

00528  
4



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

"FUNCIONALIDAD RESPIRATORIA DE LA MITOCONDRIA  
Y SU RELACION CON EL ENVEJECIMIENTO  
DE SEMILLAS DE MAIZ"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**VANESSA JACQUELINE (ALONSO) SENTIES**



MEXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES 2003  
FACULTAD DE QUIMICA

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Prof. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
Vocal	Prof. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ
Secretario	Prof. ALFREDO SALAZAR ZAZUETA
1er. Suplente	Prof. NORA ANDREA GUTIÉRREZ NÁJERA
2º. Suplente	Prof. ALBERTO GÓMEZ GUTIÉRREZ

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 104 Conjunto E Facultad de Química  
UNAM

  
Nombre completo y firma del asesor del tema:  
Dra. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

  
Nombre completo y firma del supervisor técnico:  
M. en C. ADRIANA CAMACHO VILLANUEVA

  
Nombre completo y firma del sustentante:  
VANESSA JACQUELINE ALONSO SENTÍES

Este trabajo, esta dedicado especialmente a Dios,  
a mis papás, hermanos y sobrinos, mi gran  
familia, porque sin su apoyo, amor, ánimo y  
ejemplo de esfuerzo, lucha y dedicación jamás  
hubiera podido hacer realidad este sueño, son lo  
más importante para mí.

Los quiero muchísimo.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

---

**Gracias Jesús** por dejarme cumplir una de mis más grandes metas, por ayudarme a superar todas las pruebas que se han presentado durante mi vida. Gracias porque sé que siempre estas conmigo y me cuidas en todo momento y porque sino hubieses estado conmigo no lo habría logrado. Te quiero.

**A mis papás** Jorge y Virginia porque me dieron la oportunidad de nacer y crecer en un hogar lleno de amor, ternura y unión. Gracias por su apoyo incondicional, por ser un ejemplo intachable y por su dedicación. Gracias porque me han dado lo más importante para salir adelante, el amor y las bases de una buena educación y formación, que siempre estarán conmigo. Este trabajo es de ustedes, es el fruto de tanto esfuerzo. Gracias por ser mis papas y por tanto amor. Los amo.

### **A mis Hermanos:**

- **Vicky y Matías** muchas gracias por esos consejos, por apoyarme, alentarme y por toda su ayuda, pero sobretodo gracias porque me han dejado compartir con ustedes muchas cosas. Gracias por darme esos sobrinos: **Angel, Marifer, Sebastián y Ximena** que son mi alegría y motivación para seguir adelante, los quiero mucho y quiero que sepan que a pesar de la distancia siempre los llevo en el corazón y en el pensamiento.

- **Vero** gracias por ser una gran hermana y amiga, realmente te admiro y no sé como agradecerte todo lo que has hecho por mi, siempre lo tendré en cuenta y espero saber corresponderte, sin tu ayuda y consejos jamás hubiera podido llegar hasta aquí, este trabajo también es tuyo. Te quiero mucho y de todo corazón Gracias.

- **Jorge y Esmeralda**, los quiero mucho y gracias porque están siempre conmigo, espero que siempre estemos juntos, gracias por tener a mi **Leislí**, que con su sonrisa alegra mi vida, te quiero mucho.

A mi **Bolis**, gracias abuelita porque siempre estas al pendiente de mi y porque me da gusto poder compartir contigo este logro. Te quiero mucho

A ti **Victor**, gracias por tu paciencia y comprensión, de no haber tenido tu apoyo y amor incondicional no hubiera podido lograrlo. Gracias porque no me dejaste desistir, siempre me

alentaste y hoy este es el resultado. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos. Te amo mucho bebé.

**Mimi**, de corazón gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas, por estar conmigo en las buenas y en las malas, más que una tía eres una gran amiga y te quiero mucho.

A todos mis **tíos y primos** gracias porque sé que siempre vamos a estar juntos y nos une un cariño muy especial, a todos los quiero muchísimo.

**Paola** más que una amiga eres como una hermana para mí, gracias por apoyarme, escucharme entenderme y darme la oportunidad de conocer lo que es la verdadera amistad. Te quiero mucho y espero que siempre estemos juntas.

**Valeria y Vero**, estoy segura que no hubiera sido lo mismo sin ustedes, las quiero mucho y espero conservar esta amistad. A ti Vale, gracias por tu apoyo, por estar conmigo en momentos difíciles y por hacerme reír cada vez que hacía falta. A ti Vero gracias por saber escucharme y aconsejarme, no cabe duda que las tres "V" somos únicas.

**Karla**, compartimos muchas cosas en la carrera y después en el laboratorio, gracias por todos esos momentos, disfrute mucho las largas pláticas que teníamos, gracias.

**Vane**, gracias porque le das un toque de alegría y compañerismo al laboratorio que nunca voy a olvidar, aprendí muchas cosas de ti, gracias por toda tu ayuda para la realización de este proyecto.

A todos los amigos de la Facultad, en especial a **Erika, Eric, Juan, Marco, Lety, Pedro, Pancho, Liz, Ginori, Quique** y todos los que estuvieron conmigo durante la carrera, gracias porque sin ustedes la facultad no es lo mismo, siempre recordaré todos los buenos detalles conmigo. Gracias.

E

---

De todo corazón quiero agradecerle a la Doctora Bernal el haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto, fue una gran experiencia. Gracias por todas sus enseñanzas, su ayuda, su dedicación y motivación en momentos difíciles, pero sobretodo gracias porque cada uno de sus consejos contribuyó a mi formación.

A mi asesora técnica M. en C. Adriana C. gracias por compartir conmigo tus conocimientos, por tu paciencia, dedicación y ayuda para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado designado para la revisión de esta tesis, por sus comentarios y correcciones oportunas que permitieron mejorar la versión final de este proyecto.

Quiero agradecer al Dr. Aquiles Carballo C. del Instituto de Recursos Genéticos del Colegio de Posgraduados por habernos proporcionado la semilla de los cultivares HS2 y A6, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mi segunda casa porque nunca voy a olvidar lo que se siente tomar clase en tus salones, el trabajar en uno de tus laboratorios, el ambiente, el paseo por los pasillos de la Facultad, comer en los jardines, en fin me siento orgullosa de pertenecer a la mejor Universidad. Gracias UNAM porque eres un capítulo muy importante en mi vida y en mi formación.

f

---

---

## ÍNDICE

---

---

	Página
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	5
El Maíz .....	5
El Envejecimiento .....	8
La Germinación .....	10
La Mitocondria .....	14
Cadena Mitocondrial de Transporte de Electrones .....	16
Especies Reactivas de Oxígeno .....	20
La Oxidasa Alterna .....	22
OBJETIVOS .....	24
HIPÓTESIS .....	25
METODOLOGÍA .....	26
Envejecimiento de las semillas .....	26
Obtención del material biológico .....	27
Aislamiento y purificación de las mitocondrias .....	28
Determinación de proteína .....	30
Determinación de la actividad de Cadena Transportadora de electrones y de Oxidasa Alterna .....	31



RESULTADOS .....	37
Caracterización de la Fracción Mitocondrial .....	37
Determinación de la Actividad de la Oxidasa Alterna .....	41
Determinación de la sensibilidad al envejecimiento de los diferentes cultivares ..	43
Efecto del almacenamiento inadecuado en la actividad respiratoria de diferentes cultivares de maíz .....	48
DISCUSIÓN .....	57
CONCLUSIONES .....	62
REFERENCIAS .....	64

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

	Página
Figura 1. Planta de maíz madura .....	8
Figura 2. Esquema de una semilla fresca y una envejecida .....	10
Figura 3. Corte transversal de una semilla de maíz .....	12
Figura 4. Esquema de la mitocondria .....	16
Figura 5. Esquema de la cadena transportadora de electrones .....	20
Figura 6. Curva de sobrevivencia .....	27, 45
Figura 7. Semilla germinada mostrando el mesocotilo .....	28
Figura 8. Gradientes de Percoll mostrando la localización de las mitocondrias .....	30
Figura 9. Trazo de consumo de oxígeno .....	35
Figura 10. Cálculo de oxígeno consumido .....	35
Figura 11. Efecto del Piruvato y DTT en la actividad de la oxidasa alterna, utilizando diferentes sustratos .....	44
Figura 12. Efecto del almacenamiento sobre la viabilidad y el vigor .....	47
Figura 13. Actividad Respiratoria de semillas almacenadas .....	49
Figura 14. Pérdida de la capacidad respiratoria durante el almacenamiento .....	52
Figura 15. Actividad de la Cadena Transportadora de Electrones y de la Oxidasa Alterna en semillas con diferente vigor .....	55
Figura 16. Actividad de la Cadena Transportadora de Electrones y de la Oxidasa Alterna en semillas con diferente viabilidad .....	56

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

---

Página

Tabla 1. Respiración total en presencia de ADP utilizando diversos sustratos .....	38
Tabla 2. Efecto de la incubación con ADP en el aislamiento y purificación de las mitocondrias .....	39
Tabla 3. Respiración en presencia y ausencia de NPG (inhibidor de Oxidasa Alterna) .....	40
Tabla 4. Integridad mitocondrial .....	42
Tabla 5. Valor de $P_{50}$ para los diferentes cultivares .....	45
Tabla 6. Consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones y Oxidasa Alterna del cultivar T100 .....	50
Tabla 7. Consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones y Oxidasa Alterna del cultivar HS2 .....	50
Tabla 8. Consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones y Oxidasa Alterna del cultivar A6 .....	51
Tabla 9. Consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones y Oxidasa Alterna del cultivar CQO .....	51
Tabla 10. Velocidad de pérdida de la actividad de las vías de consumo de oxígeno .....	54

J

---

---

## ABREVIATURAS

---

---

ADP.	Adenosina Difosfato
ATP.	Adenosina Trifosfato
BSA.	Albúmina Sérica Bovina
COX	Citocromo Oxidasa
CQO.	Chalqueño
C.R.	Cociente Respiratorio
C.T.E.	Cadena Transportadora de Electrones
DTT.	$C_4H_{10}O_2S_2$ DL-Ditiotreitól
ERO.	Especies Reactivas de Oxígeno
KCN.	Cianuro de potasio
$KH_2PO_4$	Fosfato diácido de potasio
KME	Buffer de reacción (Cloruro de Potasio, MOPS y EGTA a pH=7.5)
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
NADH.	Nicotinamida adenina dinucleótido
NPG.	n-propil galato
O.X.A.	Oxidasa Alterna
Pir.	Piruvato (ácido pirúvico)
PVP-40T	Polvivinil pirrolidona
SHAM	Ácido Salicilhidroxámico
SHE	Buffer de aislamiento (Sacarosa, HEPES y EGTA a pH=7.3)

---

## RESUMEN

---

El maíz junto con otros cereales son importantes para la dieta de gran parte de la población del mundo. En México la producción doméstica no es suficiente por lo que tenemos la necesidad de importar grandes cantidades de estos cereales y almacenarlos por períodos muy prolongados, sin embargo debido a la falta de infraestructura agrícola del país, el almacenamiento generalmente se realiza en condiciones desfavorables, refiriéndonos a éstas como temperatura y humedad relativas elevadas. Este almacenamiento inadecuado trae consigo diferentes alteraciones fisiológicas de la semilla. Especialmente en cuanto a la pérdida de vigor y viabilidad. Se ha reportado que diferentes cultivares de maíz presentan diferente tendencia a envejecer en almacén.

Por otro lado, diversos estudios indican que el envejecimiento de las semillas está asociado a procesos oxidativos en los que intervienen especies reactivas de oxígeno, entre las que se encuentran el radical superóxido.

En las plantas se ha encontrado que en la mitocondria, hay dos vías de consumo de oxígeno, la vía de los citocromos y la de la oxidasa alterna. Esta última tiene como función limitar la producción de los radicales superóxido.

En contraste la inhibición de los transportadores de electrones mitocondriales incrementan la producción del radical superóxido.

Por lo anterior en este trabajo se hipotetizó que la sensibilidad de las semillas al envejecimiento en condiciones de almacenamiento adverso se deben a la velocidad con que se inhibía la actividad de estas vías.

Por lo que el objetivo que nos planteamos en este trabajo fue el determinar la posible relación entre la sensibilidad al envejecimiento de los diferentes cultivares y la funcionalidad respiratoria de la mitocondria en semillas de maíz.

Para lograr este objetivo, se cuantificaron las actividades de estas dos vías de consumo de oxígeno a diferentes tiempos de almacenamiento, para así saber como es que van decreciendo estas actividades y ver el efecto del almacenamiento inadecuado sobre la funcionalidad de la mitocondria.

Los cultivares con los que trabajamos presentaron una sensibilidad contrastante al envejecimiento, la actividad de la oxidasa alterna y de la citocromo oxidasa son cultivar dependientes, estas actividades disminuyeron a diferentes velocidades conforme pasa el tiempo de almacenamiento.

Es importante destacar la participación de los diferentes mecanismos que intervienen en la diferente sensibilidad al envejecimiento de los cultivares como son; la capacidad de la oxidasa alterna, la capacidad de la citocromo oxidasa, el sistema enzimático antioxidante y la velocidad de producción de radicales superóxido de cada cultivar. Con esto podemos decir que esta sensibilidad es dependiente de todo un conjunto de factores y de como se regulan entre ellos.

