



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización bioenergética y metabólica del uniportador de calcio mitocondrial en cloroplastos.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JESÚS VÁZQUEZ MALDONADO**



**CDMX, 2022**



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: **Dra. Raquel Ortega Muñoz**

VOCAL: **Dr. José Pedraza Chaverri**

SECRETARIO: **Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar**

1er. SUPLENTE: **Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

2do. SUPLENTE: **Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica

Edificio E, Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Coyoacán, CDMX. C.P. 04510

México

---

Jesús Vázquez Maldonado

(Sustentante)

---

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

(Asesor)

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las instalaciones y recursos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA203419 “Regulación genética de la transición de la permeabilidad mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”.

A los miembros del honorable jurado: Dra. Raquel Ortega Muñoz, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por sus valiosas observaciones y sugerencias en la culminación de la presente tesis.

## **Dedicatoria**

*A mi familia y amigos que me apoyaron durante todo el proceso.*

*"Lo importante no es cómo se empieza, sino cómo se acaba"*

*(Michael Schumacher, 2010)*

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 1  |
| 1.1 Los iones calcio en la fisiología vegetal .....                                 | 1  |
| 1.2 El transporte de calcio a través del xilema.....                                | 2  |
| 1.3 El calcio y sus funciones en la célula.....                                     | 5  |
| 1.4 Transportadores de calcio en la célula vegetal .....                            | 6  |
| 1.5 Las mitocondrias y los cloroplastos: estructura, funciones e interacciones..... | 8  |
| 1.6 El complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU).....                       | 12 |
| 2. Hipótesis .....  | 17 |
| 3. Objetivo .....   | 17 |
| Objetivo general.....   | 17 |
| Objetivos particulares. ....  | 17 |
| 4. Metodología y procedimiento experimental.....                                    | 18 |
| Material vegetal .....  | 18 |
| Materiales.....   | 18 |
| Equipos .....   | 18 |
| Preparación del material vegetal.....   | 19 |
| Aislamiento de cloroplastos de <i>S. oleracea</i> .....                             | 21 |
| Aislamiento de cloroplastos de <i>A. thaliana</i> .....                             | 22 |
| Ensayo de medición del transporte de calcio intracelular por fluorimetría .....     | 24 |
| 5. Resultados.....  | 25 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 6. Discusión de Resultados..... | 30 |
| 7. Conclusiones.....            | 38 |
| 8. Perspectivas.....            | 38 |
| Bibliografía.....               | 39 |
| ANEXO .....                     | 47 |

## Índice de Figuras

| Figura | Contenido   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Análisis de las vías de transporte y de señalización del calcio en plantas  | 2      |
| 2      | Vías de transporte de agua y minerales en plantas (vía apoplástica y simplástica)   | 3      |
| 3      | Transporte de Ca <sup>2+</sup> a través del xilema.   | 5      |
| 4      | Transportadores de Ca <sup>2+</sup> en la célula vegetal.   | 8      |
| 5      | Interacción de las mitocondrias con los cloroplastos  | 10     |
| 6      | Relaciones entre el metabolismo del carbono fotorrespiratorio y no fotorrespiratorio en las mitocondrias                                  | 12     |
| 7      | Árbol filogenético de homólogos del complejo uniportador de calcio mitocondrial (MCU) en diversas especies vegetales y algunos mamíferos. | 13     |
| 8      | Composición proteica del complejo uniportador de calcio mitocondrial en mamíferos y <i>A. thaliana</i>                                    | 15     |
| 9      | Sitio de interacción del Rojo de Rutenio (RuRed).   | 15     |
| 10     | Germinación de semillas de las dos cepas de <i>A. thaliana</i>  | 20     |
| 11     | Genotipificación de las cepas silvestre (Col-0) y mutante carente de micu-1 (MICU1-KO)  | 20     |
| 12     | Procedimiento de aislamiento y cuantificación de cloroplastos de <i>S. oleracea</i>   | 22     |
| 13     | Procedimiento de aislamiento y cuantificación de cloroplastos de <i>A. thaliana</i> .   | 23     |
| 14     | Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N   | 24     |
| 15     | Ensayo de transporte de iones calcio mediante un método fluorométrico desarrollado en el laboratorio.                                     | 25     |
| 16     | Cloroplastos aislados de <i>S. oleracea</i> y <i>A. thaliana</i> .  | 26     |
| 17     | Colocalización de la subunidad MICU1  | 31     |
| 18     | Dinámica de calcio de las cepas WT y MICU1-KO HEK con diferentes construcciones MICU1, con o sin RuRed                                    | 32     |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 19    | Inhibición de la captación de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial por compuestos a base de rutenio   | 34 |
| 20    | Diagrama representativo del MCU con las subunidades de MICU  | 35 |
| 21    | Dinámica del calcio y los mecanismos regulados en cloroplastos de <i>A. thaliana</i>   | 36 |
| ANEXO |  |    |
| A     | Alineamiento de probables secuencias codificantes de uniportadores de calcio en <i>Spinacea oleracea</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> | 47 |

## Índice de Tablas

| Tabla | Contenido  | Página |
|-------|--|--------|
| 1     | Primers empleados en la genotipificación y su secuencia                            | 20     |
| 2     | Velocidades absolutas de transporte obtenidas en los cinco experimentos realizados | 28     |
| 3     | Significancia estadística entre las variables                                      | 28     |
| 4     | Análisis de varianza   | 29     |

## Índice de Graficas

| Grafica | Contenido   | Página |
|---------|---|--------|
| 1       | Ensayo de dinámica de $\text{Ca}^{2+}$ en cloroplastos de <i>A. thaliana</i> Col-0 (cepa Wild type) y MICU1-KO (cepa carente de la proteína MICU1). | 27     |
| 2       | Comparación de las velocidades de transporte de $\text{Ca}^{2+}$ entre las cepas Col-0 y MICU1-KO en presencia y ausencia de RuR.                   | 30     |

## **Definiciones de abreviaturas del presente texto**

**$\Delta\Psi$** : Potencial de membrana mitocondrial

**$\mu\text{L}$** : Microlitros, unidad de volumen

**$\mu\text{M}$** : Micromolar, unidad de concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )

**ADP**: Adenosin difosfato

**ATP**: Adenosin trifosfato

**c.b.p**: Cuanto baste para

**$\text{Ca}^{2+}$** : Iones calcio

**Col-0**: Ceba silvestre (Columbia ecotipo)

**CRC**: Capacidad de retención de calcio

**DIME**: Dominio de interacción con  $\text{Ca}^{2+}$  y RuR en el anillo D de MCU

**DNA**: Ácido desoxirribonucleico

**EMRE**: Proteína transmembranal que ancla a MICU1 al MCU mediante una cola de poliaspartato

**M**: molar, unidad de concentración ( $\text{mol/L}$ )

**MCU**: Uniportador de calcio mitocondrial

**cMCU**: Uniportador de calcio mitocondrial localizado en cloroplastos

**Medio MS**: Medio Murashige-Skoog para germinación de semillas

**MICU:** Proteína para la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hay 3 isoformas reportadas, MICU1, MICU2 y MICU3)

***micu-1*:** Gen que codifica para la proteína MICU1

**MICU1-KO:** Cepa mutante carente de *micu-1*

**mM:** Milimolar, unidad de concentración (mmol/L)

**nm:** Nanómetro, unidad de longitud

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Fuerza g:** Fuerza centrífuga relativa

**Ru360:** Complejo de amonio de rutenio dinuclear

**RuR:** Rojo de Rutenio

**s:** Segundos

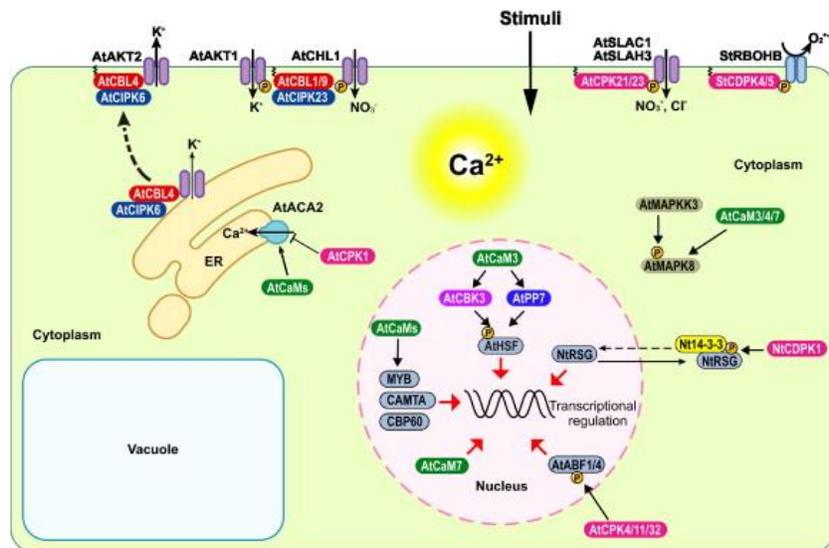
## **Resumen**

Los cloroplastos llevan a cabo los procesos de obtención de energía por mecanismos quimiosmóticos en formas similares a las mitocondrias. Tienen una membrana estromal altamente permeable y una membrana tilacoidal mucho menos permeable. En ambas membranas están incrustadas proteínas de transporte y componentes de la cadena de transporte de electrones. Estudios diversos han permitido elucidar la importancia fisiológica del calcio en las reacciones metabólicas y de señalización en plantas. En la presente tesis se caracterizó un sistema de transporte de calcio en cloroplastos aislados de *Spinacea oleracea* y *Arabidopsis thaliana*, mediante un ensayo que nos permite medir la entrada de este catión divalente en forma indirecta, con ayuda de un indicador fluorescente. Los experimentos descritos en la presente tesis fueron realizados para establecer las condiciones idóneas de detección de un transportador de calcio cloroplástico. Los resultados demuestran la probable presencia de una isoforma cloroplástica del uniportador de calcio mitocondrial (cMCU), debido a la sensibilidad de esta actividad de transporte al inhibidor Rojo de Rutenio (RuR) en ausencia de la proteína reguladora del canal AtMICU1.

## **1. Introducción**

### **1.1 Los iones calcio en la fisiología vegetal**

Los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) presentan múltiples funciones en las plantas. Estos cumplen una variedad de roles estructurales, desempeñan importantes funciones bioquímicas y ayudan en muchos procesos metabólicos al funcionar como contra catión de aniones orgánicos e inorgánicos (Marschner H., 1995). Además, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son esenciales para la división celular y el desarrollo de tejidos vegetales (Hepler P., 2005). Las perturbaciones en la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) se vinculan a estímulos ambientales o de desarrollo (White P., 1998, 2000). La mayoría de las funciones del  $\text{Ca}^{2+}$  como componente estructural de las macromoléculas están relacionadas con su capacidad de coordinación, a través de la cual proporcionan conexiones intermoleculares estables, pero reversibles, predominantemente en las paredes celulares y en la membrana plasmática (El Habbasha et al., 2015). El  $\text{Ca}^{2+}$  está involucrado en muchas vías de señalización en las células vegetales (Fig. 1) como las condiciones de homeostasis o de estrés contribuyendo al correcto crecimiento, desarrollo de las plantas, la resistencia al estrés ambiental, la respuesta hormonal, la interacción con microorganismos patógenos y la fotosíntesis. Por lo tanto, las señales de calcio constituyen una red de señalización constante y compleja en las células vegetales (Wang et al., 2019). El transporte de este ion divalente a través de los diversos compartimentos en las plantas es un tema recientemente estudiado (Navazio et al., 2020).



**Fig. 1** Análisis de las vías de transporte y de señalización del calcio en plantas. Imagen de Batistič et al., (2012).

## 1.2 El transporte de calcio a través del xilema

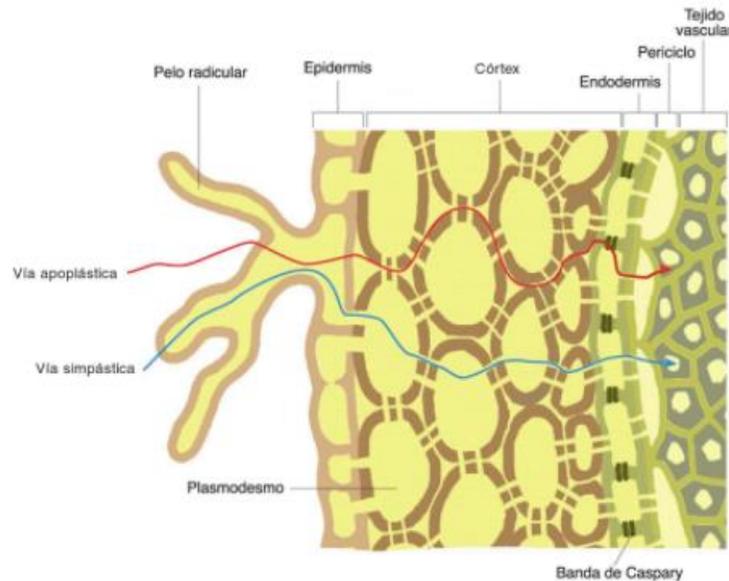
El xilema está formado por el conjunto de los vasos leñosos, parénquima xilemático y fibras leñosas. Los vasos son tubos largos de células muertas dispuestas en fila que discurren desde la raíz hasta los nervios más finos de las hojas. Sirven sobre todo para la conducción pasiva de agua y sales minerales hasta las hojas y para brindar soporte mecánico (Ramírez P., 2004). La raíz se compone de muchos tipos de células diferentes. Se sugiere comúnmente que las capas de células externas de la raíz, la epidermis y la corteza, están involucradas principalmente en la adquisición de agua y nutrientes minerales. El  $\text{Ca}^{2+}$  se absorbe por las raíces de la solución del suelo y se entrega al brote a través del xilema. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  pueden atravesar la raíz ya sea ingresando al citoplasma de las células unidas por plasmodesmos (el simplasto) o a través de los espacios entre las células (el apoplasto) (White P., 2001).

