UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TRANSPORTE DE ANIONES EN CLOROPLASTOS CON METABOLISMO C-4

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a:

ROSARIO LETICIA CORTES RIOS

México, D. F. 1977

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

CLAS. Tesis 1977
ADQ. M-[redacted] 1021 106
FECHA
PROC
$

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE	PROFRA. GUADALUPE VELEZ PRATT
VOCAL	PROFRA. ANGELINA QUINTERO
SECRETARIO	PROFR. BLAS LOTINA HENNSEN
1er. SUPLENTE	PROFR. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
2o. SUPLENTE	PROFR. JORGE SOTO SORIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

FACULTAD DE QUIMICA

SUSTENTANTE: ROSARIO LETICIA CORTES RIOS

ASESOR DEL TEMA: BLAS LOTINA HENNSEN

A mis Padres

con cariño y respeto

A Claudio

con amor

Al Profr. Blas Lotina Hennsen

con agradecimiento

C O N T E N I D O

		PAGS.
ABREVIATURAS		3
INTRODUCCION		5
GENERALIDADES		14
CAPITULO 1	I) MEMBRANA	18
	IA) DOBLE MEMBRANA	21
	IB) SISTEMA MULTILAMELAR	21
II	ESTROMA	
	IIA) CICLO DE CALVIN	48
	IIB) GRANOS DE ALMIDON	60
	IIC) PLASTOGLOBULI	60
	IID) ACIDOS NUCLEICOS	61
	IIE) PIRENOIDES	65
	IIF) RETICULO PERIFERICO	65
CAPITULO 2		
	I FOTORRESPIRACION	69
	II CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS DEL MOSOFILO Y DE LA VAINA VASCULAR EN PLANTAS C-4	74
	III DISTRIBUCION DE ORGANELOS Y SU RELACION CELULAR EN PLANTAS C-4	80
	IV CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LOS CLOROPLASTOS EN PLANTAS C-4	85

PAGS.

CAPITULO 3

I CONCEPTO SOBRE TRANSPORTE DE ANIONES C-4 95

II COMPORTAMENTALIZACION Y-RADIO TRAZADORES CINETICOS. 99

III TRANSPORTE INTERCELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4 104

IV BALANCE DE CARGA Y GRUPOS-AMINO DURANTE EL TRANSPORTE INTRACELULAR. C-4 110

V TRANSPORTE INTRACELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4 115

VI TRANSPORTE DE METABOLITOS EN RELACION A LA ACTIVIDAD FOTOQUIMICA DE LOS CLORO-PLASTOS. 121

VII MECANISMO DE TRANSPORTE DE ANIONES EN LOS CLOROPLASTOS CON METABOLISMO C-4 122

VIII EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DEL TRANSPORTE DE ANIONES EN PLANTAS C-3 124

TRANSPORTE

Transporte específico de aniones. 125

Translocador de ácidos di-carboxilicos. 127

Translocador de ATP 129

CONCLUSIONES 130

BIBLIOGRAFIA 132

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

AAT .....aspartato aminotransferasa

AMP, ADP y ATP .....adenosín mono, di y trifosfato

A-3PG ó PGA .....ácido 3-fosfoglicérico

AOA .....ácido oxaloacético u oxaloacetato

CF1 .....factor de acoplamiento

DAB .....diamino bencidina

DABS .....ácido p-diazo bencen sulfónico

DBMIB .....dibromo tiomo quinona

DCMU .....dicloro fenil dimetilurea

DCIP .....dicloro fenol indol fenol

DHAP .....dihidroxiacetona fosfato

DNA .....ácido desoxirribonucléico

1,3-DPG .....ácido 1,3-difosfocliérico

EDTA .....ácido etilen diamino tetracético

EM-NADP .....enzima málica dependiente de NADP

EM-NAD .....enzima málica dependiente de NAD

FDP .....fructuosa 1,6 -difosfato

F-6-P .....fructuosa 6-fosfato

FMN .....flavín mononucleótido

FSI .....fotosistema I

FSII .....fotosistema II

G-3P .....gliceraldehído 3-fosfato

G-6P .....glucosa 6-fosfato

KCN .....cianuro de potasio

NAD .....nicotinamida adenin dinucleótido

NADH .....nicotinamida adenin dinuclétido , su forma reducida

NADP .....nicotinamida adenin dinucleótido fosfato

NADPH .....nicotinamida adenin dinucleótido fosfato,su forma reducida

MV .....metil viológeno

Pi .....fosfato inorgánico

PEP .....fosfoenolpiruvato ó ácido fosfoenolpirúvico

PCK .....fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PQ .....plastoquinona

PQH .....plastohidroquinona

R5P .....ribosa 5-fosfato

RuDP .....ribulosa 1,5-difosfato

RNA m .....ácido ribonucléico mensajero

RNA t .....ácido ribonucléico de transferencia

RNA r .....ácido ribonucléico ribosomal

SuDP .....sedoheptulosa 1,7-difosfato.

INTRODUCCION

La Fotosíntesis es el proceso mediante el cual las -- plantas superiores elaboran materia orgánica a partir de CO_2 atmosférico, para lo cual necesitan: agua, cloroplastos y energía solar, produciendo carbohidratos y oxígeno. Cierto tipo de bacterias, algas y plantas superiores, - capturan la energía directamente de las radiaciones solares a través de los pigmentos que contienen los cloroplastos y producen consecuentemente el material alimenticio; mientras que los animales obtienen su energía a partir- del alimento vegetal, por lo que la Fotosíntesis es esencial para mantener todas las formas de vida en la tierra.

El fenómeno de la Fotosíntesis puede ser dividido en - dos pasos:

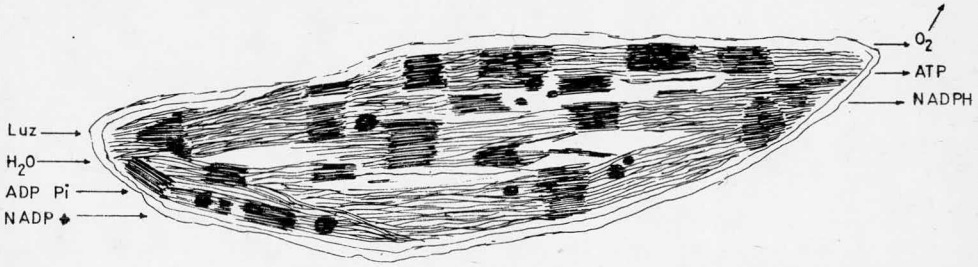
I) Reacciones dependientes de la luz Fig. (1A), las - cuales involucran la fotólisis del agua con evolución de oxígeno, transporte de electrones, reducción de NADP y la síntesis de ATP; todos los proce-- sos anteriores se llevan a cabo en las membranas de los tilacoides con la - participación en serie de los fotosistemas I y II.

II) Reacciones oscuras Fig. (1B) las cuales se inician con la fijación de CO_2 y terminan con la consecuente reducción a carbohidratos en varios pasos del Ciclo de Calvin-Benson Fig. (1B). Estas reacciones- se llevan a cabo en el estroma o matriz del cloroplasto.

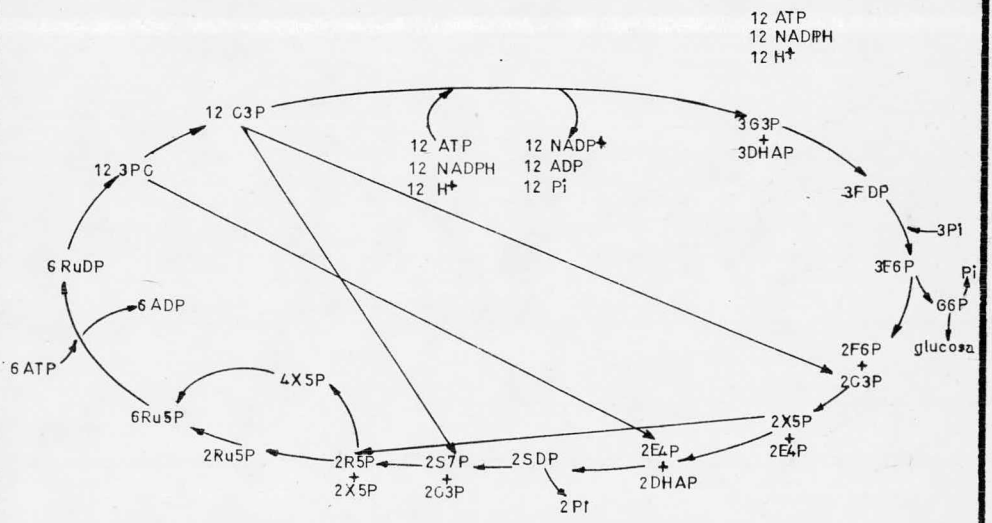
Sistemas Biológicos de Acarreo externo de la Fotofosforilación

Cloroplastos de plantas

A) Reacciones de luz



B) Reacciones oscuras



FACULTAD DE QUIMICA		UNAM
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 1

Durante la Fotosíntesis se realizan reacciones de óxido-reducción, mediante las cuales, cuatro electrones procedentes de fotólisis del agua, son transferidos a una molécula de CO_2 a través de acarreadores específicos de electrones, con la consecuente síntesis de carbohidratos y evolución de oxígeno. El potencial de óxido-reducción E0' de la pareja - agua/oxígeno es de +0.8 V usando como referencia el par H/H^+ cuyo valor es de +0.4 V. En el caso del par CO_2/carbohidratos es de -0.4 V, lo cual da como resultado una diferencia de potencial de +1.2 V por electrón transferido. En consecuencia, por cada cuatro electrones del agua, transferidos al CO_2 , se absorven aproximadamente 110 Kcal/mol de energía solar.

Con las investigaciones recientes sobre la estructura y metabolismo del aparato fotosintético en plantas superiores, se han podido diferenciar tres grupos principales:

(1) Las plantas C-3 , llamadas así porque el primer -- producto detectado al incorporar CO_2 es una molécula de tres átomos de carbono, el ácido-3-fosfoglicérico, que actúa como primer metabolito del Ci-- clo de Calvin-Benson.Fig. 1b .

Simultáneamente a la vía anterior, ocurre un proceso-- oxidativo del otro primer producto de la Fotosíntesis, el ácido fosfoglicólico que se degrada a CO_2 en el proceso conocido como Foto-respiración (1) Fig.(2). Estas características C-3 la presentan entre otras, la mayoría de las plantas agrícolas como frijol, trigo,arroz, espinaca, tabaco,jitomate.

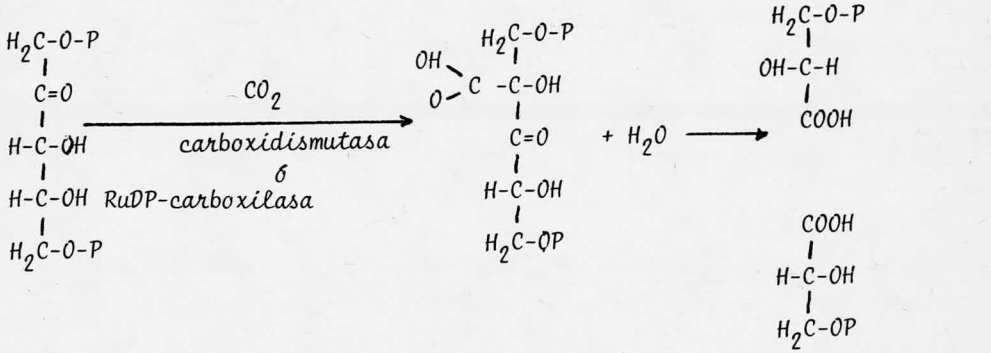
(2) El segundo grupo, son las plantas C-4 que dan como

primer producto, un ácido dicarboxílico de 4 átomos de carbono Fig. (3) - el ácido oxaloacético; dependiendo de la especie, pasa inmediatamente a - ácido málico o aspártico. La vía metabólica de este proceso se conoce como VIA DE LOS ACIDOS DICARBOXILICOS C-4 ó VIA DE HATCH-SLACK KORTSCHAK - (2). En este grupo es donde se encuentran plantas agrícolas con alta capacidad productiva, en relación con las plantas C-3. Ejemplos de plantas - C-4 son: Maíz, sorgo, caña de azúcar, etc.. Por estas razones resulta interesante conocer los mecanismos por medio de los cuales estas plantas logran mayor eficiencia en productividad.

(3) El tercer grupo, las PLANTAS CAM, dan como primer producto, moléculas de cuatro carbonos como en la vía anterior, con - la peculiaridad de que el CO_2 lo fijan en la noche e incorporan carbohidratos durante el día. Esta vía metabólica, fue detectada por primera vez en las plantas de la familia Crassulaceae y de aquí se tomó el nombre de la vía.Fig.(4). En este grupo se encuentran las plantas que crecen en zonas desérticas (4).