---

---

## INTRODUCCIÓN

---

---

La mitocondria constituye la principal fuente celular de radicales superóxido (Maxwell, et.al., 1999). Este anión es un subproducto de la respiración que se realiza en la cadena mitocondrial de los citocromos. El radical superóxido es un oxidante fuerte y por tanto capaz de oxidar a las diversas macromoléculas, resultando en la pérdida de función celular. Para contender con este efecto deletéreo, los organismos aeróbicos han desarrollado una serie de mecanismos enzimáticos y químicos, los cuales inactivan al radical superóxido. Entre los primeros se encuentra la superóxido dismutasa, la peroxidasa y las catalasas. Entre los antioxidantes químicos se encuentran el  $\alpha$ -tocoferol y el glutatión (Scandalios, 1993).

Las plantas además de las defensas antioxidantes ya mencionadas poseen un mecanismo adicional para contender contra este radical fuertemente oxidante. Este mecanismo lo constituye la oxidasa alterna, enzima localizada en la membrana interna mitocondrial y cuya función es la de evitar la formación del radical superóxido (Maxwell, et.al., 1999).

El equilibrio entre la producción y apagamiento del radical superóxido se pierde cuando los organismos son sometidos a estímulos estresantes como el envejecimiento (Camacho, 2000).

Después de la cosecha, las semillas son almacenadas por diversos períodos antes de su utilización. Durante este almacenamiento, las características que determinan su uso como insumo agrícola, vigor y viabilidad, disminuye o se pierde. El tiempo en el cual se realiza

esta disminución y/o pérdida depende de las condiciones del almacén especialmente humedad y temperatura, entre más altas son estas menor tiempo de almacenamiento requieren las semillas para perder su vigor y viabilidad (Buchvarov y Gantcheff, 1984).

En trabajos previos (Camacho, 1999) se ha reportado que la sensibilidad al envejecimiento, período de almacenamiento que tarda la semilla en perder su vigor y viabilidad, se asocia con la velocidad de producción de radicales superóxido. Pero no con las actividades de las enzimas que detoxifican el anión superóxido, por lo que se ha sugerido que las diferencias podrían deberse a que la actividad y/o estabilidad en condiciones de almacén de la oxidasa alterna, enzima que impide la formación del superóxido y/o de la cadena de citocromos que promueve la formación del radical superóxido, es diferente entre los cultivares.

Con la finalidad de explorar esta posibilidad en este trabajo se cuantificó la actividad de la vía de los citocromos y de la oxidasa alterna en cultivares de maíz con diferente sensibilidad al envejecimiento. Los resultados indican que conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, el envejecimiento de la semilla provoca una disminución en la actividad de estas vías. Sin embargo, en nuestro trabajo se observó que la sensibilidad al envejecimiento estuvo asociada a la velocidad con que se pierde la actividad de la oxidasa alterna.



---

---

## ANTECEDENTES

---

---

### **EL MAÍZ:**

El maíz constituye un producto agrícola de importancia estratégica a nivel mundial, debido a su utilización como alimento y como materia prima para la fabricación de diversos productos industriales. En las zonas rurales de México, el maíz junto con el frijol constituye la base de la dieta del individuo. Para su consumo, el maíz se prepara en forma de tortillas, tamales, pozole, pinole (tostado y pulverizado), atole, roscas, esquite (tostado, sin moler), entre otras (Arias, 1987).

En algunas regiones, como los andes, el maíz se utiliza para preparar una bebida fermentada, semejante a la cerveza, a la cual se le conoce como *chicha*.

Desde el punto de vista industrial los constituyentes más importantes del grano son el almidón del endospermo y el aceite almacenado en el embrión. El almidón se utiliza en: el lavado de ropa, en la cocina como espesante de diversos platillos; para preparar pastas adherentes y mucílagos, que se utilizan en los sellos de correos y en las solapas de los sobres. El aceite extraído de los embriones germinados de la semilla se utilizan como alimento y también en la fabricación de barnices, pinturas, cauchos artificiales y jabones (Arias, 1987).

Los principales países productores de maíz son: E.U., China, Brasil, México, Francia, Yugoslavia, Rumania, Italia, Sudáfrica y Argentina (Maarten y Sadava, 1994). En Estados Unidos el maíz se cultiva para alimento pecuario y en escala gigantesca, su producción anual es superior a 100 millones de toneladas (Se reportaron 605 mill. de toneladas en el

2001) y su valor es varias veces mayor que el de la producción anual de oro y plata en todo el mundo (Maarten y Sadava, 1994).

El maíz se puede recolectar de distintas maneras, se pueden colectar a mano, como en los países emergentes o con máquinas, como en los países desarrollados, y se almacenan en graneros. Estos son locales sombreados especialmente contruidos y ventilados para permitir la continuación del proceso de secamiento y para proteger el maíz de la humedad y de los roedores (Gutiérrez, 1992).

Desde los primeros tiempos del cultivo del maíz en América, los indios pusieron especial cuidado en la selección de las mazorcas destinadas a sembrar en la siguiente temporada. La continuada selección originó muchas variedades y razas nuevas, estas fueron seleccionadas conforme a su adaptabilidad a diferentes suelos y climas (Gutiérrez, 1992).

En 1905 los fitomejoradores, en los E.U.A., observaron que cuando el polen de una planta de maíz fecundaba las mazorcas de la misma mata los granos así originados producían una gran variedad de plantas distintas; algunas eran muy pobres, mientras que otras presentaban caracteres aceptables. Con la repetición de este proceso, y guardando sólo las mejores plantas como semillas para cada raza, se obtuvieron líneas puras. Pero dichas razas producían menos que las plantas originarias. Esto parecía hacer poco deseables las nuevas variedades, se vio también que cuando las mencionadas líneas puras se polinizaban en forma cruzada con otras, los granos así producidos con frecuencia daban plantas híbridas más productivas (Limpton y Longhurst). En algunos casos estos híbridos eran mejores, no solo en cuanto a resistencia a enfermedades y robustez de las cañas, sino que también daban un rendimiento más alto que las viejas variedades que habían servido para seleccionarias. Así pues, purificando primero y escogiendo las características

más convenientes de las antiguas variedades y luego recombinando éstas, se crearon las nuevas variedades superiores de maíz (Tribe. D., 1987).

Antes del descubrimiento de América, los indios plantaban maíz en forma muy simple; echaban las semillas en un agujero, las espolvoreaban con ceniza de madera, añadían un pescado muerto como fertilizante y cubrían las semillas con la tierra. Actualmente las variedades perfeccionadas de maíz requieren un suelo arcilloso de buen desagüe y cálido. El tiempo de desarrollo varía desde dos a siete meses. El clima ideal del maíz es con mucho sol, frecuentes lluvias durante los meses de verano, noches cálidas y humedad elevada. El maíz es realmente un producto tropical. Excesivas lluvias lo perjudican. Después de que el maíz emerge de los campos debe mantenerse el suelo libre de malezas e insectos (Güemes et.al., 1990).

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas. La planta alcanza de medio metro a seis metros de alto. Las hojas forman una larga vaina íntimamente arrollada al tallo y un limbo más ancho, alargado y flexible. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias muy densas o mazorcas. En cada mazorca se ven las filas de granos, cuyo número puede variar de ocho a treinta. A cada grano le corresponde un largo hilo sedoso que sobresale por el extremo de la mazorca (Figura 1) (Arias,1987).

Debido a que la producción del maíz es muy grande, muchas veces es necesario almacenarlo por periodos prolongados y si no se hace en condiciones adecuadas de temperatura y humedad relativa, entonces comienza a haber un deterioro en la semilla que se conoce como envejecimiento y que puede provocar pérdidas muy grandes de la producción anual (Güemes et.al.,1990).



Figura 1. Planta de maíz madura ([www.cnmaiz.com.mx](http://www.cnmaiz.com.mx)).

### **EL ENVEJECIMIENTO:**

El envejecimiento es considerado un proceso degenerativo, no regulado y determinado principalmente por factores externos. La muerte o pérdida de viabilidad no es la única ni la principal consecuencia del envejecimiento (Noodén, 1988, Smith y Berjak, 1995).

El envejecimiento se define como la disminución de la viabilidad y del vigor (velocidad de germinación, crecimiento de la plántula, desarrollo de la plántula, entre otras.) de las semillas, aunque el o los mecanismos por los cuales las semillas envejecen cuando son almacenadas no se han dilucidado, se sabe que la velocidad con la que el fenómeno se establece depende de diversos factores ambientales, como la temperatura, la humedad y la presencia de oxígeno (Vertucci 1992, Smith y Berjak 1995, Noodén 1988). En la Figura 2 se esquematiza esta relación.

El envejecimiento causa diferentes alteraciones bioquímicas en la semilla, entre las de mayor interés tenemos:

1. Cuando las semillas son ricas en lípidos tienden a tener una mayor sensibilidad al envejecimiento, esto por que hay una **susceptibilidad de los lípidos a oxidarse** y esta susceptibilidad aumenta de acuerdo a la temperatura y humedad relativa en la que se almacenan las semillas (Priestley, 1986).
2. Se ha demostrado que durante el envejecimiento se presenta una **disminución de azúcares** en semillas de maíz y soya. En cultivares de maíz con similar calidad inicial y diferente sensibilidad al envejecimiento se ha observado acumulación de monosacáridos y una disminución significativa de rafinosa y sacarosa (Bernal-Lugo y Leopold, 1992).
3. Se ha sugerido que durante el envejecimiento en el almacén se promueven **entrecruzamientos y proteólisis**, modificando la estructura **de las proteínas** y en el caso de las enzimas su actividad. Por ejemplo aquellas enzimas que participan en la movilización de reservas como la amilasa, puede traer consecuencias en la germinación como son una disminución de la misma (Ching y Schoolcraft, 1968).
4. Se ha demostrado que en semillas deterioradas o envejecidas la actividad de **enzimas antioxidantes** como la superóxido dismutasa (SOD), la peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT) es extremadamente baja (Nandi, et.al.,1997).
5. En estudios donde se han evaluado los efectos del envejecimiento sobre el metabolismo respiratorio, se ha encontrado una **disminución en la actividad de la cadena respiratoria sensible a cianuro** (Abdul-Baki, 1980) debida

- principalmente a una reducción de la actividad mitocondrial (Woodstock, et.al., 1984) y a un incremento en el transporte de electrones a través de vía de la oxidasa alterna, insensible al cianuro (Leopold y Musgrave, 1980).
6. Existe también una **pérdida de la integridad mitocondrial** que se refleja en la alteración de la estructura y funcionalidad de las mitocondrias (Stewart y Bewley, 1980, Noodén, 1988).
  7. Durante el almacenamiento prolongado se lleva a cabo la **inactivación de inhibidores de ADNasas** que pueden entonces degradar el DNA de la semilla.

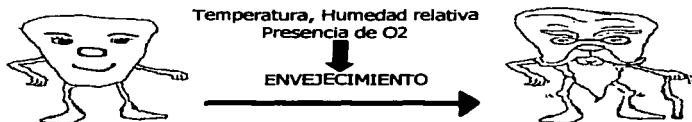


Figura 2. **Esquema de una semilla fresca y otra envejecida.** El envejecimiento se da por condiciones no adecuadas de temperatura, humedad relativa y por la presencia de oxígeno durante el almacenamiento.

### **LA GERMINACIÓN:**

En la semilla de maíz se distinguen dos regiones la del endospermo y la del embrión (Figura 3). El endospermo, contiene el material de reserva de la semilla constituido

principalmente por almidón (50-70%) y proteína (10%). El embrión comprende la plántula en miniatura y el escutelo. Este último contiene como reserva de utilización inmediata en la germinación, a los aceites (5%) y a los oligosacáridos (1-4%). Debido a su composición química, la semilla de maíz constituye una importante fuente de carbohidratos, proteínas y grasas para consumo humano o de animales domésticos y son una fuente significativa de minerales, vitaminas y fibra (Maarten y Sadava, 1994).

La germinación se ha definido de diversas formas. Bioquímicamente la germinación se define como la serie de eventos moleculares que anteceden y preparan la primera ronda de la división celular.

Fisiológicamente se define como la combinación de eventos que activan el crecimiento de un embrión deshidratado con un metabolismo casi nulo a un embrión con un metabolismo activo y vigoroso y que culmina en la protrusión de la radícula. En sentido estricto no incluye el crecimiento de la plántula, el cual es una consecuencia del término de la germinación (Bewley y Black, 1994).

Los agrónomos definen a la germinación como los procesos de desarrollo y emergencia de aquellas estructuras provenientes del embrión, manifestando así la capacidad de las semillas para formar una plántula normal bajo condiciones favorables (Maarten y Sadava, 1994).

La definición más completa y en la que nos basaremos es la que nos dice que; la Germinación comienza con la entrada de agua a la semilla (imbibición) y termina con la iniciación de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Este proceso incluye la hidratación de las proteínas cambios estructurales subcelulares, síntesis de





A medida que la semilla se hidrata su metabolismo se activa. El nivel de esta actividad metabólica se evalúa por el grado de respiración de la semilla, es por eso que el patrón de respiración de la semilla durante la germinación es un patrón caracterizado por 3 fases similar al patrón de hidratación (Bewley y Black, 1994).