La vía simplástica (Fig. 2) consta del paso de agua con los minerales a través de las membranas celulares, es decir, circulan por el interior de las células. La señalización intracelular requiere que el  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  se mantenga en niveles submicromolares en la célula en

reposo y que este catión aumente rápidamente en respuesta a señales de desarrollo o desafíos ambientales.

En la vía apoplástica (Fig. 2) el agua y los minerales circulan por las paredes celulares y los espacios intercelulares. El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el xilema a través de la vía apoplástica está influenciado notablemente por la transpiración, lo que podría provocar tanto variaciones en la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  suministrada al brote así como en el desarrollo de trastornos por  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la vía apoplástica es relativamente no selectiva entre cationes divalentes (White P., 2001).

El movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estas vías debe estar finamente equilibrado para permitir que las células de la raíz emitan señales usando la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , y que de esta forma controlen la tasa de suministro de  $\text{Ca}^{2+}$  al xilema y eviten la acumulación de cationes tóxicos en el brote (White P., 2000, 2001).



**Fig. 2. Vías de transporte de agua y minerales en plantas (vía apoplástica y simplástica).** Tomado de López Moratalla N. (2008) *Biología y Geología 1º Bachillerato*.

Cada vía de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la raíz confiere distintas ventajas y desventajas. La vía apoplástica permite que el  $\text{Ca}^{2+}$  se administre al xilema sin afectar el uso de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  para

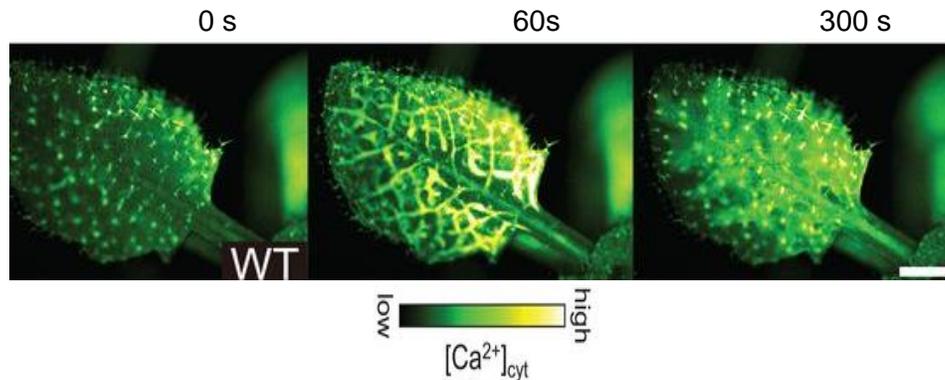
la señalización intracelular (White P., 1998). La señalización intracelular requiere que el  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  se mantenga a niveles submicromolares en la célula en reposo y que aumente rápidamente en respuesta a señales de desarrollo o estrés ambiental.

Por otra parte, varias líneas de evidencia sugieren que tanto las vías apoplásticas como las simplásticas contribuyen al suministro de  $Ca^{2+}$  al xilema, dado que el  $Ca^{2+}$  se entrega al xilema en las regiones de la raíz donde la banda de Caspary está completamente desarrollada y el transporte de  $Ca^{2+}$  apoplástico está restringido (Clarkson D., 1984, 1993; White P., 2001).

La banda de Caspary contiene las moléculas poliméricas (lignina y suberina), que dificulta la difusión de agua y solutos a través del espacio de la pared celular, lo que obliga a los solutos pasar a través de la membrana externa (membrana plasmática) y el interior (citoplasma) de las células endodérmicas que actúan como barrera selectiva. (Grebe M., 2011).

Aunque los canales de  $Ca^{2+}$  y las  $Ca^{2+}$ -ATPasas están presentes y son termodinámicamente capaces de catalizar la entrada y salida de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana plasmática de las células endodérmicas de la raíz, se ha calculado que no hay suficiente Trifosfato de adenosina (ATP) y las proteínas son insuficientes para catalizar los flujos de  $Ca^{2+}$  observados únicamente a través del simplasto (White P., 1998, 2001).

Aunque se desconocen las contribuciones relativas de las vías apoplásticas y simplásticas a la entrega de  $Ca^{2+}$  al xilema, es probable que una separación funcional de los flujos de  $Ca^{2+}$  apoplásticos (para la transferencia al brote) y los flujos de  $Ca^{2+}$  simplásticos (para la señalización celular) (Fig. 3) permita a la raíz satisfacer la demanda de  $Ca^{2+}$  del brote sin comprometer las señales intracelulares de  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . (White et al., 2003).



**Fig. 3: Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del xilema.** La fluorescencia indica un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la vasculatura de la hoja no dañada después de un corte en una hoja adyacente [Toyota et al., 2018].

### 1.3 El calcio y sus funciones en la célula

El calcio es una parte crítica de la pared celular que produce una fuerte rigidez estructural al interactuar con la matriz de polisacáridos de pectina. Esta reacción genera el pectato de calcio o pectinas, las cuales confieren estabilidad e integridad a todos los tejidos de la planta (Salisbury et al., 1994; Willats et al., 2001). El  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe la acción de la poligacturonasa, porque los niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el apoplasto de las células generan mayor proporción de pectatos y así mayor resistencia a la desintegración de las paredes (Marschner H., 1986; Romeis et al., 2001; Diaz et al 2007).

En las membranas, el  $\text{Ca}^{2+}$  cumple un rol estabilizador gracias a los grupos fosfato y carboxilo de los fosfolípidos y a proteínas de la superficie de la membrana. Deficiencias de este elemento ocasionan alteraciones, principalmente en los cuerpos lipídicos (Salisbury et al., 1994). Otras de sus funciones en la membrana son regular el flujo de solutos e inhibir el escape de los mismos del citoplasma al apoplasto u organelos, así como la de proteger bajo condiciones de estrés (Marschner H., 1986; White P., 2000). Este elemento influye en el crecimiento radical por su participación en la división y extensión de las células que

componen este sistema. Por lo tanto, una disminución o ausencia de calcio en el suelo conduce a una disminución del crecimiento de las raíces. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  -que está unido a las pectinas del apoplasto- se desprende por acción de las auxinas, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  quedan libres y activan canales en la membrana que permiten la entrada de solutos y por consiguiente la extensión celular (Sanders et al., 2002).

El equilibrio iónico y la osmorregulación también son controlados por el calcio. En las vacuolas es donde se almacena la mayor proporción de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual contribuye al balance entre cationes y aniones orgánicos e inorgánicos de la célula. Cuando se aumentan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, muchos de estos aniones se precipitan en la vacuola en forma de oxalatos de calcio permitiéndose así mantener una osmorregulación de la célula (Kordyum E., 2003; Griffiths et al., 2002).

#### **1.4 Transportadores de calcio en la célula vegetal**

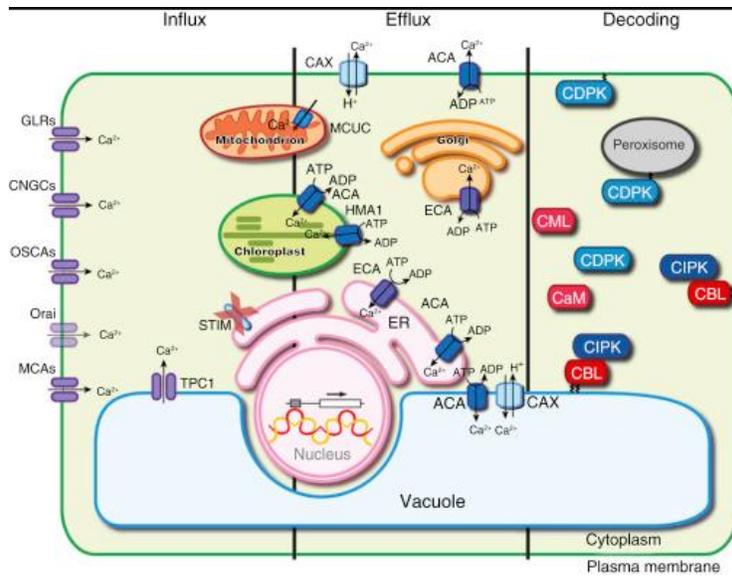
Los canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  se agrupan en cinco familias: canales controlados por nucleótidos cíclicos (CNGC), canales similares a receptores de glutamato (GLR), canales de dos poros (TPC), canales mecano sensibles (MCA), canales controlados por hiperosmolalidad (OSCA) (Fig. 4) (Demidchik et al., 2018). La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  constante se mantiene mediante la regulación orquestada de los siguientes procesos: 1) Un influjo pasivo de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del gradiente electroquímico a través de los canales de cationes permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, el tonoplasto y otras endomembranas; 2) La eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  en contra del gradiente electroquímico, mediante las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  e intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ ; y 3) La amortiguación de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  mediante compuestos intracelulares, incluidos aniones orgánicos e inorgánicos polivalentes libres -como fosfatos, ATP, Adenosín difosfato (ADP), etc.-, cabezas aniónicas de lípidos, proteínas de unión a

$\text{Ca}^{2+}$  (con dominios tipo calmodulina) y residuos carboxilo de biopolímeros y ligandos similares (Demidchik et al., 2018).

Debido a una barrera de baja energía y la nula necesidad de formación de enlaces covalentes, el paso de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales específicos es uno de los procesos fisiológicos más rápidos, que puede durar solo nanosegundos (Kuyucak et al., 2001). El bombeo o el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  contra el gradiente electroquímico es mucho más lento (rango de microsegundos). La amortiguación del exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  es relativamente rápida, pero más lenta que la difusión por canales.

La actividad de las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  y los intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  -conocidos conjuntamente como sistemas de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$ - está regulada directamente por el  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ , aumentando con la elevación de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  mediada por canales iónicos. El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera del citosol, para restaurar el  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  en reposo está mediado por bombas / transportadores impulsados por energía que pertenecen a las ATPasas de tipo P, como la ATPasa transportadora de cationes de calcio / metales pesados de tipo  $\text{P}_1\text{B}$  (AtHMA1), de tipo  $\text{P}_2\text{A}$  ATPasa transportadora de cationes de calcio (ECA) y ATPasa transportadora de cationes de calcio de tipo  $\text{P}_2\text{B}$  (ACA) (García et al., 2020).

Otros transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  se agrupan en la familia CaCA (protón de tipo CAX: intercambiador de cationes de calcio, catión de tipo CCX: intercambiador de cationes de calcio, protón de tipo MHX: intercambiador de cationes de magnesio, intercambiador de cationes de tipo NCL / EF-CAX, EF-CAX intercambiador de cationes de tipo PAM71) (Pittman et al., 2016) y la familia  $\text{CaCA}_2$  (transportador de cationes de manganeso / calcio de tipo PAM71) (Navazio et al., 2020).



**Fig. 4. Transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula vegetal.** (Imagen tomada de Edel et al., 2017).

### 1.5 Las mitocondrias y los cloroplastos: estructura, funciones e interacciones

Las mitocondrias son organelos intracelulares presentes en prácticamente todas las células eucariotas. Están encargados de suministrar una gran parte de esqueletos de carbono necesarios para la actividad celular. Por ejemplo sintetizan ATP a expensas de la oxidación de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa. También generan esqueletos de carbono de importancia fisiológica como oxalacetato, el cual es un precursor de importancia en el proceso de la gluconeogénesis (Alberts et. Al., 2002).

La mitocondria posee un sistema de doble membrana una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales se caracterizan por bajos niveles de ciertos lípidos como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glucolípidos característicos de las membranas de las células eucariotas (Lodish H., 2006). Por otro lado, las membranas internas mitocondriales son ricas en el lípido cardiolipina y deben en gran medida a este lípido la

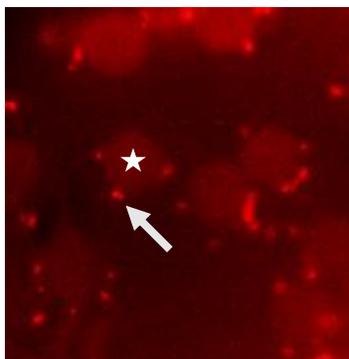
correcta función de los complejos respiratorios y de transporte (Frentzen et al., 1994). En plantas superiores, así como en otros eucariotas, las mitocondrias juegan un papel crucial al proporcionar equivalentes de ATP. Además de este papel bien establecido, cumplen una amplia gama de funciones en cooperación con otros compartimentos subcelulares. Para mantener sus funciones correctamente, el metabolismo de esqueletos de carbono acoplado al transporte de electrones en estos organelos debe regularse de manera coordinada (Yoshida et al., 2011).

Por otro lado, los cloroplastos de plantas son orgánulos grandes (de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de largo) que, como las mitocondrias, están delimitados por una doble membrana llamada envoltura del cloroplasto. Además de las membranas interna y externa, los cloroplastos tienen membranas tilacoidales. Las membranas tilacoidales forman una red de discos aplanados llamados tilacoides, que con frecuencia se disponen en pilas llamadas grana. Debido a esta estructura de tres membranas, la organización interna de los cloroplastos es más compleja que la de las mitocondrias.

