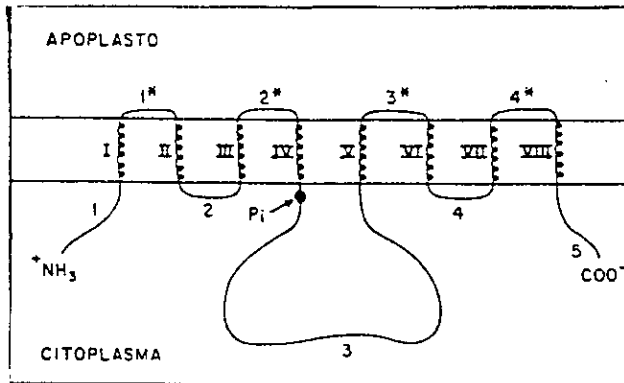


Figura 6. Modelo de las regiones hidrofílicas y transmembrales de la ATPasa de H⁺ (la numeración es la misma de la figura 4) (7).

La enzima funciona a nivel molecular bombeando H⁺ e hidrolizando ATP, su importancia fisiológica como efecto de la degradación del ATP establece gradientes eléctricos ($\Delta\psi$) y de pH (ΔpH). Los gradientes electroquímicos de H⁺ ($\Delta\mu\text{H}^+$) son utilizados por cualquier tipo de célula especializada en el transporte secundario de solutos, la elongación celular y el flujo de iones en las células guardia de los estomas (2, 8) (figura 7)

La fuerza que impulsa este transporte proviene de la ATPasa de H⁺ que actúa como una bomba primaria, la cual al bombear los H⁺ al exterior de la célula

genera el $\Delta\psi$, aumentando la concentración de H^+ en el exterior, lo cual favorece la entrada de H^+ con el sacárido mediante el acarreador.

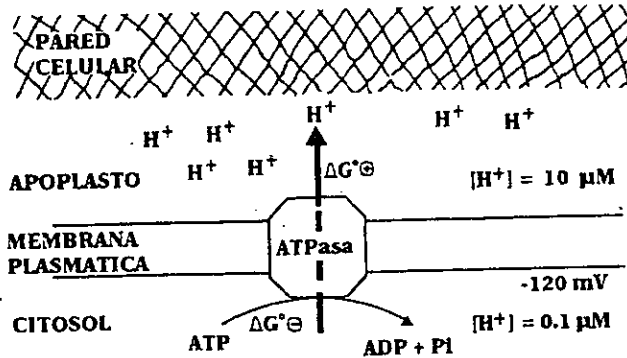


Figura 7. Esquema que presenta la localización de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, las dos reacciones que cataliza, su energética y los gradientes eléctrico y de pH que genera (8).

Recientemente se han clonado los genes de los acarreadores de hexosas y sacarosa en la membrana plasmática de células de betabel (8). En ambos casos se trata de sistemas de simporte sacárido/ H^+ , específicos, electrogénicos y que necesitan de una diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\psi$) o de pH (ΔpH) para operar. También el transporte de aminoácidos para el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales se lleva a cabo por acarreadores de simporte/ H^+ dependientes del pH y de la actividad de la ATPasa como bomba primaria (2), (figura 8).

Las membranas de células de los tejidos del floema del tallo, las raíces, el cilindro central, la epidermis y la punta de la raíz se han encontrado enriquecidos en ATPasa, lo cual sugiere su participación en el transporte transmembranal de nutrientes a través del tejido vascular.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática es muy importante en la fisiología de la célula y es altamente sensible a las variaciones del ambiente que rodean a la planta, por ejemplo los cambios en la concentración del CO_2 , humedad, luz y fitohormonas, provocan la apertura de los estomas. Particularmente para los dos últimos factores se ha observado un aumento en la actividad debido a la gran cantidad de ATPasa que existe en las células guardia (8). Dicha acción produce un eflujo de H^+ dependiente de ATP, lo que hiperpolariza a la membrana plasmática favoreciendo la entrada de K^+ a través de canales específicos. Su incremento facilita la entrada de agua para equilibrar la concentración de solutos dentro y fuera de la célula, ocasionando la turgencia de las células y con ello la apertura de los estomas (8) (figura 9).

En cuanto al transporte de H^+ del citoplasma al espacio apoplástico, este parece estar relacionado con la actividad de la ATPasa de H^+ y con el mecanismo de regulación del pH citoplásmico, que oscila entre 7 y 7.5. Aunque no es todavía muy clara la contribución de la ATPasa en este mecanismo, pues existen otros factores como los ácidos orgánicos, amortiguadores citoplásmicos, antiportes y el bombeo de H^+ que contribuyen a regular la acidificación.

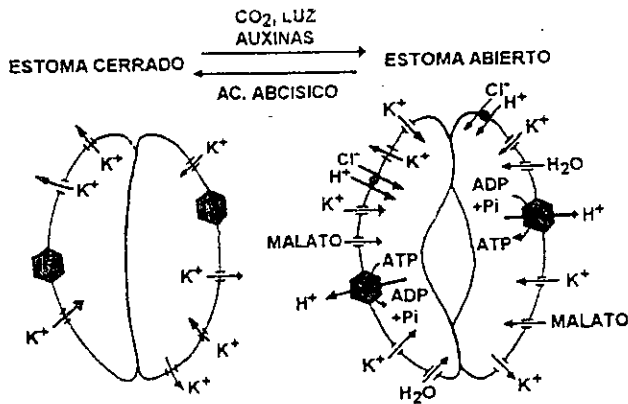


Figura 9. Ilustración de los principales eventos que llevan a la apertura reversible de los estomas (8).

Otros experimentos han puesto de manifiesto que cuando la célula vegetal crece, la pared celular se afloja como consecuencia de la acidificación producida por la actividad de las ATPasas de H⁺ (8).

También se han realizado estudios sobre la posible implicación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la respuesta de las plantas bajo condiciones extremas de alta concentración de sal, baja humedad del suelo y baja temperatura (46).

Actualmente se siguen realizando investigaciones para esclarecer el papel de las ATPasas de H⁺ de la membrana plasmática en el crecimiento, desarrollo, nutrición, acción hormonal y respuesta a patógenos en las plantas superiores (22), así como en reconocer los elementos y explicar los mecanismos de regulación de la enzima, del acoplamiento de las reacciones de hidrólisis del ATP y la del transporte vectorial de H⁺ en el que participa la enzima.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

En los ejes embrionarios sin embeber la cantidad de ATPasa de la membrana plasmática es baja y puede aumentar a medida que transcurre el tiempo de imbibición, debido a que la actividad metabólica general aumenta y la demanda fisiológica de la actividad de esta enzima aumenta.

OBJETIVOS:

1. Seleccionar el periodo de imbibición de ejes embrionarios en el que se estudiarán los niveles de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.
2. Optimizar el procedimiento de detección de la enzima.
3. Determinar la cantidad de ATPasa relativa en preparaciones de homogenados y microsomas obtenidos de los ejes embrionarios embebidos durante los tiempos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

- Semillas. Se utilizaron semillas de maíz híbrido Montecillo 89 lote A6 ° 2, CPS HT-1, almacenadas a 4°C con bolsas de desecante. Los ejes embrionarios se disectaron con navaja cuidadosamente de las semillas secas, eliminando todo el endospermo y escutelo posibles.

- Anticuerpos policlonales de conejo contra ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Estos anticuerpos fueron obtenidos previamente inoculando conejos con un péptido antigénico cuya secuencia fue elaborada con base en las tres secuencias de aminoácidos de las ATPasas de H⁺ de la membrana plasmática de: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana glauca*, y *Lycopersicon esculentum*. El péptido seleccionado consta de 14 aminoácidos (YNKLEEKKESKLLK), y se localiza en la porción amino terminal de la enzima (27).

Ensayos de Germinación y Toma de Agua

- Prueba de Germinación. Las semillas y ejes embrionarios se lavaron durante dos minutos con hipoclorito de sodio al 2% y se enjuagaron con agua bidestilada estéril y bajo condiciones de asepsia. Se sembraron en cajas de Petri sobre una base de papel filtro también esterilizado, y se les añadieron 7 ml de agua bidestilada estéril. Se utilizaron seis cajas de Petri, tres con 20 semillas por caja, y las otras tres con 30 ejes embrionarios cada una. Las seis cajas se colocaron en la incubadora a 29°C y se registró el porcentaje de germinación para los intervalos de 1, 2, 4, 7, 10, 12, 24, 48, 58, 72, 82, 100, 110 y 144 horas. Los

ejes se consideraron germinados cuando la radícula tenía aproximadamente 2 mm de longitud. Las semillas se dieron por germinadas al protruir la radícula 2 mm de la testa.

- Prueba de Toma de Agua. Para medir la toma de agua se prepararon 12 cajas, tanto para las semillas como para los ejes embrionarios, y también se mantuvieron en la incubadora a 29°C durante 1, 2, 4, 7, 10, 12, 24, 48, 58, 72, 82, 100, 110 y 144 horas. Las muestras se pesaron antes de iniciar la prueba, después del tiempo de imbibición y al término del proceso de secado. Con estos datos se calculó el porcentaje de humedad inicial de las semillas y los ejes.

- Proceso de imbibición de ejes embrionarios. Se utilizaron 60 ejes embrionarios para los tiempos de 0, 1, 2, 3, 5 y 7 horas. Se pesaron y colocaron en cajas de Petri con papel filtro y 7 ml de agua bidestilada estéril. Se incubaron a 29°C para los períodos de tiempo estipulados.

Obtención de Membranas Microsomales

En la figura 10 se presenta un esquema de la estrategia experimental seguida en este trabajo. Al cumplirse cada período de imbibición, los ejes se pesaron y se congelaron con N₂ líquido, se molieron en mortero, hasta obtener un polvo fino y éste se colocó en viales que se almacenaron a -70°C por 12 horas.