1. En la primera fase, se incrementa el consumo de oxígeno, debido a la hidratación y activación de enzimas mitocondriales que funcionan en el ciclo del ácido cítrico y en el transporte de electrones.
2. En la segunda fase, el consumo de oxígeno se estabiliza debido posiblemente a que en este período puede haber una reducción en los procesos metabólicos necesarios para la germinación que preparan al embrión para el crecimiento celular, es en este momento cuando las semillas se han hidratado completamente y las enzimas existentes se activan. Entre esta fase y la tercera es cuando emerge la radícula.
3. La tercera fase se caracteriza por un nuevo incremento en el consumo de oxígeno, el cual es atribuido a un incremento en la actividad de las enzimas mitocondriales respiratorias (Bewley y Black, 1994).

El consumo de oxígeno esta acoplado al mismo tiempo con la producción de ATP, que proporciona la energía necesaria para que se inicien otros procesos metabólicos de la germinación como la síntesis de DNA, RNA y las proteínas.

Se ha reportado que la síntesis del DNA es un evento que se inicia en tiempos tempranos de la germinación y hay síntesis temprana de DNA de tipo reparativo (Ortega, 1988), la cual tiene como fin sustituir el DNA dañado durante la maduración, deshidratación y almacenamiento de las semillas (Vázquez-Ramos y Osborne, 1986). La síntesis replicativa

del DNA es un evento tardío que se inicia alrededor de las 14 horas, alcanzando su máximo valor a las 40 horas de iniciada la germinación (Baíza et.al., 1989).

La transición del desarrollo de la germinación necesita fundamentalmente de cambios en la expresión genética. Todos los estados de expresión de los genes que codifican para proteínas de reserva y para enzimas que están involucradas en la síntesis de material de reserva durante la maduración de la semilla y otras actividades afines tienen que estar apagados, mientras que los genes que codifican para enzimas involucradas en la germinación, iniciación del crecimiento y la subsecuente movilización de reservas deben ser activados. Esto es más o menos lo que ocurre durante la síntesis del RNA (Bewley y Black, 1994).

En semillas de maíz una vez que el metabolismo de la germinación se activa con la entrada de agua, ocurre también la síntesis de proteínas, la cual se incrementa de forma progresiva conforme avanza la germinación.

En un estado más avanzado de la germinación se inicia la división celular. En el maíz se ha demostrado que las células de mesocotilo son las primeras que sufren división celular, lo cual ocurre a las 28 horas de imbibición (Baíza et.al., 1986).

### **LA MITOCONDRIA:**

Las mitocondrias son cuerpos cuyo tamaño fluctúa entre 0.2 y 5  $\mu\text{m}$ , y cuya forma es variable: filamentos, bastoncillos o esferas. La forma más conocida de las mitocondrias es la que se muestra en la figura 4. Su número varía de unas pocas a más de un millar por

célula. Este organelo contiene numerosas invaginaciones en el interior de la membrana llamadas crestas (Voet y Voet, 1995).

La mitocondria es el sitio donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo eucariótico, se ha demostrado que este organelo contiene enzimas (que regulan las reacciones que aquí se llevan a cabo), como la piruvato deshidrogenasa, enzimas del ciclo del ácido cítrico, enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos, enzimas y proteínas que participan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, además de que proporciona energía en forma de ATP necesaria para que se lleve a cabo el proceso de la germinación (Voet y Voet, 1995).

Las mitocondrias se pueden aislar y purificar. El tejido se homogeniza y las mitocondrias se aíslan por centrifugación diferencial y se purifican en gradientes de percoll (Lehninger et. al.,1993).

La mitocondria está formada por dos membranas (membrana mitocondrial externa e interna) que la protegen y que son de gran importancia para todas las funciones que se llevan a cabo dentro de la mitocondria.

La membrana mitocondrial externa es fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones. La membrana interna es impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón ( $H^+$ ). Las únicas especies que cruzan la membrana interna son aquellas para las que existen proteínas transportadoras específicas. Esta membrana aloja a los componentes de la cadena respiratoria y el complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP (Lehninger et. al.,1993).

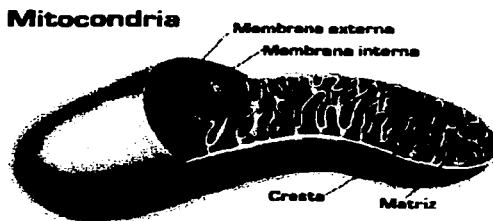


Figura 4. **Esquema de la mitocondria**, se señala únicamente las partes principales como son las membranas: interna y externa, la matriz mitocondrial y las crestas ([www.forest.ula.ve](http://www.forest.ula.ve)).

La membrana interna de una sola mitocondria puede tener más de 10,000 conjuntos de sistemas de transferencia de electrones (cadenas respiratorias) y de moléculas de ATP sintasa, distribuidas por toda la superficie de la membrana interna (Lehninger et al., 1993). Las mitocondrias son el principal sitio para el transporte de electrones y el consumo de oxígeno en los tejidos vegetales heterotróficos (Purvis, 1997).

#### **CADENA MITOCONDRIAL DE TRANSPORTE DE ELECTRONES:**

Esta cadena consta de una serie de transportadores electrónicos, la mayoría proteínas integrales de membrana, con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar 1 o 2 electrones. Cada componente de la cadena puede aceptar electrones del transportador precedente y transferirlos al siguiente en una secuencia específica.

El NAD y las flavoproteínas funcionan como transportadores de electrones al igual que otros grupos como son: La benzoquinona hidrofóbica (ubiquinona) y 2 tipos diferentes de proteínas con hierro (citocromos y proteínas ferro-sulfuradas) (Lehninger et. al.,1993).

La Ubiquinona o coenzima Q, o sencillamente UQ es una benzoquinona liposoluble que transporta electrones en cadenas de transferencia de electrones asociadas a membranas. La ubiquinona puede aceptar un electrón transformándose en el radical semiquinona (UQH<sup>-</sup>) o 2 electrones formado Ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) (Voet y Voet, 1995).

Los citocromos son proteínas acarreadoras de electrones, contienen hierro, situadas en la membrana mitocondrial interna. Existen tres clases de citocromos que se distinguen por sus diferencias en su espectro de absorción de la luz y que se designan a, b y c.

Los citocromos de los tipos a y b son proteínas integrales de membrana. Mientras que el citocromo c es una proteína soluble que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la parte exterior de la membrana mitocondrial interna, tiene un tamaño pequeño de 104 residuos de aminoácidos (Voet y Voet, 1995).

En la reacción global catalizada por la cadena respiratoria mitocondrial se transportan electrones, desde el NADH, el succinato u otro dador electrónico primario, a través de las flavoproteínas, ubiquinona y citocromos (casi todos los cuales están incrustados en la membrana interna) y finalmente al oxígeno (Lehninger et. al.,1993).

Los complejos I y II catalizan la transferencia a la ubiquinona a partir de dos dadores electrónicos diferentes: NADH (complejo I) y succinato (Complejo II). El complejo III transporta electrones desde la ubiquinona al citocromo c y el complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el citocromo c al oxígeno (Lehninger et.

al.,1993). Un esquema general de la cadena transportadora de electrones se muestra en la Figura 5.

A continuación se describirán las características de cada uno de los componentes de la cadena respiratoria de acuerdo a diversos libros de bioquímica (Lehninger, et.al., 1993, Voet y Voet,1995).

#### COMPLEJO I: NADH a Ubiquinona

También llamado NADH deshidrogenasa, es un enorme complejo de flavoproteína que contiene más de 25 cadenas polipeptídicas. Todo el complejo está incrustado en la membrana mitocondrial interna y éste está orientado de modo que su sitio de fijación de NADH mira hacia la matriz para poder interactuar con el NADH producido por cualquiera de las diversas deshidrogenasas de la matriz.

Algunos de los inhibidores de la actividad deshidrogenasa de este complejo son: amital, rotenona, piericidina A.

El ubiquinol (forma reducida de UQ) se difunde en la membrana desde el complejo I al complejo III, en donde se oxida a UQ. El flujo de electrones a través del complejo I a la ubiquinona y al complejo III va acompañado del movimiento de protones desde la matriz mitocondrial al lado exterior (citósol) de la membrana mitocondrial interna (espacio intermembranal).

#### COMPLEJO II: Succinato a Ubiquinona

También llamado Succinato deshidrogenasa, es la única enzima del ciclo del ácido cítrico ligada a la membrana. Es un complejo más pequeño y sencillo que el complejo I, contiene dos tipos de grupos prostéticos y al menos cuatro proteínas diferentes.

Otros sustratos de las deshidrogenasas mitocondriales también pasan electrones a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona, pero no a través del complejo II.

#### COMPLEJO III: Ubiquinona a Citocromo C

También llamado complejo  $bc_1$  o ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa. Este complejo funciona como una bomba de protones, debido a la orientación asimétrica del complejo, los protones producidos cuando se oxida el  $UQH_2$  a UQ se liberan al espacio intermembrana produciendo un gradiente de protones, que después será empleado para la producción del ATP.

#### COMPLEJO IV: Reducción del Oxígeno

También llamado citocromo oxidasa, contiene citocromos  $a$  y  $a_3$ . Formados por dos grupos hemo unidos a diferentes regiones de la misma proteína. La citocromo oxidasa también contiene dos iones cobre que son de gran importancia para la transferencia de electrones al oxígeno. Este complejo ha evolucionado para llevar a cabo la reducción del oxígeno con cuatro electrones sin generar intermediarios incompletamente reducidos como el peróxido, el radical superóxido o radicales hidroxilo libres ya que son especies muy reactivas que dañarían los componentes celulares.

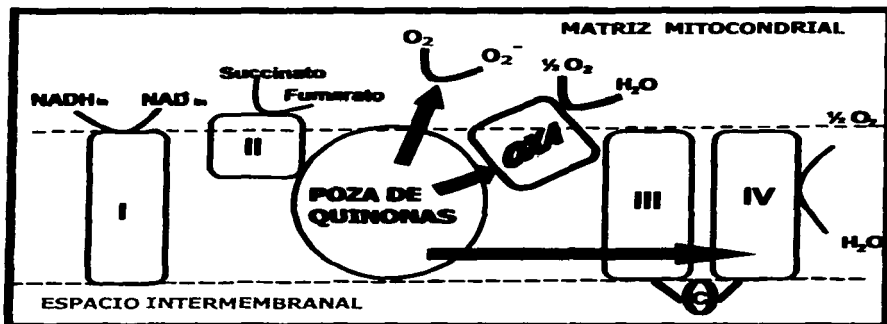


Figura 5. Esquema de la cadena transportadora de electrones. En el diagrama se señala donde se encuentra la matriz mitocondrial y el espacio intermembranal. Los complejos I, II, III y IV que forman parte importante de la cadena transportadora de electrones. La letra c es el citocromo c y las flechas negras nos indican las vías hacia donde se pueden dirigir los electrones. El recuadro morado indica en donde está localizada la Oxidasa Alternativa (OXA). La producción de radicales superóxido está señalada con rojo y a nivel de la poza de quinonas es donde se lleva a cabo la mayor producción de estos radicales.

### ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO):

Todos los organismos aeróbicos producen cierta cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO) como son, el radical superóxido ( $-O_2^{\cdot}$ ), el radical hidroxilo ( $-OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), esto durante el curso del proceso metabólico normal. Si estos radicales no son removidos efectiva y rápidamente de la célula, pueden causar daños a las macromoléculas y posiblemente la muerte celular. Sin embargo, existen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos que protegen a la célula de estas especies que son



altamente reactivas y tóxicas. Dentro de estos mecanismos están los antioxidantes como el ascorbato y el glutatión; enzimas que apagan a las ERO como la superóxido dismutasa, catalasa y la peroxidasa (Maxwell, et.al., 1999).

El radical superóxido se produce por la adición de un electrón a una molécula de oxígeno (Figura 5). La adición de otro electrón y dos protones genera el  $H_2O_2$ , muchas veces esto se acelera por la acción de la superóxido dismutasa, los radicales superóxido son producidos como un subproducto durante la respiración mitocondrial. El sitio de mayor producción de radicales superóxido a lo largo de la cadena respiratoria es la poza de quinonas. Además la adición de inhibidores como Antimicina A que bloquea al complejo III de la cadena transportadora de electrones provoca una producción excesiva de estos radicales, ya que impide el flujo normal de los electrones y estos comienzan a acumularse (Maxwell, et.al., 1999).

Se ha comprobado que durante el envejecimiento en el almacén de las semillas, se acumulan radicales superóxido, principalmente en los ejes embrionarios (Buchvarov y Gantcheff, 1984).

Las mitocondrias de las plantas a nivel de la poza de quinonas poseen una oxidasa que funciona como una vía alterna para el flujo de los electrones y por tanto puede regular la producción de radicales superóxido (Buchvarov y Gantcheff, 1984).

### **LA OXIDASA ALTERNA:**

La oxidasa alterna es un dímero con un peso molecular de alrededor de 64 kD, es resistente al cianuro y se ha encontrado en todas las células vegetales así como en algunas levaduras, hongos y protozoarios (Lambers, 1997).

La Oxidasa Alterna está localizada en la cadena transportadora de electrones al nivel de la poza de quinonas (Figura 5) y se dice que junto con la vía de la citocromo oxidasa forman la cadena de transporte de electrones.