En las plantas C-3, el Ciclo de Calvin ó Ciclo de Reducción de las Pentosas-Fosfato, se inicia con la fijación de CO_2 atmosférico por la acción enzimática de la RuDP-carboxilasa (reacciones de carboxilación), que usa como sustrato CO_2 y ribulosa-1,5-difosfato, consumiendo el ATP y $NADPH_2$, para formar ácido-3-fosfoglicérico (A-3PG).(5). La - conversión de este ácido a triosa-fosfato, la cataliza la enzima ácido-3-fosfogliceroquinasa (reacción de reducción). La fase de reducción se realiza en dos partes: La fase de fosforilación y la fase de conversión como se observa en la siguiente página. (5).

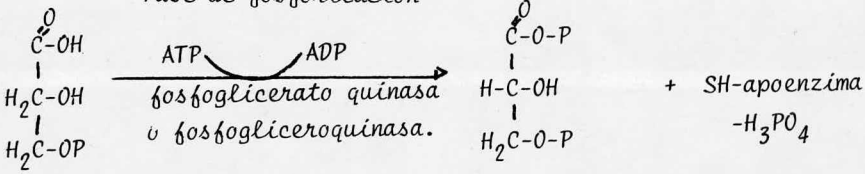
Reacciones de carboxilación



Ribulosa,1,5-difosfato ? ácido-3,fosfoglicérico

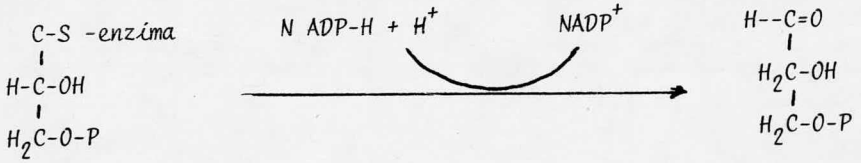
Reacciones de reducción

Fase de fosforilación



ácido-3-fosfoglicérico ácido-1,3-difosfoglicérico

Fase de conversión.



Complejo sutrato enzima D-gliceraldehído-3-P

triosa-fosfato

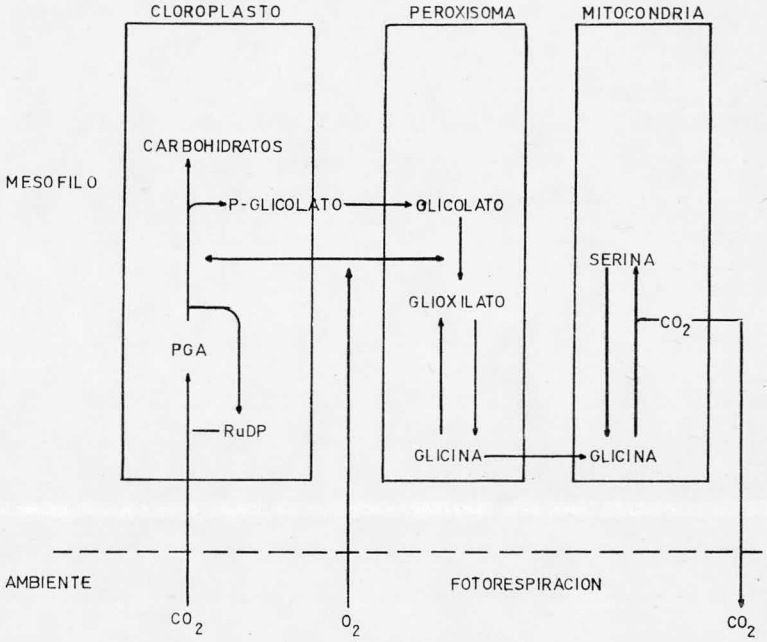
--fosfotriosa-deshidrogenasa------

Posteriormente la RuDP y el CO_2 son regenerados, mediante una serie de reacciones de fijación en donde intervienen azúcares de 5,6, y 7 carbones (6). Por último se sintetizan los productos finales: carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, grasas y ácidos carboxílicos.

Es necesario notar que el metabolismo C-4 tiene reacciones adicionales a las del Ciclo de Calvin-Benson para la síntesis de los ácidos dicarboxílicos. El CO_2 es fijado al fosfoenolpiruvato (PEP) por la PEP-carboxilasa en el citoplasma de las células del mesofilo, produciendo malato ó aspartato como metabolitos estables; posteriormente estos ácidos, son transportados a los cloroplastos de la vaina vascular, donde son descarboxilados; el CO_2 liberado, entra al Ciclo de Calvin-Benson, en cambio el piruvato que es el otro producto de la descarboxilación, es regresado a las células del mesofilo, para entrar nuevamente a la vía C-4. En el capítulo 4 la figura 30, esquematiza todas estas reacciones mas detalladamente.

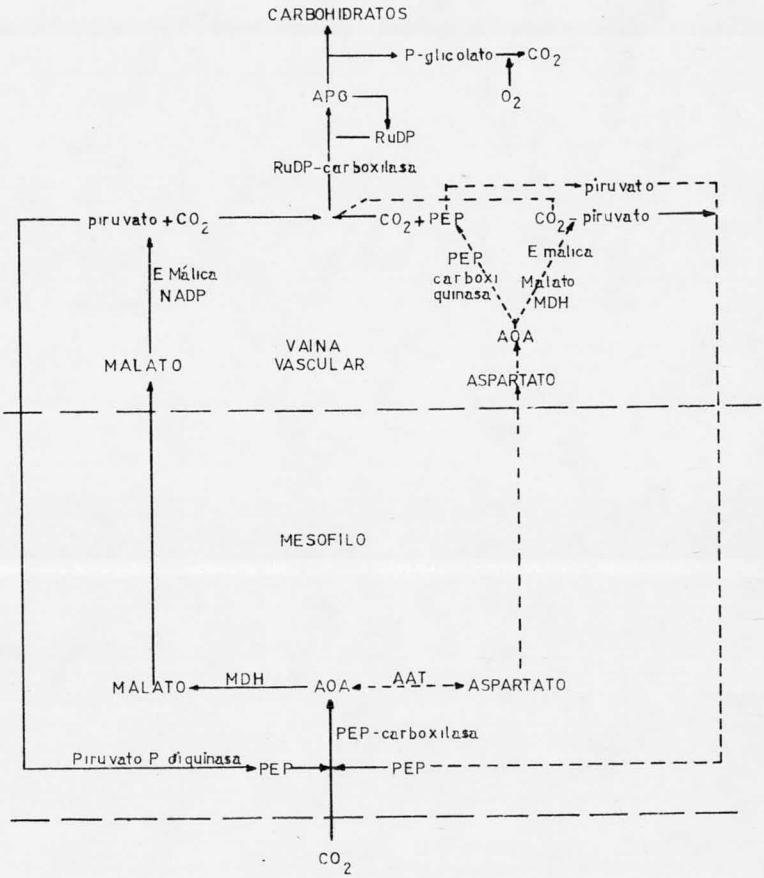
De la información anterior se puede deducir que el metabolismo C-4, necesita de la participación del citoplasma y de la membrana plasmática de la célula del mesofilo, además de la membrana plasmática y del cloroplasto de la célula de la vaina vascular. Por lo tanto el conocimiento del transporte de aniones C-4 de esta vía, ayudará a comprender los mecanismos por los cuales las plantas C-4 presentan una alta productividad agrícola.

La presente monografía revisa los trabajos de investigación, relacionados con el transporte de aniones en el metabolismo C-4 de la Fotosíntesis y al mismo tiempo una discusión sobre los mecanismos postulados.



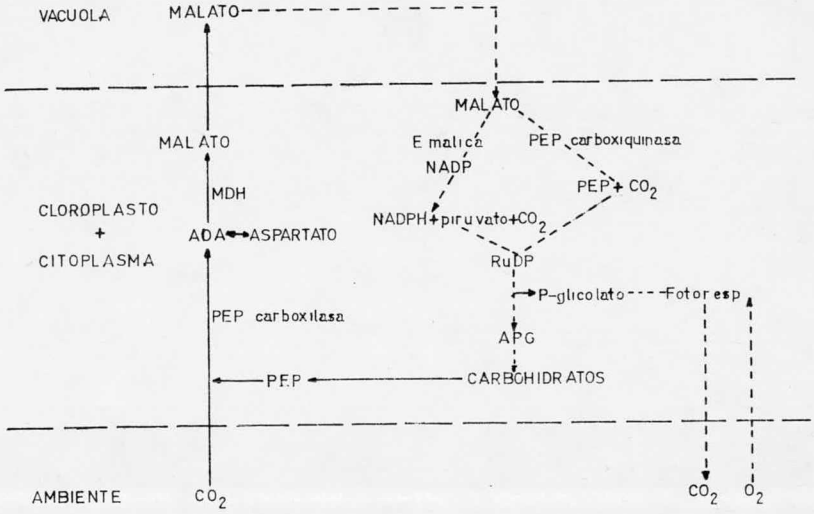
Esquema del metabolismo fotosintético C_3

FACULTAD DE QUIMICA		UNAM
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 2



Esquema del metabolismo fotosintético C_4

FACULTAD DE QUIMICA		UNAM
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 3



Esquema del metabolismo tipo CAM

FACULTAD DE QUIMICA		UNAM
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 4

G E N E R A L I D A D E S

APARATO FOTOSINTETICO

El aparato fotosintético es la parte de la célula que contiene los componentes necesarios para llevar a cabo todo el proceso de la Fotosíntesis; desde la absorción de los cuantos luminosos por los pigmentos contenidos en los cloroplastos, hasta la síntesis final de carbohidratos.

El cloroplasto es el organelo de la célula, que contiene las macromoléculas enzimáticas, coenzimas, etc., necesarias para la Fotosíntesis. Fig. (5). El número de cloroplastos por célula, en las plantas superiores, varía de 1 a 100 , dependiendo de las características particulares de crecimiento de la planta (7) Fig. (6). Los constituyentes de los cloroplastos los podemos resumir en: Membrana y Estroma.

(I) M E M B R A N A

1A) Doble membrana; cuya función es la de servir como barrera de permeabilidad entre el citoplasma y el estroma. Está formada por lípidos y proteinas.

1B) Sistema multilamelar; formado por los granos e interlamelas y es el sitio de captura de energía solar, transporte de electrones, reducción de NADP, síntesis de ATP y almacén de magnesio.

Fig. (5) CLOROPLASTO MOSTRANDO PLASTOGLOBULIS (P) EN EL ESTROMA (S). Fotografía al microscopio electrónico por fijación química (52).

II) E S T R O M A

En el estroma se llevan a cabo las reacciones concernientes al:

2A) Ciclo de Calvin-Benson

Y se encuentran en él:

2B) Granos de almidón

2C) Plastoglóbuli

2D) Acidos nucleicos

2E) Pirenoides

2F) Retículo periférico

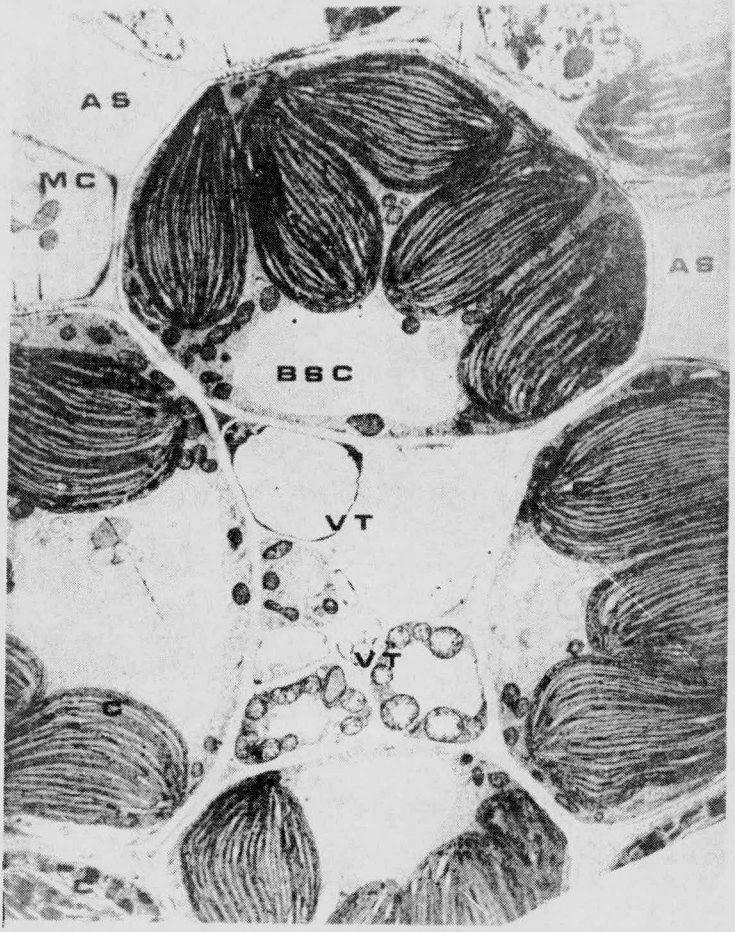


Fig. (6) Microfotografía electrónica que muestra varios cloroplastos -- en las células de la vaina vascular (BSC) células del mesofilo (MC); tejido vascular (VT); espacios aéreos (AS) cloroplastos- (C); las flechas señala los plasdodesmos. (194)

CAPITULO 1

(I) M E M B R A N A

Se sabe que para que ocurra el transporte de iones y metabolitos en la célula ó en los organelos, es necesario la presencia de una membrana biológica; por ello, para entender el transporte de aniones-dicarboxílicos en la Fotosíntesis C-4, que es el objeto de estudio de esta revisión, se realizó la siguiente síntesis sobre membranas.