- Procedimiento para la separación de membranas por centrifugación diferencial. En esta etapa, las muestras de ejes embrionarios molidos se homogeneizaron con un triturador de tejidos a 12 000 rpm durante 4 minutos, en una solución amortiguadora de homogeneización elaborado con 250 mM

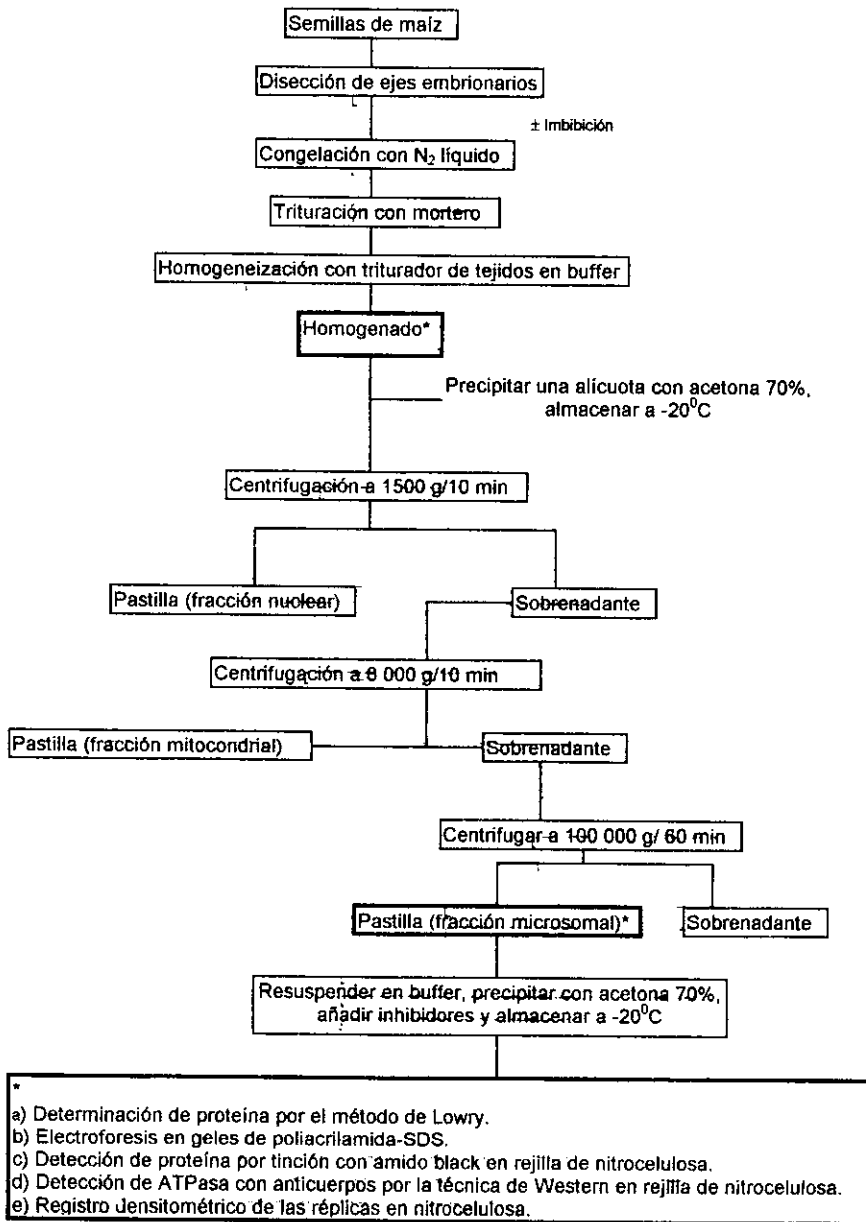


Figura 10. Esquema que ilustra la estrategia experimental utilizada en este trabajo. ...

sacarosa, 70 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM ácido etilendiaminotetracético-NaOH (pH 7), 15 mM β -mercaptoetanol, 4 mM ditioeritritol (DTE), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de quimostatina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *n*-tosil-fenilalanina clorometil cetona (TLCK) y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *n*- α -*p*-tosil-lisina clorometil cetona (TPCK). El homogenado se filtró en cuatro capas de gasa humedecida con agua bidestilada. Del filtrado obtenido se precipitaron inmediatamente 300 μl en acetona fría al 70%, para su posterior utilización en la determinación y separación de proteína por electroforesis en geles desnaturalizantes y en ensayos de inmunodetección. Esta fracción fue denominada *Homogenado*. El resto del filtrado se centrifugó a 1 500 g's por 10 minutos. El sobrenadante obtenido se centrifugó a su vez a 8 000 g's por 10 minutos, se desechó la pastilla y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 100000 g's por 60 minutos. La pastilla obtenida (*fracción microsomal*) se resuspendió en una solución amortiguadora de 250 mM sacarosa, 2 mM BTP-Mes (pH 7), 10% glicerol y 1 ml de DTE, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de quimostatina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TLCK y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TPCK.

La fracción microsomal obtenida para cada tiempo de imbibición se precipitó inmediatamente con acetona fría al 70% y se almacenó a -70°C durante 24 horas. En una tercera y última etapa, las muestras precipitadas se centrifugaron a 13 000 g's por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y la pastilla de cada muestra se colocó bajo la campana de extracción por 30 minutos, con el propósito de eliminar los residuos de acetona. Después las pastillas se resuspendieron en SDS 5% y se almacenaron en viales a -20°C , hasta llevar a

cabo las pruebas de determinación y separación de proteína, en geles de poliacrilamida-SDS y los ensayos de inmunodetección.

Determinación de proteína

• Las muestras precipitadas con acetona y centrifugadas (homogenado y fracción microsomal) se les determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado por Peterson (29), cuyo principio es la reacción de los grupos aromáticos de las proteínas con el cobre II, en combinación con la reacción de los grupos amino del reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu), para formar un complejo azul que es leído en el espectrofotómetro a 750 nm.

Los tubos se prepararon con 0.9 ml de agua bidestilada, 0.1 ml de Na DOC 0.15 % (Desoxicolato de sodio, 1.0 ml de reactivo "A" (mezcla hecha con carbonato tartrato de cobre, CTC, dodecil sulfato de sodio, SDS, hidróxido de sodio, NaOH y agua bidestilada en iguales proporciones), 0.5 ml de reactivo "B" (Folin-Ciocalteu / agua bidestilada 1:5), 2 μ l de las muestras de homogenados y 5 μ l para las de fracción microsomal (tres repeticiones por cada muestra); también se hizo la curva estándar con BSA (5 a 100 μ g) y blancos preparados con SDS 5%. La curva patrón se muestra en la figura 11.

Una vez hechas las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente, para después hacer las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro.

Para calcular la concentración de proteína de las muestras de homogenados y microsomas, se restaron los valores de absorbencia de los

blancos a los de las muestras y se interpolaron de acuerdo con los datos obtenidos con la curva patrón (figura 11):

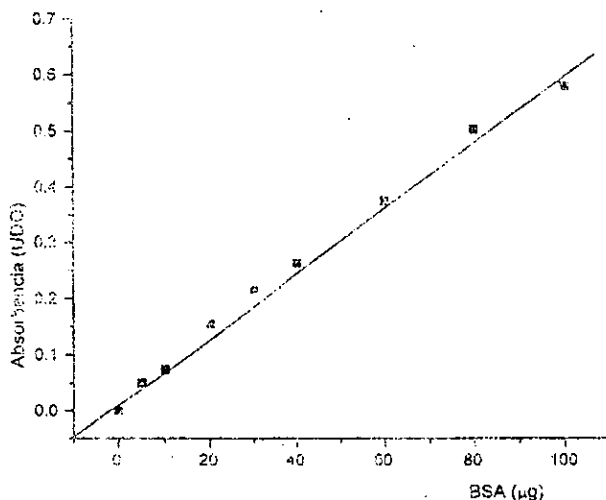


Figura 11. Curva patrón de BSA.

La concentración final de los homogenados estuvo alrededor de 16 µg/ µl en las muestras de homogenados y de 12 µg/ µl en las de microsomas.

Electroforesis en Geles Desnaturalizantes

En este trabajo se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS, dispuestos en un sistema de minigeles de placa de 0.75 mm. de grosor, elaborados con la técnica de Laemmli (38).

Se utilizó una concentración de 10% de acrilamida para el gel separador y una de 3% para el concentrador. El primero se hizo mezclando 0.240 ml de Tris 3.75 M pH 8.5, 1.005 ml de acrilamida 30% bis acrilamida 0.8%, 1.725 ml de agua

bidestilada, 16.35 μl de SDS 20%, 6.0 μl de persulfato de amonio 30% y 3.6 μl de TEMED.

Se colocó la mezcla para el gel separador en el dispositivo y se roció la superficie con SDS 0.1% para romper la tensión superficial y así obtener en el borde del gel una superficie plana. Se dejó polimerizar por 30 minutos; después se le añadió la mezcla del gel concentrador hecha con 0.266 ml de poliacrilamida 30% bis acrilamida 0.8%. 0.456 ml de Tris 0.5 M pH 6.6, 1.251 ml de agua bidestilada, 13.9 μl de SDS 20%. 7.28 μl de persulfato de amonio 10% y 4.59 μl de TEMED.

Una vez colocada la mezcla se le introdujo un peine de teflón de diez pozos, se dejó gelificar durante 30 minutos, se retiró el peine y se colocó el dispositivo en la cámara de electroforesis con buffer para correr el gel, cuya composición es de Trizma base 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1% pH 9.

Las muestras de proteína se diluyeron con un volumen igual de buffer desnaturalizante de Laemmli concentrado, que contenía urea 8.0 M, Tris-HCl 0.5 M pH 6.6, SDS 10%, β -mercaptoetanol 5% y azul bromofenol 0.01%. Se procedió a cargar entre 10 y 30 μl de proteína de cada una de las muestras.

Se hicieron geles por duplicado, uno se tiñó con una solución de azul brillante R-250 de Coomassie, disuelto en ácido acético glacial 10% y metanol 50%. La sobretinción del gel se eliminó con una solución desteñidora de metanol 50% y ácido acético 10%. El otro gel se utilizó para hacer la electrotransferencia a nitrocelulosa de las proteínas separadas electroforéticamente.

Para contar con un parámetro de referencia de pesos moleculares, en un pozo se cargaron 10 μ l de una mezcla de proteínas estándares con peso molecular conocido (tabla 1), para comparar el peso molecular aproximado de las bandas de proteínas de las muestras (la mezcla contenía 3 μ g de cada enzima).

Tabla 1. Estándares de peso molecular preteñidos. (Prestained SDS Molecular Weithg Marker Kit No. MW-SDS-BLUE, Sigma).

ENZIMA	PESO MOLECULAR (Daltons)
DESHIDROGENASA LÁCTICA (de músculo de conejo)	36,500
FUMARASA (de corazón de puerco)	55,300
PIRUVATO CINASA (de músculo de gallina)	75,200
FRUCTOSA 6P-CINASA (de músculo de conejo)	85,300
β -GALACTOSIDASA (de <i>Escherichia coli</i>)	107,000

Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa

El procedimiento se inició lavando el gel de poliacrilamida con un buffer de transferencia (Trizma base 25 mM, glicina 125 mM, metanol 20% y SDS 0.1% pH 7.5), durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Después se ensambló el gel en el dispositivo de transferencia y se llevó a cabo el proceso por 1:30 horas a 240 mA, con baño de agua circulante para enfriar la cámara.

Inmunodetección de la ATPasa de membrana plasmática

La proteína se detectó con el anticuerpo en dos sistemas: a) en muestras de proteínas separadas en un gel de poliacrilamida-SDS y transferidas a

nitrocelulosa y b) en muestras de proteína aplicadas a nitrocelulosa en un dispositivo de rendija (slot-blot) (30).