La transferencia de electrones a través de la vía de la citocromo oxidasa está acoplada a la síntesis de ATP y es inhibida por cianuro. Mientras que el flujo de electrones de la ubiquinona a través de la vía alterna no está acoplado a la producción de ATP y no es inhibida por cianuro, pero se inhibe por n-propil galato (NPG) y ácido salicilhidroxámico (SHAM).

La activación de la vía de la oxidasa alterna ocurre cuando la actividad de la vía de la citocromo oxidasa es restringida, esto es cuando se adicionan inhibidores tanto del complejo III como del complejo IV (citocromo oxidasa) o bien cuando la cantidad de electrones que entran en la cadena es excesiva provocando una saturación de la vía de la citocromo oxidasa (Lambers, 1997).

Se ha demostrado que una de las funciones de la vía alterna es la de disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno producidas durante el transporte de electrones en la respiración, la oxidasa alterna juega un papel muy importante en la disminución de radicales superóxido formados en las células vegetales (Purvis, 1997).

Estudios realizados con plantas transgénicas han demostrado que la oxidasa alterna no tiene ningún efecto significativo en el crecimiento de las plantas, a excepción de los casos

en los que las plantas han sido tratadas con Antimicina A (inhibidor de la citocromo oxidasa) ya que en estos casos la oxidasa alterna es la única vía para que el oxígeno reaccione con los electrones y se lleve a cabo la respiración de la planta y de esta manera pueda crecer, sin embargo no se puede comparar con el crecimiento de una planta normal, ya que la oxidasa alterna no logra un desarrollo completo de la planta. (Maxwell, et.al., 1999)

Diferentes investigadores han observado que la vía de la oxidasa alterna del transporte de electrones en las mitocondrias reduce la producción de especies reactivas de oxígeno durante y después de la exposición de tejidos vegetales a un determinado estrés. Una de las formas de aumentar la actividad al máximo de la oxidasa alterna es con la adición de piruvato y DTT (ditiotreitól) (Purvis, 1997).

---

---

## **OBJETIVOS**

---

---

### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la posible relación entre la sensibilidad al envejecimiento de los diferentes cultivares y la funcionalidad respiratoria de la mitocondria en semillas de maíz.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Determinar la calidad de la fracción mitocondrial obtenida.
- 2.- Determinar la sensibilidad al envejecimiento de los diferentes cultivares.
- 3.- Cuantificar la velocidad de respiración de los diferentes materiales
- 4.- Observar el efecto del almacenamiento inadecuado sobre la funcionalidad mitocondrial de:
  - a) La actividad de la Cadena Transportadora de Electrones
  - b) La actividad de Oxidasa Alterna.

---

## HIPÓTESIS

---

Dado que la sensibilidad al envejecimiento de semillas de maíz se correlaciona positivamente con el nivel de radical superóxido producido por la mitocondria y la producción de este radical se regula por la actividad respiratoria de la mitocondria, entonces ésta también deberá estar asociada a la sensibilidad de las semillas al envejecimiento.

---

---

## METODOLOGÍA

---

---

### ❖ ENVEJECIMIENTO DE LAS SEMILLAS:

- Las semillas se colocaron en cajas totalmente herméticas conteniendo una solución de cloruro de sodio saturada. En la caja se colocaron rejillas en el fondo y las semillas se distribuyeron en una canastilla de plástico cuidando que no quedaran encimadas. La humedad relativa en el interior de la caja cerrada se controló al 75% debido a la solución saturada de cloruro de sodio.
- Las cajas se colocaron en cámaras de incubación a 30° C.
- Cada 15 días se realizó un muestreo de semillas y se germinaron durante siete días para así observar la viabilidad del lote.
- El procedimiento para germinar las semillas consiste en lavar las semillas con una solución de cloralex al 20% y después enjuagarlas con agua destilada hasta la completa desaparición del olor a cloro. Después se colocaron las semillas en toallas de papel de estraza previamente humedecidas y se taparon con otra toalla igual, las toallas se enrollaron y se colocaron en cajas cerradas herméticamente. La caja contiene agua, que no este en contacto con los rollitos de las semillas, para esto se colocaron unas rejillas en el fondo de la caja. Las cajas se introducen en una incubadora a 26° C, por 7 días.
- Después de este periodo se contaron las semillas germinadas y se expreso como porcentaje del total del lote ensayado. Este valor constituye la viabilidad del lote.

De esta forma mediante una curva de sobrevivencia, en la figura 6 (tiempo de almacenamiento vs. % germinación) se calculó el tiempo de almacenamiento que el lote tardó en perder el 50% de la viabilidad, este valor constituyó el  $P_{50}$ .

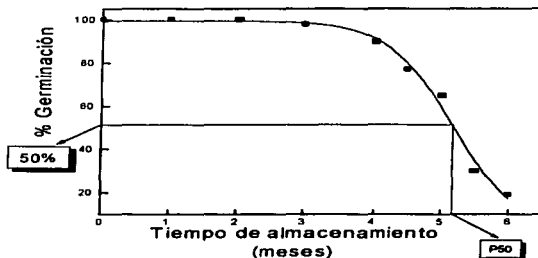


Figura 6. **Curva de sobrevivencia** (tiempo de almacenamiento vs % germinación), con esta gráfica podemos conocer la sensibilidad al envejecimiento de cada uno de los materiales con los que se trabajó, cuantificado como  $P_{50}$ . En este caso la gráfica se realizó con los datos del cultivar T100.

#### ❖ **OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO:**

- Las semillas se sumergieron en una solución de cloralex al 20% durante dos minutos para después lavarlas con agua destilada hasta que el olor a cloro desapareció.
- Las semillas se distribuyeron en hojas sanitas húmedas y se envolvieron en forma de taco se colocaron dentro de una charola con sello hermético con agua en el fondo, pero sin tener contacto con las semillas o en una cámara de germinación.

- Se pusieron a germinar en una incubadora a 26°C, en completa oscuridad por 4 días.

Después de ese tiempo se retiró el mesocotilo de las semillas germinadas, el mesocotilo es la parte intermedia entre la plántula y lo que es el embrión. Es importante que todo el material obtenido y el manejo de éste se haga a temperaturas bajas (4° C) por lo que es necesario siempre tenerlo en hielo o bien realizar la homogeneización en un cuarto frío.



Figura 7. **Semilla germinada mostrando el mesocotilo.** En esta fotografía se ve la semilla de maíz sin germinar, la misma semilla después de los cuatro días de germinación y de esta obtenemos el tejido con el que se trabajó, el mesocotilo

#### ❖ **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS:**

(Modificación de la Técnica reportada por Uribe y Moreno, 1992)

- El tejido se homogenizó con arena y una solución de SHE (Sacarosa 0.25 M, HEPES 10mM y EGTA 2mM a pH 7.3) en una relación 2 gramos por cada ml, BSA 1% (libre de ácidos grasos), se le adiciona al tejido PVP-40 a un 0.6%, cisteína (Stock 1.2 mg/ ml) 4µl por cada 10 ml de SHE.



- El homogenado se filtró a través de una gasa, para remover los residuos celulares, el filtrado se colocó en tubos de vidrio corex y se centrifugó a 1000 g, 10 minutos a 4° C.
- La pastilla se desechó ya que aquí quedaron los núcleos y residuos de tejido y la arena o los sólidos que no sirven. El sobrenadante se colocó ahora en tubos de plástico y se centrifugó a 7000 g, 10 minutos a 4° C.
- De esta centrifugación se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente con un pincel en 500  $\mu$ l de SHE + 0.5% BSA.
- Se agitaron suavemente y se dejaron incubar a 4° C, 10 minutos. Las pastillas se juntaron y se les añadieron 30 ml de SHE + cisteína en la misma proporción que la primera solución.
- Se volvieron a centrifugar a 7000 g por 10 minutos a 4° C.
- El sobrenadante se desechó y la pastilla se homogeneizó en el líquido que retiene la pastilla. Esta muestra es lo que denominamos mitocondrias crudas.
- En tubos pequeños de plástico especiales para ultracentrifuga TLX se colocaron 1.7 ml de SHE + BSA (libre de ácidos grasos) 1% y 1.3 ml de Percoll y de 20  $\mu$ l–300  $\mu$ l de la muestra por cada tubo. Esto es para que mediante gradientes de Percoll obtengamos una muestra de mitocondrias puras.
- Se centrifugaron a 30,000 rpm durante 30 minutos a 4° C, en la ultracentrifuga (Beckman Optima™ TLX Ultracentrifuga. Rotor: TLX Beckman.)
- La pastilla contiene las mitocondrias rotas, que no eran adecuadas para los experimentos que realizamos, por lo que trabajamos con la franja intermedia, una franja turbia que es donde se localizan las mitocondrias purificadas (Figura 8).

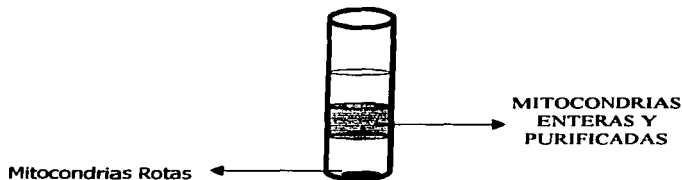


Figura 8. **Gradiente de Percoll mostrando la localización de las mitocondrias.** La banda con la que se trabajó fue la intermedia que contiene la muestra con mitocondrias enteras.

- Esta banda se extrajo con una pipeta Pasteur plástica con precaución de no jalar o mezclar las demás bandas.
- La banda se incubó 10 minutos con 100  $\mu$ l de BSA (libre de ácidos grasos) 10%.
- Se le adicionó aproximadamente 30 ml de buffer (SHE + cisteína). La cantidad de cisteína es de 4  $\mu$ l por cada 10 ml de SHE, de un stock (1.2 mg/ml).
- Se centrifugaron 15 minutos a 7000 g, a 4° C.
- El sobrenadante se desechó y la pastilla contenía las mitocondrias purificadas.
- La pastilla se resuspendió con el líquido que retuvo y el volumen de estas se cuantificó con una micropipeta, y se trasladaron a un tubo eppendorf.
- De esta manera se obtuvieron las mitocondrias enteras y purificadas.

❖ **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA:**

Técnica de Lowry, et.al., 1951:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- En tubos de ensayo se colocaron 0.5 ml de agua y 1.5 ml de solución C (solución A + solución B en una proporción 100:1). La solución A esta formada por carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.4%, tartrato de sodio 0.16% y SDS 1%. La solución B es sulfato de cobre pentahidratado al 4%.
- Al mismo tiempo se le adicionó la muestra en un volumen de 2-3  $\mu$ l.
- Se agitaron en Vortex y se dejaron en reposo por 10 minutos
- Después de este tiempo se le adicionó 150  $\mu$ l de la solución de Folin 1N (1:1 Folin 2N y agua)
- Se agitaron en Vortex y se dejaron en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Al mismo tiempo se realizó una curva patrón utilizando un stock (1mg/ml) de BSA que va de 0-100  $\mu$ l del stock.
- Se leyeron las absorbencias 660 nm en el espectrofotómetro.

❖ **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES (C.T.E.) Y DE LA OXIDASA ALTERNA (O.X.A.):**

- Este proceso se realizó en el oxímetro, el cual esta provisto de una cámara en donde se llevó a cabo el proceso de la respiración y la reacción principal que nos interesa para medir la capacidad respiratoria de la mitocondria, además cuenta con un registrador que va trazando, en un papel cuadrículado especial, como es que se lleva a cabo el consumo de oxígeno y por lo tanto la actividad de las oxidasas.

- Lo primero que realizó fue la limpieza de la cámara la cual esta provista de un electrodo sensible al oxígeno lo que permite se pueda medir la respiración o el consumo de oxígeno y de una barra magnética que mantiene en agitación constante la solución contenida en la cámara.
- Después se ajustó la puntilla del registrador a 100, para comenzar la reacción.
- Lo primero que se colocó en la cámara es el buffer de reacción que se denomina KME<sup>(1)</sup> por las siglas de sus componentes, esta buffer esta a un pH de 7.5 y se adicionó 1.6 ml.
- Una vez que se tiene el buffer de reacción se agregaron las siguientes soluciones, con una microjeringa de 25  $\mu$ l: 1.5  $\mu$ l de ATP de un stock de 300 mM, 1.9  $\mu$ l de un stock de  $MgCl_2$  1 M y 9.5  $\mu$ l de un stock de  $KH_2PO_4$  1 M.
- Estas soluciones permitieron que las mitocondrias respiraran y se sintieran en un ambiente óptimo para realizar sus funciones y al mismo tiempo realizar las mediciones de interés.
- Una vez que se colocaron las soluciones, entonces se adicionó el volumen de la muestra que corresponde a 0.500 mg de proteína.
- Se dejó agitando durante 5 minutos, después se adicionó el sustrato en este caso es Succinato 500 mM, 19  $\mu$ l.
- Al momento de que se adicionó el sustrato, se bajó la plumilla del registrador y comenzó a registrar y a correr el papel, se dejó correr 2 minutos y se agregó:

ADP	100 mM	4 $\mu$ l
-----	--------	-----------

(1) KME: KCl 120 mM, MOPS 20 mM y EGTA 1mM para 500 ml.

