

## ANEXO - Trabajo Práctico N° 1 Membranas Celulares

Según el Modelo de Mosaico Fluido se considera a la membrana como constituida por una doble capa lipídica con la porción hidrofílica hacia el exterior y la porción hidrofóbica hacia el interior (Figura 1 y 2)

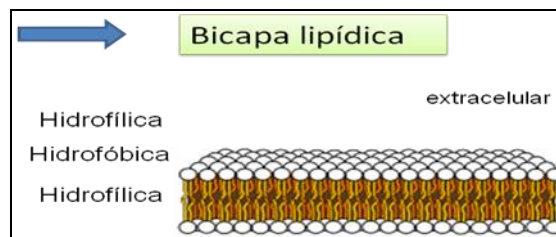


Figura 1: Bicapa lipídica

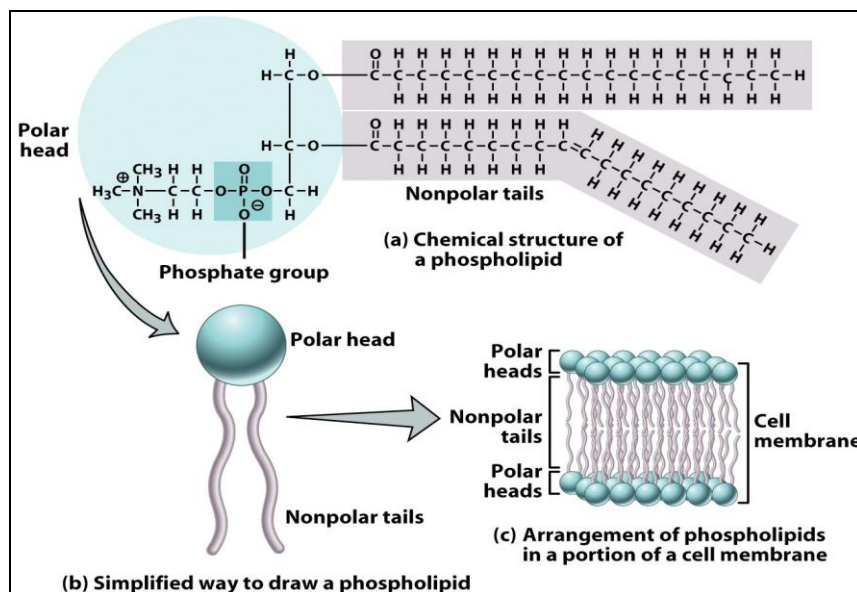


Figura 2: Fosfolípidos presentes en la membrana plasmática

Las moléculas de proteínas “flotan” en la doble capa lipídica, con uno o ambos extremos hidrofílicos penetrando una o ambas superficies de la membrana. Las dos superficies de la membrana son diferentes entre sí y existe una gran variedad en este aspecto en cuanto a la calidad y cantidad de lípidos y proteínas entre distintas membranas como la plasmalema, tonoplasto, retículo endoplásmico y membranas de dictiosomas, cloroplastos, núcleo, mitocondrias, etc.

La composición de las membranas también depende de la especie de que se trate y del medio en que ellas viven, por ejemplo, en membranas de cloroplastos hay mayor cantidad de glucolípidos, siendo menos abundante los fosfolípidos.

Las moléculas de proteínas son básicamente de tres tipos según su función: proteínas catalíticas (enzimas), proteínas que constituyen canales y otras que facilitarían el pasaje de solutos a través de la membrana (transportadores o carriers). Según su disposición, las proteínas pueden ser integrales o intrínsecas cuando están estrechamente ligadas a todos los componentes de la membrana y su remoción es difícil; y periféricas o extrínsecas, cuando están débilmente unidas a una u otra superficie de la membrana. Algunas de éstas se encuentran ligadas a moléculas cortas y ramificadas de polisacáridos unidos a la superficie externa de la membrana. Una función importante de estos polisacáridos sería la de reconocimiento de moléculas externas, como proteínas y otros polisacáridos secretados eventualmente, por ejemplo, por patógenos (Figura 3). La composición y el comportamiento de la membrana plasmática, entre otros factores, es determinante respecto a la sensibilidad de algunos organismos a las bajas temperaturas y a las heladas, ya que los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas son más fluidos a bajas temperaturas que los ácidos grasos saturados, permitiendo, por ejemplo, a las plantas que tienen una mayor proporción de los primeros, más resistencia a heladas, mientras que las especies susceptibles poseen ácidos grasos saturados en mayor proporción.