- Detección de la proteína electrotransferida del gel a la membrana de nitrocelulosa. Después de la transferencia se lavó la membrana de nitrocelulosa en TBS (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 0.5 M) por 10 minutos, después se bloqueó ésta con solución de leche descremada 2% en TBS por 30 minutos. El siguiente paso fué lavar la nitrocelulosa dos veces con TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, tween-20 0.05%), por 5 minutos.

Posteriormente se añadió el primer anticuerpo anti ATPasa de membrana plasmática diluido en TBS 1:1,000 por 12 horas (toda la noche) a temperatura ambiente y agitación suave.

Después se lavó la membrana dos veces con TTBS, 5 minutos cada vez y se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG-conjugado con fosfatasa alcalina), diluido 1: 1,000, incubado por 6 horas a temperatura ambiente.

Al término de este periodo se lavó la membrana con TTBS y una con TBS, 5 minutos cada vez. Se cortó y separó el carril con los estándares preteñidos (ya que el procedimiento de revelado los sobretiene) y luego se agregó la mezcla para desarrollar color, elaborada con 100 ml de buffer de carbonatos (bicarbonato de sodio 0.1 M, cloruro de magnesio 1.0 M pH 9.8), 1.0 ml de NBT (30 mg de cloruro de p-nitro azul de tetrazolio, disuelto en 1.0 ml de dimetilformamida 70%) y 1.0 ml de BCIP (15 mg de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil sal de toluidina disueltos en 1.0 ml de dimetilformamida). Se dejó reaccionar entre 5 y 15 minutos, hasta

que aparecieron claramente las bandas de proteína, cuidando que no se oscureciera el fondo de la membrana, para lo cual se detuvo la reacción lavando dos veces con agua bidestilada 10 minutos cada vez. La inmunorréplica se guardó a 4°C, hasta fotografiar y llevar a cabo el perfil densitométrico.

- Detección de la ATPasa adsorbida directamente al papel de nitrocelulosa. En este segundo sistema se ejecutó la técnica de Western (30) en el dispositivo de ranuras o slot-blot. Para ello se cortó un trozo de papel de nitrocelulosa de 11 x 3.5 cm, se humedeció en TBS por 5 minutos y posteriormente se colocó en el dispositivo Multiprotean II Screen de Bio Rad. Se conectó al vacío. En las ranuras de la parte superior se agregaron volúmenes de 10 a 20 µg de proteína de cada muestra, tanto de homogenados como de fracciones microsomales, y en la parte inferior se añadieron volúmenes iguales de SDS 5%, como blancos. La membrana se colocó al vacío por 30 minutos, posteriormente se lavó una vez con TTBS y otra con TBS 5 minutos cada vez. Se bloqueó con leche descremada 2% por 30 minutos, se lavó con TTBS dos veces 5 minutos cada vez y se inició la inmunodetección de la misma manera que la utilizada con la membrana del gel electrotransferido (ver sección anterior).

- Detección de proteínas en papel de nitrocelulosa con Amido Black. Con el propósito de hacer una comparación de la proteína total de las muestras y la inmunodetectada con los anticuerpos contra la ATPasa de membrana plasmática, en la misma matriz plana, se llevó a cabo la técnica de tinción de proteínas con amido black (28). Para ello se llenaron las ranuras del dispositivo de slot-blot con

10 o 20 μg de proteína de cada muestra (homogenados y microsomas), y otras con BSA en concentraciones de 2.5 a 20 μg . Se conectó al vacío el dispositivo por 30 minutos y después se lavó la membrana con TBS durante 10 minutos. Se tiñó con una solución de amido black (amido black 0.1%, agua bidestilada 45%, ácido acético glacial 10% y metanol 45%), diluida 1: 1,000 en TBS, por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente se lavó con agua bidestilada para eliminar el exceso de tintura y se guardó en papel desecante y en la oscuridad hasta llevar a cabo el análisis densitométrico.

Análisis densitométrico de proteínas o complejos antígeno-anticuerpo en ranuras en nitrocelulosa

Barrido con rayo láser. Se realizó la densitometría de las proteínas de las muestras de homogenados y fracciones microsomales de los slot-blots revelados por la técnica de Western con un aparato Gel Scan XL, acoplado a una computadora para la cuantificación de los densitogramas.

La nitrocelulosa se humedeció con agua bidestilada y se colocó en el soporte del aparato, señalando en él las distancias inicial y final entre las ranuras, a fin de hacer la lectura de cada muestra y sus blancos. Las proteínas o los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron como picos de absorbancia.

Cada experimento se realizó con tres preparaciones y se hicieron tres repeticiones por lo menos en cada una de ellas.

RESULTADOS.

Ensayos de germinación y toma de agua.

Con el propósito de conocer el comportamiento fisiológico de los ejes embrionarios de maíz y con ello seleccionar el periodo apropiado para la detección de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, se llevaron a cabo ensayos de germinación y toma de agua en ejes embrionarios y semillas embebidos en agua.

Como se puede observar en la figura 12A, los ensayos con semillas de este híbrido muestran que el inicio de la protrusión de la radícula se presenta hacia las 48 horas de imbibición. En las siguientes diez horas posteriores a la germinación de las primeras semillas, ésta se duplicó y alcanzó un máximo de 86% en un lapso de 110 horas de imbibición. En cuanto a la toma de agua, las tres fases clásicas se pudieron observar de las 0 a las 4 horas (fase I), de las 4 a las 70 horas (fase II) y de las 70 horas en adelante (fase III).

En la figura 12B, se muestra que en el caso de los ejes embrionarios la germinación se hizo evidente alrededor de las 34 horas de imbibición, exhibiéndose un máximo porcentaje de germinación del 88% hacia las 100 horas de imbibición. Asimismo, la curva de toma de agua de los ejes embrionarios fue muy rápida desde las primeras horas de imbibición, lo que se refleja en el elevado incremento del peso húmedo de los ejes embrionarios embebidos. El fin de la fase I se alcanzó a la hora y la fase II se inició inmediatamente terminando cerca de las 110 horas, cuando se inició la fase III.

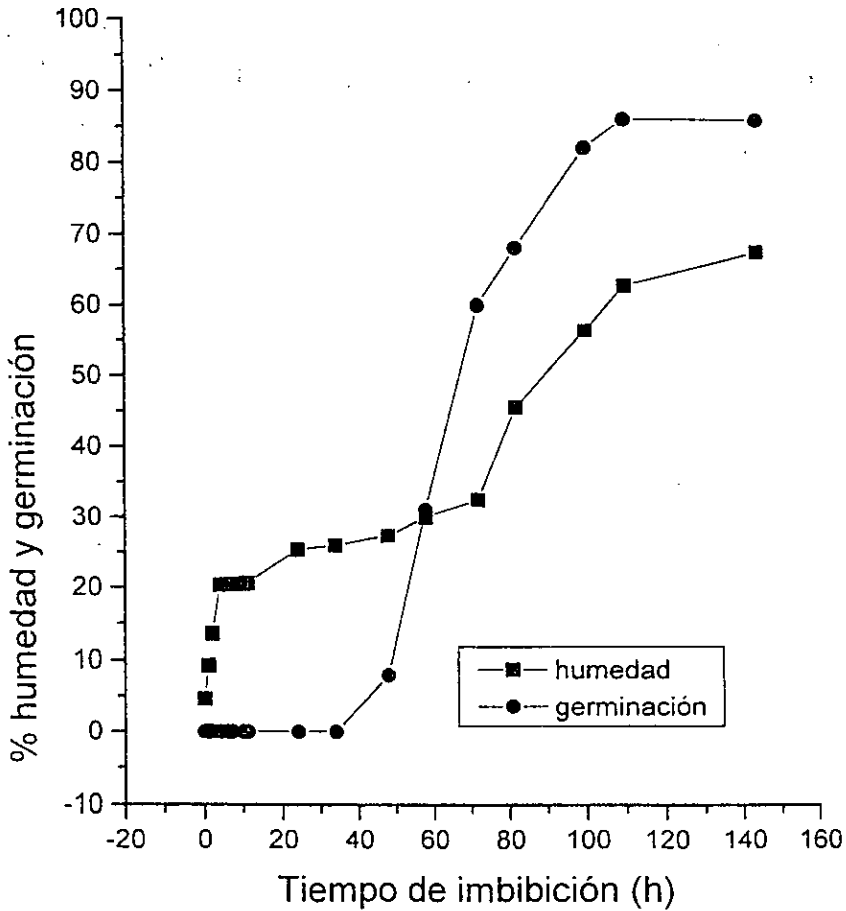


Figura 12 A. Porcentaje de germinación y humedad en semillas.

Los datos de las gráficas corresponden al promedio de tres repeticiones con 20 semillas para cada tiempo de imbibición en cada prueba.

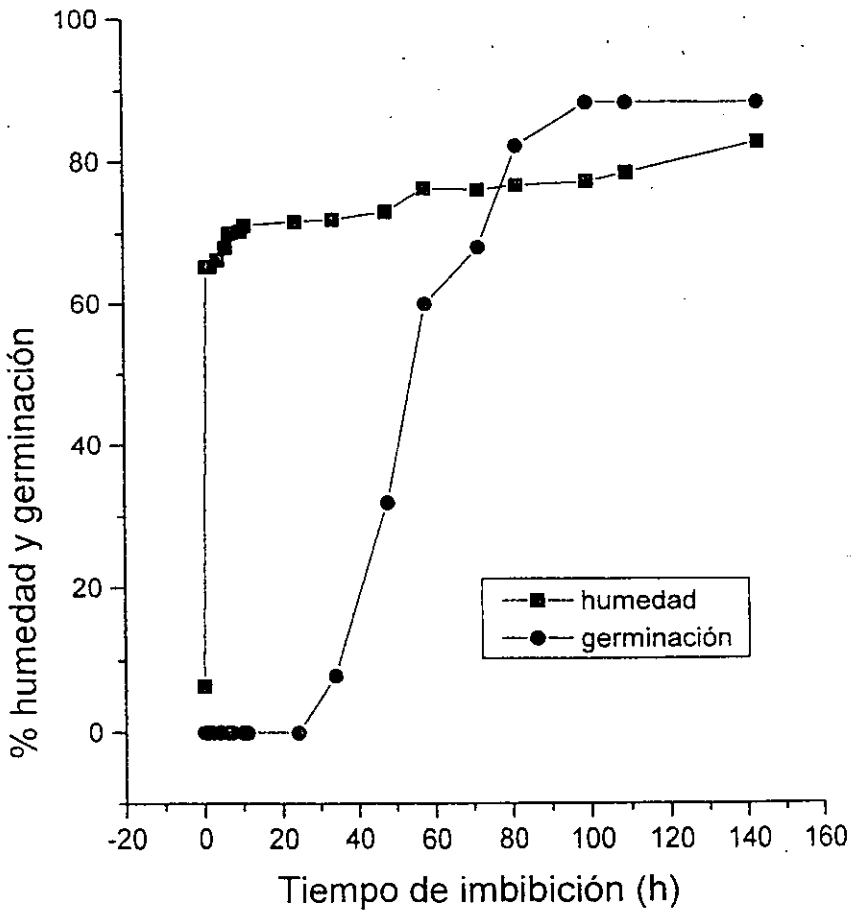


Figura 12 B. Porcentajes de humedad y germinación de ejes embrionarios.