- Se dejó correr el papel otros dos minutos y se le adicionó:

KCN	1 M	4 $\mu$ l
-----	-----	-----------

- Se esperó a que el papel corriera aproximadamente 4 minutos y se le adicionó:

Piruvato	16.5 mg/ml	30 $\mu$ l
----------	------------	------------

DTT	15.4 mg/ml	10 $\mu$ l
-----	------------	------------

Estas dos soluciones son activadores de la oxidasa alterna, por lo que con su adición se logró ver la máxima actividad de la enzima.

- Se dejó que el papel corriera 5 minutos aproximadamente y se le adicionó:

NPG	10 mM	19 $\mu$ l.
-----	-------	-------------

Con el NPG se logró inhibir el consumo de oxígeno por parte de la oxidasa alterna.

Cada vez que se dejó que el papel corriera por un tiempo permitimos que se registrara el trazo para entonces calcular la pendiente y de esta manera saber la velocidad del consumo de oxígeno de las mitocondrias.

- La adición de todas las soluciones, nos permitió tener un medio apto para que las mitocondrias pudieran respirar y cuantificar la capacidad de las vías de la cadena transportadora de electrones. Como sustrato empleamos el succinato.
- El NPG lo empleamos para inhibir la vía de la oxidasa alterna y el KCN fue usado para inhibir la citocromo oxidasa y de esta manera poder cuantificar la actividad de las dos vías.

- Para cada uno de los trazos que obtuvimos se calculó el “cero químico” o “cero absoluto” que es el cero que registra el oxímetro cuando ya no hay oxígeno disponible dentro de la cámara de reacción. Para determinarlo, se adicionó 100  $\mu\text{g}$  de hidrosulfito de sodio al medio de reacción y se dejó correr el papel hasta que registró una línea horizontal constante.
- Un ejemplo de los trazos que se registraron en el oxímetro se presenta en la figura 9, donde podemos ver la respiración de las mitocondrias sin sustrato exógeno, el aumento de la respiración cuando se le adicionó el sustrato, luego se le adicionó el ADP pero no se logró observar un cambio en el valor de la pendiente. Cuando se le adicionó el KCN se puede ver como disminuyó la pendiente y esto es debido a que se inhibió el complejo IV de la cadena transportadora de electrones, dejando solo en funcionamiento la vía de la oxidasa alterna. Se le adicionó piruvato y DTT por lo que se activó al máximo la actividad de la oxidasa alterna. Cuando se adicionó NPG se inhibió la respiración por la vía alterna y entonces vimos la respiración residual, es decir, el consumo de oxígeno por cualquier otro tipo de oxidasa diferente de la citocromo y de la alterna, en la figura 9, lo ejemplificamos como cero.
- Una vez que obtuvimos los trazos, se calculó el valor de las pendientes y se contaron el número de cuadros del papel como se ejemplifica en la figura 10.

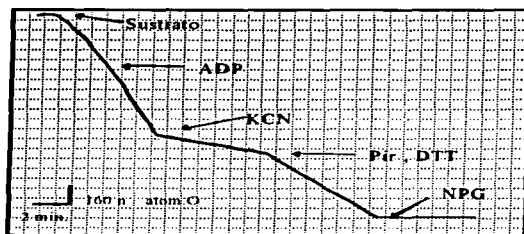


Figura 9. **Trazo de consumo de Oxígeno.** Se señala la adición de cada una de las soluciones para ver el efecto de esta sobre el consumo de oxígeno por parte de las mitocondrias. En el extremo inferior izquierdo se señala la escala del papel que nos indica la cantidad de oxígeno que se consume por cada uno de los cuadros.

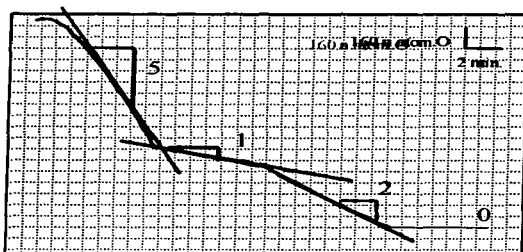


Figura 10. **Cálculo de Oxígeno consumido.** Se calculan las pendientes en cada región del trazo, las cuales y este valor se sustituye en la Ecuación 1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

$$V = \text{No. Cuadros} \left( \frac{100}{O_{\text{químico}}} \right) 6.4 \left( \frac{\text{Velocidad del papel}}{\text{mg. proteína}} \right) \quad \text{ECUACIÓN 1}$$

**DONDE:**

No. Cuadros: Son los cuadros que contamos en el trazo al sacar las pendientes.

O químico: Es el cero verdadero que alcanza el oxímetro cuando se le adiciona Hidrosulfito de sodio.

6.4: Es una constante que proviene de la saturación del agua con oxígeno.

Velocidad del papel: Se debe ajustar dependiendo del tipo de muestra que se va a medir y se da en cm/min.

mg. proteína: Cantidad de proteína de la muestra cuantificada por el método de Lowry.

- Este procedimiento se le realizó a cada uno de los materiales con los que trabajamos tanto frescos como almacenados.



---

---

## RESULTADOS

---

---

### **CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL:**

Dado que el procedimiento para aislar mitocondrias es largo y los resultados dependen en gran medida de las características funcionales de la mitocondria, lo primero que se hizo fue determinar las características funcionales de la preparación de mitocondrias purificadas. Los parámetros que deben considerarse son: cociente respiratorio, que detecta la dependencia de la respiración a la adición de ADP, integridad de la membrana externa de la mitocondria y actividad de la oxidasa alterna.

Una de las funciones de la mitocondria es la fosforilación oxidativa que resulta de la actividad conjunta de los complejos transportadores de electrones y de la ATPasa. Estas actividades se encuentran embebidas en la membrana de las mitocondrias y para su acción requieren de una fuente de poder reductor, ADP y oxígeno. Es por esto que en mitocondrias aisladas la estimulación de la respiración por la adición exógena de ADP indica que la funcionalidad de la mitocondria aislada es adecuada para estudios bioquímicos. Esta funcionalidad se expresa como cociente respiratorio e indica el número de veces que el consumo de oxígeno basal se estimuló por la adición de ADP.

Para conocer el cociente respiratorio de las mitocondrias aquí aisladas se cuantificó la respiración mitocondrial utilizando diferentes sustratos en ausencia y presencia de ADP y luego se realizó el cociente entre el consumo de oxígeno en presencia de ADP y el consumo de este gas en ausencia del dinucleótido (Tabla 1). Los sustratos utilizados para determinar el cociente respiratorio fueron: citrato, malato, mezcla de malato y glutamato,

NADH y succinato. El oxígeno consumido fue diferente para cada uno de los sustratos utilizados (Tabla1). En ausencia de ADP, la velocidad mínima de consumo de oxígeno, por las mitocondrias aisladas se registró al utilizar citrato como sustrato. El succinato como sustrato para la respiración fue cinco veces más eficiente que la de citrato y entre 1.5 a 2.5 veces respecto a los otros sustratos utilizados.

Tabla 1. Respiración total en presencia de ADP utilizando diversos sustratos, de mitocondrias aisladas de semillas de maíz HS2.

<b>Sustrato</b>	<b>Actividad respiratoria en Presencia de ADP (ngátomos O/min.mg.proteína)</b>	<b>Actividad respiratoria en Ausencia de ADP (ngátomos O/min.mg.proteína)</b>	<b>Cociente respiratorio</b>
Citrato 10 mM	85.5	61.07	1.4
Malato 10 mM	149.8	107	1.4
Malato + Glutamato 10 mM	192.1	160.08	1.2
NADH 2 mM	249.1	207.58	1.2
Succinato 10 mM	407.1	290.78	1.4

La respiración en presencia de ADP se incrementó, respecto a la registrada en su ausencia, en solo 20% cuando el sustrato respiratorio fue NADH o malato + glutamato, mientras que este incremento fue del 40% cuando se utilizaron los otros tres sustratos. Por tanto el valor del cociente respiratorio varió entre 1.2 a 1.4. Los resultados anteriores mostraron que el consumo de oxígeno fue estimulado por la adición de ADP exógeno. Sin

embargo, los valores de C.R. recomendados en la literatura para la realización de estudios bioquímicos en mitocondrias es de el orden de 2 o más (Rosignol, et al., 2000).

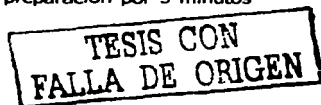
Con la finalidad de evaluar si el bajo C.R. de la preparación mitocondrial era debida al hecho de que en el procedimiento de aislamiento de las mitocondrias se incluyen dos periodos de incubación con ADP, se aislaron mitocondrias omitiendo este par de incubaciones y en esta preparación se determinó el C.R. utilizando succinato como sustrato respiratorio. Como puede observarse en la tabla 2.

Tabla 2 Efecto de la incubación con ADP en el aislamiento y purificación de las mitocondrias. En esta cuantificación se empleo succinato como sustrato y las mitocondrias son de semillas frescas del cultivar HS2

<b>Condiciones de aislamiento y purificación.</b>	<b>Respiración en ausencia de ADP</b>	<b>Respiración en presencia de ADP</b>	<b>Cociente Respiratorio</b>
Incubación con ADP	305.06	305.06	1
Sin incubación	234.5	281.4	1.2

El cociente respiratorio de las mitocondrias aisladas en ausencia de ADP fue ligeramente menor que el obtenido en presencia del dinucleótido.

Se ha reportado que la actividad de la oxidasa alterna enmascara el efecto del ADP en la actividad respiratoria de la mitocondria (Vanlerbergh, et al., 1995), por lo que se realizaron trazos de respiración adicionando al medio de reacción NPG (n-propil galato, inhibidor de oxidasa alterna) desde el inicio e incubando la preparación por 5 minutos

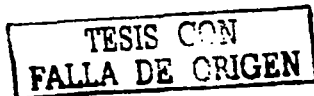


antes de iniciar la determinación de la respiración. Con esto se logró inhibir a la oxidasa alterna desde el inicio y ver que tanto enmascaraba el efecto. En la tabla 3 se muestra que en presencia de NPG, el ADP no estimuló la respiración mientras que, en ausencia de NPG, el consumo de oxígeno se incrementó ligeramente por la adición del ADP. El valor del cociente respiratorio fue un poco mayor en ausencia de NPG que en presencia del mismo. Estos resultados sugieren que la actividad de la oxidasa alterna no juega un papel importante sobre la respuesta de las mitocondrias al ADP.

Tabla 3 Respiración en presencia y ausencia de NPG (inhibidor de OxA). Empleamos como sustrato Succinato y el material biológico son mitocondrias aisladas de mesocotiles de semillas frescas del cultivar HS2

<b>Condiciones</b>	<b>Respiración en ausencia de ADP</b>	<b>Respiración en presencia de ADP</b>	<b>Cociente Respiratorio</b>
S / NPG	388.5	464.8	1.2
C /NPG	367.7	367.7	1.00

El citocromo C es una proteína de bajo peso molecular que se encuentra débilmente unida a la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Su función es recibir los electrones del complejo III y transferirlos a la citocromo oxidasa (complejo IV). Por lo que si durante el aislamiento de las mitocondrias no se preserva la integridad de la membrana externa mitocondrial, el citocromo C se escapa y el consumo de oxígeno se hace dependiente de la adición exógena de citocromo C. Por otro lado, mitocondrias con membrana externa



dañada también presentarán bajo C.R., pues el transporte de electrones y por tanto la fosforilación oxidativa, estaría dañada. Por lo anterior y para definir si la preparación mitocondrial obtenida con el procedimiento descrito en métodos, preservaba la integridad de la membrana externa de la mitocondria se estudio el efecto de la adición de citocromo C reducido en el consumo de oxígeno (Tabla 4). La adición exógena de citocromo C reducido no tuvo efecto en la capacidad respiratoria de la preparación mitocondrial. Esto sugirió que la membrana externa de la mitocondria estaba intacta. Con la finalidad de comprobarlo lo que se hizo fue adicionar un detergente no iónico a diferentes concentraciones y congelar y descongelar la preparación, estos tratamientos dañan la integridad de la membrana externa de la mitocondria. Como se observa en la tabla 4 la respiración de la mitocondria disminuyó como consecuencia de estos tratamientos y la adición de citocromo C incrementó dicho parámetro, hasta el nivel original. En conjunto los experimentos indican que las mitocondrias son funcionales, que tienen una alta capacidad de respiración, pero que su dependencia de ADP exógeno es limitada.

Al mismo tiempo se realizó una medición de la integridad mitocondrial en semillas almacenadas por 10 semanas, del cultivar HS2. En este caso se obtuvo una integridad del 99%.

#### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA OXIDASA ALTERNA:**

La oxidasa alterna o vía alterna es una de las vías que consume oxígeno en la mitocondria, además es una enzima que evita la formación excesiva de las ERO (Especies Reactivas de Oxígeno).

Tabla 4. Integridad mitocondrial. Medida por el cambio en la capacidad respiratoria de las mitocondrias de mesocotilos de semillas del cultivar HS2; en presencia y ausencia de citocromo c reducido.