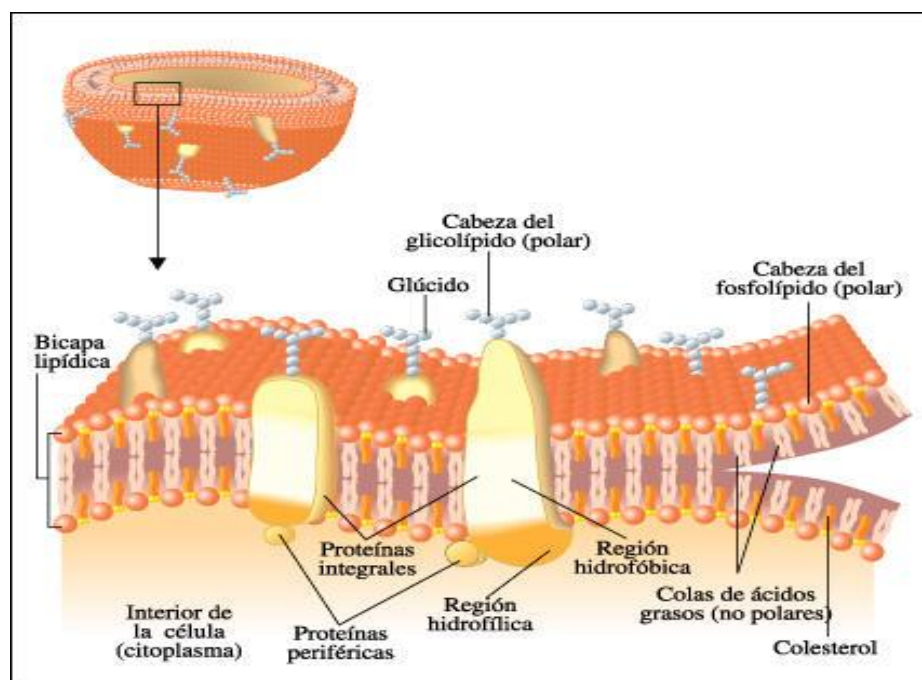


Figura 3: Membrana plasmática (Modelo mosaico-fluido)

Algunos organismos del tipo de los protistas y la mayoría de las células de hongos y plantas superiores presentan una **pared celular**. Excepciones en cuanto a la presencia de pared son las células de grano de polen y las del endosperma. Algunas células vegetales poseen solamente pared primaria (células jóvenes en activo crecimiento, fotosintetizadoras, parenquimáticas, etc.). Los componentes proteicos de la pared primaria juegan un importante rol en el crecimiento de la pared (extensina) y en el reconocimiento de moléculas externas (lectinas), cuya presencia demuestra su actividad metabólica.

En algunas células vegetales los protoplastos secretan una pared secundaria entre la primaria y la membrana plasmática luego de que la célula ha detenido su crecimiento. (Por ej., células del tejido xilemático que conducen fluidos bajo tensión).

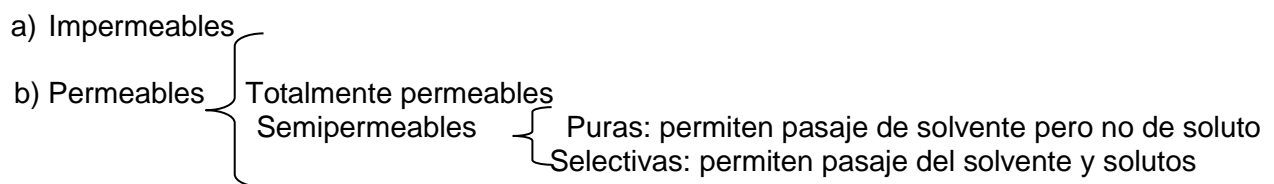
El diámetro de los poros de la pared celular es lo suficientemente grande como para permitir que el agua y los solutos disueltos en ella puedan moverse libremente por las paredes en el espacio denominado **apoplasto**. La pared celular es atravesada por plasmodesmos, que son canales de citoplasma que conectan protoplastos de células vecinas. Esta vía, denominada **simplasto**, facilita la circulación tanto de solventes como de solutos entre células de un mismo tejido.