Las membranas biológicas han sido consideradas como-asociaciones de lípidos y proteínas en forma coloidal, capaces de responder a diferentes condiciones metabólicas y del medio ambiente. Según el modelo hipotético más aceptado, la membrana está formada por tres fases - adyacentes: dos fases acuosas separadas por una lipídica. (8) Fig. (7).

En la fase lipídica están incorporadas las proteínas como lipoproteínas ó proteolípidos, responsables de la especificidad funcional de la membrana. Existe además una fase adicional constituída por - los carbohidratos, los cuales parecen estar exclusivamente dirigidos ha-cia la fase acuosa externa (9). Las proteínas están inmersas en una doble capa lipídica, en la cual, algunos lípidos presentan cierta fluidez, dánle a la membrana un caracter dinámico, aún cuando los detalles moleculares son todavía vagos (10). Los lípidos existen en su gran mayoría con una orientación normal a la superficie acuosa, con la cabeza polar orientada - hacia el exterior o interior de la membrana en forma de bicapa. Como las cadenas de ácidos grasos son líquidos a la temperatura fisiológica, se originan regiones de hidrocarburo líquido en el corazón de la fase lipídi-

ca (11); en las cuales pueden disolverse moléculas apolares. Es factible- en base a datos recientes con monocapas y liposomas, que la fase lipídica no sea una solución ideal, sino que esté formada por regiones en las que se segregan diferentes clases de lípidos y proteínas (12). Esto puede deberse a las interacciones polares entre diferentes lípidos y proteínas, - pero además, algunas clases de lípidos pueden estar constituídos por cadenas de ácidos grasos que son líquidos a la temperatura fisiológica. Así - puede pensarse que en la membranas existen regiones de fluidez variable y sólo aquellas que son líquidas, serían capaces de solubilizar moléculas - de complejos apolares.

La presencia de las proteínas también puede crear regiones limítrofes en las cuales los lípidos no existen con una composición representativa del promedio de los lípidos que contiene la membrana. Existen algunas evidencias que sugieren que los lípidos acídicos se encuentran concentrados en la periferia de las proteínas (13). De cualquier manera, - estudios recientes con diferentes membranas, sugieren que las proteínas o agregados de proteínas de ciertos lípidos, son capaces de migrar en el plano de la membrana, como se observa en la Fig. 7 (migración cis) (14) y de rotar sobre un eje normal a la superficie acuosa externa (15). Además los lípidos son capaces de rotar sobre un eje equivalente y de moverse en el - plano de la membrana (16). Es posible que en este caso, los lípidos migren como una sóla molécula ó quizas como agregados de varias moléculas. En el caso de las proteínas ó de los lípidos, el contacto de una fase acuosa -- con la otra (movimiento trans) parece por el momento ser menos favorecido- cinéticamente. Sin embargo no existen datos suficientes como para tomar una posición al respecto (8).

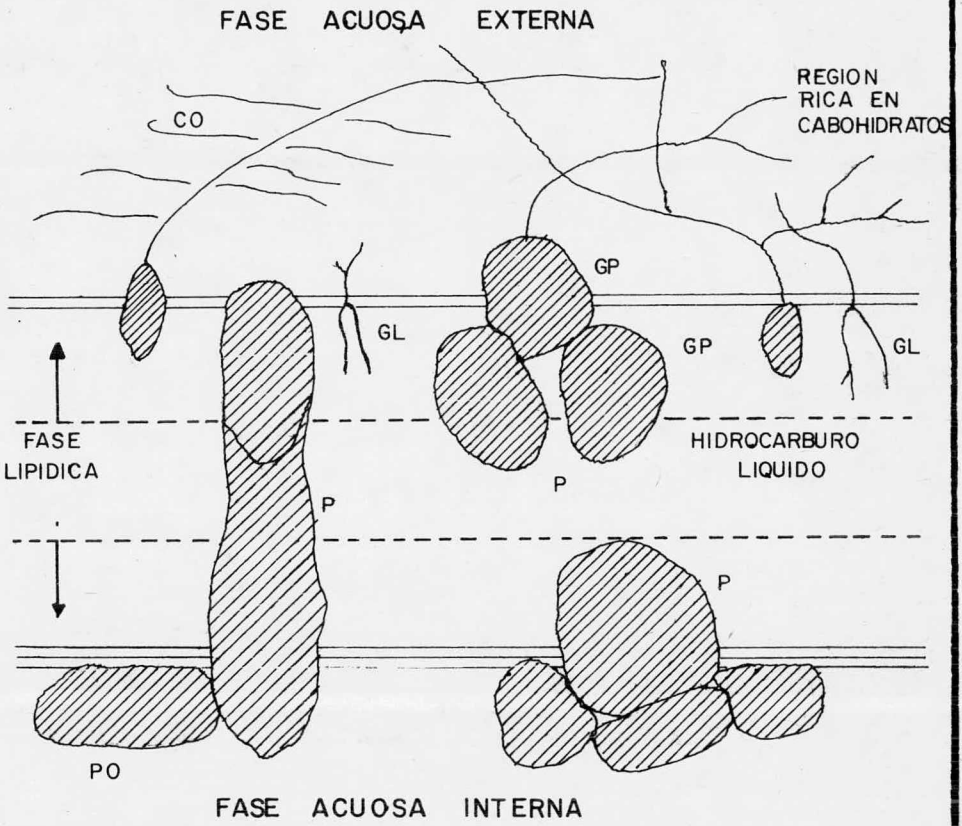


Diagrama hipotético de una membrana biológica, P, proteínas; GP, glicoproteínas; GL, glicolípidos. Los fosfolípidos no han sido representados. PO, representa. Proteína organizadora y CO. Carbohidrato organizador.

FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 7

1A) Doble membrana

En las fotografías de microscopio electrónico Fig.-(8), se muestran los cloroplastos de las plantas superiores, con una doble membrana: la externa y la interna. La membrana interna , según pruebas (17), actúa como barrera de permabilidad entre el citoplasma y el estroma para los metabolitos del Ciclo de Calvin-Benson . Se sugiere que la membrana interna desempeña un papel importante en la formación de nuevas lamelas, aunque en estudios de auto-radi ografía no se observa movimiento de marca de la doble membrana a la lamela interna cuando se suministran precursores de membrana,tritiados (18). Park y Sane (19) han sugerido que existe un proceso complejo de biosíntesis en la membrana del plastidio. En recientes experimentos hechos con algas y plantas superiores, Mackender y Leech (20) sugieren que se efectúa un proceso de multipasos en el ensamble de la membrana.

1B) Sistema multilamelar.

El sistema multilamelar es un complejo de membranas donde se llevan a cabo las reacciones dependientes de la luz y por lo -- tanto, donde se encuentra: la clorofila, los transportadores de electrones, el factor de acoplamiento, etc.. Este sistema multilamelar está distribuído en casi todo el interior del cloroplasto y está formado por un -conjunto de vesículas aplanadas llamadas tilacoides y por membranas no-vesiculadas conocidas como interlamelas.

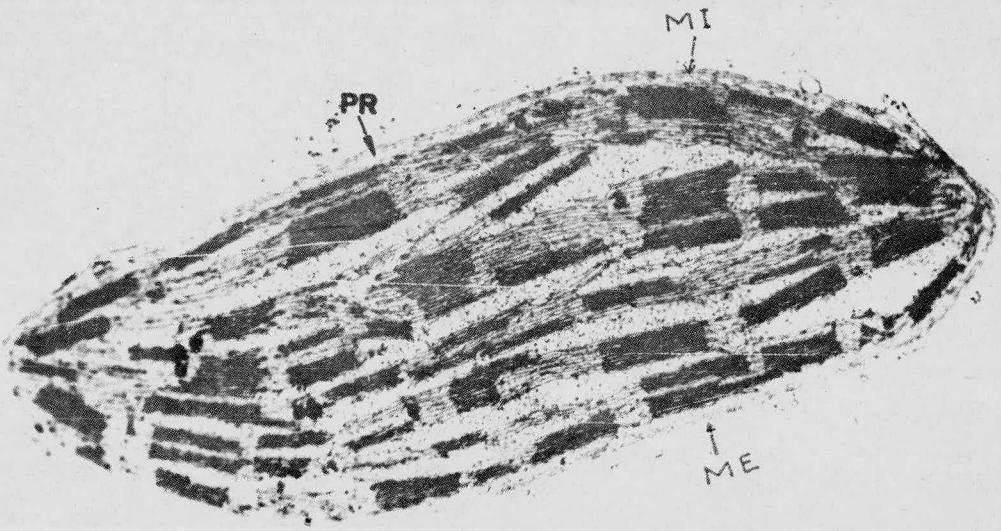


Fig. (8) Cloroplasto de maíz que muestra la membrana interna (MI) y la membrana externa (ME); (PR) es el retículo periférico, continúa con la membrana interna. (172)

Los tilacoides Fig. (9) en ciertas regiones se agrupan en pilas, dando lugar a los llamados "granos" que son las regiones mas visibles, ya que en ellos se encuentra la clorofila. Fig. (10).

Los "granos" Fig. (11) se encuentran interconectados espacialmente por la interlamelas, y los componentes para el proceso fotosintético se encuentran formando parte tanto de la membrana del tilacoide como de las membranas interlamelares.

En la Fotosíntesis el flujo de electrones en los cloroplastos, da lugar a la formación de oxígeno y NADPH (reacción de Hill) a este evento está acoplada la formación de ATP. Estos procesos se localizan en el sistema multilamelar de los cloroplastos (21) Fig. (12). Los -- productos de las reacciones luminosas (NADPH y ATP) son usados en el Ciclo de Calvin-Benson, localizado en el estroma del cloroplasto.

La reacción de Hill y la fotofosforilación se han estudiado en el sistema multilamelar aislado, libre de estroma, conocido conocido como sistema multilamelar de cloroplastos rotos de clase II ó tipo C (22); usando donadores y aceptores artificiales y gracias a ello se descubrieron las reacciones fotosintéticas y no se tuvo que esperar a la obtención de los cloroplastos intactos con la doble membrana (cloroplastos de clase I). Esto es explicable porque al aislar los cloroplastos de clase II, se pierde la ferredoxina y posiblemente el cofactor natural de la fotofosforilación. La evolución de oxígeno en la Fotosíntesis, fue descubierta por Hill en 1937 (23) al usar ferricianuro como aceptor artificial