<b>Tratamiento</b>	<b>Respiración sin Cit. C</b>	<b>Respiración con Cit. C</b>	<b>Mitocondrias Enteras</b>
Ninguno	567.3	567.3	100 %
Tritón <sup>(1)</sup> 0.001%	227	529.5	42.9 %
Tritón 0.01%	189.1	643	29.4 %
Tritón 0.01% y -20°C por 20 mín.	75.7	479.1	15.8 %

(1) Detergente no iónico

Una característica importante de esta vía es que es resistente a KCN (cianuro), a diferencia de la citocromo oxidasa, la otra enzima que consume oxígeno en la mitocondria que es inhibida por éste compuesto. En este experimento se evaluó la fracción de OxA activa y la actividad total. Para medir la actividad total de la oxidasa alterna, se adicionó piruvato y DTT en el medio de reacción, ya que esta enzima se encuentra como un dímero unido por puentes disulfuro y su máxima actividad la presenta cuando los grupos sulfhidrilos están reducidos. Al mismo tiempo se probaron diferentes sustratos respiratorios, para ver cual de ellos permitía la mayor actividad de la oxidasa alterna, los

resultados de estos experimentos se muestran en la figura 11, en donde se observa que con el succinato se obtuvo la mayor actividad de esta enzima tanto en presencia de piruvato y DTT como en ausencia de los mismos, lo importante en este caso es que en ausencia de los activadores de la oxidasa alterna se obtuvo el mismo valor de la capacidad de esta vía, lo que sugiere que empleando succinato como sustrato, toda la OxA se encuentra en su estado activo. Con los demás sustratos se obtuvo una actividad menor pero en todos los casos aumentó cuando se le adiciona piruvato y DTT. En el caso del malato la actividad de la enzima fue menor que en los otros sustratos utilizados, su actividad se incrementó por efecto del piruvato y DTT, indicando que solo una fracción de la oxidasa alterna se encontraba en forma activa.

#### **DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD AL ENVEJECIMIENTO DE LOS DIFERENTES CULTIVARES.**

El tiempo en el que el 50% de las semillas de un lote pierden su viabilidad es lo que conocemos como  $P_{50}$ . Este término nos va a permitir conocer la sensibilidad al envejecimiento de estos cultivares, es decir un cultivar con una alta sensibilidad al

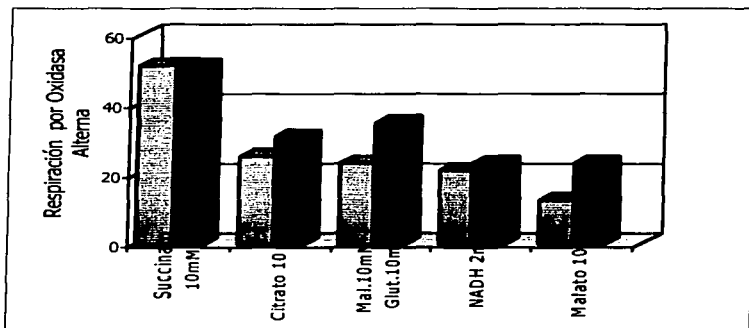


Figura 11. Efecto del Piruvato y DTT en la actividad de la vía resistente a cianuro (Vía de la OxA). Y efecto de los diferentes sustratos sobre la actividad de la OxA. Las barras grises indican la actividad de la Oxa en ausencia de Pir y DTT, mientras que las negras son en presencia de Pir y DTT. La determinación se realizó en mitocondrias de semillas frescas del cultivar HS2.

envejecimiento va a presentar un  $P_{50}$  bajo, puesto que el cultivar no va a tener la resistencia suficiente para ser almacenado por largos períodos, mientras que un cultivar con una baja sensibilidad al envejecimiento va a tener un  $P_{50}$  alto, por ejemplo en este caso T100 (Tabla 5).

Para poder determinar con exactitud el valor del  $P_{50}$ , empleamos una curva de sobrevivencia de tiempo de almacenamiento vs % germinación (Figura 6). En esta gráfica lo que hacemos es extrapolar el punto en donde el lote de semillas presenta un porcentaje de germinación del 50% y así obtenemos el tiempo de almacenamiento en el que se alcanzó esta pérdida de viabilidad.



Tabla 5. Valor de  $P_{50}$ , (Tiempo en el que el 50% de las semillas de un lote pierde su viabilidad) medido en meses, para los diferentes cultivares.

CULTIVARES	$P_{50}$ (meses)
CQO	1.5
A6	2.7
HS2	4
T100	5.5

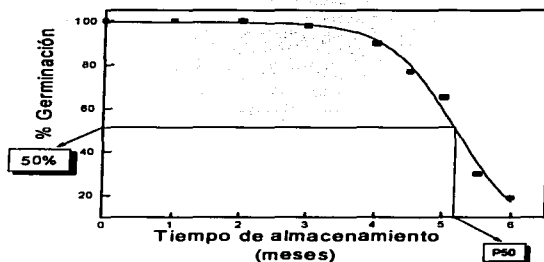


Figura 6. **Curva de supervivencia** (tiempo de almacenamiento vs % germinación), con esta gráfica podemos conocer la sensibilidad al envejecimiento de cada uno de los materiales con los que se trabajó, cuantificado como  $P_{50}$ . En este caso la gráfica se realizó con los datos del cultivar T100.

En este trabajo empleamos 4 diferentes cultivares (Chalqueño (CQO), A6, HS2, T100) que son contrastantes entre ellos en cuanto a su  $P_{50}$ .

En la tabla 5 se muestra el P<sub>50</sub> que presentan los diferentes cultivares, comenzamos con el CQO (Chalqueño) que es un cultivar que en 1.5 meses el 50% de sus semillas pierden su viabilidad, por lo que su sensibilidad al envejecimiento es muy alta. El cultivar contrastante de CQO sería en este caso T100 que pierde su viabilidad en 5.5 meses, lo que nos dice que es un poco más resistente al envejecimiento y su sensibilidad es menor. El A6 y HS2 los podríamos clasificar como cultivares con una sensibilidad al envejecimiento intermedia, siendo el HS2 (4 meses) un poco más resistente que el A6 (2.7 meses).

Es importante resaltar que esta es una clasificación entre los cultivares con que trabajamos en donde vemos una diferencia en sensibilidad, pero existen cultivares mucho más resistentes al envejecimiento y otros que son más sensibles al envejecimiento.

El efecto del almacenamiento en la fisiología de la semilla se evaluó de dos formas. En una la viabilidad del lote de semillas se evaluó como el porcentaje de semillas que a los cuatro días de germinación mostraron un mesocotilo desarrollado. La otra consistió en calcular el porcentaje de semillas que protuyeron radícula (cuando al menos de 2 mm.) a los siete días de germinación. En el primer caso se está estimando el efecto del almacenamiento en el vigor de la semilla. En el segundo caso se está evaluando viabilidad. En la Figura 12 se puede observar que en los cultivares T100 y HS2, el vigor de la semilla cuantificado como crecimiento del mesocotilo es más sensible que la viabilidad del lote.

En ambos lotes el vigor decrece desde el primer mes de almacenamiento, mientras que el decremento en viabilidad se inició a partir de los 3.5 meses para el caso del HS2 y de 4 meses para el caso de T100. En contraste, la sensibilidad del vigor y la viabilidad fue similar en los cultivares de A6 y CQO.

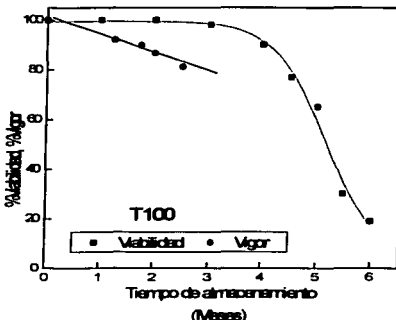
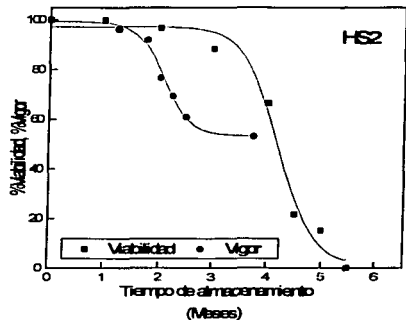
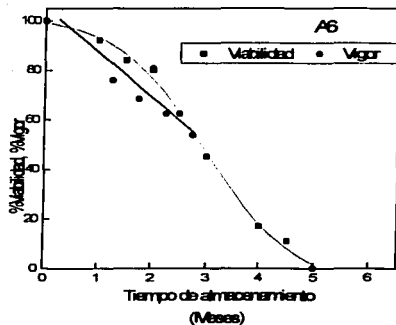
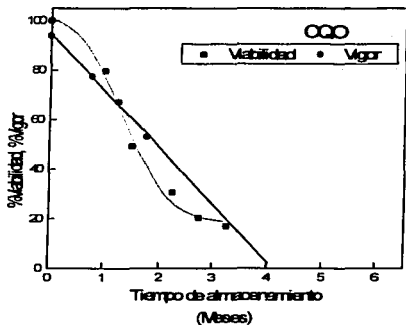


Figura 12. Efecto del almacenamiento sobre la Viabilidad y el Vigor. El % de viabilidad se cuantificó como protusión de radícula después de 7 días y % de vigor se cuantificó como crecimiento de mesocotilo después de 4 días. El tiempo de almacenamiento esta medido en meses. En cada una de las gráficas se encuentra el nombre del cultivar que se esta estudiando.

## **EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO INADECUADO EN LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE DIFERENTES CULTIVARES DE MAÍZ.**

La tasa de consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas del mesocotilo de semillas frescas de cualquiera de los cultivares fue cultivar dependiente (Figura 13). HS2 fue el cultivar con mayor respiración (400 ngatms de Oxígeno/min./mg. proteína) y T100 el que presentó menor consumo (200 ngatms de Oxígeno/min./mg. proteína). Este mismo parámetro disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la velocidad de este decremento fue lineal para A6, CQO y HS2. Mientras que para T100 el decremento se realizó a dos diferentes velocidades. En T100 este comportamiento se detectó durante las primeras seis semanas. Pasado este punto, la velocidad de pérdida de la respiración fue mayor en T100 que en A6.

En mitocondrias de plantas, el consumo de oxígeno está dado por la contribución de dos vías, la cadena de fosforilación oxidativa y la vía de la oxidasa alterna. La contribución de cada una de estas vías al consumo mitocondrial de oxígeno se puede evaluar mediante la utilización de inhibidores. El oxígeno consumido por la vía de la fosforilación oxidativa es sensible a cianuro y el consumido por la vía de la oxidasa alterna es sensible a n-propilgalato (NPG). En las tablas #6, #7, #8 y #9, se muestra la actividad de cada una de estas vías en los diversos cultivares a diferentes tiempos de almacenamiento. Al igual que en la respiración total, cada una de estas actividades disminuye conforme aumenta el tiempo de almacenamiento. Con la finalidad de analizar el efecto del almacenamiento en la actividad de estas vías metabólicas, se graficó el oxígeno consumido por las mitocondrias a cada tiempo de almacenamiento, expresado como porcentaje del control, contra el

tiempo de almacenamiento (Figura 14). En todos los casos la actividad de las vías que contribuyen a la respiración mitocondrial decrecieron a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento.

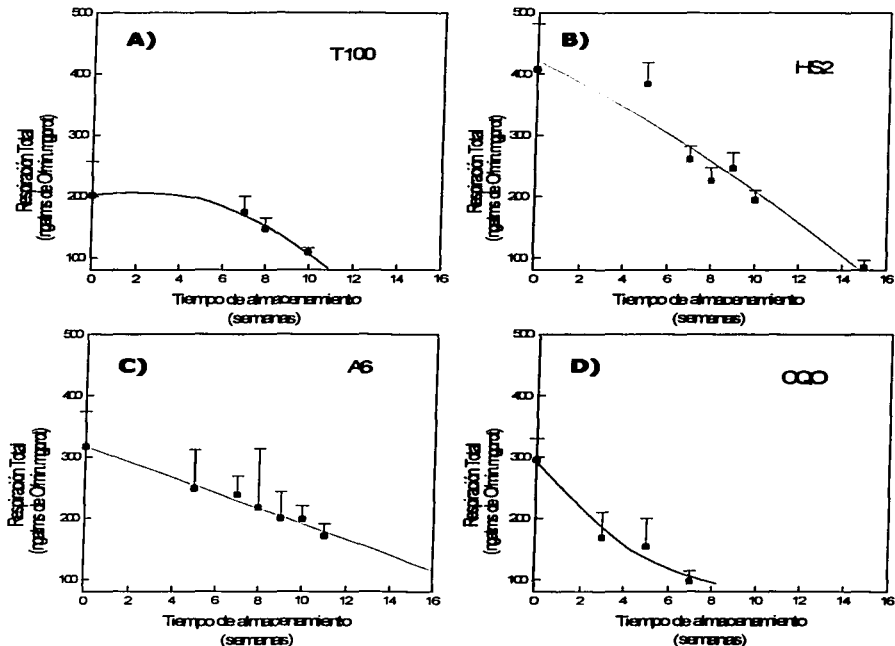


Figura 13. **Actividad Respiratoria de semillas almacenadas por diferentes tiempos.** Tenemos en el panel: A) Cultivar T100, B) Cultivar HS2, C) Cultivar A6 y D) Cultivar CQO.