Más importante aún, los cloroplastos son responsables de la conversión fotosintética de  $\text{CO}_2$  en carbohidratos. Además, los cloroplastos sintetizan aminoácidos, ácidos grasos y los componentes lipídicos de sus propias membranas. La reducción de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), un paso esencial en la incorporación de nitrógeno en compuestos orgánicos, también ocurre en los cloroplastos. Los cloroplastos son solo uno de varios tipos de orgánulos relacionados que desempeñan una variedad de funciones en las células vegetales (Cooper G., 2000).

Estudios que abordan las interacciones entre cloroplastos y mitocondrias, han atraído mucha atención de los investigadores (Fig. 5). Usando energía lumínica, agua y  $\text{CO}_2$ , los cloroplastos

producen carbohidratos en una serie de reacciones fotosintéticas que las mitocondrias usan parte de estos esqueletos de carbono para generar ATP.



**Fig. 5. Las mitocondrias interactúan con los cloroplastos en células de mesófilo de *A. thaliana*.** Las hojas de una planta ecotipo Col-0 (cepa silvestre columbiana ecotipo) fueron sometidas a un procedimiento de remoción de la epidermis y fueron teñidas con el indicador mitocondrial JC-1 - *colorante catiónico lipofílico que se acumula en las mitocondrias dependiendo del valor de potencial de membrana mitocondrial-* ( $4\mu\text{M}$ ). Las mitocondrias (flecha) se aprecian como corpúsculos de elevada fluorescencia roja adyacentes a los cloroplastos (estrella), observados como objetos fluorescentes circulares de mayor tamaño pero menor intensidad.

Incluso este metabolismo fundamental puede considerarse como una forma de interacción entre los cloroplastos y las mitocondrias. Algunos otros ejemplos de la interacción metabólica, que incluyen transporte de equivalentes reductores de los cloroplastos a las mitocondrias mediante mecanismos de transporte redox, suministro de esqueletos de carbono (C) para la asimilación de nitrógeno (N) en los cloroplastos y metabolismo del fotorrespirador (Yoshida et al., 2011).

El metabolismo mitocondrial está implicado en varios procesos asociados a la luz que incluyen la fotosíntesis, la fotorrespiración, el metabolismo del nitrógeno, el transporte de reductores y el mantenimiento del equilibrio redox (Araujo et al., 2014).

Por lo tanto, estudios previos han demostrado que las interacciones entre la fotosíntesis y la respiración inducen cambios en las vías metabólicas del carbono (Nunes-Nesi et al., 2007b)

y que, en las hojas iluminadas, el metabolismo intracelular se modula dinámicamente en función de cambios ambientales (Noguchi et al., 2008).

Históricamente, la fotosíntesis y la respiración se han considerado como vías independientes, sin embargo, las recientes investigaciones sugieren que la función tanto de los cloroplastos como de las mitocondrias están estrechamente coordinadas e interactúan a través de grupos de metabolitos intracelulares -el metabolismo respiratorio interactúa con las reacciones del ciclo de Calvin-Benson de la fotosíntesis, la fotorrespiración y la asimilación de nitratos- (Araújo et al., 2014).

Dentro de este tema de investigación, se ha dirigido mucho interés a la contribución del sistema respiratorio mitocondrial a la fotosíntesis. Se ha propuesto que la disfunción del sistema respiratorio mitocondrial afecta la eficiencia fotosintética y en ocasiones incluso la producción de biomasa. Esto sugiere que tanto las vías metabólicas de las mitocondrias como de los cloroplastos están íntimamente relacionados para la asimilación óptima de C.

En el metabolismo fotorrespiratorio (Fig. 6) se produce el aminoácido glicina, el cual ingresa a la mitocondria mediante un transportador de seis cruces transmembranales de la familia SLC25a (Picault et al., 2004). Posteriormente este aminoácido es metabolizado por la enzima glicina decarboxilasa (GDC), ocasionando que la glicina se descarboxile produciendo amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), el cual activa a la enzima piruvato decarboxilasa (PDC)-cinasa la cual al fosforilar a la PDC la inactiva (inactivación reversible). De esta forma, la enzima PDC es sumamente importante para el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Este ciclo se ve inactivado por acción del metabolismo fotorrespiratorio, produciendo una reducción del 95% de su metabolismo (Yoshida et al., 2011). En este proceso se ven involucrados cloroplastos-peroxisoma-mitocondria

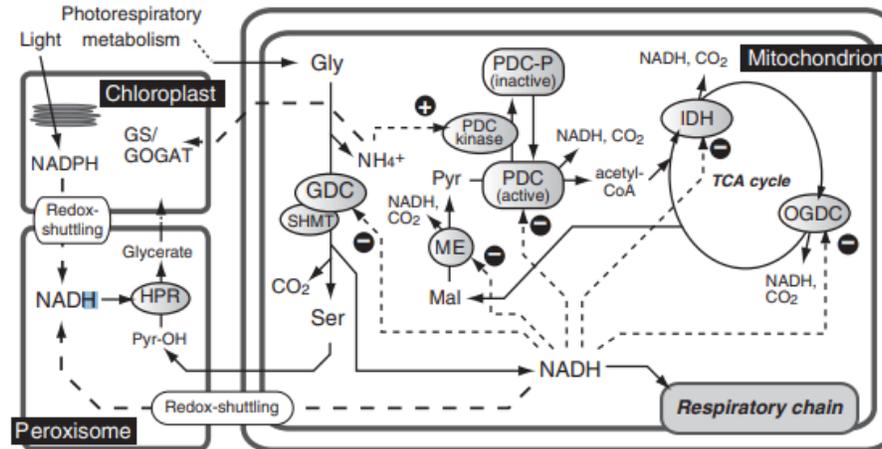
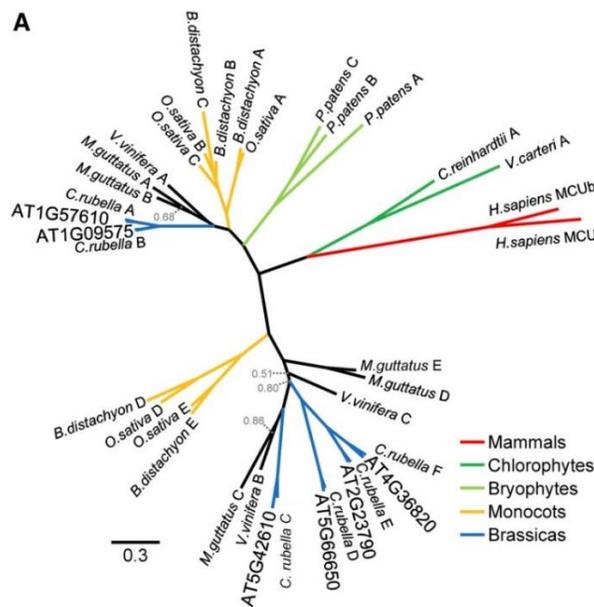


Fig. 6. Relaciones entre el metabolismo del carbono fotorespiratorio y no fotorespiratorio en las mitocondrias (Yoshida et al., 2011).

## 1.6 El complejo Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU)

En las mitocondrias de mamíferos, el complejo uniportador de calcio mitocondrial (MCU) controla gran parte de la actividad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  medible a través de las membranas internas (Wang et al., 2018). Tras su descubrimiento y caracterización inicial, así como la identificación de sus componentes moleculares, incluida la unidad formadora de canales MCU, junto con algunos de sus reguladores, incluidos MICU1 - Proteína para la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hay 3 isoformas reportadas, MICU1, MICU2 y MICU3)- y EMRE -Proteína transmembranal que ancla a MICU1 al MCU mediante una cola de poliaspartato-, el estudio del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias de mamíferos se ha estudiado ampliamente (Pallafacchina et al., 2018). Tres características distintivas definen el transporte de calcio mitocondrial de los mamíferos: 1) su cinética rápida, 2) la inhibición con derivados de rutenio y 3) su dependencia del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) (De Stefani et al., 2016). Más recientemente se han descrito las propiedades de MCU y las subunidades MICU en la planta modelo *A. thaliana* (At-MICU) sobre la fisiología vegetal general (Wagner et al., 2015). A pesar de que existe evidencia que indica la presencia de un MCU canónico en

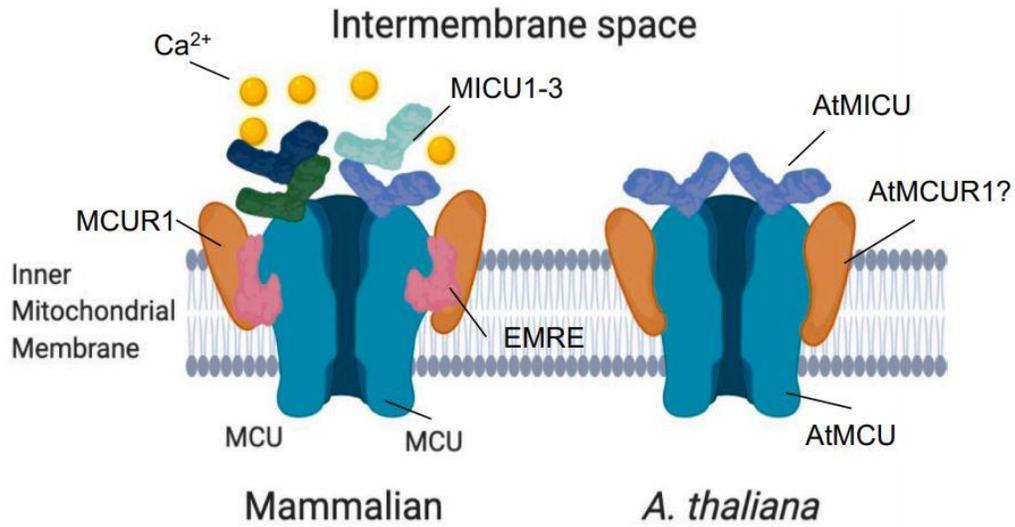
mitocondrias y cloroplastos en diversas plantas, tanto su actividad como posible papel en la fisiología vegetal no han sido estudiados a profundidad -Fig. 7- (Wagner et al., 2015; Teardo et al., 2017; Selles et al. 2018). Los pocos estudios sobre MCU y sus proteínas accesorias en plantas se han llevado a cabo en *A. thaliana*. Lo anterior se debe a que *A. thaliana* presenta un rápido tiempo de generación, gran cantidad de progenie y un genoma diploide relativamente pequeño, el cual fue el primero en ser secuenciado en plantas (Philip et al., 2013). Actualmente existen extensas bibliotecas de mutantes de inserción que han facilitado la caracterización de muchos genes y sus productos (<https://www.arabidopsis.org/>). Estas herramientas disponibles para *Arabidopsis* han contribuido a una mejor comprensión de múltiples procesos básicos de las plantas, entre los cuales destacan la producción y respuesta a hormonas, los ritmos circadianos y el desarrollo de las diversas estructuras vegetales entre otros (Wang et al., 2018).



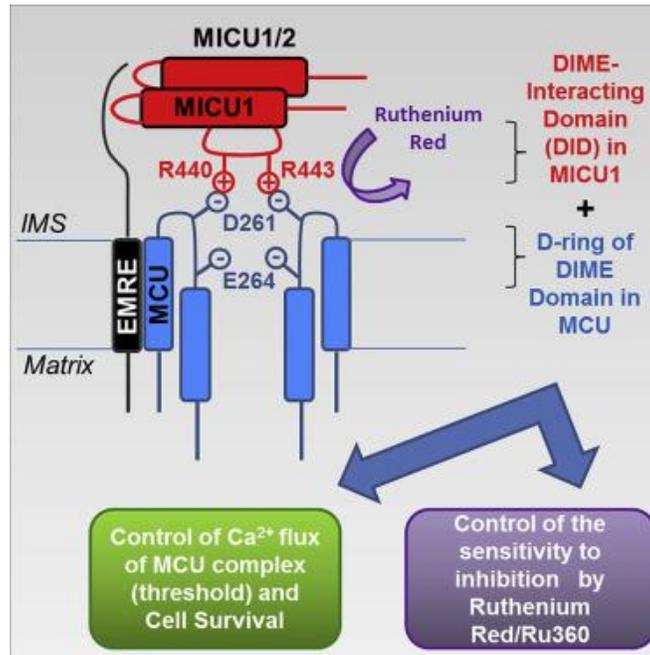
**Fig. 7:** Árbol filogenético de homólogos del complejo uniportador de calcio mitocondrial (MCU) en diversas especies vegetales y algunos mamíferos. MCU se encuentra ampliamente distribuido en el reino *plantae* (Imagen tomada de Teardo et al., 2017).

En los experimentos, las plantas que presentaban deficiencia de At-MICU mostraron niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  basales intramitocondriales elevados, junto con el manejo alterado del  $\text{Ca}^{2+}$  de la matriz tras la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por ATP (esto en raíces). Además, presentaron modificaciones ultraestructurales en su red mitocondrial, donde los orgánulos parecían menos electrodensos hacia el centro y "tubulares" hacia la periferia. Estos resultados sugieren que la falta de MICU1 de hecho perturba el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual también se ha detectado en mitocondrias de mamíferos (Wagner et al., 2015).