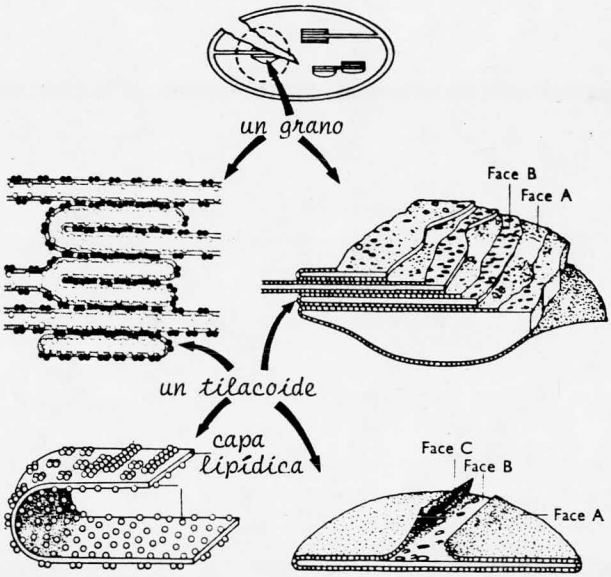
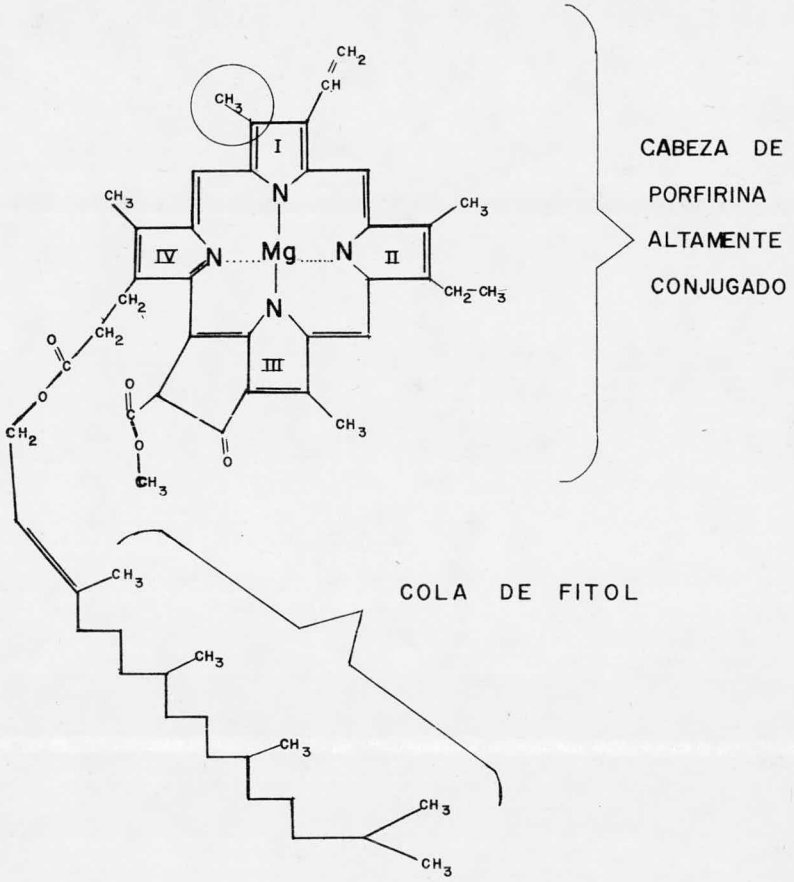


Fig. (9) Esquema de la estructura de un tilacoide basada en la interpretación de la técnica de enfiramiento-congelamiento (53).



Clorofila a (Chl a)

NOTA:

En clorofila b (Chl b) tiene el grupo $H-C\overset{O}{\overset{\|}{\diagdown}}$ en vez del metilo encerrado en un circulo.

Estructura de la clorofila a y b.

FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 10

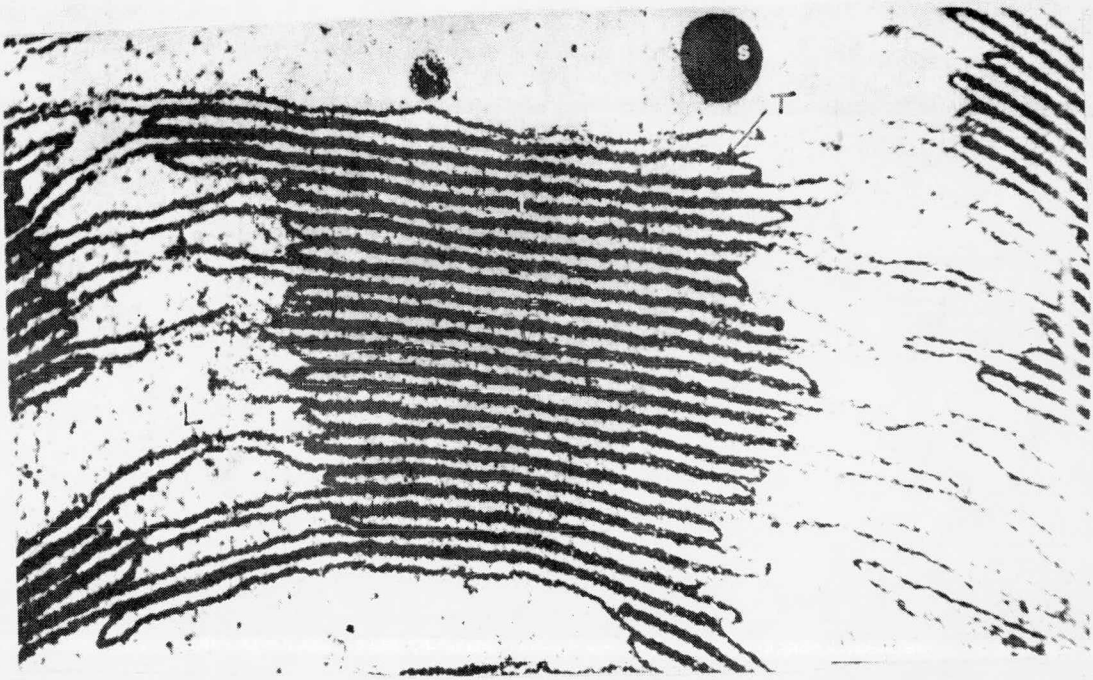


Fig. (11) *Tilacoides apilados* (T) *formando los granos* (G); (L) *lamelas.* (153).

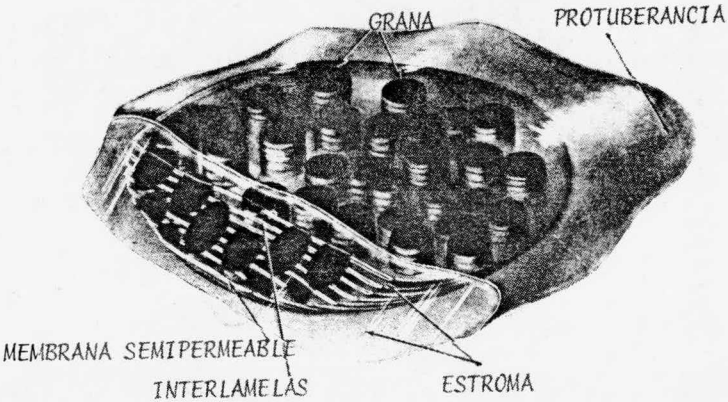


Fig. (12) Modelo de cloroplasto a escala; diámetro del grana (0.5 micras)

(195)

En el transporte de electrones participan dos fotorreacciones en serie en forma cooperativa. El fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII). Cada fotosistema contiene sus propios pigmentos cosechadores de luz, los cuales absorben los fotones (λi) y los transfieren a la trampa ó centro de reacción. En el centro de reacción del FSII, el evento inicial fotoquímico, genera un oxidante fuerte (Z^+) y un reductor débil (Q^-); mientras que el FSI genera un oxidante débil (P^+) y un reductor fuerte (X^-). El oxidante fuerte (Z^+) puede extraer electrones del agua, mientras que el oxidante débil (P^+) dona electrones a $NADP^+$ (24a). Los dos fotositemas se unen por la interacción de (Q^-) con (P^+) y la energía libre que se observa en este proceso es utilizada para la síntesis de ATP.

Con el impacto de la teoría quimiosmótica de Mitchel (25) y con la mejor comprensión sobre la estructura de la membrana del tilacoide, se puso mayor atención a la localización de las partes funcionales del sistema de flujo electrónico. La relación estructura-función revisada por Park y Sane (26) y las relaciones sobre la topografía de la membrana han logrado un mayor conocimiento del transporte de electrones en la Fotosíntesis. Al respecto Witt y colaboradores (27) propusieron que los dos fotosistemas están atravesando de dentro hacia afuera de la membrana produciéndose una carga positiva dentro y una carga negativa fuera. Hauska (28) modificó la sugerencia del Dr. Racker, diciendo que la membrana involucrada en el flujo electrónico, es análoga a la membrana interna de la mitocondria, pero invertida. Esta breve revisión es sobre las membranas del sistema multilamelar fundamentalmente de las plantas C-3; poste

riormente se discutirá el presente estatus de identificación de los acarreadores de electrones endógenos en los sitios donador y aceptor de los dos fotosistemas y las evidencias de la localización en el lado de la -- membrana involucrada, así como la metodología usada para obtener este -- enfoque.

Aceptor de electrones endogenos en fotosistema I.

El Fotosistema I genera un potente reductor que puede ser usado en otros sistemas redox artificiales; entre los primeros -- componentes artificiales reducidos están:el ferricianuro (29) y p-benzoquinona. La reducción del cloroplasto por la luz roja, permitió el descubrimiento de la evolución de oxígeno fotosintéticamente en sistemas libres de células, mucho antes de que fuera conocido el aceptor natural de la reacción de Hill. Posteriormente se encontr aron otros aceptores artificiales que fueron reducidos, como antraquinonas, Colorantes como DCIP, sales de tetrazolio, rojo de metilo y sales de dipirilo. Los de potenciales redox más positivos pueden ser reducidos por FSII. In vivo el aceptor de FSI en cloroplastos es la ferredoxina (31). Se acepta que la reducción del $NADP^+$ por la ferredoxina es la reacción de Hill fisiológica y que el aceptor terminal de la cadena transportadora de electrones es - el $NADP^+$. Esta reacción es catalizada por la ferredoxina-NADP-reductasa y la enzima ha sido cristalizada por Shin y colaboradores (32) y está unida a la lamela de los cloroplastos, pero se extrae facilmente de éstos por envejecimiento o fraccionamiento.

La ferredoxina forma un complejo 1:1 con la ferredoxina-NADP-reductasa (33,34,35) y se encuentra debilmente unida a la membrana (36). En el sistema multilamelar se encuentra una ferredoxina-soluble y se sabe que no actúa como aceptor primario. Recientemente se ha identificado la ferredoxina unida a la membrana como el aceptor primario, observando los cambios de absorción a 430 nm y por técnicas de-- ERS(37). En el sistem multilamelar se han aislado diferentes componentes estructurales tales como FRS (sustancia reducida por ferredoxina)de Yocum y San Pietro (38), ORS (sustancias que reducen al oxígeno) de Honeycutt y Krogmann (39), Sletal de Regitz (40), el cual interacciónó des-- pués con la ferredoxina unida a la membrana. Selman (41) reportó que DABS inhibe la foto-reducción dependiente de la ferredoxina, pero no la de metilviológeno. Otro componente descrito para la función de FSI es un requerimiento de lípido reportado por Brand (42).

Localización del sitio aceptor de FSI en la membrana.

Los aceptores de electrones lipofílicos (quinonas) así como los polares (ferricianuro ó NADP) son reducidos facilmente por cloroplastos de clase II. Esto sugiere que los aceptores de FSI son reducidos en el exterior (lado de la matriz) por el sistema multilamelar de los cloroplastos, en un ambiente altamente hidrofílico alrededor del sitio aceptor de FSI. Tiene sentido fisiológico que la reducción del NADP ocurra en el exterior de la membrana o sea , por el lado de la matriz ó estroma, ya que ahí se encuentran las enzimas del Ciclo de Calvin-Benson que consumen NADPH y ATP formados en la luz. El estudio con

anticuerpos fue útil para determinar el lado de la membrana involucrada. Obviamente un anticuerpo (Ac) contra un componente de la membrana, puede reaccionar con su antígeno (Ag) solamente si el componente es accesible al Ac ; por ejemplo si éste, está localizado en la superficie de la membrana vesiculada. No es lógico que un Ac hidrofílico y de gran tamaño, pueda reaccionar con componentes embebidos en la membrana, así como tampoco es lógico que éste pueda penetrar en la membrana. La reacción de un Ac contra su componente de la membrana, nos dirá cuales son los componentes de superficie en la vesícula membranosa que reaccionan con el Ac específico y cual es su localización en la membrana. Menke (43) y Berzborn (44) prepararon un Ac contra la ferredoxina-NADP-reductasa y observaron inhibición de la actividad enzimática en la enzima pura, así como inhibición indirecta al que se encuentra unido al sistema multilamelar (45 y 46).

Ensayos de aglutinación indirecta (Prueba de Coombs) ó aglutinación mixta (prueba de Uhlenbruck) mostraron datos positivos. Estos resultados le permitieron a Berzborn postular que la ferredoxina-NADP-reductasa está localizada en la superficie de la membrana, pero de alguna manera embebida en una cresta ó depresión (46). El Ac reaccionó con el Ag, con sólo uno de los dos sitios de reacción y no se extiende en la hendidura para reaccionar con el segundo antígeno (Ag). Después de remover el factor de acoplamiento por EDTA, el Ac contra la reductasa, dió aglutinación (46), Esto indica que la hendidura para la reductasa está paricilmente formada por el factor de acoplamiento. Como se ha mencionado, la ferredoxina-NADP-reductasa forma un complejo estequiométrico con la ferredoxina (47) y como la reductasa está unida a la membrana, el complejo hace que la ferre-

doxina se una a la membrana. Esto fue observado directamente por Hiedemann Van-Wyk y Kannangara (48) por un Ac contra la ferredoxina y precipitó al - cloroplasto. Esto demuestra que ambas, la reductasa y la ferredoxina, es-- tán unidas en la superficie externa de la membrana.