Tabla 6. Actividad de consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones (C.T.E.) y vía de la oxidasa alterna (OxA) en mitocondrias del cultivar T100

<b>Tiempo almacenamiento (semanas)</b>	<b>Actividad de C.T.E (natms de O/min.mg. prot)</b>	<b>Actividad OxA (natms de O/min.mg. prot)</b>
0	184.15 ± 58	25.73 ± 5
7	158.62 ± 32	21.61 ± 4.9
8	133.09 ± 13	17.49 ± 3.2
10	95.23 ± 7.5	12.98 ± 0

Tabla 7. Actividad de consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones (C.T.E.) y vía de la oxidasa alterna (OxA) en mitocondrias del cultivar HS2

<b>Tiempo almacenamiento (semanas)</b>	<b>Actividad de C.T.E (natms de O/min.mg. prot)</b>	<b>Actividad OxA (natms de O/min.mg. prot)</b>
0	407.7 ± 75	51.10 ± 8
5	362.12 ± 35	26.01 ± 10
7	242.06 ± 14	22.53 ± 6
8	207.08 ± 25	22.65 ± 4
9	213.44 ± 23	26.18 ± 6
10	167.36 ± 13	31.74 ± 3
15	73.04 ± 8	13.06 ± 0.3

Tabla 8. Actividad de consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones (C.T.E.) y vía de la oxidasa alterna (OxA) en mitocondrias del cultivar A6

<b>Tiempo almacenamiento (semanas)</b>	<b>Actividad de C.T.E (natms de O/min.mg. prot)</b>	<b>Actividad OxA (natms de O/min.mg. prot)</b>
0	275.58 ± 59	40.75 ± 6
5	230.40 ± 22	23.44 ± 2
7	218.72 ± 55	21.90 ± 4
8	202.36 ± 33	20.32 ± 4
9	177.52 ± 37	21.22 ± 7
10	186.01 ± 80	17.15 ± 2
11	170.14 ± 20	13.98 ± 1

Tabla 9. Actividad de consumo de Oxígeno por Cadena Transportadora de Electrones (C.T.E.) y vía de la oxidasa alterna (OxA) en mitocondrias del cultivar CQO.

<b>Tiempo almacenamiento (semanas)</b>	<b>Actividad de C.T.E (natms de O/min.mg. prot)</b>	<b>Actividad OxA (natms de O/min.mg. prot)</b>
0	251.70 ± 79	29.10 ± 6
3	136.90 ± 42	31.01 ± 6
5	138.44 ± 40	18.53 ± 2
7	81.95 ± 16	14.67 ± 2

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

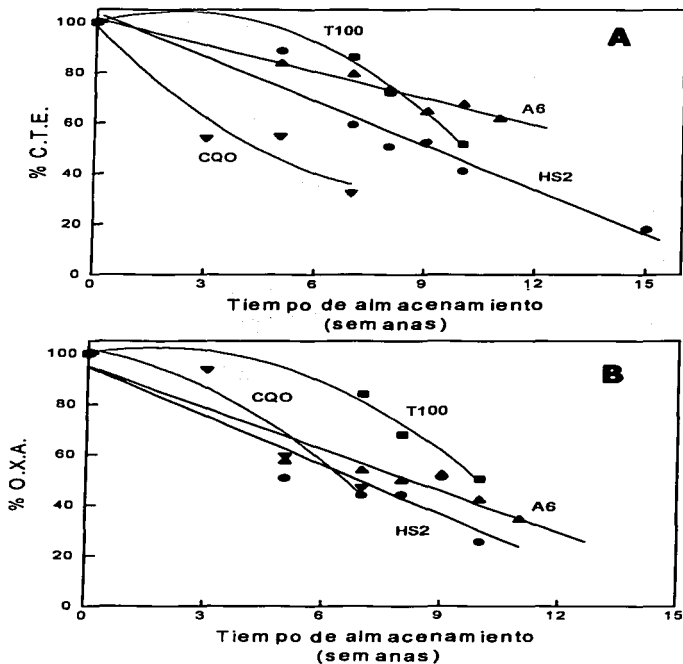


Figura 14. Pérdida de la capacidad respiratoria durante el almacenamiento. En el panel A se representa la capacidad de % de la cadena de transporte de electrones (CTE) para los cuatro cultivares y en el B la capacidad de la oxidasa alterna (OXA) para los cuatro cultivares.



La velocidad con que disminuyó la actividad de cada una de las vías mitocondriales que consumen oxígeno fue cultivar dependiente. Para HS2 y A6, la pérdida de la actividad de cada una de las vías fue monótonica respecto al tiempo de almacenamiento. En el caso de T100 y CQO, la velocidad del decremento dependió del período de almacenamiento y de cual de las vías se analizó.

En el caso de la cadena transportadora de electrones la fase de menor velocidad, se observó en T100 en las primeras cuatro semanas de envejecimiento. En el CQO ésta fase se presenta después de las cuatro semanas. En contraste para la vía de la oxidasa alterna, la fase de lento decaimiento del consumo de oxígeno se presentó para ambos cultivares en las primeras semanas de almacenamiento. El período que dura esta fase fue menor en el caso de CQO.

Con la finalidad de hacer una comparación cuantitativa de la pérdida de estas actividades durante el almacenamiento se calculó la pendiente en la zona que se puede ajustar a una recta para cada una de las gráficas de la Figura 14. Los resultados de esta operación se muestran en la Tabla 10.

La velocidad de pérdida de actividad de la cadena transportadora de electrones y de oxidasa alterna fue mayor para T100 y CQO que para A6 y HS2 y entre cada grupo fue similar.

Para explorar si la pérdida de vigor y viabilidad correlacionaban con la pérdida de actividad de las vías mitocondriales que consumen oxígeno, se graficó el % de actividad de las mitocondrias vs el % de vigor o viabilidad que presentaban el lote de semillas utilizadas para aislar las mitocondrias (Figuras 15 y 16). La correlación sólo se presentó en CQO

entre actividad de oxidasa alterna y viabilidad. En A6 la correlación fue de C.T.E. con vigor y viabilidad y en HS2 solo se presentó entre E.T.C y viabilidad.

Tabla 10. Velocidad de pérdida de la actividad de las vías de consumo de oxígeno.

<b>CULTIVAR</b>	<b>C.T.E. (%/semanas)</b>	<b>O.X.A. (%/semanas)</b>	<b>O.X.A. C.T.E.</b>
A6	3.51	5.46	1.5
HS2	5.87	6.41	1.1
CQO	9.01	11.63	1.3
T100	11.30	10.83	0.95

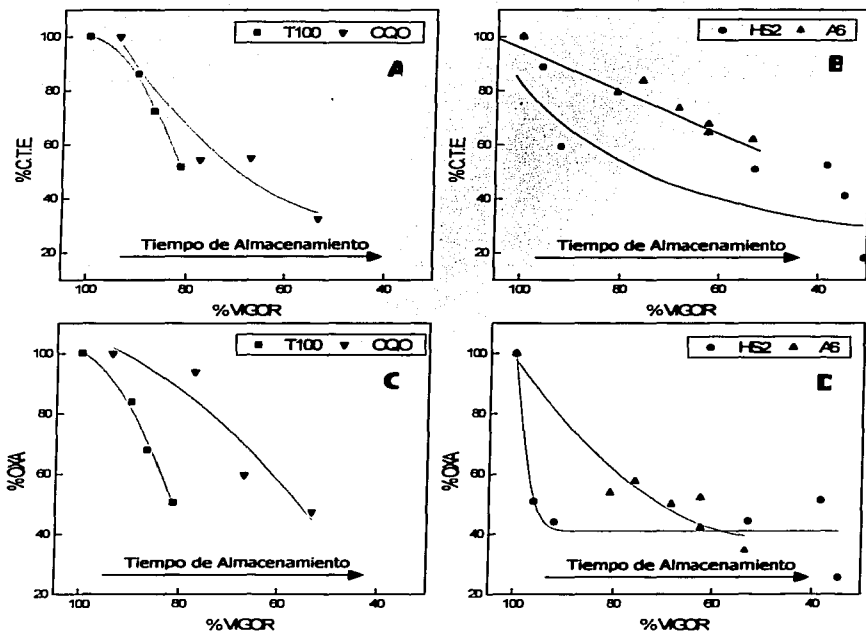


Figura 15. **Actividad de la Cadena Transportadora de Electrones y de la Oxidasa Alterna en semillas con diferente Vigor.** Panel A y B % de actividad de C.T.E. (cadena de transporte de electrones), en el A se presentan los cultivares T100 y CQO, en el B HS2 y A6. En los paneles C y D vemos el % de actividad de O.X.A. (oxidasa alterna); en el C los cultivares T100 y CQO y en el D los cultivares HS2 y A6. Al mismo tiempo vemos como es que avanza el tiempo de almacenamiento.

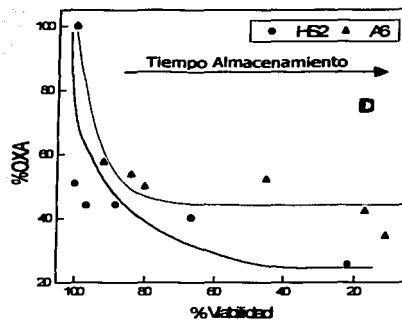
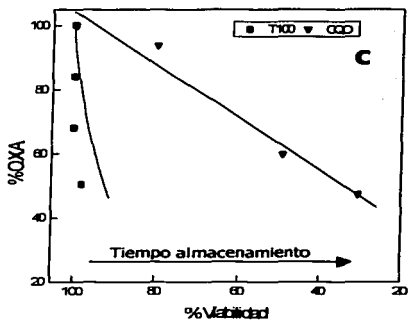
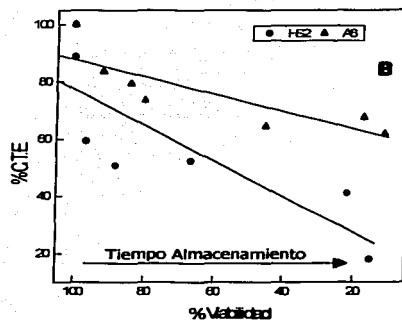
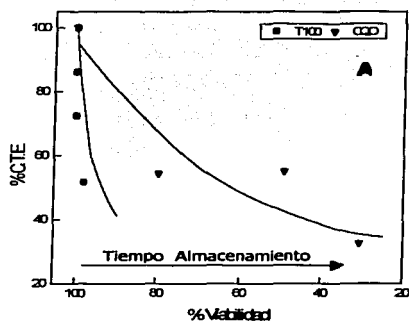


Figura 16. Actividad de la Cadena Transportadora de Electrones y de la Oxidasa Alterna en semillas con diferente Viabilidad. Panel A y B % de actividad de C.T.E. (cadena transportadora de electrones); el A es el cultivar T100 y CQO, el B es para HS2 y A6. En el panel C y D se grafican % de actividad de O.X.A. (oxidasa alterna); el C es para T100 y CQO, el D son los cultivares HS2 y A6. Al mismo tiempo podemos ver como es que avanza el tiempo de almacenamiento.

---

---

## DISCUSIÓN

---

---

Los efectos negativos causados por el almacenamiento inadecuado de las semillas se manifiestan como una disminución en la velocidad de germinación y del crecimiento de la plántula. En algunas condiciones el deterioro se manifiesta como una pérdida de viabilidad (Camacho, 1999).

Los procesos de germinación y crecimiento utilizan grandes cantidades de ATP para sostener la alta actividad biosintética que requieren (Sánchez, 1996). Las mitocondrias son los organelos que sintetizan grandes cantidades de ATP como producto de la fosforilación oxidativa (Lehninger et.al., 1993). Por lo que es de suponerse que la incompetencia de las semillas deterioradas para germinar o de sus plántulas parar crecer podría deberse a la funcionalidad de la mitocondria que se afecta negativamente durante el almacenamiento inadecuado de las semillas.

Las consecuencias de esta pérdida de funcionalidad mitocondrial son cuando menos de dos tipos, por un lado no se produce suficiente ATP (Purvis, 1997), para sostener con éxito los procesos de germinación y crecimiento de la plántula y por el otro, se produce un incremento en la producción del radical superóxido (Buchvarov y Gantcheff, 1984), subproducto natural de la actividad respiratoria mitocondrial, que de sobrepasar la capacidad del sistema antioxidante, con que la célula cuenta (Scandalios, 1993), causará la oxidación y por lo tanto la pérdida de función de las diversas biomoléculas.

Una forma de evaluar la funcionalidad de la mitocondria es a través de cuantificar su actividad respiratoria (Voet y Voet, 1995). En plantas la actividad respiratoria de la

mitocondria comprende dos vías, la de los complejos transportadores de electrones asociados a la producción de ATP y la de oxidasa alterna cuya función es la de evitar la formación del radical superóxido durante la fosforilación oxidativa (Maxwell et.al., 1999). La inhibición de estos elementos disminuye la producción de ATP e incrementa la producción de radical superóxido.

Se ha reportado que la sensibilidad al deterioro de las semillas en almacén, definido como la velocidad con la que pierden viabilidad en dichas condiciones de almacenamiento, es diferente entre diversos cultivares y que esta sensibilidad al deterioro o al envejecimiento correlaciona con la magnitud del incremento en la velocidad de producción del radical superóxido de la mitocondria (Camacho, 1999), lo que sugiere la existencia de una correlación entre sensibilidad al envejecimiento y la funcionalidad respiratoria de la mitocondria.