Las **vacuolas** cumplen un rol fundamental en vegetales superiores: son responsables de mantener la forma y rigidez en tejidos constituidos por células que sólo poseen pared primaria (ej. Hojas y tallos jóvenes) gracias a la presión que ejercen en ellas el agua y los solutos disueltos. A expensas de ello el volumen celular aumenta significativamente lo que hace posible el aumento del área de absorción del agua en raíces o de la luz en hojas constituyendo este aumento de volumen y superficie la segunda función vacuolar. Entre los procesos metabólicos que ocurren en vacuolas se puede citar el último paso en la síntesis de etileno que tiene lugar en el tonoplasto. La concentración de materiales disueltos en vacuolas es alta, tanto como la concentración de sales en el agua de mar (0,4 a 0,6 M). Existen cientos de materiales disueltos: sales, moléculas orgánicas pequeñas, proteínas, pigmentos, productos secundarios del metabolismo como alcaloides y cristales.

La vacuola actuaría también como reservorio de productos que no serían metabolizados inmediatamente por la célula y que impedirían su desperdicio. Su rol en la homeostasis (mantenimiento de parámetros fisiológicos en un nivel medianamente constante) constituye también una característica de la actividad vacuolar. Por ejemplo, la vacuola juega un importante papel en el mantenimiento del pH constante puesto que elevada concentración de iones hidrógeno en el citosol puede ser bombeado dentro de la vacuola. Esto ocurre en cítricos donde

el pH vacuolar desciende hasta valores de 3,0 mientras el pH del citosol circundante es de 7,0 a 7,5. Los solutos totales en la vacuola determinan sus propiedades osmóticas y las del citosol que se hallan en equilibrio.

Hasta el momento hemos analizado la composición y organización de las membranas citoplasmáticas. Una segunda propiedad de las mismas referente al aspecto funcional es lo referido a las características del movimiento de diferentes sustancias a través de ellas y los factores que las regulan. De acuerdo a la permeabilidad se pueden clasificar las membranas según el esquema que sigue:



Las membranas celulares pertenecen al tipo de las semipermeables selectivas, lo que se refleja en el rápido movimiento del agua a través de ellas, con velocidades variables y menores para los solutos. Éstas ejercen una regulación precisa del movimiento de moléculas y iones dentro y fuera de la célula, es decir, regulan el transporte de sustancias (movimiento de moléculas y iones entre diferentes compartimientos de un sistema biológico). La membrana determina entonces el tipo de moléculas que se mueven dentro y fuera de la célula y la dirección y velocidad de transporte. Dentro del transporte se puede diferenciar el pasivo del activo. El primero ocurre cuando las moléculas de soluto se mueven a través de la membrana sin que la célula realice trabajo alguno mientras que el segundo requiere suministro de energía de reacciones metabólicas ocurridas en el citoplasma o incluso en la propia membrana, producto generalmente de la hidrólisis del ATP.

En relación al transporte de solventes y solutos en una membrana biológica podemos enunciar (Figura 4 y 5):

- 1) En las células que están biológicamente inactivas (muertas o sin actividad metabólica por bajas o altas temperaturas, inhibidores, etc.) sus membranas se vuelven mucho más permeables a los solutos, tornándose menos selectivas. De este modo los solutos dentro y fuera de la célula difunden a favor del gradiente de concentración.
- 2) Las moléculas de agua y gases disueltos como el N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> difunden pasivamente a través de todas las membranas rápidamente.
- 3) Los solutos hdrofóbicos penetran a una tasa directamente proporcional a su solubilidad en lípidos: los solutos más hidrofóbicos o menos hidrofílicos, se mueven a través de la membrana

más rápidamente que aquellos con propiedades opuestas debido a su solubilidad en la doble capa lipídica, cuya naturaleza es fundamentalmente hidrofóbica.

- 4) Las moléculas hidrofílicas y los iones con similar solubilidad en lípidos, penetran a tasas inversamente proporcionales a su tamaño.
- 5) Los iones y cationes con mayor densidad de cargas penetran más lentamente que aquellas con menor densidad (el caso de  $K^+$  vs.  $Ca^{++}$  o  $Fe^{++}$  vs.  $Fe^{+++}$ ) o compuestos más o menos ionizados (esto depende de su constante de ionización=  $K_i$ : es baja en ácidos y bases débiles y alta en ácidos y bases fuertes)
- 6) El grado de hidratación de los iones influencia la penetración de la membrana: a mayor grado de hidratación, existe menor velocidad de penetración.