Recientemente se describió un Ac contra P700 (49). El- Ac reaccionó con P700 porque la foto-oxidación de ascorbato estimulada por plastocianina, fue inhibida por el Ac de P700 y además se aglutinó, por lo tanto, indica que el complejo proteico P700 está accesible en la superficie externa de la membrana.

Koening (50) preparó dos anticuerpos contra fracciones de cloroplastos de clase II, uno de ellos inhibió la actividad de FSI, mientras que el otro lo hizo después de romper la membrana; los datos sugieren que un Ac actúa en el exterior del FSI, mientras que el otro en el interior. Más tarde Briantais y Picaud (51), prepararon anticuerpos contra FSI y FSII, obtenidos por fraccionamiento de la membrana del cloroplasto con Titrón X-100 . Ellos demostraron que los anticuerpos contra FSI reaccionaban con precipitación en un sistema intacto del sistema lamelar, mientras que el Ac contra FSII lo hace en pequeño grado. (51). Con los datos encontra-- dos, concluyeron que el FSI es por tanto accesible en la superficie externa del tilacoide y sus datos los usaron como prueba que apoya al modelo binario de Arntzen, Dilley y Crane (52), para la lamela del cloroplasto.

El modelo binario de la estructura membranal del tilacoide, visualiza a las partículas de FSI arregladas en la mitad superior-

del tilacoide y encima de la partícula de FSII que se encuentra en el interior (52). Este modelo está de acuerdo con la interpretación de los datos obtenidos en microscopía electrónica por la técnica de congelamiento-fractura, en la cual se observan dos tipos de partículas en la membrana del tilacoide, una pequeña (FSI) hacia el exterior del tilacoide y la otra grande (FSII) (53)mirando hacia el loculus del tilacoide.

Los datos de modificación química del Dr. Dilley (55) apoyan el modelo binario usando p-diazobencen-sulfónico (DABS). Este compuesto no puede penetrar en la membrana, ya que es muy soluble en agua y por lo tanto,marca grupos reactivos localizados en el exterior de ella (56). Después de marcarlos, fraccionaron la membrana del cloroplasto en partículas de FSI y FSII, encontrando la mayoría de la marca en FSI, lo que sugiere que FSI está en el exterior de la membrana del tilacoide. Recientemente localizaron uno de los puntos de marcaje de DABS entre los componentes funcionales de FSI, porque se puede detectar actividad de FSI con metil viológeno en cloroplastos marcados con $DABS^{32}$ pero no con NADP Fig. (13).

Las experiencias con aceptores hidrofílicos, anticuerpos y modificación química, dejan claro que FSI está orientado hacia la superficie exterior de la membrana del tilacoide, mirando hacia la matriz ó estroma del cloroplasto. Más específicamente el sitio aceptor de FSI, incluyendo ferredoxina, ferredoxina-NADP-reductasa y un componenete estructural desconocido que es reducido por la ferredoxina (FRS,ORS, y S-letal), están expuestos y accesibles al medio ambiente hidrofílico.

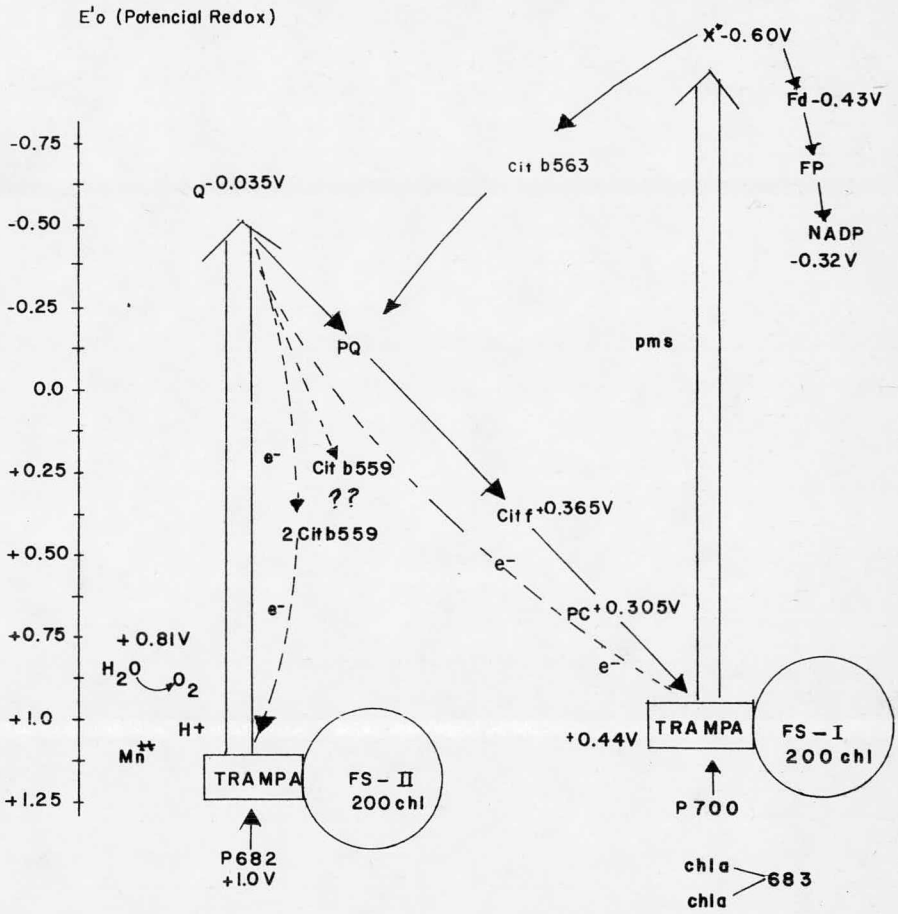
Donador de electrones en Fotosistema I.

Duysens desarrolló el concepto de dos reacciones en serie dependientes de la luz (57), en base a observaciones en las cuales el citocromo F, es reducido por la luz de longitud de onda corta absorvido -- por FSII y oxidado por la longitud de onda larga ,absorvido por FSI.(58,59 .Al avanzar la investigación sobre la posición relativa del citocromo f a la plastocianina, Haehnel (60) con los experimentos de pulsos de luz, re-- porta que el citocromo f posiblemente no esté localizado en el flujo de e- lectrones principal que va de plastoquinona a P700, en constrate a la plastocianina (61), la cual dona más del 90% de los electrones al FSI. Estos - últimos datos están en contradicción con los de Biggs (62) y Larku-Bonner- (63) que midieron cambios de absorción de citocromo f con luz continua, ellos concluyeron que el citocromo f desempeña un papel funcional en el flujo de electrones cíclico y no cíclico.

Recientemente se han introducido inhibidores para la - plastocianina, como las histonas y la polilisina (64), KCN (65) y bajas -- concentraciones de Hg^{++} (66). Se ha observado que la polilisina (67) y los iones Hg^{++} (68), inhiben el flujo de electrones entre el citocromo f y FSI por consiguiente estos datos indican que la plastocianina funciona después del citocromo f . Fig. (13). Se puede concluir que, de acuerdo con las evidencias existentes, se favorece a la plastocianina como el donador de electrones inmediato para FSI.

Flujo de electrones cíclico alrededor de FSI.

La fotofosforilación cíclica fue descubierta por Arnon al agregar menadiona ó FMN (69) a cloroplastos aislados. Más tarde se vió



Esquema Z. P682 es la trampa que atrapa la energía en fotositema II (FS II), se cree que es un dímero de clorofila. Q⁻ se cree que es un derivodo de plastoquinona Citocromo f. PC - plastocianina P700 dímero de clorofila, trampa de energia para fotosistema I (FS I). X - Ferroproteína Fd Ferredoxina, Fp Flavoproteína y NADP coenzima de la NADP - reductosa

FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 13

que el flujo de electrones cíclico, incluye sólo FSI y no es inhibido por el DCMU , ya que este compuesto inhibe FSII (70). El citocromo b563 ha sido implicado como participante en el flujo de electrones cíclico (71). Bohme y Cramer (72) reportaron datos directos para postular un sitio de acoplamiento en la oxidación del citocromo b563. Diferentes experimentos apoyan los esquemas que incluyen al citocromo f en el flujo de electrones - cíclico (73). Experimentos posteriores donde aislaron en cloroplastos, un complejo citocromo f-b563 (74), apoyan las evidencias anteriores. Los datos de inhibición de la oxidación de citocromo b563 por DBMIB, indican -- que plastoquinona está involucrada está involucrada (75) en el sistema cíclico. Fig. (13).

Localización del sitio donador de FSI en la membrana.

Witt (76) y Schelephake (77) aportaron las primeras evidencias que indican la asimetría de la membrana del cloroplasto de acuerdo con la hipótesis quimiosmótica. Ellos encontraron que el centro de reacción de ambos fotosistemas I y II, produce una separación de cargas a través de la membrana después de la iluminación, con la formación de carga - positiva en el interior. Cada fotosistema genera medio campo eléctrico (77) Esto indica que el sitio donador y aceptor de electrones del FSI podría - estar localizado en diferentes lados de la membrana, con el sitio donador en el interior ó hacia el interior de la membrana. La asimetría de FSI - fue enriquecida por los experimentos de Hauska (78) con anticuerpos con-- tra plastocianina, que es el donador de electrones inmediato para FSI. El Ac específico contra plastocianina no es capaz de reaccionar con la molécula en los cloroplastos intactos, por ejemplo no inhibe la reacción de - Hill ó el sistema donador de FSI y tampoco ocurre aglutinación, en cambio

sonicando los cloroplastos en presencia del Ac, inhibe y aglutina. El Ac-- contra citocromo f , tampoco reacciona con el sistema lamelar de los clo-- roplastos intactos, pero lo hace cuando los cloroplastos están sonicados. (49). Estos datos indican que tanto la plastocianina, como el citocromo f- no son accesibles desde el exterior y posiblemente están localizados en--- el interior del cloroplasto (49).

La sugerencia de que el sitio donador de FSI está - - localizado en el interior de la membrana, está apoyada por los experimen-- tos recientes con donadores de electrones para FSI hidrofílicos compara--- dos con los lipofílicos. Hauska (78) encontró que no son cofactores del - flujo de electrones cíclico los sulfoderivados de PMS y piocianina. Am---- bos tienen el mismo potencial redox pero diferente lipoficidad y polari--- dad. Posteriormente encontró lo mismo, cuando se usaron sulfoderivados de- FMN y DCIP (79). Estos resultados indican que el sitio aceptor de FSI no - está accesible a compuestos hidrofílicos polares.

La conclusión en la localización de plastocianina en - el interior de la membrana no está totalmente de acuerdo con los experi- - mentos con polilisina. Se ha visto que este compuesto inhibe las reacciones de FSI (80) y específicamente inhibe entre citocromo f y P700 (81) Fig. (13); porque la polilisina reacciona con la plastocianina solubilizada, se infiere que la polilisina inhibe el flujo de electrones bloqueando a nivel de plastocianina (81). En experimentos recientes la polilisina inhibe a -- cloroplastos sonicados sin plastocianina (82) y a bajas concentraciones, es timula la actividad de FSI en estos cloroplastos (82). Esto puede explicar se, asumiendo que polilisina bloquea cargas negativas en una molécula dife-

rente a plastocianina. La inhibición de FSI por policationes es prevenida por sales, tripsina, luz ó aceite de lecitina, sugiriendo que la inhibición depende de grupos cargados negativamente en la superficie de la membrana diferente a la plastocianina misma (83). La neutralización de las cargas negativas en el exterior de la membrana por bloqueo con carbodimida mas glicina-metil-éster, protege a FSI de la inhibición por polilisina (84). Cambios conformacionales también pueden ser implicados, incluyendo una abertura en la partición. Existe por tanto la posibilidad de que la polilisina inhiba la función de la plastocianina induciendo cambios conformacionales en el exterior de la membrana del tilacoide.

Aceptor de electrones de fotosistema II.