En *A. thaliana* no se han encontrado otros componentes accesorios de MCU, incluidos EMRE, MCUB, MICU2 y MICU3. Sin embargo, la presencia de homólogos de MCUR1 de mamíferos -cuya participación como componentes de MCU ha sido debatida- puede encontrarse en *A. thaliana* (Fig. 8) (Mallilankaraman et al., 2012; Gutiérrez-Aguilar M., 2020). Otro grado de complejidad en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de MCU en plantas reside en el hecho de que *A. thaliana* tiene seis isoformas de MCU (AtMCU), de las cuales dos se expresan en mitocondrias de los tubos polínicos (AtMCU1, AtMCU2) y una en raíces (AtMCU3). En el caso de AtMCU1, se ha demostrado que puede formar canales sensibles a RuR (la sensibilidad al RuR es conferida mediante una interacción potencial con el dominio DIME -Dominio de interacción en el anillo D de MCU que involucra las argininas 440 y 443- del complejo MCU) además de una interacción funcional con AtMICU1 tras la constitución del núcleo (Fig. 9) (Antony et al., 2016; Paillard et al., 2018).



**Fig. 8: Composición proteica del complejo uniportador de calcio mitocondrial en mamíferos y *A. thaliana*.** Imagen tomada de Gutiérrez-Aguilar M., 2020.



**Fig. 9. Sitio de interacción del Rojo de Rutenio (RuR).** Imagen tomada de Paillard et al., (2018).

Las mitocondrias de las raíces de las plántulas deficientes en AtMCU1 también presentan cambios leves pero significativos en el manejo del Ca<sup>2+</sup>, en lo que concierne al fenotipo

presentan raíces más cortas (Carraretto et al., 2016). Específicamente, se reducen las tasas de acumulación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto sugiere que AtMCU1 tiene un papel significativo en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, pero otras isoformas de AtMCU pueden contrarrestar tales deficiencias de transporte de calcio, debido por la delección de AtMCU1, este estudio encontró mayores niveles de transcripción de AtMCU4 en hojas de *A. thaliana*, lo que sugiere un posible efecto compensatorio sobre la eliminación de AtMCU1 (Carraretto et al., 2016). Sin embargo, la sobreexpresión de AtMCU1 dio como resultado un fenotipo similar en comparación con la deficiencia de AtMCU1 en términos de longitud de raíz más corta y cambios en la morfología mitocondrial (Carraretto et al., 2016). En conjunto, estos estudios sugieren que los niveles de MCU en las plantas deben ajustarse con precisión para garantizar una señalización adecuada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Gutiérrez-Aguilar M., 2020).

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sésiles, y por lo tanto no pueden alejarse de las condiciones ambientales adversas tales como la deficiencia de nutrientes, la sequía, la salinidad, el frío y aquellas causadas por el ataque de patógenos y herbívoros. Por esta razón resulta importante comprender los mecanismos celulares de susceptibilidad o resistencia a condiciones adversas. En este sentido, las mitocondrias y los cloroplastos son de vital importancia para la homeóstasis celular y su papel en la respuesta a diversos tipos de estrés ha sido reportada recientemente (Philip et al., 2013).

Por lo anterior, en el presente proyecto de investigación se propone estudiar un probable sistema de transporte de calcio en cloroplastos aislados.

## **2. Hipótesis**

Si el transporte de calcio intracelular en cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* es dependiente del uniportador de calcio mitocondrial, entonces la eliminación genética de la subunidad reguladora AtMICU1 deberá alterar la cinética de transporte de este catión divalente.

## **3. Objetivo**

### **Objetivo general.**

- Determinar la probable presencia de un uniportador de calcio mitocondrial en cloroplastos.

### **Objetivos particulares.**

- Adaptar un método para aislar cloroplastos de hojas intactas o protoplastos.
- Caracterizar el transporte de calcio en cloroplastos aislados.
- Determinar una probable inhibición con rojo de rutenio.

## **4. Metodología y procedimiento experimental**

### **Material vegetal**

Con la finalidad de validar la técnica de extracción de cloroplastos, se utilizaron hojas de *Spinacia oleracea* (espinaca) como material vegetal inicial. Esta especie cuenta con una probable isoforma del uniportador de calcio en cloroplastos utilizando la herramienta bioinformática BLAST (anexo fig. A). Las hojas de *S. oleracea* fueron adquiridas en la Tienda UNAM localizada en Ciudad Universitaria. Adicionalmente se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 (Columbia ecotipo) y la planta mutante MICU1-KO (Cepa mutante carente de *micu-1*) del *Arabidopsis* Biological Resource Center. Las plantas usadas para los aislamientos fueron de 2-3 semanas de crecimiento.

### **Materiales**

1. Caja Petri
2. Tijeras.
3. Tubos de microcentrífuga
4. Tubos de centrifuga 50ml
5. Un agitador magnético
6. Tela Miracloth
7. Gasas

### **Equipos**

8. Fluorómetro Spectrovis Plus Vernier
9. Centrífuga para tubos de microcentrífuga

10. Centrifuga para tubos Falcon
11. Microscopio óptico
12. Microscopio de fluorescencia
13. Balanza analítica
14. Biodrop

### **Preparación del material vegetal**

Se retiraron las hojas del ramo de espinaca. Se lavaron con abundante agua para retirar la tierra de las hojas, después se realizó un segundo lavado con agua destilada y se dejaron secar sobre un papel absorbente. Por último las hojas se mantuvieron en refrigeración hasta ser utilizadas en un intervalo de tiempo no mayor a una semana.

La segunda especie vegetal utilizada en el estudio fue *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0 (utilizada como control) y una mutante isogénica llamada MICU1-KO. Esta última cepa carece del regulador del uniportador de calcio mitocondrial -MICU1- (Wagner et al., 2015). Se germinaron semillas en cajas Petri con medio Murashige-Skoog (MS) y 2% de sacarosa.

En la segunda semana de crecimiento, las plántulas se trasplantaron en macetas con sustrato Sunshine Mix #3, vermiculita y agrolita en proporción 3:1:1 respectivamente -Fig. 10- [Pedroza-García et al., 2015].

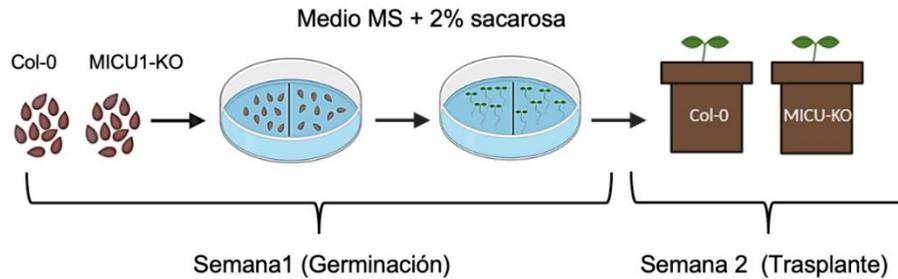


Fig. 10. Germinación de semillas de las dos cepas de *A. thaliana* (López C., 2020).

### Caracterización genotípica entre cepas

Al igual que en el estudio de Wagner y colaboradores, al usar un juego de los primers LBb1.3, MICU RP1 y MICU LP2, la cepa Wild type (WT) da un amplicón de 1000bp. Por otro lado, la cepa carente de *micu-1* (gen que codifica para la proteína MICU1) presenta un amplicón de 700bp al usar los primers LBb1.3 y MICU RP1 y no se detectó amplicón en la cepa WT (Fig. 11) (López C., 2020).

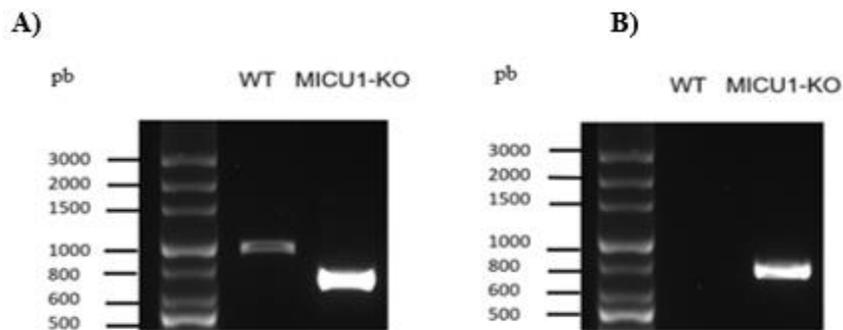


Fig 11. Genotipificación de las cepas silvestre (Col-0) y mutante carente de *micu-1* (MICU1-KO).

Imagen tomada de López, C. 2020 (tesis de licenciatura).

Tabla 1. Primers empleados en la genotipificación y su secuencia (López C., 2020).

| Nombre Oligonucleotidos | Secuencia             |
|-------------------------|-----------------------|
| LBb1.3 (TDNA pROK2)     | ATTTTGCCGATTCGGAAC    |
| MICU RP1                | TAGACAAGGAGTTGGCCACAG |
| MICU LP2                | TTACATGCGTCAGCTGAGTTG |

LBb1.3 (TDNA pROK2), MICU RP1, MICU LP2 son oligonucleótidos específicos de *micu-1*

Los resultados sugieren la confirmación del genotipo de las cepas. En la imagen A) (Fig. 11), se observan las bandas que confirman la mutación de MICU1-KO. El DNA (Ácido desoxirribonucleico) extraído de la cepa (Wild type) WT sometido a una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con sondas específicas da un amplicón de 1000 pb (pares de bases), mientras que la MICU1-KO uno menor (700 pb). En la imagen B) -Fig. 11- se confirma que la cepa MICU1-KO es homocigota nula, ya que se observó el mismo amplicón de 700 pb mientras que con el DNA de la cepa WT no se detectó un amplicón (López C., 2020).

### **Aislamiento de cloroplastos de *S. oleracea***

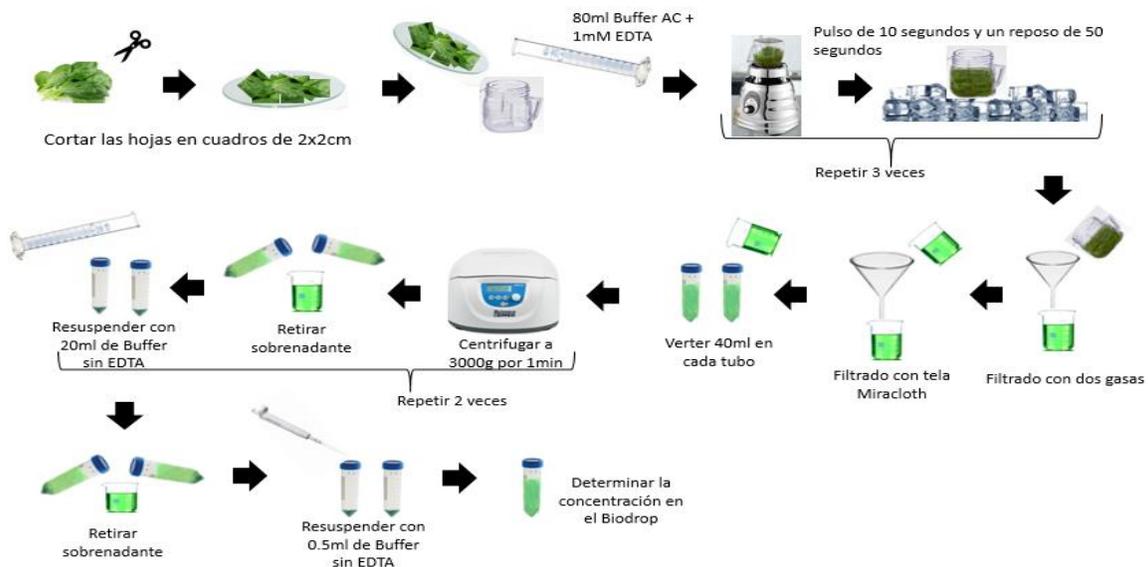
Se cortaron las hojas de la espinaca en cuadritos de 2x2cm hasta tener un aproximado de 3-4 g y se reservaron en un vidrio de reloj previamente enfriado. Las hojas de espinaca se depositaron en el contenedor y se adicionaron 80ml de Buffer de aislamiento de cloroplastos (AC) + 1mM (milimolar) EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

*Nota: Las muestras se deben mantener en condiciones cercanas a 0°C.*

A continuación, se cerró la cámara y se homogenizó con tres pulsos de 10 segundos c./u. Entre un pulso y otro se dejó reposar (colocar en hielo) 50 segundos/pulso. Después se filtró el homogenizado empleando dos gasas, el filtrado se recibió en un vaso de precipitados, y se realizó un último filtrado ahora usando tela Miracloth.

Se depositaron 40ml en cada uno de los dos tubos de centrifuga redondeados. Se centrifugó a 3000 Fuerza g (g) por un minuto. Una vez terminado se desechó el sobrenadante de ambos tubos, se resuspendió el sedimento con 20ml de Buffer AC sin EDTA. A continuación, se volvió a centrifugar con las mismas condiciones anteriores (repetir dos veces).

Se eliminó el sobrenadante de ambos tubos, después se resuspendió el sedimento con 0.5ml de Buffer AC sin EDTA en un tubo, se procedió a concentrar la muestra vertiendo los 0.5ml en el segundo tubo y se volvió a resuspender. Por último, se determinó la concentración en el Biodrop, además se realizó la observación de los cloroplastos en el microscopio (Fig. 12).



**Fig. 12. Procedimiento de aislamiento y cuantificación de cloroplastos de *S. oleracea*.** Buffer AC: Buffer Aislamiento de cloroplastos (Procedimiento adaptado de Mills et al., 1980).