Esta gráfica muestra los datos promedio del porcentaje de humedad y germinación de tres repeticiones con 30 ejes embrionarios cada prueba para diferentes tiempos de imbibición.

Para una mejor comparación en la figura 13A se muestran las curvas de germinación en ejes y semillas. Como se puede ver ambas desarrollaron un patrón muy semejante, pero las semillas presentaron un retraso de 14 horas en cuanto al inicio de la germinación. El porcentaje máximo de germinación en semillas y en ejes fue prácticamente el mismo.

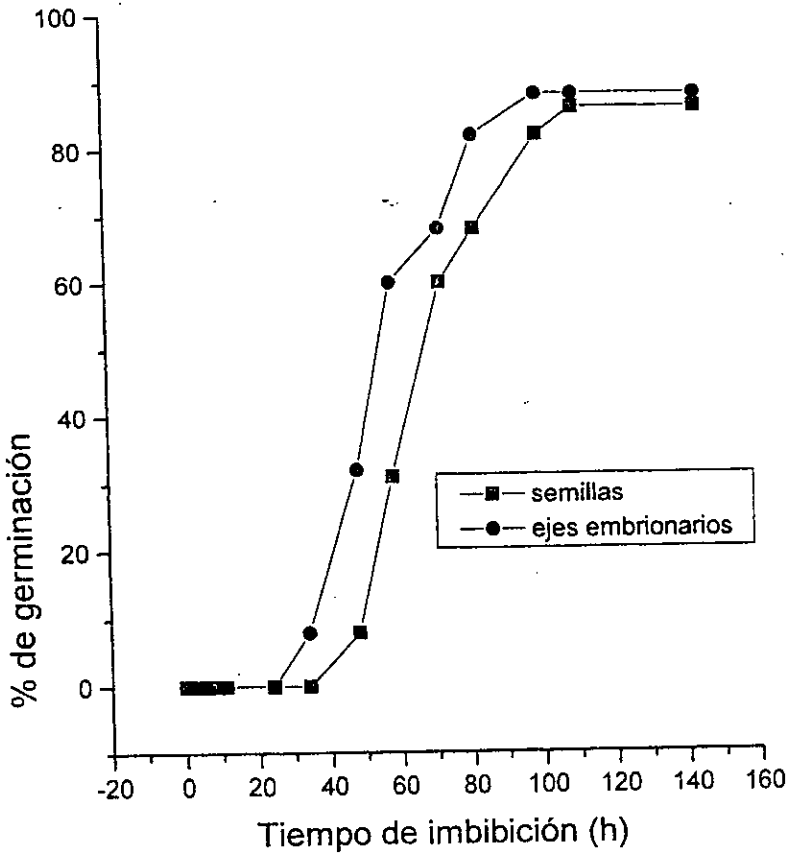


Figura 13 A. Germinación de semillas y ejes embrionarios.

En la gráfica se comparan los datos promedio de tres repeticiones con 30 ejes embrionarios y 20 semillas cada una.

Análogamente, si se comparan las curvas de los resultados de toma de agua por ejes y semillas (figura 13B), la captación de agua de los ejes embrionarios sube más rápidamente que la de las semillas, posiblemente porque estas últimas presentan mayor número de cubiertas o tejidos que los ejes, pero la fase II en las semillas tiene un final muy claro (aprox. 72 horas), y en los ejes pareciera terminar en las 110 horas, pero de manera menos marcada, debido tal vez a la inexistencia de tejidos de reserva que soporten el desarrollo normal de la protrusión de la radícula, que sí se puede observar en la curva de las semillas.

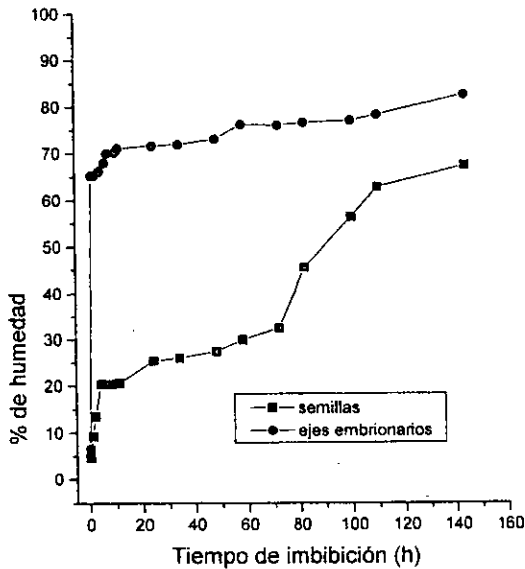


Figura 13 B. Toma de agua de semillas y ejes embrionarios.

Los datos graficados corresponden al promedio de tres repeticiones de 20 semillas y 30 ejes embrionarios cada una.

De acuerdo con estos parámetros fisiológicos seleccionamos las primeras siete horas de imbibición para nuestro estudio, en donde se incluyen las fases I y II, ya que estas fases involucran el inicio de la actividad metabólica del eje, misma que precede al periodo en el que se inicia la protrusión de la radícula (34 horas) y cuando es posible detectar cambios en los niveles de ATPasa, desde el estado latente del eje embrionario hasta el del reinicio de su metabolismo.

Obtención de fracciones subcelulares en varios tiempos de imbibición

- Determinación de niveles totales de proteína. De acuerdo con el objetivo (determinar la cantidad de ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en ejes embrionarios embebidos durante las primeras horas del procesos de germinación), nos propusimos determinar a la enzima tanto en fracciones membranales crudas (microsomas) como en homogenados totales. Por ello, primero procedimos a determinar la proteína total extraíble en los homogenados de tres experimentos, ya que era posible tener niveles cambiantes de proteína membranar a lo largo del periodo de imbibición estudiado. Esos cambios podrían deberse a la síntesis de novo de la proteína y su incorporación a la membrana. En los homogenados se observó un ligero incremento desde la primera hora hasta las cinco horas de imbibición, para después descender muy ligeramente como se muestra en la figura 14A. Sin embargo, dada la gran desviación estandar a las 3 y 7 horas, el patrón no resultó muy claro.

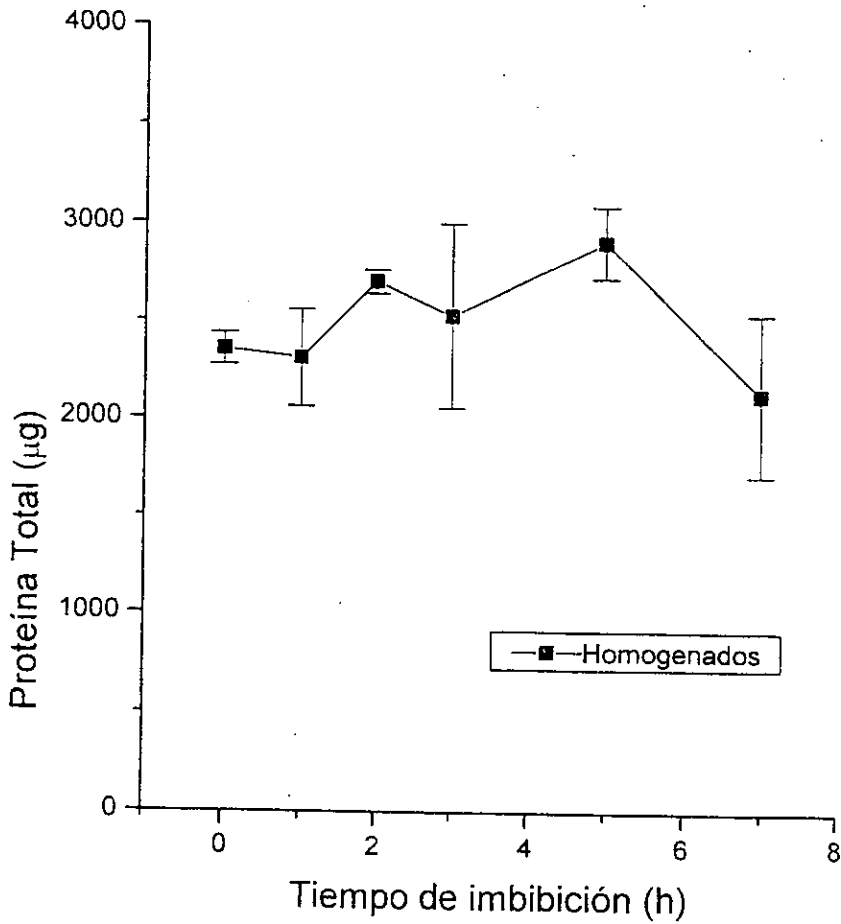


Figura 14 A. Niveles de Proteína Total en Homogenados.

Se embrieron 60 ejes embrionarios durante los tiempos indicados, se congelaron con N_2 líquido y se homogeneizaron como se describe en Materiales y Métodos. La proteína se determinó por el método de Peterson (29) en los homogenados obtenidos, y se aplicaron 30 μg a cada ranura.

En cuanto a los ensayos realizados con microsomas, la proteína total presentó un incremento más claro solo hasta las dos horas de imbibición, para descender y mantenerse constante hasta las siete horas (figura 14B).

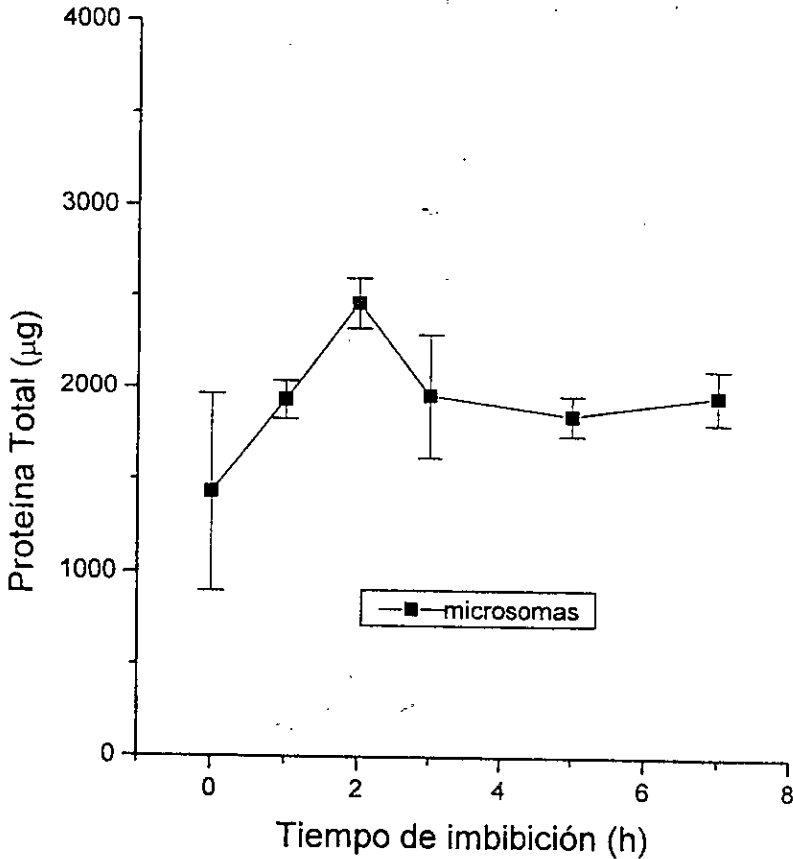


Figura 14 B. Niveles de Proteína Total en Microsomas.