El aceptor primario de FSII es el "apagador" de la fluorescencia de FSII llamado (Q^-) por Duysens (57), él cual está conectado con un gran almacén de "apagadores" secundarios de la fluorescencia llamado (A). Los dos "apagadores" de la fluoresencia pueden ser separados físicamente por el inhibidor DCMU. Se ha encontrado que el almacén grande (A), es idéntico en sus propiedades a la plastoquinona ya que su concentración en la membrana es cerca de 10 a 20 mayor que la concentración de (Q^-) (85) ó alrededor de 5 moléculas por cada transporte electrónico (76) El almacén grande (A), actúa como un marcapaso en el flujo de electrones, entre las dos reacciones de luz (76). Resultados recientes indican que varios fotosistemas II pueden reducir la misma molécula de plastoquinona (76). La naturaleza química de (Q^-), no está suficientemente clara. Stiehl y Witt (76) sugieren que (Q^-) es un almacén pequeño de plastoquinona, el cual es reducido a semiquinona (86), separado físicamente del almacén

grande (A). Experimentos de ESR efectuados por Kohl (87) concluyeron que-- plastoquinona cromanoxilón, es el aceptor primario. Por otro lado experi-- mentos de Bohme y Cramer (72) sugieren que citocromo b559 (en la forma debajo potencial) está localizado antes del almacén principal de plastoquino na, porque la oxidación por FSI es inhibida por el antagonista de plasto-- quinona (DBMIB) (72). El citocromo b559 actúa como un "apagador" secundario de la fluorescencia en presencia de DCMU (88) y está presente en su forma reducida (89). El compuesto C550 descubierto por cambios de absorción a - 550 nm , por Knaff y Arnon (90), está relacionada con el aceptor primario- de FSII, aunque ahora se sabe que no está en la cadena principal y estructuralmente es beta carateno (91).

El potencial redox del sitio aceptor de FSII, ha sido- revaluado por Cramer y Butler (92), con valores de -35mV y -270 mV. Por otro lado Amesz (93) encontró un valor de potencial redox medio de -150mV , para el "apagador" de fluorescencia de FSII Fig. (13).

Localización en la membrana del sitio aceptor de FSII.

Koening (50) preparó anticuerpos de FSII y encontró inhibición de la actividad de FSII. Estos datos indican que el sitio aceptor de FSII está hacia el lado de la matriz. Radunz, Schmidt y Menke (50) en-- contraron que los anticuerpos contra clorofila a, así como el Ac de plasto quinona, reaccionan con FSII y plastoquinona respectivamente (94); aunque- se logró inhibición del 15% en la fotofosforilación. Estos datos parecen - indicar que el sitio aceptor de FSII y plastoquinona en particular, está - localizado hacia el exterior y es accesible parcialmente al estroma. Schleiphake (95) obtuvo separaciones de carga a través de la membrana, al ilumi

nar ambos fotosistemas y propuso que los sitios de FSI y FSII, están localizados en diferentes lugares de la membrana con el sitio aceptor en el exterior de ella.

Reinwald (96) demostró que el bombeo de protones en los tilacoides es realizado por la plastoquinona de la cadena transportadora de electrones. Durante la reducción de las plastoquinonas por FSII, los protones son tomados del exterior del tilacoide, transformándose la plastoquinona (PQ) en plastohidroquinona (HQ) que atraviesa la membrana y es oxidada por FSI, liberando un protón al interior del tilacoide.

La dependencia en pH del potencial redox del "apagador" de la fluorescencia, requiere captación de protón, posiblemente del exterior (92). Cerca del apagador de fluorescencia se ha encontrado al citocromo b559 (88), que no forma parte principal de la cadena transportadora de electrones.

Donador de electrones de FSII.

El donador de electrones en la Fotosíntesis de las plantas verdes, es el agua. Esta afirmación la dedujeron de las oscilaciones en la eficiencia de la evolución de oxígeno después de la iluminación de los cloroplastos con pulsos cortos de luz y se encontró que se requieren 4 cuantos para la evolución del oxígeno . Cuatro centros de captura P682 son transformados del estado So al S3; al susministrar 3 pulsos de iluminación y después del cuarto, se libera oxígeno y regresa al estado cero (So). Cheniae ha resumido el aspecto bioquímico y biofísico de FSII, y la evolución del oxígeno (97) y encuentra que el manganeso está involu-

crado en la fotooxidación del agua.

Para entender mejor el sitio donador de FSII, mencionaremos brevemente que los inhibidores específicos para este fotosistema tales como altas concentraciones de ciano carbonilo de fenil hidrazona (98), hidroxilamina (99); altas concentraciones de amoniaco ó metilamina (100) ; tratamiento con tris (101); calentamiento suave, tratamiento con KCN (102) y el uso de agentes caotrópicos con perclorato, (103) actúan afectando la donación de electrones del agua, indicando que el agua es el donador universal de FSII.

Localización en la membrana del sitio donador de FSII.

El uso de donadores específicos lipofílicos para FSII en el sistema lamelar de los cloroplastos, indica que este fotosistema está embebido en el área lipofílica de la membrana, sin embargo es accesible en cierta región a la superficie del estroma. En particular el sitio donador es la zona más accesible. Esto se dedujo de los experimentos por modificación química (104), con anticuerpos (105) y con digestión enzimática (106). Usando DABS^{32} (104) se reveló que FSII es marcado en la luz y no en la oscuridad. Esto indica un cierto cambio conformacional del FSII, ya que se expone hacia la matriz en la luz, pero no sin ella; puesto que usando DPC como donador artificial, funciona la cadena de FSII, los datos indican que el agua está incapacitada para donar electrones a FSII y como DABS es un reactivo no penetrante, se sugiere que el sitio donador del agua, está localizado cercano a la superficie externa del tilacoide y que funcionalmente se expone con la luz solar.

Evidencias sobre la asimetría de la membrana.

Los experimentos con anticuerpos contra componentes de

la membrana del cloroplasto, como las modificaciones químicas, han permitido determinar los componentes accesibles a ambos lados de la membrana. El primer anticuerpo contra un componente del cloroplasto que ha sido estudiado en detalle, es el anticuerpo contra el factor de acoplamiento CF1, preparado y purificado por Mc Carty y Racker (107); ellos estudiaron su efecto en la capacidad de fotofosforilación de las lamelas de cloroplastos intactos. Sus resultados han indicado que este Ac contra CF1. inhibe la formación de ATP, pero no la bomba de protones. Esta conclusión se obtuvo en base a las observaciones de cloroplastos libres de CF1 (lavados con EDTA), en donde se muestra captación de protones, mientras que los cloroplastos - inhibidos por Ac contra CF1, indican que el CF1 aunado a su función en - la formación de ATP, tiene un papel estructural ó un papel en la conservación de la energía (107). Posteriormente se observó que un Ac de conejo -- contra CF1, inhibe la bomba de protones, es decir acelera el eflujo de protones. Es interesante notar que la polilisina inhibe la formación de ATP . (108); también afecta la remoción de protones, transporte de K^+ y cambio -, de volumen a altas concentraciones; ésto indica que una distorción en el - factor de acoplamiento localizado en la superficie, aumenta la permeabilidad de la membrana(108). Lo mismo ha sido observado inhibiendo con tripsina el sistema de acoplamiento sobre la membrana, porque la tripsina no sólo inhibe la formación de ATP, sino que aumenta el abatimiento del gradiente de pH (109).

Otro papel estructural para el CF1 es el que señala - Berzborn (46). Como ya se indicó, él afirma que la ferredoxina-NADP-reductasa y la ferredoxina, están localizadas en una cresta ó criba sobre la superficie de la membrana del tilacoide (56) y particularmente formada por - la prominencia de CF1 saliendo de la membrana. Recientemente los Anticuer-

pos contra las subunidades de CF; clarificaron la fina estructura del factor de acoplamiento CF1 y condujeron al aislamiento y caracterización de cinco subunidades polipépticas (49). La localización del factor de acoplamiento sobre el lado de la matriz, ha sido bien establecido por Howell y Maudrianakis (110). Las prominencias sobre el lado de la matriz de la membrana, son debidas al CF1 como sucede en la RuDP-carboxilasa preparada por Kannangara y colaboradores (111) en donde se aglutinaron lamelas de cloroplastos aislados.

Al microscopio electrónico se observa que la diamino bencidina (DAB) forma un precipitado insoluble del lado del sistema multilamelar al oxidarse, lo que indica que el sitio donador de FS1 está accesible del lado de la lamela. De lo anterior se concluye que existe asimetría de la membrana del tilacoide. Esto ha sido reforzado con los experimentos de Hind y Jagendorf (114) sobre la captación de protones del lado exterior de la membrana durante la iluminación y con la formación de un gradiente de pH a través de ella.

La tabla I resume los resultados discutidos en secciones previas. De acuerdo a esta tabla se deduce que el SITIO ACEPTOR de FSI, está en un medio hidrofílico hacia la fase acuosa del lado de la matriz, en cambio el SITIO DONADOR de FSI, no está accesible, ya que ha evidencias concluyentes de que se localiza embebido en el interior. Cuando no hay apilamiento, el sitio del ACEPTOR de FSII (Q) no está accesible al exterior. Los anticuerpos contra algunos componentes de FSII indican claramente una cierta accesibilidad de FSII. Por otro lado, los anticuerpos contra plastoquinona, así como la captación de protones hacia el exterior

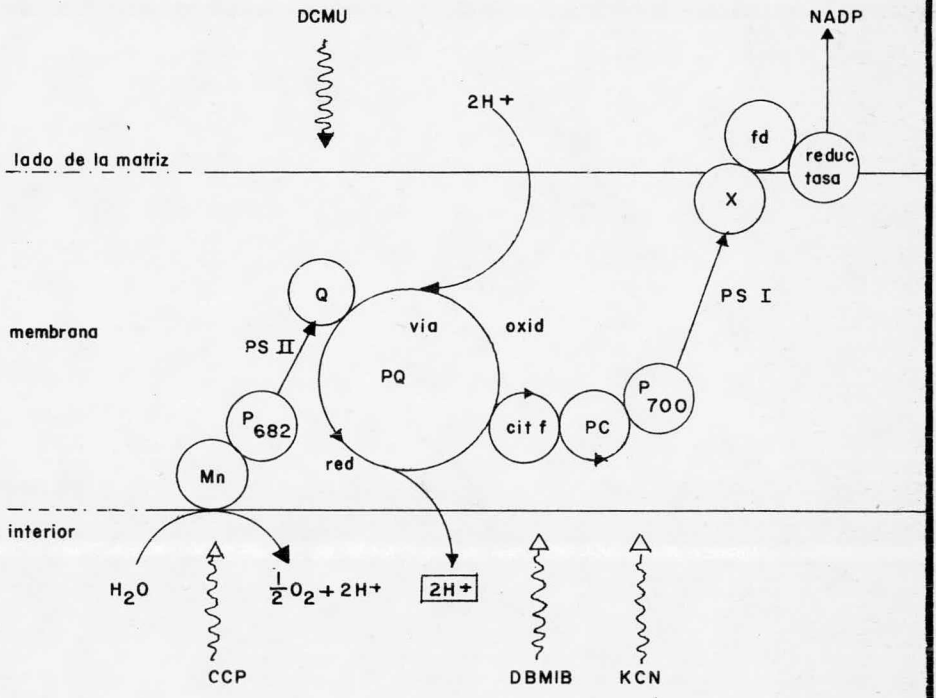
y la reducción por el FSII sugieren que el SITIO ACEPTOR de FSII, está cubierto por capas de lípidos y proteínas , pero orientado hacia el exterior La mayoría de los resultados sobre la localización del SITIO DONADOR de - FSII (marcaje con DABS, reacciones con anticuerpos, inactivación con tripsina, etc.,) indican que la fotólisis del agua está expuesta en cierta forma a la superficie de la membrana. En particular el marcaje con DABS en la luz, indica que el sitio de fotólisis del agua está expuesto a un cambio - conformacional, ya que en la oscuridad no se afecta.

Witt, Junge y asociados (76) proponen que los dos fotosistemas y la cadena de transporte electrónico, están en zig-zag a través- de la membrana con el sitio donador de ambos fotosistemas orientados hacia el interior.

Las crestas y depresiones en la superficie de la mem-- brana, pueden exponer temporalmente sitios de la fase lipídica como se encuentra en los estudios de Ac contra ferredoxina-NADP-reductasa y algunos- galactolípidos, glucolípidos y luteína, puesto que los anticuerpos no producen aglutinación directa.

Es posible que la alteración en el exterior de la membrana, ya sea por anticuerpos, modificaciones químicas ó digestiones enzi- enzi máticas , conduzca a un rearreglo conformacional de la membrana y a- una inhibición en el interior de ella.

En la Fig. 14, se muestra el esquema del flujo electrónico , donde se definen acarreadores del flujo de electrones en zig-zag a



Flujo electrónico del agua a NADP en zig-zag a travéz de la membrana. Se observan los puntos de inhibición de algunos inhibidores del flujo electrónico.

FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 14

TABLA I. EVIDENCIAS SOBRE LA ASIMETRIA DEL FLUJO ELECTRONICO EN LA MEMBRANA.

LOCALIZACION HACIA AFUERA	LOCALIZACION HACIA DENTRO
U ORIENTADA HACIA EL EXTERIOR.	U ORIENTADA HACIA EL INTERIOR.

FOTOSISTEMA II

POR EL LADO DEL ACEPTOR	
Bomba y captación de protones vía plastoquinona. Fotorreducciones por FSII Ac contra plastoquinona y Ac contra clorofila Ac contra subpartículas de cloroplasto Formación de campo Enfoque al Cit b559 Nueva versión del modelo binario.	El enfoque de aceptores HIDROFILICOS.
	POR EL LADO DEL DONADOR.
Se marca con DABS Ac contra luteína Ac contra partículas de FSII Se digiere con tripsina.	Formación de campo Acoplamiento de la energía a fotoreducciones. Protón de la fotólisis del agua liberado en el interior.

LOCALIZACION HACIA AFUERA U ORIENTADA HACIA EL EXTERIOR.	LOCALIZACION HACIA DENTRO U ORIENTADA HACIA EL INTERIOR.
FOTOSISTEMA I	
POR EL LADO DEL ACEPTOR	
Aceptores hidrofílicos	
Ac contra la reductasa	
Ac contra ferredoxina	
Ac contra S letal	
Ac contra bupartículas del cloroplasto	POR EL LADO DEL DONADOR
Marcaje con DABS^{32}	Ac contra plastocianina
Formación de campo	Ac contra citocromo
Modelo binario	Oxidación química lenta de citocromo f por ferricianuro.
Inhibición de plastocianina por polilisina	Oxidación de DAB, precipita el producto.
	No se marca con DABS
	Formación de campo
	Protones liberados en el interior a través de plastoquinona.
	Enfoque de donadores lipofílicos pero no hidrofílicos.

TABLA I EVIDENCIAS SOBRE LA ASIMETRIA DEL FLUJO ELECTRONICO EN LA MEMBRANA.

través de la membrana. Dos protones se liberan dentro y dos protones son - tomados del exterior por la plastoquinona (115). Un conjunto de plastoquinonas conecta con dos fotosistemas a través de la membrana, como lo ha sugerido Reinwald y colaboradores (96). Los equivalentes de reducción son -- transportados vía plastoquinona y los protones pasan del exterior hacia el interior.

El sistema de flujo electrónico en zig-zag a través - de la membrana, facilita la discusión sobre el número de sitios de conservación de energía en la fotofosforilación cíclica y no cíclica.

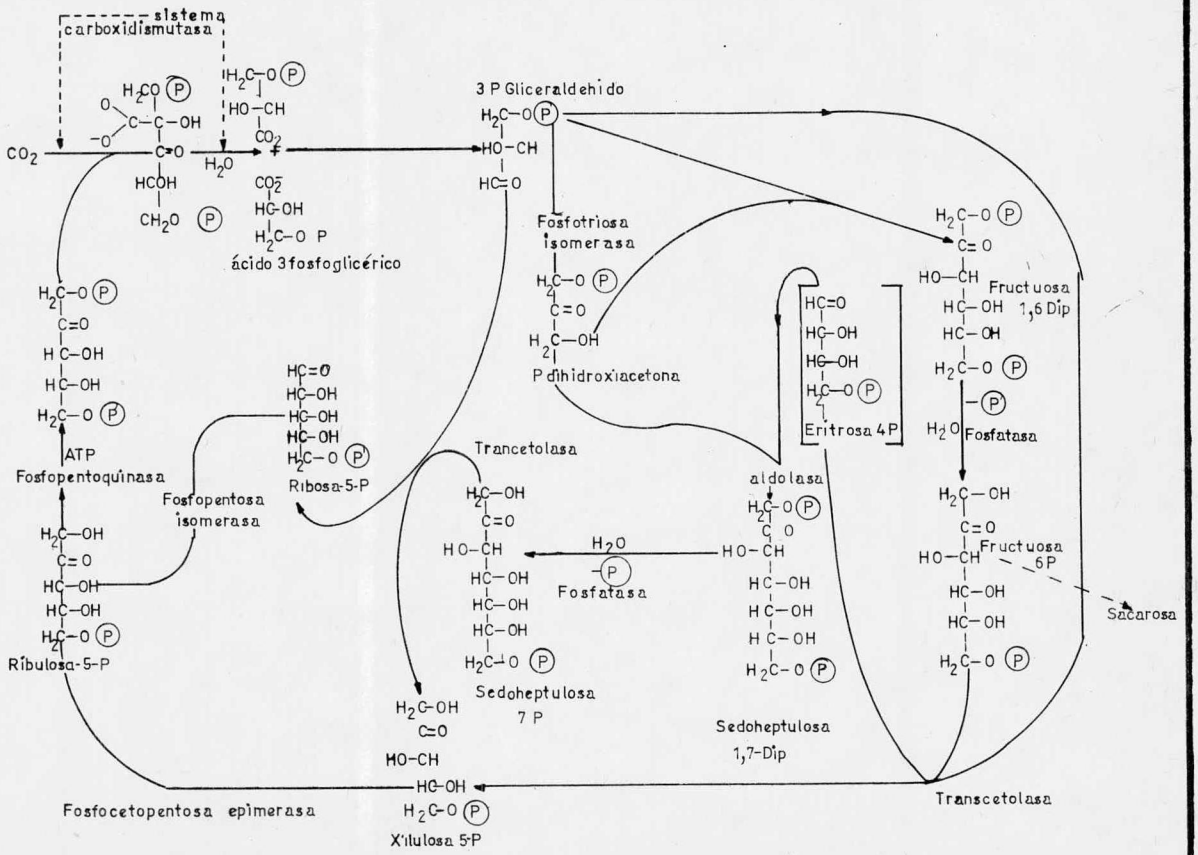
En la fotorreducción por FSII, existe un sitio de conservación de energía en la fotólisis del agua, que contribuye a la formación de ATP. Se ha encontrado que la fotorreducción de aceptores artificiales de FSII con fenilendiamina oxidada ó benzoquinona oxidada (116) están acoplados con la formación de ATP. Esto fue más evidente cuando se usó DBMIB (117) ó KCN como inhibidor del flujo electrónico entre FSI y FSII

De acuerdo con la teoría quimiosmótica y el esquema - de zig-zag a través de la membrana, el sitio de liberación de protones en el interior, por la reacción de fotólisis del agua, puede ser responsable del acoplamiento en la fotorreducción por FSII. Junge (115) lo apoya con- la observación de liberación de protones en el interior, durante la fotoreducción por FSII.

2A) CICLO DE CALVIN-BENSON

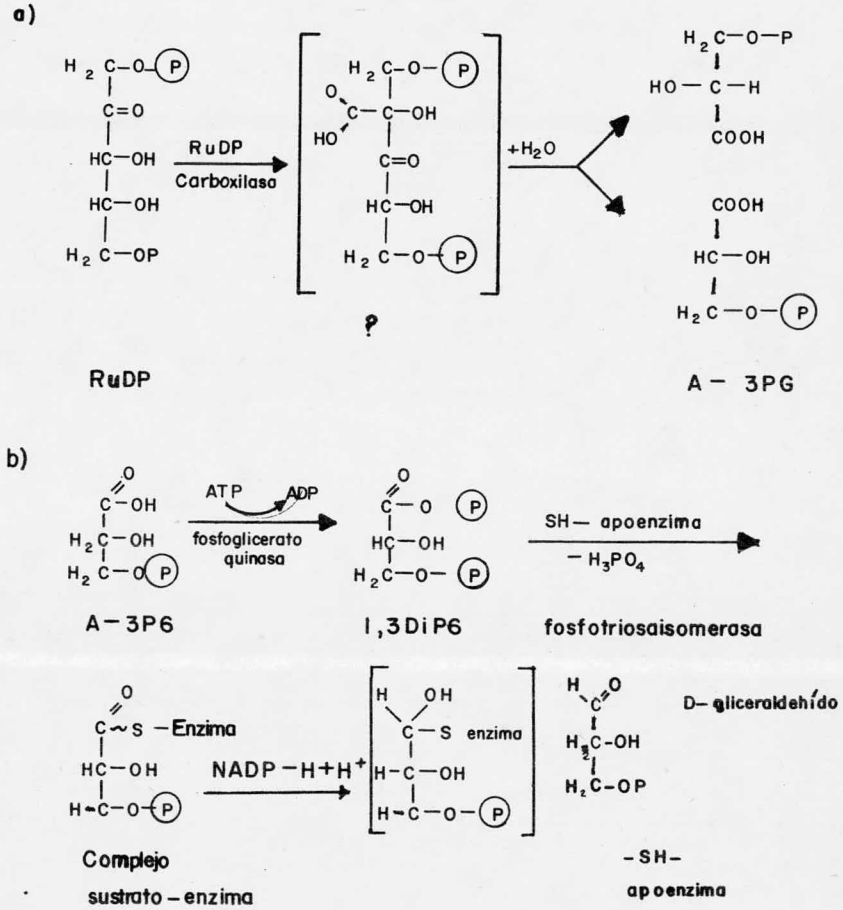
La vía metabólica por la cual el CO_2 es fijado y reducido a carbohidratos en todas las plantas superiores, se conoce como Ciclo de las Pentosas-Fosfato ó Ciclo de Calvin-Benson. Este Ciclo es el proceso metabólico de las reacciones oscuras de la Fotosíntesis que tiene lugar en el estroma del cloroplasto. Los estudios de Melvin Calvin y colaboradores (121) con trazadores radioactivos, permitió seguir el proceso que se desarrolla en las células vegetales vivas durante la fijación de CO_2 y determinar directamente los compuestos que se forman. Encontraron que el primer compuesto que se vuelve radioactivo es el ácido 3-fosfoglicérico (A-3PG) y que el grupo carboxilo se forma por adición de CO_2 a una molécula "aceptora", la ribulosa-1,5-difosfato (RuDP) mediante la acción de una carboxilasa (RuDP-carboxilasa), dando un intermediario de seis carbones que no se separa de la enzima y se descompone en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (A-3PG). Este ácido se transforma por reducción en gliceraldehído-3-fosfato (G-3P). La reacción es muy endergónica y para cambiar el equilibrio a favor de la formación de aldehído, se requiere de un susministro de energía en forma de ATP y NADPH + H^+ (equivalente de reducción). La reducción del A-3PG se realiza en varios pasos y requiere de la intervención de dos enzimas: La fosfoglicerato quinasa Fig. (16b) que produce la transferencia de un resto fosfato del ATP al grupo carboxilo del A-3PG y la fosfotriosa-deshidrogenasa que cataliza la hidrólisis de uno de los fosfatos de ácido 1,3-difosfoglicérico (1,3-DPG) al reaccionar con el grupo -SH de la apoenzima específica Fig (16c). El NADPH, le transfiere su hidrógeno al complejo acil-S-enzima proteina, lo que lleva al

desdoblamiento reductivo del complejo en G-3P y su SH-apoenzima reactiva_ da Fig. (16c) (122). Hasta aquí los pasos de la vía metabólica son comunes, en adelante la mayoría de las reacciones del Ciclo, regeneran RuDP - (Fig. 15). La primera etapa consiste en que aproximadamente el 96 % de - las moléculas de G-3P está sujeto a una enolización para formar la correspondiente hidroxiacetona Fig. (15) . Una molécula de G-3P y otra de hidroxiacetona (DHA) se unen en condensación aldólica por la acción de una aldolasa, para formar un azúcar de seis átomos de carbono que es la fructuosa 1,6-difosfato (F-1,6DP), la cual por acción de una fosfatasa pierde su grupo fosfato-1 y se transforma en fructuosa -6-fosfato (123). Este - compuesto es eliminado en parte como producto final del Ciclo e interviene en otros caminos metabólicos de la célula, como síntesis de sacarosa. Hasta aquí el CO_2 es transformado en azúcar de seis átomos de carbono. En la etapa de regeneración de la ribulosa-1,5 diP, intervienen la F-6P y el G-3P como materia prima (123). La reacción entre ambos compuestos catalizada por la transcetolasa, origina un compuesto de cuatro carbonos, la eritrosa-4-fosfato (E-4P) y uno de 5 , la xilulosa-5-fosfato (X-5P). La - E-4P reacciona con la DHAP en una condensación aldólica para formar sedoheptulosa-1,7-difosfato (SDP) que sufre una desfosforilación por la fosfatasa correspondiente y da origen a la sedoheptulosa-7-fosfato (S-7P) (121). Los dos primeros átomos de carbono de la S-7P son escindidos como fragmentos moleculares y después de su unión con la coenzima son transferidos a una moléculas de G-3P para obtener X-5P y R-5P. La X-5P pasa a Ru-5P por la fosfocetosa-epimerasa. El siguiente paso de las reacciones es la conversión de la X-5P a Ru-5P por la fosfocetopentosa epimerasa. La Ru5P en presencia de ATP se fosforila, dando RuDP, catalizada por la fosfopentoquinasa. Con la obtención de RuDP se cierra el Ciclo de Calvin (121) y la molé



Reducción cíclica del carbono en la fotosíntesis. Por Calvin y Bassham (1962)

FACULTAD DE QUIMICA	UNAM
Q.F.B. LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL 1977	FIG 15



FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 16

cula queda lista para reaccionar nuevamente con el CO_2.