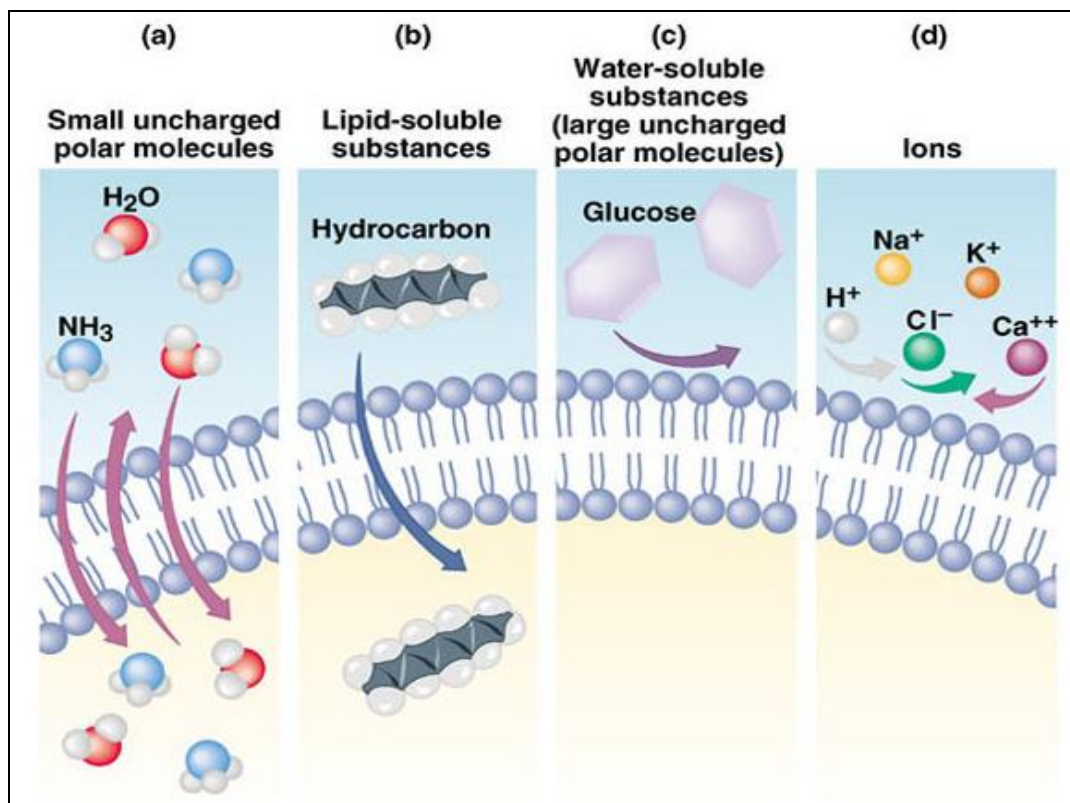


Figura 4: Difusión de distintas sustancias por la membrana plasmática

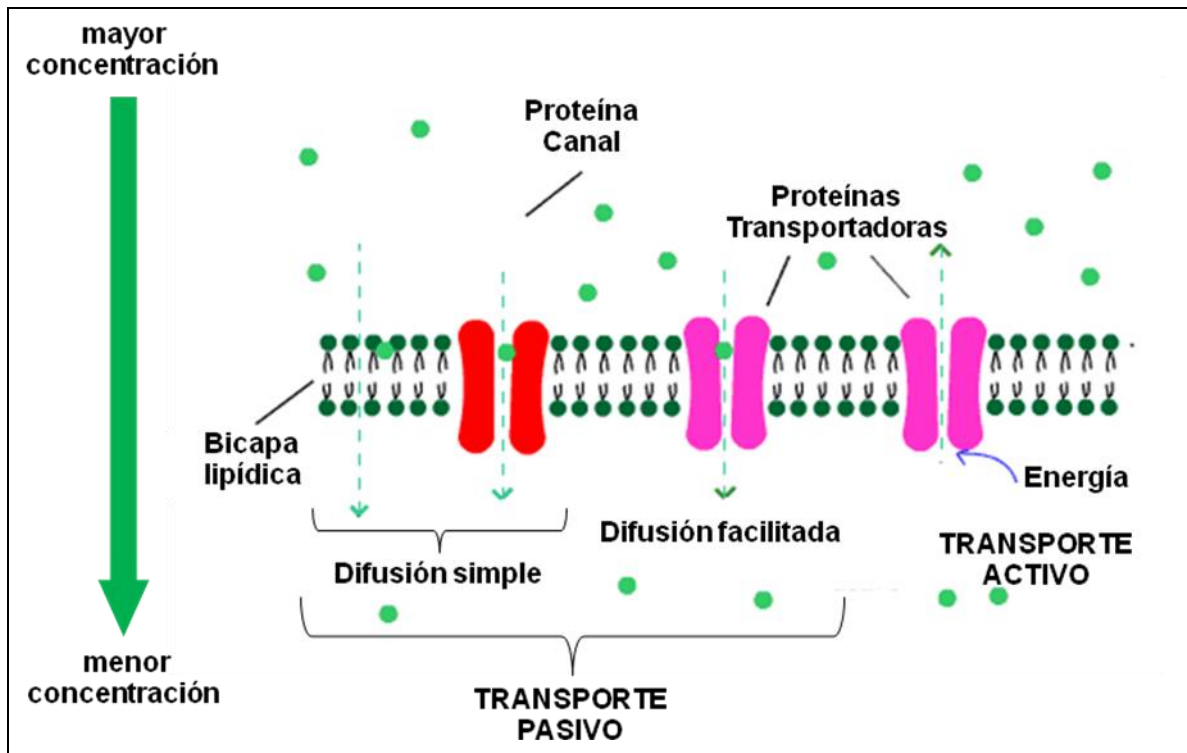
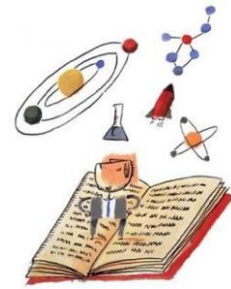


Figura 5: Transporte activo y pasivo de sustancia en la membrana plasmática.

Los factores ambientales (sequía, salinidad, frío, temperaturas congelantes, temperaturas elevadas, anoxia, alta intensidad luminosa y desbalance de nutrientes) ejercen una influencia directa sobre casi todos los aspectos del funcionamiento de las plantas durante su ciclo de vida. En respuesta a condiciones cambiantes, y a menudo desfavorables, la percepción del estrés por las plantas inicia cadenas de transducción de señales que conducen a la expresión de genes específicamente relacionados con el estrés, así como la generación de metabolitos que protegen contra este. La membrana plasmática de las células en general, y de las células vegetales en particular, actúa como una barrera que las separa y protege del medio ambiente.

Las modificaciones en la membrana plasmática causadas por factores de estrés incrementan la permeabilidad y la liberación de iones, lo cual puede medirse como el flujo de electrolitos.

Estimar el daño de la membrana celular en función de la liberación de iones en solución es un método fácil y es ampliamente utilizado para evaluar la resistencia ante factores de estrés. El método inicialmente fue descrito por Sullivan (University of Nebraska) en la década del 60 para evaluar resistencia a altas temperatura en sorgo y maíz y luego se han hecho modificaciones para evaluar resistencia al frío y sequía en diversas especies vegetales.