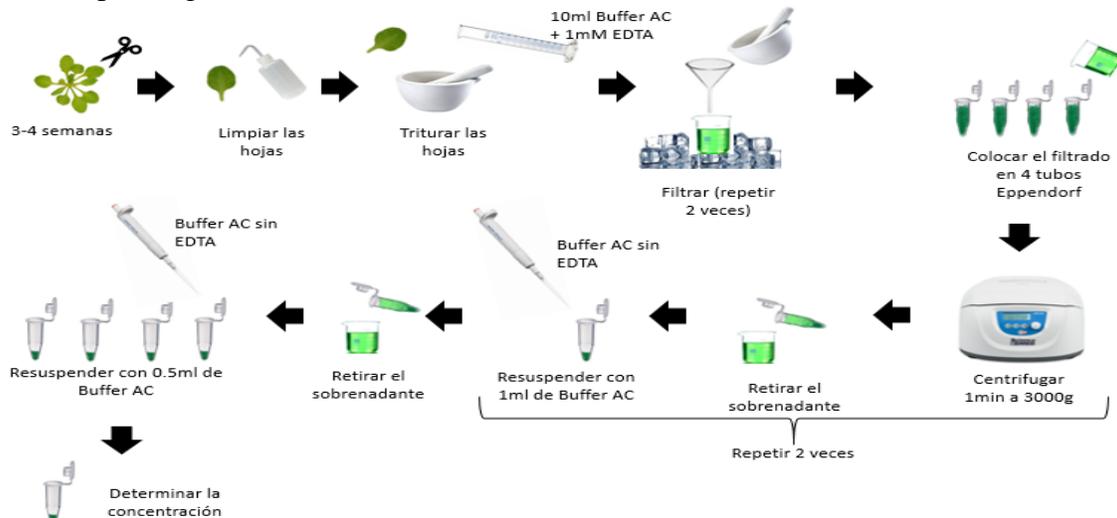
### Aislamiento de cloroplastos de *A. thaliana*

Se recolectaron aproximadamente 0.5g de hojas de *A. thaliana* (Col-0 y MICU1-KO), se realizó un lavado a las hojas con agua destilada y posteriormente se dejaron secar en papel absorbente. Después de este paso se mantiene todo el material que se usará en cadena de frío, se repitió el mismo procedimiento para cada una de las cepas.

Una vez secas las hojas, se colocaron en un mortero el cual previamente ha sido enfriado, se vertió 10ml de Buffer AC + 1mM EDTA y se procedió a triturar.

Utilizando un embudo y dos trozos de tela miracloth se filtró el triturado (repetir dos veces), el filtrado se recibió en un vaso de precipitados, se colocó en cuatro tubos Eppendorf 1.5ml del filtrado.

A continuación, se centrifugaron los tubos por un minuto a 3000g, una vez terminado el tiempo se eliminó el sobrenadante de todos los tubos Eppendorf y se resuspendió el sedimento de cada tubo con 1ml de Buffer AC sin EDTA, luego se centrifugó a 3000g por un minuto (repetir dos veces). Después se eliminó el sobrenadante de los cuatro tubos Eppendorf, para concentrar la muestra se resuspendió el sedimento de un tubo con 0.5ml de Buffer AC, una vez resuspendido se vierten esos mismos 0.5ml al segundo tubo y se repitió el procedimiento con los tubos restantes. Finalmente, se procedió a determinar la concentración en el Biodrop, además se realizó la observación de los cloroplastos en el microscopio (Fig. 13).

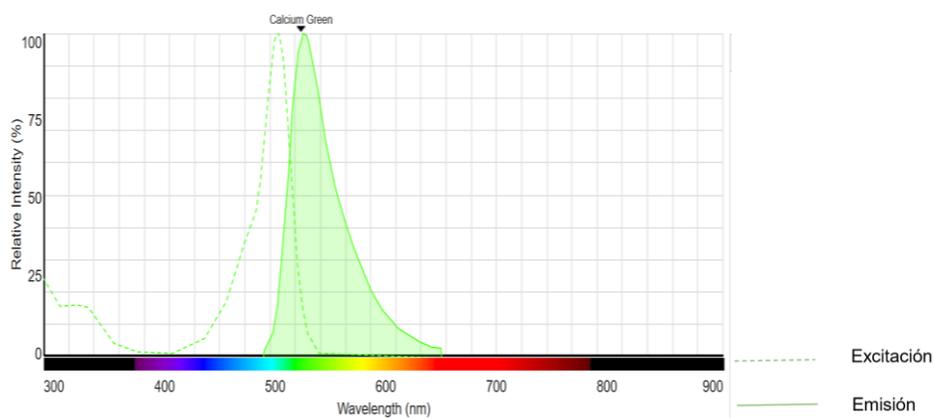


**Fig. 13. Procedimiento de aislamiento y cuantificación de cloroplastos de *A. thaliana*.** Buffer AC: Buffer

Aislamiento de cloroplastos (Mills et al., 1980)

## Ensayo de medición del transporte de calcio intracelular por fluorometría

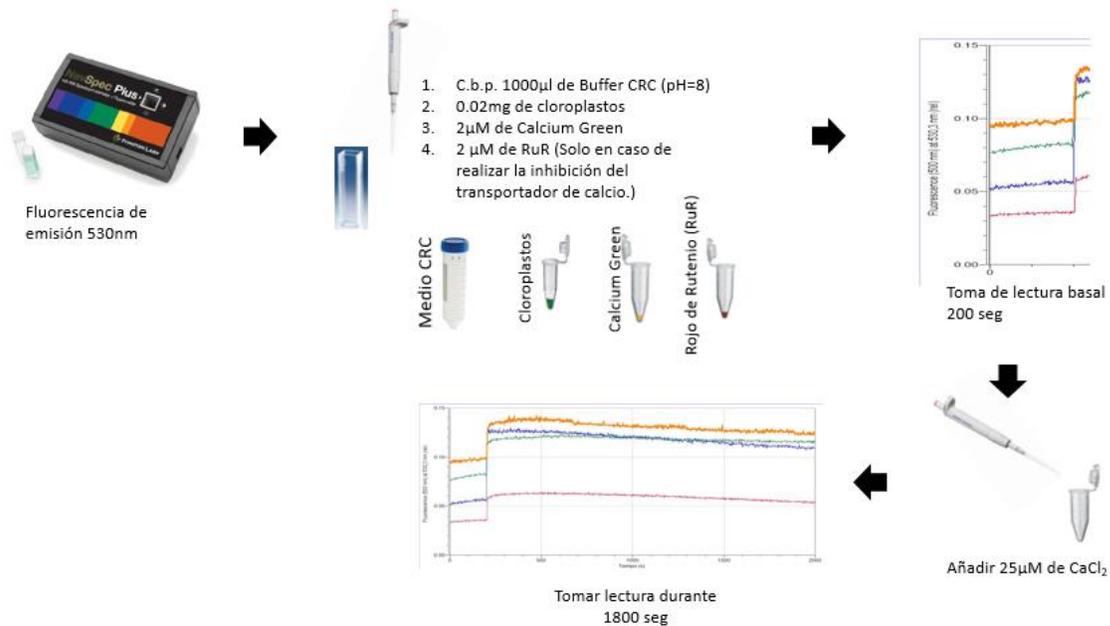
El transporte de calcio se determinó por un método ampliamente utilizado en mitocondrias aisladas o células de mamíferos permeabilizadas (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014). Para ello se utilizó el indicador fluorescente Calcium Green 5N el cual absorbe luz a 500nm (nanómetros) y emite con un máximo de 530nm (Fig. 14). Al ser un indicador impermeable con una constante de afinidad reportada de  $4.3\mu\text{M}$  (Rajdev et al.,1993). La unión con los iones  $\text{Ca}^{2+}$  no es considerada fuerte y por ende, cuando el calcio es transportado a un compartimento subcelular, el indicador permanece en el exterior de los organelos y la fluorescencia disminuye. Lo anterior constituye un método relativamente sencillo y seguro para medir cambios en las concentraciones de calcio asociadas al transporte de este catión divalente.



**Fig. 14: Espectro de fluorescencia de Calcium green-5N.** Imagen modificada de la hoja del reactivo obtenido de ThermoFisher Scientific.

Los ensayos se realizaron en un tiempo de 2000s. En una celda de plástico se añadió en el siguiente orden c.b.p (cuanto baste para). 1000 $\mu\text{l}$  (microlitros) de Buffer CRC - capacidad de retención de calcio- (pH=8), 0.02 mg de los cloroplastos, 2 $\mu\text{M}$  de Calcium Green(fluoróforo). Por último, se añadió **2  $\mu\text{M}$  de RuR** en caso de realizar la evaluación del efecto inhibitor de transporte de calcio.

Se tomó la lectura basal por 200s, después se añadió  $25\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Se tomaron lecturas hasta llegar a los 2000s y se guardaron los resultados obtenidos para su posterior análisis estadístico (Fig. 15).

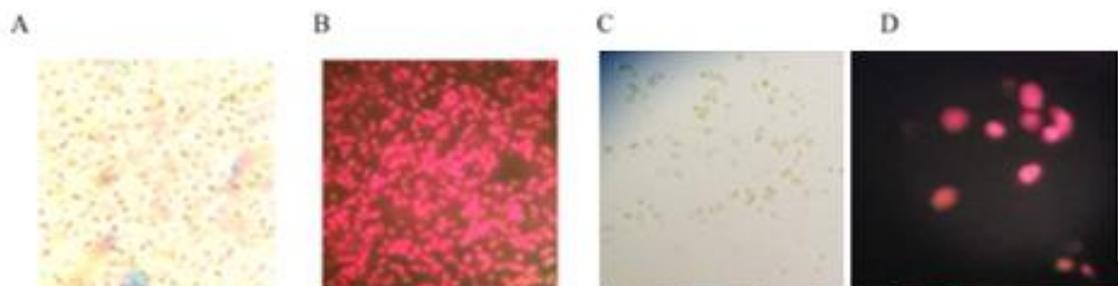


**Fig. 15: Ensayo de transporte de iones calcio mediante un método fluorométrico desarrollado en el laboratorio.** 1) Se inició calibrando el fluorómetro y adicionando la solución reguladora de pH, reactivos y cloroplastos. Se detectan cambios en la fluorescencia a 530nm y se utilizan las pendientes que son proporcionales a la velocidad de transporte de calcio.

## 5. Resultados

Para poder evaluar la calidad de las preparaciones de cloroplastos, estos se observaron en un microscopio de fluorescencia. En estas observaciones se determina tanto la morfología de los organelos como la fluorescencia de la clorofila, cuya intensidad nos indica si han sido sometidos a estrés mecánico excesivo o no (Fig. 16). Las observaciones consistentemente

muestran una morfología ovalada en los organelos. Además, se detectaron altos niveles de fluorescencia, indicativo de preparaciones susceptibles de ser usadas para los experimentos.

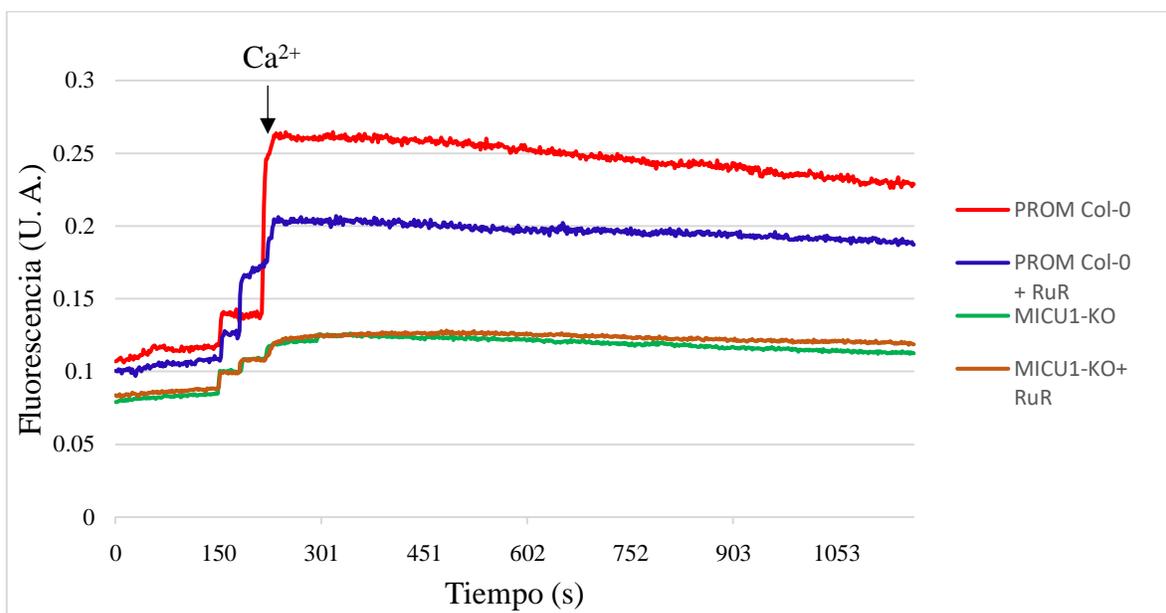


**Fig. 16. Cloroplastos aislados de *S. oleracea* y *A. thaliana*.** Aislamiento de cloroplastos de *Spinacia oleracea* A, B y *Arabidopsis thaliana* C, D. Cloroplastos irradiados con luz blanca (A y C) y en el campo de autofluorescencia de la clorofila al ser excitada a 400nm (B y D). Micrografías representativas.

En las imágenes A y B que corresponden a los cloroplastos de *S. oleracea* no se observa ninguna interferencia por parte del medio o algún otro contaminante. Los cloroplastos presentan una respuesta aceptable a la fluorescencia. Por lo tanto, la espinaca adquirida en la Tienda UNAM es un buen modelo. De igual manera para las imágenes C y D que corresponden a cloroplastos de *A. thaliana* no se observa presencia de contaminantes, se aprecia la forma ovalada de los cloroplastos y buena respuesta a la fluorescencia. La única diferencia perceptible es la cantidad de organelos. Esto debido a diferencias en la cantidad de muestra tomada de los dos modelos.