Se embibieron 60 ejes embrionarios durante los tiempos indicados, se congelaron con N_2 líquido y se homogeneizaron como se describe en Materiales y Métodos. La proteína se determinó por el método de Peterson (29) en los microsomas obtenidos y se aplicaron $30 \mu\text{g}$ a cada ranura de la rejilla.

Si se comparan las gráficas de proteína total en homogenados y en microsomas (figura 14 C), se observa que tienen patrones semejantes, aunque el aumento de proteína en los microsomas a las 2 horas sí es muy claro. Naturalmente, la cantidad de proteína es mayor para los homogenados que para los microsomas, lo que es lógico si se considera que las muestras de homogenados incluyen toda clase de proteínas celulares incluyendo las solubles, en tanto que en las de microsomas se han seleccionado solo las de corpúsculos membranosos.

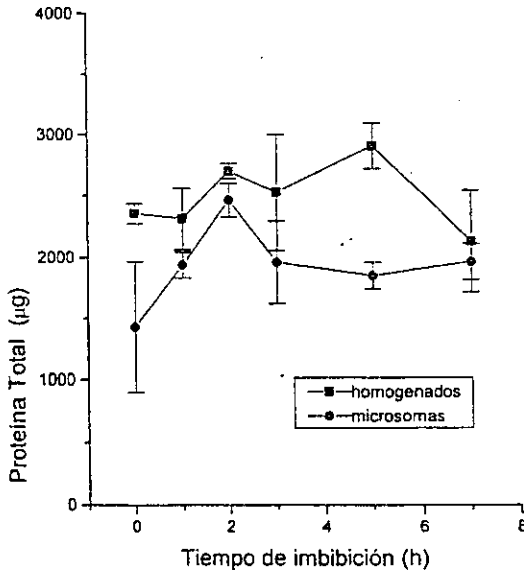


Figura 14 C. Niveles de Proteína Total en Homogenados y Microsomas.

En la gráfica se comparan las curvas con la desviación estandar del promedio de la proteína total de tres diferentes experimentos para homogenados y microsomas.

Ya que en este trabajo la ATPasa iba a ser detectada mediante anticuerpos en una matriz plana (nitrocelulosa), y a que variaciones en esta detección pueden depender de la cantidad de proteína total aplicada al papel, (se optó sólo por la detección en rejilla), fue necesario cerciorarse de que las cantidades aplicadas estaban estimadas correctamente, de que su adsorción era completa y de que estas condiciones se verificarían en todos los tiempos de imbibición. Para ello se llevaron a cabo ensayos de detección de una proteína conocida (BSA) en cantidades estipuladas en las rendijas o ranuras (slots) de un soporte de acrílico, tiñendo a la proteína con la técnica de amido black. Se optimizaron las condiciones en el intervalo esperado de concentración de proteína para las muestras y tratando de encontrar las condiciones para establecer un comportamiento lineal entre la concentración de proteína y su tinción en la rejilla.

Con estas premisas se realizaron dos tipos de ensayos, en unos manteniendo constante la concentración de BSA a 10 μg y en otros donde la concentración de BSA se fué incrementando entre 5 y 40 μg . En el primer ensayo se aplicaron y tiñeron 10 μg de BSA en diferentes ranuras de la rejilla. Los resultados se observan en la fotografía de la réplica en rejilla (slot blot) (figura 15A), así como en los trazos densitométricos correspondientes obtenidos con el Gel Scan (figura 15 B), el cual proporciona la cuantificación densitométrica relativa de las bandas teñidas en la réplica en rejilla, tal como se muestra en las figuras 15B para 10 μg y 16A para el rango de 5-40 μg de BSA.

Figura 15 A. Tinción de una rejilla con 10 μg de BSA para cada línea.

Se aplicaron 10 μg de BSA a cada ranura de una rejilla con una matriz de nitrocelulosa. Posteriormente la proteína adsorbida se tiñó con amido black como se describe en Materiales y Métodos.

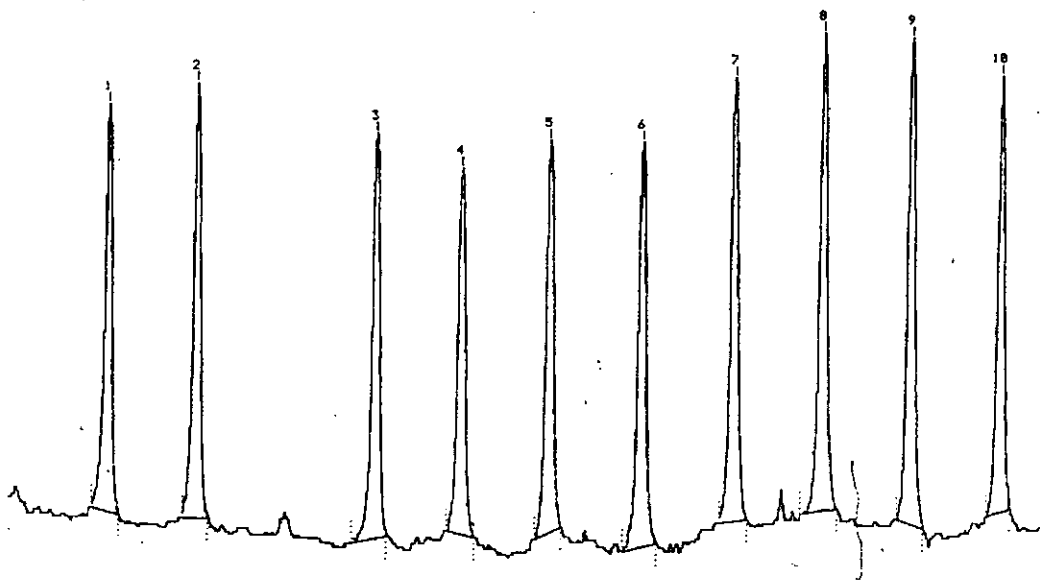


Figura 15 B. Perfil densitométrico de las bandas de 10 μg de BSA adsorbidas en nitrocelulosa y teñidas con amido black.

Los picos muestran los registros densitométricos realizados con un GEL SCAN XL.

Para cuantificar esta información se graficaron los datos de absorbencia de los picos obtenidos para las ranuras correspondiente (figuras 15C y 16B respectivamente). Como se puede observar, cuando se aplicó la misma cantidad (10 μg) de la proteína de referencia en diferentes pozos se tuvo prácticamente la misma absorbencia por experimento (figura 15C), por lo que se puede decir que el ensayo fué muy reproducible en cada experimento, si bien la absorbencia de los picos de 10 μg varía de un experimento a otro como se puede ver en la figura 15C.

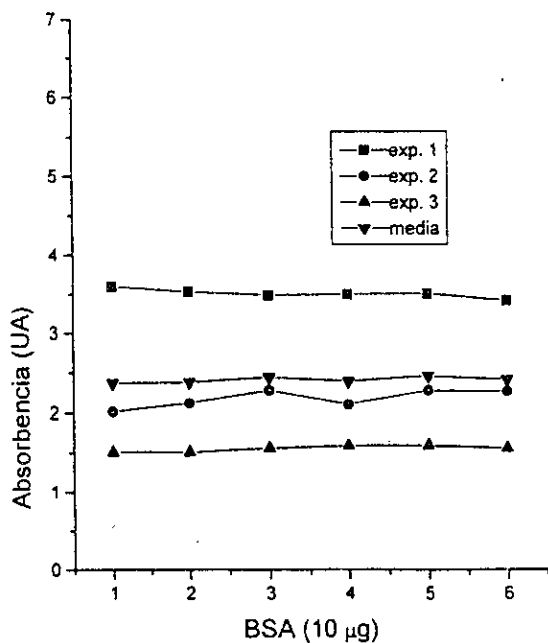


Figura 15 C. Cuantificación de la tinción de varias muestras de 10 μg de BSA con amido black.

La gráfica muestra los datos de la absorbencia de varios ensayos con la misma cantidad de BSA (10 μg). Tres rejillas de tres experimentos se adsorbieron con 10 μg de BSA por ranura, se tñieron con amido black y luego se les hizo el registro densitométrico respectivo. Los picos de densidad de este registro fueron integrados por el programa del GEL SCAN XL y se presentan en unidades arbitrarias (UA).

En el caso del experimento de tinción de cantidades crecientes de BSA en el rango de 5 a 40 μg , el registro de las bandas densitométricas (figura 16A) y la integración de los picos respectivos mostrados en la figura 16B, reveló una relación lineal entre la absorbencia y la cantidad de BSA.



Figura 16 A. Tinción de una rejilla con diferentes concentraciones de BSA (5-40 μg).

Se aplicaron 5 μg (línea 1), 10 μg (línea 2), 15 μg (línea 3), 20 μg (línea 4), 30 μg (línea 5) y 40 μg (línea 6).

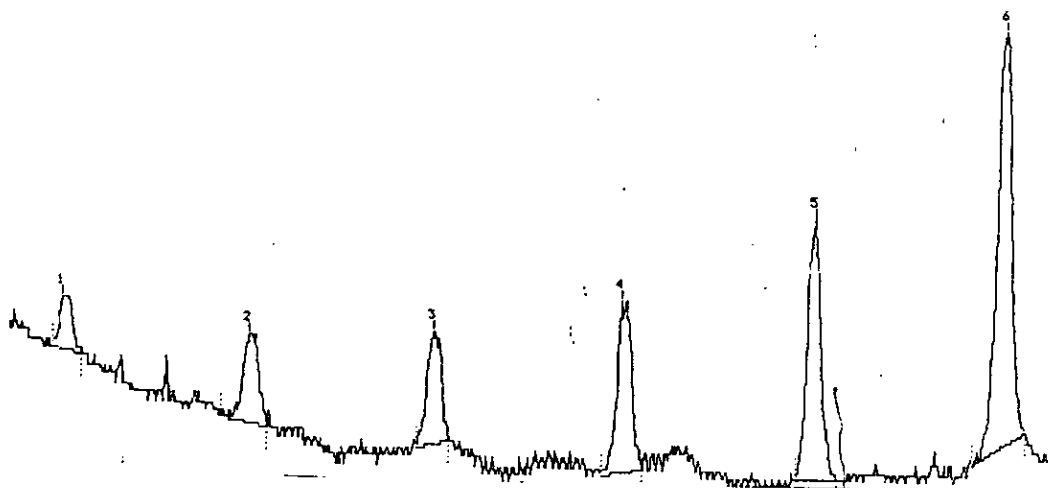


Figura 16 B. Perfil densitométrico de las bandas de BSA adsorbidas en nitrocelulosa y teñidas con amido black.