## Datos curiosos o de actualidad

### Grupo de Fisiología Vegetal y Acuaporinas Canales de agua

Autora: Olivella Patricia 14/08/2012



Gabriela Amodeo y su grupo de investigación. Foto: Martínez Lláser.

Durante su evolución, las plantas se perfeccionaron en el buen manejo de uno de los recursos más esenciales para la vida, el agua. Este desafío impuesto por la naturaleza hizo que los vegetales desarrollaran distintas estrategias que abarcaron desde sencillos cambios anatómicos hasta complejos ajustes en las etapas de su desarrollo.

Al Grupo de Investigación en Fisiología Vegetal y Acuaporinas vegetales que dirige la bióloga Gabriela Amodeo le interesa estudiar el papel que juega la vía celular en el transporte de agua y en particular los canales específicos para el transporte de agua conocidos como acuaporinas. “Cuando el agua ingresa a la vía celular debe atravesar la membrana plasmática. Históricamente se pensó que la permeabilidad al agua de la bicapa lipídica de la membrana era más que suficiente. Sin embargo, en ciertos tejidos, existían evidencias experimentales que únicamente podían ser explicadas con la presencia de una vía alternativa, esto es, poros o canales proteicos que facilitarían el pasaje de agua”, explica Amodeo. Fue necesario que transcurrieran cuarenta años desde que se plantearon estas hipótesis para que se identificara, en 1993, una proteína aislada en glóbulos rojos (originalmente llamada CHIP28) que demostrara experimentalmente que favorece el transporte de agua a través de la membrana. Más adelante, estas proteínas recibieron el nombre de