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$  en las dos especies de interés. Los cloroplastos de *S. oleracea* fueron incubados con el indicador fluorescente y al adicionar un bolo de calcio equivalente a  $25\mu\text{M}$ , se observó un incremento

abrupto en la fluorescencia seguido de una disminución paulatina de la fluorescencia asociada al transporte de calcio al interior de los organelos (Grafica 1).



**Grafica 1. Ensayo de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en cloroplastos de *A. thaliana* Col-0 (cepa Wild type) y MICU1-KO (cepa carente de la proteína MICU1).** La flecha denota la adición del bolo de calcio. n=5. Promedio de los datos obtenidos en los cuatro experimentos realizados de cada uno de las cepas con presencia de inhibidor y en ausencia de 2  $\mu\text{M}$  de Rojo de Rutenio (RuR).

Posteriormente se cuantificaron las velocidades absolutas de las cepas (Col-0 y MICU1-KO). Esto se realizó midiendo la pendiente de los gráficos la cual es proporcional a la velocidad de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los cloroplastos en intervalos de tiempo similares (Tabla 2). Los resultados sugieren que las velocidades de transporte son similares. Por lo anterior se decidió evaluar estos datos usando dos tipos de análisis estadísticos.

**Tabla 2. Velocidades absolutas de transporte de iones calcio obtenidas en los cinco experimentos realizados.** Las unidades están dadas en unidades relativas de fluorescencia sobre segundo.

| # Experimento | <i>A. thaliana</i> Col-0 |             | <i>A. thaliana</i> MICU1- KO |             |
|---------------|--------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
|               | Valor abs. Pendientes    |             | Valor abs. Pendientes        |             |
|               | sin RuR                  | con RuR     | sin RuR                      | con RuR     |
| <b>1</b>      | 0.000006631              | 0.00000452  | 0.00001184                   | 0.000008938 |
| <b>2</b>      | 0.00001478               | 0.0000159   | 0.00001886                   | 0.000008167 |
| <b>3</b>      | 0.00001987               | 0.000005192 | 0.000008864                  | 0.000005324 |
| <b>4</b>      | 0.0001406                | 0.00002941  | 0.00001735                   | 0.000006919 |
| <b>5</b>      | 0.00003348               | 0.00001454  | 0.00003187                   | 0.00001587  |
| <b>PROM</b>   | 4.30722E-05              | 1.39124E-05 | 1.77568E-05                  | 9.0436E-06  |
| <b>SE</b>     | 2.47694E-05              | 4.52097E-06 | 3.96646E-06                  | 1.81285E-06 |

*A. thaliana* Col-0 (Cepa Wild type), *A.thaliana* MICU1-KO (Cepa mutante carente de la proteína MICU1), Rojo de Rutenio (RuR).

Se llevaron a cabo pruebas t de student para evaluar probables diferencias entre dos grupos a comparar. Inicialmente se compararon las velocidades de transporte de iones calcio entre las mismas cepas (Col-0 o MICU1-KO) sin RuR versus las que fueron incubadas con RuR. De igual forma, se compararon cepas distintas en ausencia y presencia de RuR. Se observó que solo hay un caso en el que se observa una diferencia significativa. Por lo tanto, el efecto inhibitorio del RuR pudo ser detectado en la cepa MICU1-KO (Tabla 3).

**Tabla 3. Significancia estadística entre las variables.** El signo \* denota  $P < 0.05$

| Prueba t student   |                       |               |                    |         |
|--------------------|-----------------------|---------------|--------------------|---------|
| Variable 1         | Variable 2            | Estadístico t | Valor critico de t | Valor p |
| <b>Col-0</b>       | <b>Col-0 + RuR</b>    | 1.39          | 2.77               | 0.23    |
| <b>MICU1-KO</b>    | <b>MICU1-KO + RuR</b> | 3.54          | 2.77               | 0.02*   |
| <b>Col-0</b>       | <b>MICU1-KO</b>       | 1.02          | 2.77               | 0.36    |
| <b>Col-0 + RuR</b> | <b>MICU1-KO + RuR</b> | 1.00          | 2.77               | 0.37    |

Col-0 (Cepa Wild type), MICU1-KO (Cepa mutante carente de la proteína MICU1), Rojo de Rutenio (RuR).

Para poder determinar si existe un efecto genético adicional al farmacológico sobre un posible cMCU. Se llevó a cabo un análisis de varianza entre todas las condiciones (Tabla 4). En este análisis observamos que no hay diferencias significativas asociadas a la eliminación de MICU1. Por lo tanto, la eliminación genética de esta proteína no parece alterar el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Usando esta prueba también se pudo determinar que el RuR no tuvo un efecto significativo en el posible transportador de calcio, con excepción de la cepa MICU1-KO.

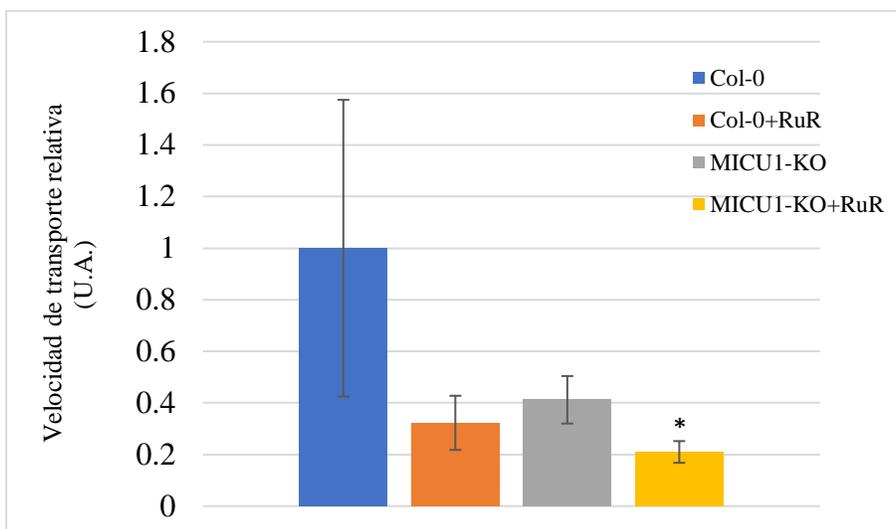
**Tabla 4: Análisis de varianza.**

| <b>ANALISIS DE VARIANZA</b> |      |
|-----------------------------|------|
| <b>Valor F</b>              | 1.41 |
| <b>Valor crítico para F</b> | 3.23 |
| <b>Probabilidad</b>         | 0.27 |
| <b><math>\alpha</math></b>  | 0.05 |

A continuación, se decidió evaluar las velocidades de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Grafica 2) de ambos tipos de cepas (Col-0 y MICU1-KO), como también del efecto inhibitorio del RuR. Observamos que comparando Col-0 vs MICU1-KO no muestran una diferencia significativa en la velocidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Comparando Col-0 vs Col-0+RuR se observó que no hay un efecto inhibitorio debido a que no hay diferencia significativa en la velocidad de transporte del ion, pero aún hay la posibilidad de que empleando una concentración más alta se puede observar un efecto inhibitorio. En la comparativa de MICU1-KO vs MICU1-KO+RuR se observó que, si hay diferencia significativa, por lo tanto se está presentando un efecto inhibitorio por parte de RuR. Finalmente se llevó a cabo una comparativa entre la cepa Col-0 vs MICU1-KO ambos en presencia de RuR y se observó que, no hay una diferencia

significativa en la velocidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo tanto, no podemos saber si el RuR tiene un mayor efecto en alguna cepa.

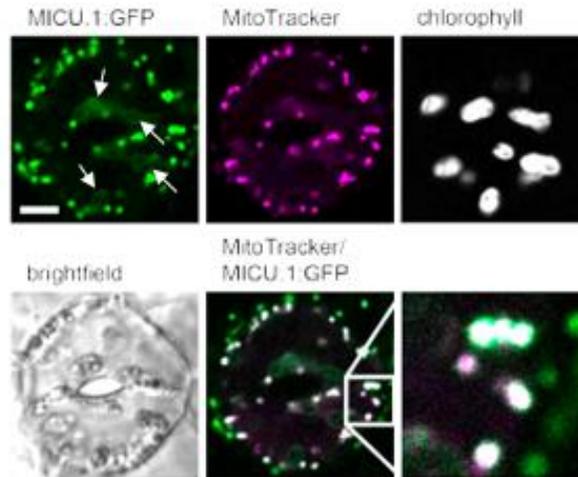
**Grafica 2. Comparación de las velocidades de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  entre las cepas Col-0 y MICU1-KO en presencia y ausencia de RuR.**



Representación gráfica de los datos presentados en la tabla 3. N=5. \* $p < 0.05$  versus MICU-KO. Col-0 (Cepa Wild type), MICU1-KO (Cepa mutante carente de la proteína MICU1), Rojo de Rutenio (RuR).

## 6. Discusión de Resultados

Wagner y colegas han reportado previamente que las plantas carentes de MICU1 presentan anomalías en el transporte de calcio y en la ultraestructura mitocondrial (Wagner et al., 2015). En su estudio también se constató la colocalización casi total de MICU1 con marcadores mitocondriales. Sin embargo, también se pudieron observar mínimas señales de fluorescencia asociadas a una proteína de fusión MICU1-GFP en cloroplastos (Fig. 17).

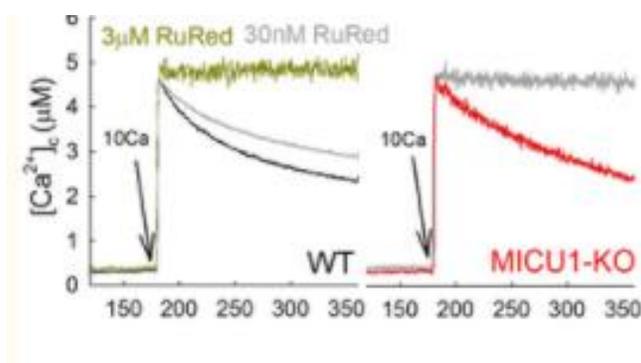


**Fig. 17. Colocalización de la subunidad MICU1.** La proteína de fusión MICU-GFP - proteína fluorescente sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  - colocaliza casi totalmente con el marcador mitocondrial Mitotracker. Sin embargo, también es posible detectar una mínima señal verde fluorescente en cloroplastos (flechas). Imagen modificada de Wagner et al., 2015.

En el presente trabajo se constató que los cloroplastos de *Spinacia oleracea* y *Arabidopsis thaliana* presentan características a nivel microscópico similares, lo cual nos permitió determinar que el método de aislamiento es el adecuado. La morfología nos muestra que los cloroplastos no sufrieron algún tipo de estrés (mecánico, térmico o estrés por pH) durante el procedimiento. Además, la muestra obtenida no presenta contaminantes que pudieran interferir en los resultados. En las imágenes 11.B y 11.D se detectó una autofluorescencia aceptable, con lo cual se asume que los cloroplastos de ambas muestras se encuentran en óptimo estado para ser utilizados en los experimentos. Esta última metodología se emplea para medir el estado fisiológico de las plantas o para evaluar la salud/vigor de estas en los laboratorios, empleando dispositivos portátiles. También es útil para evaluar la respuesta de las plantas a los cambios en el medio ambiente (Donaldson L., 2020).

La Grafica 1 detalla los cinco experimentos realizados en dos tipos de *A. thaliana* (Col-0 y MICU1-KO). Se observa que los gráficos presentan una pendiente negativa. Esto indica que el  $\text{Ca}^{2+}$  está entrando a los cloroplastos, debido a que la pendiente de los gráficos es proporcional a la velocidad de entrada de calcio.

Por lo anterior, a pesar de que podemos decir que, si hay un transportador de calcio en las paredes de los cloroplastos, el transporte de este ion es lento en comparación con otras especies. Específicamente, se ha visto que en músculo esquelético de ratones (Fig. 18), la entrada de calcio a las mitocondrias es considerablemente más rápido y depende de  $\Delta\Psi$  (Vecellio Reane et al., 2016; Paillard et al., 2018).

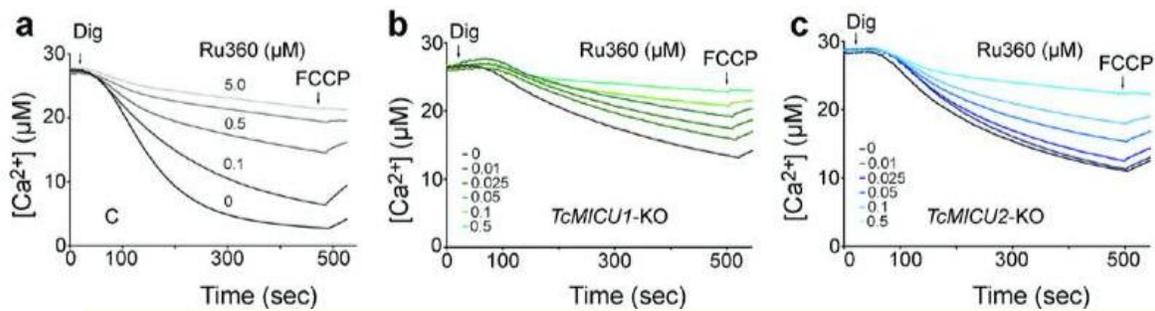


**Fig. 18.** Dinámica de calcio de las cepas WT (Wild type) y MICU1-KO HEK (línea celular HEK293 con mutación carente de MICU1) con diferentes construcciones MICU1 (tipo de isoforma de la subunidad reguladora MICU), con o sin Rojo de rutenio (RuR) (Imagen tomada Paillard et al., 2018).