Los picos muestran los registros de 5 μg (pico 1), 10 μg (pico 2), 15 μg (pico 3), 20 μg (pico 4), 30 μg (pico 5) y 40 μg (pico 6), realizados con un programa GEL SACAN XL.

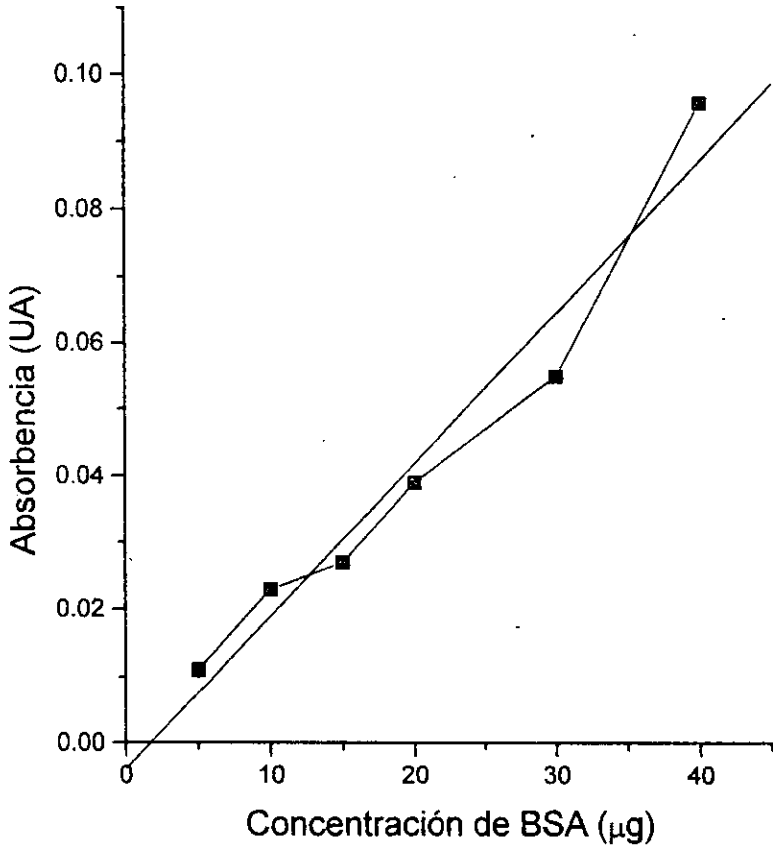


Figura 16 C. Cuantificación de la tinción de BSA (5 a 40 µg) con amido black.

En la gráfica se muestra la relación entre la concentración de la proteína BSA aplicada a la rejilla y la absorbancia obtenida a partir del perfil densitométrico para cada preparación.

Por lo tanto existe una correspondencia entre la intensidad de la tinción (absorbencia) y la concentración de la proteína, tanto cuando se mantiene ésta constante como cuando se va incrementando. Esto sugiere que la proteína se adsorbe íntegramente a la nitrocelulosa y que el ensayo es capaz de detectar diferencias cuantitativas en la proteína aplicada.

Con estas pruebas de apoyo se procedió a realizar una serie de réplicas tipo Western en rejilla (slot blots), tanto en las muestras de homogenados como en las de microsomas, para detectar específicamente la cantidad de proteína ATPasa, utilizando los anticuerpos específicos. Se obtuvo el perfil de la réplica en Western (figura 17A), se hizo la densitometría correspondiente y se graficaron los datos del análisis densitométrico respectivo en la figura 17B. En la foto se puede ver que la intensidad de la tinción de la proteína contenida en las ranuras y reactiva al anticuerpo no mostró variación a lo largo de las 7 horas. Cuando se graficaron los datos respectivos de absorbencia para cada tiempo de imbibición se nota claramente este comportamiento. En esta gráfica se observa que no existe un cambio en la cantidad de la ATPasa detectada mediante la réplica de Western a través del periodo estudiado en tres diferentes preparaciones. El resultado de este mismo tipo de experimentos, pero realizados con microsomas fue muy semejante, tal como se ve en las figuras 18A y 18B, donde también los datos procesados muestran un patrón gráfico similar, ya que ninguno de los tiempos presentó cambio en dicha concentración de enzima: los datos corresponden a una línea horizontal en todo el rango de tiempo en los tres diferentes experimentos.

1 2 3 4 5 6

Figura 17 A. Tinción de Western en la inmunorréplica en rejilla de las fracciones de homogenados de ejes embrionarios embebidos a diferentes tiempos.

60 ejes embrionarios fueron embebidos 0 h (línea 1), 1 h (línea 2), 2 h (línea 3), 3 h (línea 4), 5 h (línea 5) y 7 h (línea 6). Se aplicaron 10 μg de proteína de los homogenados a cada ranura de la nitrocelulosa en la rejilla. Una vez adsorbidas las muestras se incubaron con el anticuerpo anti ATPasa según la técnica de Western.

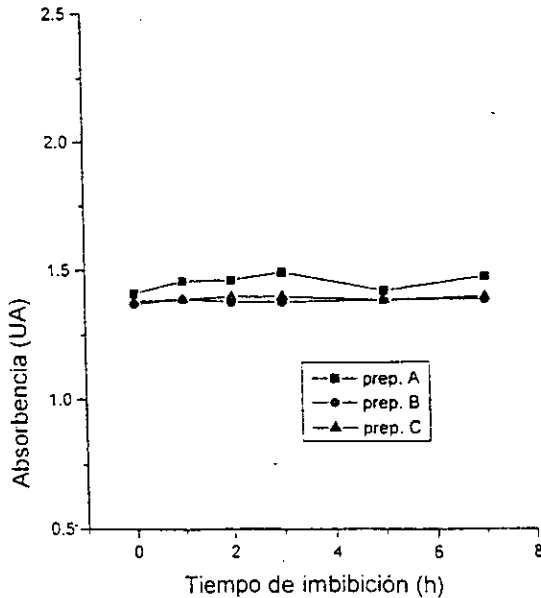


Figura 17 B. Cuantificación de la tinción de western de homogenados obtenidos de ejes embrionarios embebidos de 0 a 7 horas.

Se aplicaron 10 μg de muestra de homogenados a una rejilla con nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo anti ATPasa según el procedimiento Western. Las bandas resultantes se cuantificaron con el programa GEL SCAN XL, como se describió en Materiales y Métodos. Se presentan los datos de tres preparaciones diferentes de homogenados para cada tiempo de imbibición.

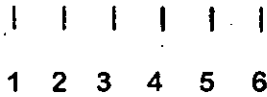


Figura 18 A. Tinción de Western en la inmunorréplica en rejilla de las fracciones de microsomas de ejes embrionarios embebidos a diferentes tiempos.

Se embebieron 60 ejes 0 horas (línea 1), 1 hora (línea 2), 2 horas (línea 3), 3 horas (línea 4), 5 horas (línea 5) y 7 horas (línea 6). De las muestras de microsomas se aplicaron $10\mu\text{g}$ de proteína a cada ranura de la nitrocelulosa en la rejilla. Una vez adsorbidas las muestras se incubaron con el anticuerpo anti ATPasa según la técnica de Western.

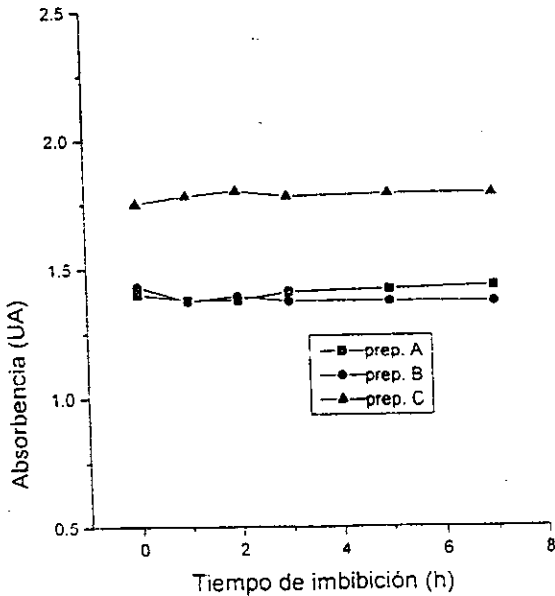


Figura 18 B. Cuantificación de las inmunorréplicas Western de fracciones de microsomas obtenidas de ejes embrionarios embebidos de 0 a 7 horas.

Se aplicaron $10\mu\text{g}$ de muestra de microsomas a una rejilla con nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo anti ATPasa según el procedimiento de Western. Las bandas resultantes se cuantificaron con el programa GEL SCAN XL, como se describió en Materiales y Métodos. Se presentan los datos de tres preparaciones diferentes de microsomas para cada tiempo de imbibición.

En la figura 19 se muestra la comparación de los datos representativos de los experimentos anteriores: iguales niveles de ATPasa detectados en homogenados y microsomas, confirmándose la semejanza de los patrones en ambas muestras. La comparación no se puede hacer en términos de magnitudes absolutas, ya que la intensidad de las bandas variaba de experimento a experimento, como se pudo observar en las figuras 18A y 18B.

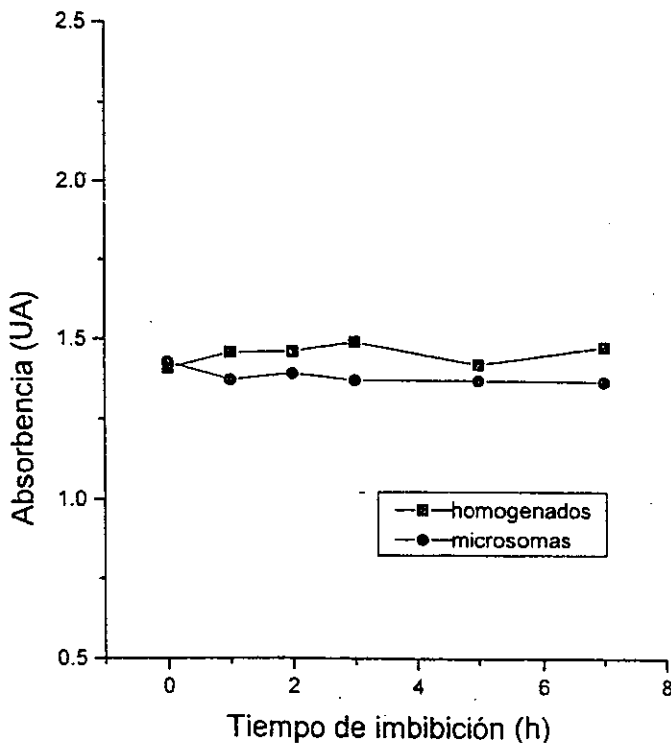


Figura 19. Comparación de la cuantificación de las inmunorrélicas en Western de homogenados y microsomas.