acuaporinas (AQP), y se las ubicó dentro de una familia denominada proteínas intrínsecas de membrana (MIP). A partir de ese momento las acuaporinas fueron encontradas en distintos organismos: mamíferos, insectos, plantas, levaduras y bacterias, y asociadas a diferentes procesos fisiológicos o patológicos. “Algunas de ellas se expresan constitutivamente en tejidos especiales mientras que otras son inducidas por alguna necesidad fisiológica. Por ejemplo, en plantas se han detectado niveles de expresión muy altos en procesos de elongación celular, en células estomáticas, vasos de las raíces, tallos y hojas”, agrega la investigadora. Pero además del transporte de agua, hay ciertas acuaporinas que permiten el transporte de solutos como boro, glicerol o urea, incluso en mayor medida de lo que permiten el transporte de agua.

“Nuestra pregunta científica apunta a conocer cuál es el papel que juegan las acuaporinas en el transporte de agua en plantas. Si en condiciones desfavorables para el crecimiento de una planta los canales de agua muestran un cambio en el perfil de expresión o en su regulación, esto apoyaría la hipótesis de que su presencia permite controlar el pasaje de agua por la vía célula a célula”, sostiene Amodeo. “En los últimos años han surgido evidencias de cómo es posible esto. Entre los mecanismos más relevantes se encuentran aquellos asociados con la regulación en la expresión del canal, los que afectan la cantidad de acuaporinas en la membrana o los que directamente afectan la inactivación o activación del canal como resultado de una respuesta a una situación de estrés”, agrega.

El grupo de investigación que encabeza Amodeo se formó contemporáneamente con la aparición de las primeras evidencias acerca de la existencia de acuaporinas en plantas; por lo que aún no eran conocidos sus mecanismos de regulación. Por esta razón, su proyecto inicial consistía en caracterizar en forma comparativa el transporte de agua en membranas celulares para dilucidar los posibles mecanismos regulatorios del funcionamiento de los canales de agua, sobre todo para detectar señales inducidas por estrés abiótico, en particular cambios de pH y calcio intracelular.

Para realizar su trabajo, los investigadores utilizan diversas técnicas que fueron desarrolladas no sin cierta dificultad. “La molécula de agua que atraviesa la acuaporina no tiene carga, lo que hace imposible medir una corriente eléctrica. Las membranas nativas en las cuales se encuentran las acuaporinas, además, tienen en general una permeabilidad al agua que no es despreciable”, explica Amodeo. Por eso, para medir la permeabilidad al agua de una membrana, los investigadores utilizan dispersión luminosa (*light scattering*) del cambio de volumen, la fluorescencia o la medición directa por videomicroscopía de las variaciones del volumen celular en función del tiempo.

“Dentro de las estrategias propuestas para el mejoramiento vegetal se hace imprescindible estudiar la fisiología del agua en la planta y, más aún, identificar los mecanismos de regulación que se desencadenan cuando su suministro es limitado, por ejemplo, en condiciones de estrés biótico o abiótico”, sostiene la investigadora. “Ahora, en el auge de la nanotecnología, se plantean también aplicaciones tecnológicas rescatando su papel de poros específicos para el agua en diseños biotecnológicos para filtración selectiva”, agrega. El estudio de las acuaporinas permite, por lo tanto, un nuevo marco de exploración que abarca desde la biofísica hasta la biología de sistemas y que puede aportar una mirada nueva a viejos interrogantes de la fisiología.

### **Grupo de Fisiología Vegetal y Acuaporinas**

#### **Vegetales (Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental)**

Laboratorio 2, 4to. piso, Pabellón II, teléfono 4576-3390,

interno 201. [www.dbbe.fcen.uba.ar](http://www.dbbe.fcen.uba.ar)

**Dirección:** Dra Gabriela Amodeo

**Integrantes:** Dra. Karina Alleva, Dra. Moira Sutka. **Tesistas de doctorado:** Mercedes Márquez, Cintia Jozefkowicz, Victoria Vitali y Agustin Yaneff.

**Tesistas de grado y pasantes:** Esteban Tubert y Florencia Scochera.