En mamíferos, el  $\Delta\Psi$  oscila entre los -180 y -200mV (Nicholls et al., 2013). En estas condiciones, la ecuación de Nernst predice que al añadir iones calcio estos se distribuirán a razón de 1 ion afuera de la mitocondria por cada  $1 \times 10^6$  iones en la matriz mitocondrial. Considerando los estudios en plantas de Moore y Booner los valores de  $\Delta\Psi$  en mitocondrias aisladas rondan cerca de los -135mV. En estas condiciones, la distribución de iones calcio descrita por la ecuación de Nernst sería de 1 ion afuera de la mitocondria por cada  $1 \times 10^4$

iones en la matriz mitocondrial. Estos dos órdenes de magnitud en la distribución de iones calcio bien podría explicar las diferencias observadas en el transporte mitocondrial de mamíferos versus plantas (Moore et al.,1982). En el caso de cloroplastos, no encontramos reportes sobre el potencial de membrana y las fuerzas que impulsan la entrada de iones calcio a estos organelos.

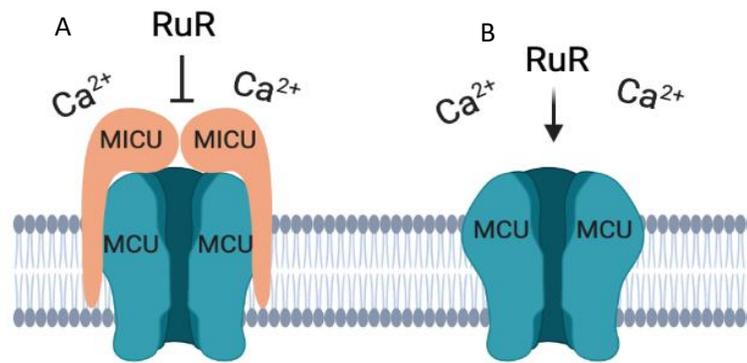
En la Tabla 3 se determinó que solo en la cepa MICU1-KO si presentó el efecto inhibitorio y en los demás casos los valores de las pendientes no presentan diferencias estadísticamente significativas. Esto nos puede indicar que, si hay la presencia de cMCU, además que la concentración de inhibidor utilizada está por debajo de la concentración mínima para actuar sobre el transportador de calcio cMCU. En este sentido, la sensibilidad a RuR varía considerablemente entre especies, un ejemplo de esta diferencia de sensibilidad a inhibidores en MCU lo reportaron Bertolini y colegas empleando como modelo *Trypanosoma cruzi* en los cuales midieron el efecto dosis-respuesta en dos mutantes TcMICU1-KO y TcMICU2-KO (Fig. 19), empleando como inhibidor Ru360. -en la literatura se encuentra que MCU tiene inhibidores específicos, RuR, Ru360 (Complejo de amonio de rutenio dinuclear) y Gadolinio- donde notaron que el MCU de las mitocondrias que no tenían las subunidades MICU1 o MICU2 son más sensibles a los inhibidores (Bertolini et al., 2020; Teardo et al., 2019).



**Fig. 19. Inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial por compuestos a base de rutenio** (Bertonolini et al., 2020).

En resumen, en la cepa Col-0 existe la posibilidad de que sí se lleve a cabo el efecto inhibitorio mediado por RuR, pero requeriría de una mayor concentración del inhibidor.

Los resultados sugieren que la ausencia de MICU1 no ocasiona cambios significativos en el transporte de calcio basal en cloroplastos aislados (Gráfica 2). Esto podría indicar que MICU1 es una subunidad accesoria de MCU exclusiva de mitocondrias. Sin embargo, en ausencia de la proteína MICU1, el transporte de calcio medido fue inhibido por el ligando RuR. Considerando estos resultados, se puede proponer un modelo en donde MICU1 funciona como un regulador en cloroplastos de *A. thaliana* y en su ausencia, el inhibidor RuR tiene acceso al poro o boquete de cMCU en donde se lleva a cabo el transporte de iones calcio. En contraposición, la presencia de MICU1 constituye probablemente un tapón o protección a los efectos de RuR sobre cMCU ya que en presencia de MICU1, los efectos del inhibidor del transporte de calcio no son significativos (Fig. 20).

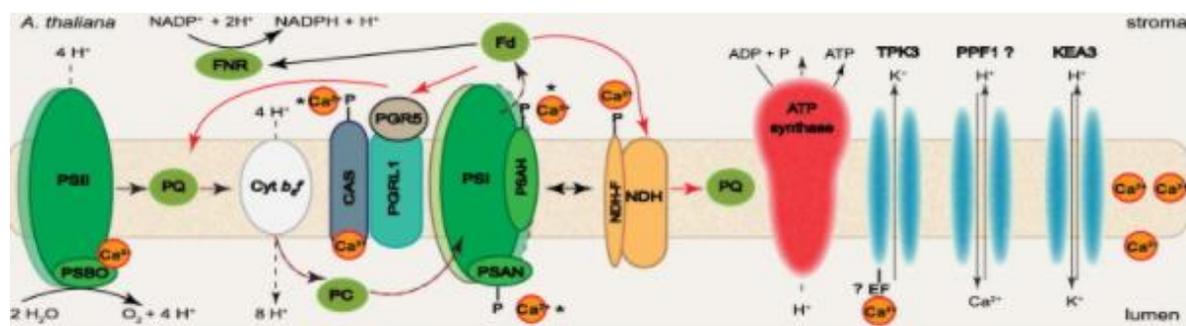


**Fig. 20. Diagrama representativo del cMCU (Uniprotador de calcio mitocondrial localizado en cloroplastos) con las subunidades de MICU (Proteína para la captación de  $Ca^{2+}$ ). Cuando la subunidad MICU1 está presente en cMCU(A) va a interferir en el efecto inhibitorio, debido a que impide la unión del rojo de rutenio con los residuos de Asp y Glu de la secuencia del dominio DIME (Dominio de interacción en el anillo D de MCU), es por ello que cuando la subunidad MICU1 (B) está ausente los inhibidores pueden unirse con mayor facilidad al sitio DIME y por ello muestran una mayor sensibilidad a rojo de rutenio (RuR).**

Al comparar Col-0 + RuR con MICU1-KO + RuR (Grafica 2) se observa un posible efecto inhibitorio el cual aparentemente es mayor en MICU1-KO, aunque este no resulta ser significativo, por lo tanto tal vez aumentando la concentración de RuR podamos diferenciar mejor el efecto del inhibidor. En caso de presentarse esta diferencia, lo que podría estar ocurriendo es que al no tener el transportador la subunidad accesoria MICU1, el inhibidor no tiene que competir con la subunidad permitiéndole ser más afín por el transportador resultando en una entrada de calcio más lenta en la cepa MICU1-KO tratada con RuR. De hecho, Paillard y colegas recientemente demostraron que células de mamíferos carentes de MICU1 presentan una elevada sensibilidad a inhibición de MCU usando RuRed/RuR360, esto debido a una posible competencia por el sitio DID (Dominio de Interacción-DIME) entre la subunidad MICU1 y RuR (Paillard et al., 2018).

Considerando los resultados presentados en este trabajo y aquellos reportados por Wagner y colegas en 2015, es muy probable que MICU1 sea una proteína presente en mitocondrias y cloroplastos. A estas proteínas con localización múltiple se les conoce como ecoformas (Yogev et al., 2011). Existe la posibilidad, ya que los cloroplastos se encuentran en constante contacto con las mitocondrias (Fig. 17) y es común que ambos organelos “compartan” algunas proteínas como por ejemplo translocadores de la familia SLC25a (Picault et al., 2004).

Otro factor que podría estar interfiriendo en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  es la fotosíntesis, debido a que puede estar siendo activada por la adición de este ion, ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como cofactor en el Complejo Generador de Oxígeno (OEC) o Complejo Divisor de Agua que forma parte del fotosistema II (Fig. 21), el cual tiene la función de descomponer de las moléculas de agua (Wang et al., 2019). Por otro lado, PsbQ, PsbP y PsbO son proteínas que forman parte de OEC, de los cuales PsbQ y PsbP requieren  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  como cofactores esenciales (Wang et al., 2019). Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede influir en las propiedades del mecanismo de fotoprotección, transferencia de electrones fotosintéticos, incluso en el ciclo de Calvin-Benson -interacciona con las proteínas FBPase/SBPase- (Wang et al., 2019; Hochmal et al., 2015).



**Fig. 21.** Dinámica del calcio y los mecanismos regulados en cloroplastos de *A. thaliana* (Imagen tomada Hochmal et al., 2015).

En otras palabras, la fotosíntesis podría ser un factor adicional causante de alteraciones del transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que los fotosistemas están trabajando para la generación de ATP, y por lo tanto el flujo de  $\text{H}^+$  a los estromas (quimiosmosis) podría estar interfiriendo el transporte del catión.

Con base a los resultados presentados en la presente tesis más los disponibles en la literatura, es posible proponer que la presencia de un transportador de calcio en cloroplastos es muy probable y que resulta lógico que los cloroplastos lo requieran para su correcto funcionamiento. Por ello la importancia del estudio del transporte de calcio también radica en la transducción de señales. En este sentido, los cloroplastos son capaces de detectar las condiciones ambientales como las sequías (Teardo et al., 2019). Por ejemplo, Teardo y colegas demostraron cómo las modificaciones a MCU les permiten a las plantas adquirir resistencia al estrés. En su estudio más reciente (2019), ellos emplearon dos cepas cMCU-KO (*cmcu-1* y *cmcu-2*) las cuales tienen una mayor resistencia a la falta de agua durante 18 días y les permitió una mejor recuperación en comparación con dos cepas silvestres usando dos ecotipos distintos (Teardo et al., 2019). En ese sentido, los resultados sugieren que la presencia de un complejo MCU completo en cloroplastos podría contribuir a la homeostasis celular al regular el flujo de iones calcio a estos organelos.

## 7. Conclusiones.

- Se logró establecer una metodología para aislar los cloroplastos.
- Se pudo detectar una actividad de transporte de calcio en cloroplastos aislados.
- El transporte es sensible a RuR en ausencia de MICU1.
- MICU1 es un bloqueador de los efectos de RuR.
- La ausencia de MICU1 no modifica la velocidad de transporte de calcio en cloroplastos pero si en protoplastos.
- Los cloroplastos de *A. thaliana* probablemente expresan un MCU.
- Los cloroplastos de *A. thaliana* probablemente expresan otros transportadores de iones calcio.

## 8. Perspectivas.

- Determinar los efectos de diversos reguladores fisiológicos (e.g. ATP) en la cinética de transporte.
- Medir los efectos sobre el transporte de calcio en cloroplastos aislados de plantas sometidas a estrés térmico.
- Detectar MICU1 y MCU por Western Blot en cloroplastos.

## Bibliografía

1. Alberts B., Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Molecular biology of the cell*. Omega Eds, España. pg. 767-769.
2. Antony, A. N., Paillard, M., Moffat, C., Juskeviciute, E., Correnti, J., Bolon, B., Rubin, E., Csordás, G., Seifert, E. L., Hoek, J. B., & Hajnóczky, G. (2016). *MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration*. *Nature communications*, 7, 10955
3. Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A. & Fernie, A.R. (2014). *On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions*. *Photosynth Res* 119, 141–156
4. Batistič, O., & Kudla, J. (2012). *Analysis of calcium signaling pathways in plants*. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(8), 1283–1293.
5. Bertolini, M. S., & Docampo, R. (2020). Different Sensitivity of Control and MICU1- and MICU2-Ablated *Trypanosoma cruzi* Mitochondrial Calcium Uniporter Complex to Ruthenium-Based Inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9316
6. Carraretto, L., Checchetto, V., De Bortoli, S., Formentin, E., Costa, A., Szabó, I., & Teardo, E. (2016). *Calcium Flux across Plant Mitochondrial Membranes: Possible Molecular Players*. *Frontiers in plant science*, 7, 354.
7. Clarkson, D. T., Williams, L., & Hanson, J. B. (1984). *Perfusion of onion root xylem vessels: a method and some evidence of control of the pH of the xylem sap*. *Planta*, 162(4), 361–369.