Los datos graficados corresponden al promedio de tres experimentos para cada tipo de muestra en los diferentes tiempos de imbibición (ver figuras 17 B y 18 B).

Con el fin de completar este resultado se combinaron los datos obtenidos de los experimentos de detección con amido black y la réplica en Western en las mismas muestras, para corroborar que la misma cantidad de proteína fue aplicada y adsorbida para todos los tiempos y puesta a reaccionar con el anticuerpo. Se encontró que no había variaciones en estas muestras en cuanto a la cantidad de proteína aplicada y los niveles de ATPasa, lo mismo en homogenados que en microsomas. Por lo que puede decirse que la concentración de ATPasa detectada en estos experimentos con ejes embrionarios en proceso de germinación, se mantuvo constante durante las primeras siete horas de imbibición, tal como se observa en las figuras 20A y 20B.

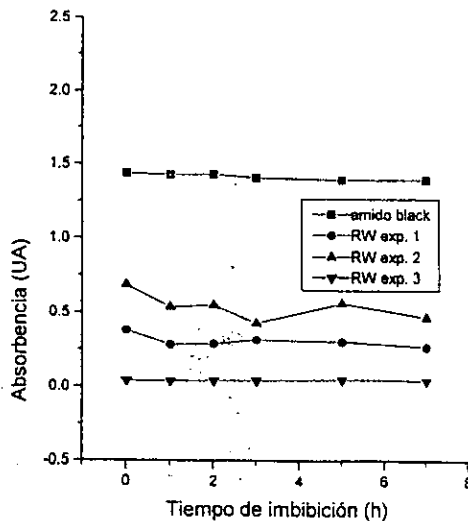


Figura 20 A. Comparación de las cantidades de proteína total aplicada y las cantidades de ATPasa detectadas en homogenados obtenidos de ejes embrionarios embebidos a diferentes tiempos.

En esta gráfica se compara el promedio de tres ensayos de amido black con tres experimentos de réplicas en Western de homogenados. La proteína total se detectó por la tinción de amido black y la ATPasa con el anticuerpo por la técnica de Western.

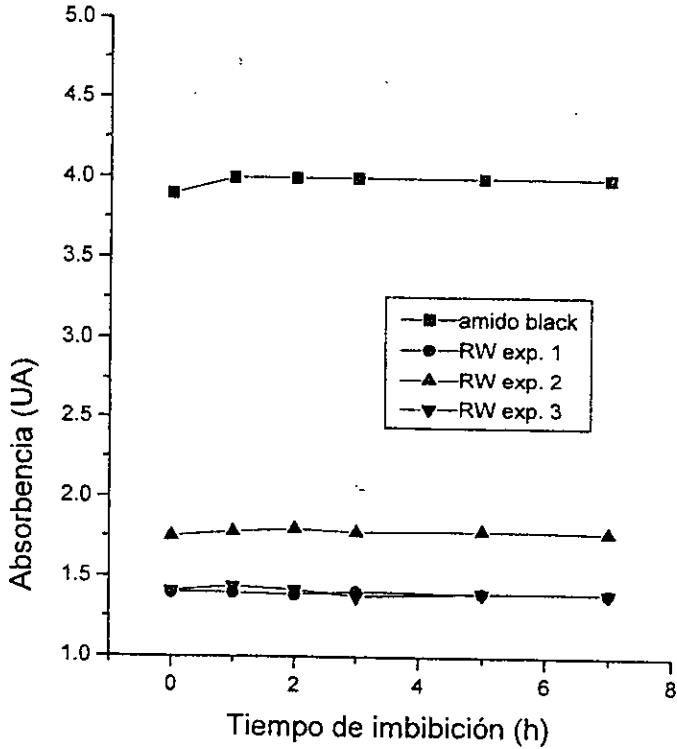


Figura 20 B. Comparación de las cantidades de proteína total aplicada y las cantidades de ATPasa detectadas en microsomas obtenidos de ejes embrionarios embebidos a diferentes tiempos.

En esta gráfica se compara el promedio de tres ensayos de amido black y tres réplicas en Western de microsomas. La proteína se detectó por la tinción de amido black y la ATPasa con el anticuerpo por la técnica de Western.

DISCUSIÓN

Los dos parámetros fisiológicos de la germinación de ejes embrionarios de maíz que se examinaron en este trabajo fueron la velocidad de germinación y la viabilidad de los ejes (estimados como porcentaje de germinación de la población de ejes a diferentes tiempos) y la entrada de agua a los ejes (estimada como incremento en su peso húmedo). El primer parámetro mostró que tanto el lote de semillas como el de ejes tenía una alta y semejante viabilidad indicando que la disección manual de los ejes no había afectado sus estructuras. Esto además puede apoyarse por el hecho de que los ejes tuvieron una mayor velocidad de germinación a lo largo del tiempo estudiado, cuando se compararon con las semillas, como era de esperarse (ver figuras 13 A y 13 B). Este fenómeno está de acuerdo con los reportes en la literatura, que lo han explicado en términos de una hidratación más rápida del eje debida a la ausencia de las cubiertas semi-impermeables de la semilla, las cuales permiten una hidratación más lenta del interior de la semilla (31).

Debido a que las 7 primeras horas de imbibición de los ejes embrionarios comprenden a la fase I y parte de la fase II de hidratación, es probable que en este periodo de transición de actividad metabólica pudiéramos encontrar cambios en los niveles de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, ya que esta enzima es fundamental para varias actividades celulares. De ahí que se hayan seleccionado las primeras siete horas de imbibición de los ejes embrionarios para este estudio.

La detección de la enzima se hizo en el homogenado total y en la fracción microsomal de los ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos. El interés en hacerlo en ambas preparaciones era debido al hecho de que la ATPasa podría estar no ensamblada en la membrana (y por tanto presente en el homogenado y ausente en la fracción microsomal), ya fuera por estar en vías de degradación, o por el contrario, en vías de síntesis *de novo*, ya que a estos tiempos de imbibición se ha postulado por una parte, que no hay una organización correcta de la membrana (31, 32, 44) y que hay biosíntesis de algunas ATPasas, por ejemplo la mitocondrial (33). Utilizando las fracciones de homogenado total y de membranas totales (fracción microsomal), se podría tener una estimación adecuada de la enzima. Los resultados de este trabajo muestran, por las inmunorrélicas de homogenados y microsomas, que no hay aumento preferencial de la ATPasa en ningún tiempo, ni en homogenados ni en microsomas.

Un parámetro importante que tenía que determinarse era la cuantificación de la proteína total, tanto de los homogenados como de la fracción microsomal, ya que este dato es útil para estimar si hay un enriquecimiento de la ATPasa con respecto a la proteína total existente en cada tiempo de imbibición. Notoriamente, los niveles de proteína total en homogenados apenas aumentaron ligeramente a lo largo de las 7 horas de imbibición, en cambio los niveles de proteína total membranar sí experimentaron un aumento significativo a las dos horas de imbibición (35) (figura 14 C). Un dato idéntico ha sido obtenido en embriones de maíz en nuestro laboratorio (34), lo cual indica que al menos las proteínas membranales del eje embrionario están contribuyendo a ese aumento, pues el

embrión contiene al eje embrionario y al escutelo. No se puede decir de estos experimentos si el escutelo también contribuye.

De estos experimentos también se desprende que el aumento de proteína es específico de las membranas, pues las fracciones proteicas de los homogenados no experimentan cambios. Aunque no se puede precisar en qué tipo de membranas de las que integran la fracción microsomal, se da el aumento de proteína a las dos horas de imbibición. Sin embargo, bajo las mismas condiciones de imbibición y en el mismo maíz se ha encontrado que fracciones purificadas de membranas plasmáticas de embriones embebidos 2 horas presentan este aumento de proteína (35, 49).

Los ensayos de adsorción de proteína a la matriz de nitrocelulosa dieron buenos resultados, ya que se obtuvieron los intervalos de linealidad en la detección de la proteína total y gracias a ello se pudo determinar que las cantidades de proteína microsomal añadida y adsorbida en cada tiempo de imbibición eran iguales y que por lo tanto, si se encontraban diferencias en las cantidades de ATPasa detectada se debería a un enriquecimiento o disminución específicos de esta enzima y no a la aplicación de una cantidad mayor o menor de proteína a la rejilla con la matriz de nitrocelulosa.

Cuando se detectó específicamente la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática con un anticuerpo específico, los resultados indicaron que a lo largo de las 7 horas de imbibición los niveles de la enzima no cambiaban, ni en los homogenados, ni en los microsomas. Este resultado es interesante, pues por una parte indica que ya desde tiempo cero hay niveles de ATPasa detectables, tal y

como se ha encontrado en los embriones enteros (36), lo cual sugiere que al menos parte de la ATPasa detectada en los embriones proviene de los tejidos del eje embrionario. Desgraciadamente, el ensayo de inmunodetección usado en ambos casos no permite determinar las cantidades absolutas de antígeno (en este caso la ATPasa), para comparar sus niveles en ejes (este estudio) y en embriones (estudio de la ref. 36), y de ahí, obtener la posible contribución del escutelo a los niveles de ATPasa observados en los embriones. Posiblemente se podrían tener datos al respecto comparando las curvas de microsomas en embriones y ejes embrionarios contra una curva patrón de ATPasa.

Por otra parte, el no haber encontrado cambios en los niveles de ATPasa a lo largo de las 7 horas de imbibición muestreados contrasta con los resultados obtenidos en embriones de maíz, en donde se encontró un aumento significativo de la proteína detectada por el anticuerpo a las dos horas de imbibición (37). En este caso se puede sugerir que entonces el aumento de ATPasa a las dos horas de imbibición del embrión sí puede deberse a la ATPasa presente en el escutelo, ya que éste está ausente en el eje embrionario y presente en el embrión.

El hecho anterior es muy significativo, ya que el escutelo es un tejido con una gran actividad de transporte, pues actúa como tejido de tránsito y metabolismo de carbohidratos de alto peso molecular y proteínas de reserva del endospermo que tienen que acceder al eje embrionario convertidos en moléculas más sencillas (37). Ya que la ATPasa favorece el transporte secundario a través de la membrana, se explicaría su aumento en el escutelo en horas tempranas de la imbibición, si bien este aumento es muy rápido y transitorio. El eje embrionario

aparentemente conservaría sus niveles basales de transporte al menos durante las primeras horas de imbibición, como lo indican nuestros resultados. Posteriormente, cuando la demanda de la actividad de transporte y de elongación de las células aumenta, o sea al final de la germinación, se esperaría que los niveles de ATPasa aumentaran en el eje mismo.