Por lo anterior en este trabajo se evaluó la actividad respiratoria de las mitocondrias aisladas de mesocotilos de semillas germinadas por cuatro días. Estas condiciones permitieron evaluar el efecto del almacenamiento inadecuado de las semillas tanto en el vigor de la semilla como en su viabilidad (Fig. 12) Se observó que en A6 y CQO, el vigor y la viabilidad se pierden a la misma velocidad mientras que en T100y HS2, el vigor se pierde a mayor velocidad que la viabilidad. Dado que el mesocotilo se desarrolla solo en semillas germinadas, lo que se está evaluando al definir el vigor como el % de semillas que presentaron desarrollo de mesocotilo, es el % de semillas que germinaron más rápidamente ( $\leq 100h$ ) mientras que en la viabilidad se considero el % de semillas que protuyeron radícula, hayan o no desarrollado el mesocotilo. Esto significa que en la viabilidad también se están incluyendo las semillas que tardaron en germinar mas de 5

días, pues se consideraron como semillas viables aquellas que protuyeron la radícula y con un crecimiento de 2mm. Por lo anterior, los dos tipos de patrones, el de velocidad de pérdida de vigor y el de viabilidad a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento (Fig. 12) podría deberse a que en CQO y A6 el lote de semillas está constituido por una población de semillas tal que el almacenamiento, aún a tiempos cortos, produce la pérdida de viabilidad mientras que en HS2 y T100 los tiempos cortos de almacenamiento solo inducen retraso en la germinación. De forma tal que en el primer caso las semillas que no germinaron antes de los cuatro días ya no germinaron.

Aparentemente los lotes de A6 y CQO poseen una mayor población de semillas débiles que los lotes de HS2 y T100. Es muy probable que estas condiciones sean genéticas pues todos los lotes estuvieron almacenados en condiciones óptimas ( $T=4^{\circ}\text{C}$  y  $\text{HR}= 50\%$ ) desde su cosecha y al momento de su utilización presentaron 100% de viabilidad.

La actividad respiratoria total de las mitocondrias fue reflejo de la actividad conjunta de la cadena transportadora de electrones (CTE) o vía de los citocromos y de la actividad de la oxidasa alterna. Para todos los cultivares, la actividad respiratoria de la mitocondria inducida por el almacenamiento disminuyó, indicando que las vías que contribuyen a esta actividad mitocondrial están siendo dañadas. Las diferencias en los patrones de pérdida de actividad respiratoria por el almacenamiento reflejan las cinéticas con que se daña la actividad de la CTE debido a que la contribución de la oxidasa alterna solo fue de menos del 20%.

En HS2 y A6, la relación entre disminución de consumo de oxígeno y almacenamiento, para cada uno de las vías mitocondriales que consumen oxígeno, fue monotónica, mientras que para T100 y CQO no lo son. Tal parecería que en HS2 y A6 existe una

población mitocondrial homogénea cuyos componentes son similares y por tanto pierden funcionalidad a la misma velocidad. En el caso de CQO y T100, el comportamiento bifásico de esta relación sugiere la existencia de dos subpoblaciones de mitocondrias. En las cuales sus componentes respiratorios presentan diferente sensibilidad a las condiciones de almacenamiento. Esta sugerencia se observó mejor en T100 que en CQO. Lo anterior podría ser consecuencia de los orígenes genéticos de los materiales. A6 y HS2 son híbridos producidos en el colegio de posgraduados, es decir que el par de alelos para cada gen fue similar. Mientras que CQO y T100 son razas, es decir, materiales adaptados a una cierta región climática, y por tanto contienen alelos diferentes en algunos de los genes. Aparentemente esta heteroplasmia le confiere ventajas al individuo.

Para todos los cultivares aquí estudiados, la actividad de CTE y OXA disminuyeron a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento. En estas condiciones se ha reportado que la producción de ATP disminuye (Vanlerberghe, et.al., 1995) y la de radical superóxido se incrementa (Maxwell et.al., 1999). Por lo que se puede sugerir que la disminución del vigor y la viabilidad en almacén se debe al menos en parte a la disminución en la disponibilidad de ATP y al aumento en la producción del radical superóxido.

El hecho de que no en todos los casos se haya obtenido una buena correlación sugiere que otros mecanismos como por ejemplo, la defensa antioxidante (Bernal-Lugo et.al., 2000) o bien la síntesis de ATP citoplásmico (Vanlerberghe, et.al., 1995), podrían también participar en mayor o menor medida para cada caso. Por ejemplo, en A6 se observó una buena correlación ( $r^2=0.9902$ ) entre pérdida de actividad de CTE y vigor o viabilidad, este comportamiento apoya la interpretación de que la disminución en la disponibilidad de ATP



contribuyó de manera importante en la pérdida de viabilidad y vigor en almacén, mientras que en chalqueño, por las mismas razones, la pérdida de viabilidad se debió importantemente al incremento del radical superóxido.

La sensibilidad al deterioro de la semilla, con excepción de chalqueño, correlacionó solo a tiempos tardíos de almacenamiento debido, quizás a que en esta fase avanzada del almacenamiento, el vigor y la viabilidad solo dependen de las actividades respiratorias y sus productos. Cuando se grafica el cociente entre las velocidades con que se pierde la actividad de la oxidasa alterna y de CTE y el  $P_{50}$ , se genera una línea recta, indicando que las semillas son más sensibles al deterioro cuando la estabilidad de la actividad de la OXA es menor que la de CTE y por tanto hay mayor producción del radical superóxido.

---

---

## CONCLUSIONES

---

---

- Con la metodología utilizada para el aislamiento y purificación de las mitocondrias de mesocotilos de semillas de maíz, se obtuvieron mitocondrias funcionales y con una membrana íntegra, adecuadas para realizar los diferentes experimentos.
- Las muestras de mitocondrias que obtuvimos tienen las siguientes características:
  - Son poco dependientes a la adición del ADP exógeno
  - Tienen un cociente respiratorio relativamente bajo
  - El almacenamiento inadecuado no afecta la integridad de la membrana mitocondrial.
- Los cultivares con los que se trabajó son contrastantes en cuanto a su sensibilidad al envejecimiento T100 > HS2 > A6 > CQO (Tabla 5).
- El consumo de oxígeno es cultivar dependiente HS2 > A6 > CQO > T100 (Figura 13).
- Se demostró que el almacenamiento provoca:
  - Una disminución en el vigor y la viabilidad de cada cultivar (Figura 12).
  - Disminuye la capacidad del consumo de oxígeno de cada cultivar (Figura 13).
  - Disminuye la actividad de las vías de consumo de oxígeno, cadena transportadora de electrones y oxidasa alterna (Figura 14).
- Se encontró una relación directa entre:

- La disminución en la actividad de la oxidasa alterna y la viabilidad para el CQO (Figura 16).
- La disminución en la actividad de la CTE y el vigor y la viabilidad para el A6 (Figura 15 y 16).
- La disminución en la actividad de la CTE y la viabilidad para el HS2 (Figura 16).

---

---

## REFERENCIAS

---

---

- Abdul-Baki AA. 1980. Biochemical aspects of seed vigor. Hort. Sci. 15:765-771.
- Arias, P. S. 1987. Monografía del maíz. Estudios Monográficos ENEP ARAGON, UNAM, pag. 17, 62, 63.
- Baíza A.M., J.M. Vázquez-Ramos y E. Sánchez de Jiménez, 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. Journal Plant Physiology 135: 416-421.
- Bernal Lugo I., Leopold A.C. 1992 Changes in soluble carbohydrates during seed storage. Plant Physiol. 98: 1207-1210.
- Bernal Lugo I., Leopold A.C. Seed Stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. Seed Science Research 5, 75-80, 1995.
- Bernal Lugo I., Camacho A., Carballo A. Effects of seed Ageing on the Enzymic Antioxidant System of Maize cultivars. CABI Publishing USA. Seed Biology: Advances and Applications (Eds. Black M., Brad K.J. and Vázquez R.J.) p.p.151-159, 2000.
- Bewley J.D. y M. Black 1994. Seeds Physiology of development and germination. Second Edition. Plenum Press New York and London. pp. 147-191
- Buchvarov P y Gantcheff T. 1984 Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds. Physiol. Plant. 60: 53-56.
- Camacho, V. A. Producción y detoxificación enzimática de especies reactivas de oxígeno en semillas de maíz con distinta sensibilidad al envejecimiento. Tesis Maestría

- en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM, México, D. F., pag: 1-13, 20-37, 1999.
- Ching TM y Schoolcraft I., 1968. Physiological and chemical differences in aged seeds. *Crop Science*. 8: 407-409.
- Gutiérrez, D. L. J. 1992. Pérdida por manejo en maíz durante la cosecha y su relación con la dispersión de las plagas de postcosecha. Informe Técnico. Campo Experimental de Zacatepec, CIR. CENTRO, SARH-INIFAP. pag. 13-17.
- Güemes, G. M. J., Cabrera, R. J. y Vázquez A. J. M. P. 1990. Marco de Referencia del maíz almacenado en Morelos. Campo Experimental de Zacatepec. CIFAP-MOR. SARH-INIFAP, pag. 28-90.
- Lambers, H. Respiration and the alternative oxidase. En *A molecular Approach to primary metabolism in higher plants*. Foyer, C .H., Quick, W. P. editores. Taylor & Francis. Londres. pag: 295-306, 1997.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega S.A. 2ª. Edición. Pag: 542-571. Barcelona (1993).
- Leopold A.C. y Musgrave M.E. 1980., *Respiratory pathways in aged seeds*. *Physiol. Plant*. 49: 49-54.
- Limpton, M., Longhurst, R. 1985. *Modern Varieties, International Agricultural Research and the Poor*. Consultative Group on International Agricultural Research Study Paper Number 2.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RL. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol. Chem*. 193: 265-275.

- Maarten J.C. y David E. Sadava. *Plants, genes and Crop Biotechnology*. Second Edition. ASPB Education Foundation. Pag: 212-228. E.U.A. (1994).
- Mazat. J-P, Rossignol. R., Malgat. M., Rocher. C.,Faustin. B., Letellier.T. What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions... that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504: 20-30, 2001.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Plant Biology* 96: 8271-8276, July 1999.
- Nandi S., Sen-Mandi S. y Sinha T.P., 1997., Active Oxygen and their scavengers in rice seeds (*Oryza sativa* cv. IET 4094) aged under tropical environmental conditions. *Seed Sci. Res.* 7: 253-259.
- Noodén L.D., 1988. The phenomenon of senescence and aging. En Noodén L.D. y Leopold A.C. eds. *Senescence and aging in plants*. Academic Press Inc. USA. pp. 1-50.
- Ortega M. R. (1988). Localización del DNA sintetizado durante las primeras horas de la germinación de maíz.Tesis Licenciatura para obtener titulo de Bióloga. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F. pag: 8-22, 86.
- Priestley D.A., Cullinan V. y Wolfe J., 1985, Differences in seed longevity at the species level. *Plant Cell Environ.* 8: 557-562.
- Purvis, A. C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 100: 165-170. 1997.

- Rossignol. R., Letellier. T., Malgat. M., Rocher. C., Mazat. J.P. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: Implication for mitochondrial diseases. *Biochem J.* 347: 45-53, 2000.
- Sánchez Jiménez Ma. de la Paz. Osmocondicionamiento de semillas de frijol y su efecto en eventos bioquímicos pre y post osmocondicionamiento. Tesis Licenciatura Q.F.B. Facultad de Química. UNAM. México. Pag: 2-6 (1996)
- Scandalios, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology.* 101: 7-12, 1993.
- Serna., Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. Agt. Editor S.A., México., 1996.
- Smith Michael T and Berjak P. Deteriorative Changes Associated with the loss of Viability of Stored Desiccation-Tolerant and Desiccation-Sensitive Seeds. *Seed Development and Germination.* Edited by Kigel J. and Galili G. E.U.A. (1995). Pag: 701-746.
- Stewart R.R.C. y Bewley J.D., 1980, Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65:245-248.
- Tribe, D. 1987. International agricultural research. *Proc. Australian Academy of Technological Science and Engineering.* pp. 2-3.
- Uribe A., Moreno-Sánchez R., *Plant Sci.* 86 (1992) 21-32.
- Vanlerberghe, G.C., Day. D.C., Wiskich. J.T., Vanlerberghe. A.E., McIntosh. L. Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria. *Plant Physiology* 109: 353-361 (1995).

- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. Alternative Oxidase: From gene to function. *Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 48: 703-734, (1997).
- Vanlerberghe, G. C., Robson. C.A. and Yip.J.Y.H. Induction of Mitochondrial Alternative Oxidase in Response to a Cell Signal Pathway down-regulating the Cytochrome Pathway Prevents Programmed Cell Death. *Plant physiology*, 129: 1829-1842. August 2002.
- Vázquez-Ramos J.M. and DJ. Osborne 1986. Analysis of the DNA synthesized during early germination of rye embryos using BND-cellulose chromatography. *Mutation Research* 166: 39-47.
- Vertucci C.W. 1992 Towards a unified hypothesis of seed aging. En: Côme D. y Corbineau F. eds. *Fourth international workshop in seeds : basic and applied aspects of seed biology*. pp. 739-746 AFSIS. Paris.
- Voet, D. y Voet, J. *Biochemistry*. John Wiley & sons inc. 2a. edición., U.S.A., pag. 125, 414-415, 563-583, 1995.
- Woodstock L.W., Furman K. y Solomos T., 1984. Changes in respiratory metabolism during aging in seeds and isolated axes of soybean. *Plant Cell. Physiol.* 25: 15-26.