8. Clarkson D. T. (1993). Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Phil Trans, R. Soc. Lond. B* 341: 5-17
9. Cooper GM (2000). *The Cell: A Molecular Approach; Chloroplasts and Other Plastids*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates
10. Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T. A., & Pottosin, I. (2018). *Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. The New phytologist*, 220(1), 49–69.
11. De Stefani, D., Rizzuto, R., & Pozzan, T. (2016). *Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. Annual review of biochemistry*, 85, 161–192.
12. Díaz, A., Cayón, G., & Mira, J. J. (2007). *Metabolismo del calcio y su relación con la “mancha de madurez” del fruto de banano. Una revisión. Agronomía Colombiana*, 25(2), 280-287.
13. Donaldson L. (2020). *Autofluorescence in Plants. Molecules* (Basel, Switzerland), 25(10), 239
14. Edel, K. H., Marchadier, E., Brownlee, C., Kudla, J., & Hetherington, A. M. (2017). *The Evolution of Calcium-Based Signalling in Plants. Current biology : CB*, 27(13), R667–R679.
15. El Habbasha S.F. and Faten M. Ibrahim (2015). *Calcium: Physiological Function, Deficiency and Absorption*. ,8(12), pp 196-202.
16. Frentzen, M., and R. Griebau. (1994). *Biosynthesis of Cardiolipin in Plant Mitochondria. Plant Physiology* 106. 1527-1532.
17. G. Pallafacchina, S. Zanin, R. Rizzuto, (2018). *Recent Advances in the Molecular Mechanism of Mitochondrial Calcium Uptake* [Version 1; Referees: 4 Approved], F1000Research, 7,

18. García Bossi J., Kumar K., Barberini M. L., Domínguez G. D., Rondón Guerrero Y. D. C., Marino-Buslje C., et al. (2020). *The role of P-type IIA and P-type IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPases in plant development and growth*. J. Exp. Bot. 71, 1239–1248.
19. Grebe, M. (2011). *Unveiling the Casparian strip*. Nature 473, 294–295
20. Griffiths, H. y M.A.J. Parry. (2002). *Plant responses to water stress*. Ann. Bot. 89, 801- 802.
21. Gutiérrez-Aguilar M. (2020). *Mitochondrial calcium transport and permeability transition as rational targets for plant protection*. Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics, 1861(12), 148288.
22. Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., & Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. Journal of molecular and cellular cardiology, 72, 316-325.
23. Hepler P. K. (2005). *Calcium: a central regulator of plant growth and development*. The Plant cell, 17(8), 2142–2155.
24. Hochmal, A. K., Schulze, S., Trompelt, K., & Hippler, M. (2015). *Calcium-dependent regulation of photosynthesis*. Biochimica et biophysica acta, 1847(9), 993–1003.
25. Kordyum, E.L. (2003). *Calcium signaling in plant cell in altered gravity*. Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine 32(8), 1621-1630.
26. Kuyucak S, Andersen OS, Chung SH. (2001). *Models of permeation in ion channels*. Reports on Progress in Physics 64: 1427–1472.
27. Lodish H. (2006). *Biología celular y molecular*. Médica Panamericana Eds., Madrid, pg. 513-634

28. López Moratalla, N., (2008). *Biología y Geología 1º Bachillerato*, España, S.A. EDITEX
29. López, C., (2020). Caracterización del transporte de calcio intracelular en *Arabidopsis thaliana*. (Tesis de grado) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
30. Mallilankaraman, K., Cárdenas, C., Doonan, P. J., Chandramoorthy, H. C., Irrinki, K. M., Golenár, T., Csordás, G., Madireddi, P., Yang, J., Müller, M., Miller, R., Kolesar, J. E., Molgó, J., Kaufman, B., Hajnóczky, G., Foskett, J. K., & Madesh, M. (2012). *MCURI is an essential component of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake that regulates cellular metabolism*. *Nature cell biology*, *14*(12), 1336–1343.
31. Marschner H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*, (2nd ed.). London. Academic Press.
32. Marschner, H. (1986). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, Londres. pp. 7-73, 285-299.
33. Mills D. J., Mitchell P. & Schürmann P. (1980). Modulation of coupling factor ATPase activity in the intact chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. *112*(2), 173-177.
34. Moore, A. L., & Bonner, W. D. (1982). *Measurements of membrane potentials in plant mitochondria with the safranin method*. *Plant physiology*, *70*(5), 1271–1276.
35. Navazio, L., Formentin, E., Cendron, L., & Szabò, I. (2020). *Chloroplast Calcium Signaling in the Spotlight*. *Frontiers in plant science*, *11*, 186.
36. Nicholls, D.G. & Ferguson, S.. (2013). *Bioenergetics: Fourth Edition*. Bioenergetics: Fourth Edition. 1-419.

37. Noguchi K, Yoshida K (2008) *Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. Mitochondrion* 8:87–99.
38. Nunes-Nesi A, Sweetlove LJ, Fernie AR (2007b) *Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. Physiol Plant* 129:45–56.
39. Paillard, M., Csordás, G., Huang, K. T., Várnai, P., Joseph, S. K., & Hajnóczky, G. (2018). *MICU1 Interacts with the D-Ring of the MCU Pore to Control Its Ca<sup>2+</sup> Flux and Sensitivity to Ru360. Molecular cell*, 72(4), 778–785.e3.
40. Pallafacchina, G., Zanin, S., & Rizzuto, R. (2018). *Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1858.
41. Pedroza-García, J. A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sánchez, M., & Plasencia, J. (2015). *Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. Plant molecular biology*, 87(3), 303-315.
42. Philip N. Benfey<sup>1</sup> and Ben Scheres<sup>2</sup>. (2013) *Arabidopsis as a Model for Systems Biology*, Handbook of systems biology 2013, Pages 391-406
43. Picault, N., Hodges, M., Palmieri, L., & Palmieri, F. (2004). *The growing family of mitochondrial carriers in Arabidopsis. Trends in plant science*, 9(3), 138–146.
44. Pittman J. K., Hirschi K. D. (2016). *CAX-ing a wide net: Cation/H(+) transporters in metal remediation and abiotic stress signaling. Plant Biol. (Stuttg)* 18, 741–749.
45. Rajdev, S., & Reynolds, I. J. (1993). *Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. Neuroscience letters*, 162(1-2), 149–152.

46. Ramírez Padilla, Bernardo. (2004). *Botánica. Generalidades, morfología y anatomía de plantas superiores*. (1ra ed). Colombia. Editorial Universidad del Cauca
47. Romeis, T., A.A. Ludwiig, R. Martin y J.D.G. Jones. (2001). *Calcium dependent kinases play an essential role in a plant defense response*. EMBO J. 20(20), 5556-5567.
48. Salisbury, F. y C. Ross. (1994). *Fisiología Vegetal*. Cuarta edición. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. México, D.F. pp. 3-177.
49. Sanders, D., J. Pelloux, C. Brownlee y J.F. Harper. (2002). *Calcium at the crossroads of signaling*. Plant Cell S401-S417.
50. Selles, B., Michaud, C., Xiong, T. C., Leblanc, O., & Ingouff, M. (2018). Arabidopsis pollen tube germination and growth depend on the mitochondrial calcium uniporter complex. *The New phytologist*, 219(1), 58–65.
51. Teardo, E., Carraretto, L., Moscatiello, R., Cortese, E., Vicario, M., Festa, M., Maso, L., De Bortoli, S., Calì, T., Vothknecht, U. C., Formentin, E., Cendron, L., Navazio, L., & Szabo, I. (2019). A chloroplast-localized mitochondrial calcium uniporter transduces osmotic stress in Arabidopsis. *Nature plants*, 5(6), 581–588.
52. Teardo E, Carraretto L, Wagner S, Formentin E, Behera S, De Bortoli S, Larosa V, Fuchs P, Lo Schiavo F, Raffaello A, Rizzuto R, Costa A, Schwarzländer M, Szabò I. (2017) *Physiological Characterization of a Plant Mitochondrial Calcium Uniporter in Vitro and in Vivo*. Plant Physiol. Feb;173(2):1355-1370.
53. Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., ... & Gilroy, S. (2018). *Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling*. Science, 361 (6407), 1112-1115.

54. Vecellio Reane, D., Vallese, F., Checchetto, V., Acquasaliente, L., Butera, G., De Filippis, V., Szabò, I., Zanotti, G., Rizzuto, R., & Raffaello, A. (2016). *A MICUI Splice Variant Confers High Sensitivity to the Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake Machinery of Skeletal Muscle*. *Molecular cell*, *64*(4), 760–773.
55. Wagner, S., Behera, S., De Bortoli, S., Logan, D. C., Fuchs, P., Carraretto, L., ... & Doccia, F. G. (2015). The EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein MICU choreographs mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *27* (11), 3190-3212.
56. Wang, L., Wang, L., Chen, Q., Chen, G., Zhang, S., Wu, J., & Tao, S. (2018). Identification and comparative analysis of the MCU gene family in pear and its functions during fruit ripening. *Journal of plant physiology*, *229*, 53–62.
57. Wang, P., Fernandez-Sanz, C., Wang, W., & Sheu, S. S. (2018). Why don't mice lacking the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter experience an energy crisis?. *The Journal of physiology*, *598*(7), 1307–1326.
58. Wang, Q., Yang, S., Wan, S., & Li, X. (2019). *The Significance of Calcium in Photosynthesis*. *International journal of molecular sciences*, *20*(6), 1353.
59. White PJ. (1998). *Calcium channels in the plasma membrane of root cells*. *Annals of Botany*, *81*, 173–183. Reino Unido
60. White P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et biophysica acta*, *1465*(1-2), 171–189.
61. White P. J. (2001). The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of experimental botany*, *52*(358), 891–899.
62. White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). *Calcium in plants*. *Annals of botany*, *92*(4), 487–511.

63. Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). *Pectin: cell biology and prospects for functional analysis*. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 9–27.
64. YogeV, O., & Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(3), 1012–1020.
- Yoshida K., Noguchi K. (2011) *Interaction Between Chloroplasts and Mitochondria: Activity, Function, and Regulation of the Mitochondrial Respiratory System during Photosynthesis*. Kempken F. (eds) *Plant Mitochondria*. *Advances in Plant Biology*, vol 1. Springer, New York, NY.

## ANEXO

**Fig. A.** El alineamiento muestra una comparativa entre el uniportador de calcio reportado en cloroplastos de *A. thaliana* (sp|F4I111.1|MCU6\_ARATH) y probables proteínas en *Spinacea oleracea*. El alineamiento sugiere que la proteína XP\_021847437.1 es un uniportador de calcio en *S. oleracea*.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

sp|F4I111.1|MCU6_ARATH = MCU de cloroplasto de arabidopsis
XP_021847437.1      proteina similar en Spinacea oleracea (espinaca)

XP_021847839.1      MAFKKTLVQRLFNLSRFSTPSISRNTAAKPPSEPPEPSRLKRNMQRRPLYQAATTPPSSS      60
XP_021847838.1      MAFKKTLVQRLFNLSRFSTPSISRNTAAKPPSEPPEPSRLKRNMQRRPLYQAATTPPSSS      60
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      -----MW-----SMGLIRR-----TAMSNAI      16
XP_021847437.1      -----MW-----RSYFQRT-----LTLAATH      16
          ::                      : *                      :

XP_021847839.1      GALRLFPFAGEM--LKEMNNAKDRIRLSGLIALPQQSPPKSAAREEEPPAGLSVKEVRKL      118
XP_021847838.1      GALRLFPFAGEM--LKEMNNAKDRIRLSGLIALPQQSPPKSAAREEEPPAGLSVKEVRKL      118
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      -----SQ-RTWLGHGGLRSC--VTVKTPSEDEEEKKKEITIAEAKKL      58
XP_021847437.1      RSRHFLPPPSRPFMPFAPST-ASADEHGED----HTVMATARGGRENEAGISLGEVKKL      70
          :                      .                      : : *          :: : * : **

XP_021847839.1      LRSQAELIRSKL-SEVDRDWWVTYNEFLGLIEDS-CGGNKEQAFSFAKTLDDSGSVIVLG      176
XP_021847838.1      LRSQAELIRSKL-SEVDRDWWVTYNEFLGLIEDS-CGGNKEQAFSFAKTLDDSGSVIVLG      176
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      MRLVNVEDMKKKLVGVADRDVVSYSTLLEASQGMGIARSPDEAHVFARVLDDAGVLLIFR      118
XP_021847437.1      MRLVNVEALKNKL-GEQGKEVIGYSELKTCESMGVVRVSVDEAAAFKVLDDAGVLLIFR      129
          : *  : *  : : * * .  : : : * . *  : .  : : * * * : * * * * * * * : : :

XP_021847839.1      NAVCLRPHQ----VAQAIQTLVTPPAITDPNDPRRQLELELMEDQKVEIDTKAEALVRRE      231
XP_021847838.1      NAVCLRPHQEIKTLVAQAIQTLVTPPAITDPNDPRRQLELELMEDQKVEIDTKAEALVRRE      236
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      DKVYLHPDKVVDLIR-----RAMPDQNPEDQIKKEFNKLRIMKEEIDVLAHRQVRKI      172
XP_021847437.1      DKVYLHPDKVVELVR-----SSVPLALTPEDDPRRAELQRLQERKEEIDRQAHQVRKI      183
          : * * : * : :          *  .  : *  : * : : .  * * * *  * .  **

XP_021847839.1      LWAGLGYMNVQTAAFMRLTFWELSWDVMEPICFYVTSAYFMLGYTFFLRTAKEPSFEGFF      291
XP_021847838.1      LWAGLGYMNVQTAAFMRLTFWELSWDVMEPICFYVTSAYFMLGYTFFLRTAKEPSFEGFF      296
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      LWCGLATSMVQIGLFFRLTFWEFSWDVMEITFFATATGIIVGYAYFLMTRDPTQDFM      232
XP_021847437.1      LWSGLGVAVMQVGLFFRLTFWEFSWDVMEIAFFTATGLVIGYGYFMITSKDPTYQDLM      243
          **.*.  : : * . * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * : : :

XP_021847839.1      QSRFNAKQTRLMKTHDFDVKRYNELRKAFDPHYSSSSSL--DRSLMFRFDHKKI-----D      344
XP_021847838.1      QSRFNAKQTRLMKTHDFDVKRYNELRKAFDPHYSSSSSL--DRSLMFRFDHKKI-----D      349
sp|F4I111.1|MCU6_ARATH      KRLFLSRQRKLLKSHKFDKERFKELERLFKMTSSCHAAASIRNRVGLLEDLEDALQSRRD      292
XP_021847437.1      KTLFLSRQRKLFKKYQFDVDRFKELKGRCKNLLDEKQ---INN-----LVLKDT-----      289
  
```