Un parámetro complementario importante por estudiar sería la medición de la actividad enzimática de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, paralelamente a los niveles detectados por anticuerpo. Esto sería importante, pues no se puede asegurar que toda la enzima detectada por el anticuerpo está activa, o si hay una fracción inactiva, o si la que está presente modifica su actividad a lo largo del periodo de imbibición estudiado. De hecho, esta última posibilidad se ha observado en preparaciones de membranas plasmáticas purificadas, en donde se ha establecido que la actividad de la ATPasa aumenta al aumentar la cantidad de enzima, pero que además durante las primeras 8 horas de imbibición se presentan consecutivamente dos formas diferentes de la enzima (34, 36).

Otras enzimas membranales también aparecen desde las primeras horas de imbibición de los embriones de maíz, como la citocromo oxidasa y la ATPasa mitocondrial (35,36). Estos datos reflejan que es posible encontrar enzimas activas en las membranas de embriones embebidos aun por tiempos tan cortos como 20 minutos (50). Por lo cual es de esperarse que esas enzimas sean las remanentes del periodo de formación de la semilla. Los datos del presente trabajo apoyan esta propuesta.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1. Aun cuando el intervalo de tiempo seleccionado incluyó las fases I y II de la toma de agua, la segunda de las cuales está reportada como una etapa de reinicio de la actividad metabólica con un consecuente incremento en la cantidad de la ATPasa, con los experimentos realizados en este estudio no se logró detectar este incremento.

2. La cantidad de proteína total detectada en las muestras de homogenados y microsomas no se modifica significativamente a lo largo del intervalo de tiempo estudiado, pero en el caso de los microsomas existe un incremento significativo a las dos horas de imbibición. No sabemos si este aumento tiene una implicación fisiológica.

3. Se encontró que desde el inicio del proceso de toma de agua en los ejes embrionarios ya existe una cantidad de ATPasa, tanto en las muestras de homogenados como en las de microsomas, lo cual puede ser interpretado como enzima remanente del proceso de formación de la semilla.

4. La cantidad de ATPasa detectada mediante anticuerpos específicos en las muestras tanto de homogenados como de microsomas de ejes embrionarios no varía. Esto sugiere que en este periodo los ejes embrionarios tienen una cantidad constante de la enzima.

Sin embargo, el hecho de que la enzima detectada con el anticuerpo no varíe, no implica que la enzima tenga la misma actividad a lo largo del periodo estudiado, ni tampoco que sea la misma.

PERSPECTIVAS

1. Detectar la ATPasa mediante el uso de anticuerpos, en escutelos disectados y comparar sus niveles con los del eje embrionario en las primeras horas de imbibición. Este resultado debería ser consistente con el que se ha obtenido en embriones enteros, en los que la actividad de la enzima y su cantidad aumentaron a las dos horas de imbibición.

2. Llevar a cabo experimentos de inmunocitoquímica para identificar si hay una regionalización anatómica específica de la ATPasa en el eje embrionario, en los diferentes tiempos de imbibición. Es probable que las capas de células del eje embrionario adyacentes al escutelo muestren un aumento de enzima, debido a la necesidad de transporte entre las dos regiones.

3. Purificar las membranas plasmáticas a partir de la fracción microsomal de los ejes embrionarios embebidos a diferentes tiempos y ahí detectar y cuantificar la actividad de la ATPasa para poder hacer una correlación entre cantidad de enzima y actividad durante el periodo de imbibición seleccionado. Esto podría ayudar a dilucidar si hay enzima inactiva pero antigénica a lo largo del tiempo de imbibición, o si la relación proteína : actividad cambia. Si esto sucediera, sugeriría que puede haber enzima más o menos activa en ciertos tiempos.

4. Llevar a cabo la cuantificación de la ATPasa en un intervalo de tiempo que incluya el momento de la protrusión de la radícula (germinación) y corroborar el incremento de la ATPasa y su relación con la elongación celular. Esto proporcionaría la evidencia de que la enzima puede aumentar en un momento fisiológico como el de la protrusión de la radícula, en donde hay elongación celular, ya que se requiere de que haya acidificación promovida por la ATPasa.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Avers, Ch. **Biología Celular**. (1991). 2da. edición. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 532 p.
2. Baudouin, M. and M. Boutry. (1995). *Plant Physiol.* **108**: 1-6.
3. Bewley, J. D. **Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. Vol. I.** (1978). M. Black. New York. 308 p.
4. Devlin, R. M. (1975) **Fisiología Vegetal**. Omega. España. 468 p.
5. Dieter, H.(1980). **Fisiología Vegetal**. Omega. España. 168 p.
6. Gavilanes, R. M., R. O. García R., V. Sánchez L., J. Villegas M., A. Carballo y S. Sánchez N. (1994). En: Cuaderno de Posgrado. División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM, México, pp. 49-60.
7. Gavilanes R. M y O. R. García R. (1995). En: Mensaje Bioquímico. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM. Vol. XIX. Martínez. M. F., Morales L. S., Jiménez C. M. E. y Saavedra A. V., editores. México.
8. Gavilanes R. M., S. Sánchez N., Ma. C. Enríquez A. y O. R. García R. (1995). *Ciencia.* **46**, 251-262.

9. Ginzo, D. H. En: Sívori, E. M. , E. R. Montaldi y O. H. Caso. (1980). En: *Fisiología Vegetal*. Vol. IV. Hemisferio Sur. Argentina. 264 p.

10. Greulach, V. A. y J. E. Adams. (1970). **Plantas. Introducción a la Botánica Moderna**. Limusa. México. 679 p.

11. Evenari, M., S. Klein, H. Anchori y N. Feinbrun.(1957). Bull. Res. Counc. Israel. **6D**: 33-37.

12. Foard, D. E. and A. H. Haber. (1966). *Planta*. **71**: 160-170.

13. Haber, A. H. and H. J. Luipold. (1960). *Plant Physiol*. **35**: 486-494.

14. Haber, A. H. and H. J. Luipold. (1960). *Plant Physiol*. **35**: 168-173.

15. Pedersen P. and E. Carafoli. (1987). *Trends Biochem. Sci*. **12**: 186-189.

16. Peña, A. (1986). **Las Membranas de las Células**. La Ciencia desde México. Núm. 18. SEP. FCE. CONACYT. 125 p.

17. Raven, P. H., R. F. Evert y S. E. Eichhorn. (1991). **Biología de las Plantas**. Vol. 1. Reverté, España. 369 p.

18. Serrano, R. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 1-28.
19. Serrano, R. (1989). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 61-94.
20. Serrano, R., J. M. Villalba, M. G. Palmgren, F. Portillo, A. Parets-Soler, M. Roldán, C. Ferguson y C. Montesinos (1992). *Biochem. Soc. Trans.* **20**: 562-566.
21. Simon. E. W. (1984). **Seed Physiology**. Vol. 2. Academic Press. Australia. 568 p.
22. Sussman, M. R. y J. F. Harper. (1989). *Plant Cell.* **1**: 853-960.
23. Wallace, R., J. L. King y G. P. Sanders. (1992). **La Ciencia de la Vida**. Vol. 1. Trillas. México. 425 p.
24. Sánchez, N. S. (1990). **Estudio comparativo de dos ATPasas de H⁺ en la germinación de semillas de maíz de diferente sensibilidad al deterioro**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 89 p.

25. Salisbury, F. B. y C. W. Ross. (1994). **Fisiología Vegetal**. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759 p.
26. Serrano, R. (1990). En: *The Plant Plasma Membrane*. C. Larsson e I. M. Moller, eds. Springer Verlag. Heidelberg. pp. 127-153.
27. Wach A., Schesser, A. y Goffeau, A. (1992). *J. Bioenerg. Biomem.* **24**: 309-317.
28. Schaffner, W. y Weissmann, C. (1973). *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.
29. Peterson, G. L. (1977). *Anal. Biochem.* **83**: 346-356.
30. Towbin, H. F. Staehelin y Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **161**: 89-95.
31. Crowe, J. H., Crowe, L. M., Hoekstra, F. A. y Wistrom, C. A. (1989). En: *Seed Moisture* (P. C. Stanwood y M. B. Mc Donalds eds.). 1989. Crop Science Society of America USA. Madison CSSA Special Publication. **14**: 1-14.
32. Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. y Crowe, L. M. (1992). *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 579-599.

33. Ehrenshaft, E. y Brambl, R. (1990). *Plant Physiol.* **65**:931-938.
34. Sánchez, N. S., Tuena de Gómez-Puyou, M., Rodríguez Sotres, R., Carballo, A. y Gavilanes Ruiz, M. (1998). *Biochim. Biophys. Acta* (en prensa).
35. García-Rubio, O., Sánchez-Nieto, S., Enríquez-Arredondo, C., Sepúlveda, J., Carballo, A. y Gavilanes-Ruiz, M. (1997). En: *Basic and Applied Aspects of Seed Biology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Vol. 30.* (R. H. Ellis, M. Black, A. J. Murdoch y T. D. Hong, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 499-505.
36. Sánchez-Nieto, S., García-Rubio, O., Pacheco-Moisés, T. Carballo, A., Rodríguez-Sotres, R. y Gavilanes-Ruiz, M. (1997). *Physiol. Plant.* **101**: 157-164.
37. Mayer, A. M. y Poljakoff-Mayber, A. (1989). **The Germination of Seeds.** Pergamon Press. Oxford, New York. pp. 120-135.
38. Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**:680-685.
39. Alexander P., M. J. Bahret, J. Chaves, G. Courts y N. S. A'Alessio. (1992). **Biología.** Prentice Hall, U. S. A. 717 p.

40. Assmann, S. M. y Haubrick, L. L. (1996). *Curr. Op. Cell Biol.* **8**:458-467.
41. Logan, H., Basset, M., Very, A. y Sentenac, H. (1997). *Physiol. Plant.* **100**: 1-15.
42. Briskin, D. P. (1994). *Weed Sci.* **42**: 255-262.
43. Bush, D. R., Chiou, T. J. y Chen, L. (1996). *J. Exp. Bot.* **47**: 1205-1210.
44. Bewley, J. D. (1986). En: *Physiology of Seed Deterioration*. Crop. Sci. Society of America. U. S. A. CSSA. Spec. Pub. No. 11. pp. 27-45.
45. Briskin, D. P. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* **1019**: 95-109.
46. Michelet, B. y M. Boutry. (1995). *Plant Cell* **108**: 1-6.
47. Stryer, L. (1990). **Bioquímica**. Reveté, España. 1084 P.
48. Poole, R.J. (1978). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**: 437-460.
49. García R., O. R. (1994). **Actividad de dos ATPasas de H⁺ en fracciones microsomales de ejes embrionarios y embriones de maíz**

durante la germinación. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Campus Iztacala. UNAM. 59 p.

50. Sánchez, N., S. (1994). **Caracterización de la aparición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en la germinación de embriones de maíz.** Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 115 p.