Estequiometría del Ciclo de Calvin-Benson

6 moléculas de RuDP y 6 moléculas de CO_2 mas 8 de ATP; 12 de NADPH y 12 protones, producen 6 moléculas de RuDP, 18 de ADP, 18 de Pi, 12 de $NADP^+$ y hexosa. (121).

REGULACION DE LA VIA DE LAS PENTOSAS-FOSFATO O CICLO DE CALVIN-BENSON.

Como ya se dijo, las reacciones oscuras se localizan - en el estroma del cloroplasto en donde se utiliza ATP y NADPH para reducir el CO_2; mientras que los compuestos redox de las reacciones luminosas se - encuentran en la membrana del tilacoide de manera que sus componentes es-- tructurales pueden actuar como una bomba electrogénica de protones, gene-- rando una diferencia de potencial a través de la membrana del tilacoide, - fundamentalmente por un gradiente de pH alcalinizando afuera y acidifican- do dentro del tilacoide.

Los estudios con cloroplastos de clase II (sin envol- tura externa), indican que la captación de H^+ en la luz es de 600 nmoles - H^+ por mg^{-1} de clorofila encontrándose un pH de 5, lo que indica uqe el es pacio intratilacoide se acidifica (125); con un volumen intratilacoidal de 3.3 microlitros por mg^{-1} (126). En cambio al iluminar los cloroplastos in- tactos casi no ocurre intercambio de protones a través de la doble membra- na. Heldt (125) observa un incremento de pH de 7 a 8 en el estroma cuando- se pasa de oscuridad a luz, lo que indica una alcalinización del estroma,-

que la planta usa para la regulación de la Fotosíntesis. Si los protones-son captados en el compartimiento intratilacoidal, se observa que la electroneutralidad es mantenida por movimiento de contraiones. Hay evidencias de que 600 nmoles de H^+ por mg de clorofila se obtienen del espacio intratilacoidal, pero la mitad de equivalentes en nanomoles(nmoles) se desplaza al estroma como contraión y la doble membrana o envoltura del cloroplasto es impermeable a los cationes divalentes y el volumen del estroma es aproximadamente de 23 microlitros por mg de clorofila (125), entonces el intercambio protón-magnesio aumenta el contenido de Mg^{++} hasta 13 nmoles-en el estroma, ya que el protón al moverse hacia el interior del tilacoide , el magnesio de mueve hacia afuera. La evolución de oxígeno y la reducción del NADP propician un ambiente reducido por la formación de NADP H , que tiene influencia sobre la actividad enzimática del Ciclo de Calvin; estas modificaciones ocurren por el cambio de concentración del ATP y son controladas por la fotofosforilación.

La presencia de intermediarios fosforilados es otro - factor que interviene en la regulación de la actividad enzimática del ciclo y que eleva la selectividad del transporte en el cloroplasto a través de la membrana interna al citoplasma, por ejemplo la triosa fosfato, la G-3P y la DHAP (126) se mueven hacia el citoplasma en intercambio con -- fosfato inorgánico (Pi) ó con ácido 3-fosfoglicérico (A-3PG)mediante un translocador de fosfatos localizado en la membrana interna del cloroplasto. Estas propiedaades de intercambio de la membrana interna, regulan la cantidad de fosfato libre , en compuestos fosforilados en el cloroplasto-(125), ya que la hexosa fosfato y la RuDP no atraviesan la membrana interna del cloroplasto, por esta razón, el almidón sintetizado en el cloroplasto, debe ser convertido en triosa-fosfato para servir como fuente -

de carbono. El A-3PG, la DHAP y el G-3P son los principales compuestos fosforilados que suplen las necesidades energéticas de la célula.

Hay dos enzimas de particular interés en el Ciclo de Calvin, las cuales son extremadamente sensibles a los cambios de pH y a los iones magnesio: La RuDP-carboxilasa y la fructuosa difosfatasa (FDPasa Lilley y Walker (127) han usado sistemas de cloroplastos reconstruídos y obtienen una alta actividad de la RuDP-carboxilasa usando 15 mM de cloruro de magnesio a pH = 7.9. Reduciendo los niveles de magnesio y bajando el pH, la enzima sufre una fuerte inhibición.

Investigaciones efectuadas por Werden (128) establecen que el pH óptimo para la fijación de CO_2 in vivo, debe ser de 8.1 y que el proceso es completamente inhibido a pH = 7.3 . La fijación de CO_2 en cloroplastos intactos se puede realizar con sustratos que suplen el ATP y NADPH en el estroma después de la iluminación haciendo variar la fijación de CO_2 a una actividad máxima.

Por lo tanto se concluye que la RuDP-carboxilasa y la FDP-asa son enzimas reguladoras y marcapasos de las reacciones oscuras y la doble membrana del cloroplasto actúa no sólo como barrera para los intermediarios del Ciclo de Calvin, sino también para mantener el medio ambiente iónico, en el cual la maquinaria fotosintética puede operar eficientemente.

REGULACION DE LA RIBULOSA DIFOSFATO CARBOXILASA

Los estudios metabólicos con hojas intactas (129) indican que in vivo la RuDP-carboxilasa es activa en luz e inactiva en oscuridad, pero es difícil explicar su regulación por la carencia de sustratos.-

Se ha medido la cantidad de RuDP en cloroplastos intactos en cambios de luz -oscuridad; Cuando los cloroplastos están en la oscuridad los niveles de RuDP son similares a los de hojas adaptadas a la oscuridad y las cantidades remanentes son significativas, ésto es una medida de la actividad de la carboxilasa, por lo tanto la cantidad remanente de RuDP puede medirse en cloroplastos lisados en presencia de magnesio y pH apropiado y la enzima puede - ser reactivada. La producción de RuDP es inhibida en presencia de luz y por lo tanto los niveles de RuDP total son cero, lo que indica que la RuDP es - accesible a la carboxilasa y ésta es activa en la luz. Stoker y Walker (130 determinaron que el DL-gliceraldehído es inhibidor del Ciclo de Calvin, sin embargo en la oscuridad no tiene efecto sobre los niveles de RuDP.

Se ha observado que la enzima, después de lisis, presenta alta afinidad (baja Km) por el CO_2 y por la RuDP (131). La Km del CO_2 es de 13 a 18 micromoles y la Km de la RuDP es de 10 a 30 micromoles a pH =7.8 pero después de un tiempo, disminuye la afinidad por el sustrato. La Km del CO_2 es de 540 a 670 micromoles y la Km de la RuDP-carboxilasa es de 110 micromoles , dependiendo de las condiciones de incubación. Estos valores de - Km son muy parecidos a los de enzimas purificadas (132)por lo que se piensa que la enzima podrá funcionar a los niveles de CO_2 atmosférico (10 micromoles de CO_2 a 25^oC). En las tablas 2 y 3 , se muestran los parámetros cinéticos y los valores de Km del CO_2 y RuDP en relación a la máxima velocidad relativa, respectivamente (131).

Como se observa en las tablas siguientes (2 y 3)existen tres formas cinéticas de la RuDP-carboxilasa, sólo la de mas alta afinidad ha sido identificada después de la lisis del cloroplasto.

TABLA 2 PARAMETROS CINETICOS DE LA RUDP-CARBOXILASA OBTENIDOS CON DIFERENTES PREPARACIONES DE CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

	ALTA AFINIDAD Baja Km	INTERMEDIO	BAJA AFINIDAD Alta Km
Km (HCO_3^-) pH = 7.8	0.5-0.8	2.5-3.0	20-25 mM
Km (CO_2)	13-22 microM	67-81 microM	540-670 microM
Velocidad máxima relativa	1.0	3.5-4.0	0.8-0.9
Km (RuDP)	10-30 microM	30 microM	30.11 microM

FORMA DE CARBOXILASA	VELOCIDAD micromol mg^{-1} Clor hr^{-1}
Cloroplastos intactos fotosintetizantes	20
Alta afinidad bajo Km carboxilasa en oscuridad	24
Km intermedio carboxilasa en oscuridad	27
Baja afinidad alto Km carboxilasa en oscuridad	1

TABLA 3 ACTIVIDAD DE VARIAS FORMAS CINETICAS DE LA RUDP-CARBOXILASA (CO_2 9.0 micromoles) USANDO LAS MISMAS PREPARACIONES DE CLOROPLASTOS. (131)

La actividad de la carboxilasa depende de la concentración de iones magnesio (133), a 10 mM se obtiene un 80% de activación. Sin embargo si se lisa el cloroplasto en soluciónes sin iones magnesio, la enzima es activa sólo en un 30% cuando se mide con RuDP a pH = 7.8. Si algún otro intermediario fosforilado como el ATP, FDP ó 6-fosfogluconato está presente, la enzima se inhibe completamente en los plastidios lisados (134). El pH también tiene influencia en la actividad y la alta afinidad de la carboxilasa. Las siguientes observaciones sugieren que la luz puede activar la fijación de CO_2, ya que la luz causa que el pH del estroma se eleve a 8 y la concentración de iones magnesio sea de 10 mM aproximadamente y en estas condiciones la enzima se activa. En la oscuridad los cloroplastos tienen un pH de 7.0 en el estroma y bajas concentraciones de magnesio de tal manera que la RuDP-carboxilasa se encuentra inactiva.

Buchanan y Schurmann (135) proponen que la enzima es activada por la fructuosa-6-fosfato e inactivada por FDP, por lo que los intermediarios fosforilados, pueden ser incluídos en la regulación de la RuDP-carboxilasa. Chu y Bassham (136) muestran que la carboxilasa es activada por NADPH y 6-fosfogluconato.

La alta afinidad de la RuDP-carboxilasa, también es dependiente de la afinidad de ésta por el oxígeno (137), esta actividad de oxigenasa produce fosfoglicolato y ácido fosfoglicólico (138). El fosfoglicolato se hidroliza a glicolato y es transportado hacia fuera del cloroplasto, para servir como sustrato en la Foto-respiración que se lleva a cabo en el peroxisoma Fig. (2).

La comparación de la actividad de la carboxilasa con la oxigenasa en función del pH y de los niveles atmosféricos de CO_2 y oxí-

geno, dan evidencias de que la disminución de los sustratos en la Fotosín- y la Fotorrespiración, podrían ser controladas por estos factores. El pH óptimo para la RuDP-carboxilasa de alta afinidad, es de 8.2 a 8.3, mien--- tras que la oxigenasa es de 8.6 a 8.8. Estos datos fueron obtenidos en soluciones idénticas de preparaciones de cloroplastos para comparar las velocidades.

REGULACION DE LAS ENZIMAS: FRUCTUOSA DIFOSFATASA Y SEDOHEPTULOSA DIFOSFATASA.

Los estudios de la vía fotosintética en Chlorella, indican que las actividades de la fructuosa difosfatasa (FDPasa) y sedohep-- tulosa difosfatasa (SDPasa), son mayores en la luz que en la oscuridad - (129). Los iones magnesio y FDP tienen influencia en el pH óptimo de la - FDPasa (140). En presencia de bajas cantidades de iones magnesio (0.25mM)- y FDP (0.15 mM), la enzima exhibe un pH óptimo de 8.8 (141). Recientemente Baier y Latzko (142) mostraron que, en presencia de un fuerte agente reductor como el ditiotreitol (DTT), se mide una considerable alta actividad de la FDPasa con cantidades fisiológicas de Mg^{++} y FDP a valores de pH meno-- res de 8, la presencia de DTT, propicia que los iones magnesio y FDP cam-- bien el pH óptimo de la enzima, lo que está de acuerdo con la activación de FDPasa en la iluminación y su desactivación en la oscuridad, ya que el pH y la concentración de iones magnesio, varían en la luz y en la oscuri-- dad.

Buchanan, Schurman y Kalbere (135) muestran que en los cloroplastos purificados la FDPasa es activada por la ferredoxina reducida en presencia de factores proteicos. Estos investigadores establecen que la

activación es estrictamente dependiente de los iones magnesio. Con FDP - (0.5 mM), Mg-ATP (0.5 mM) ó Mg-ADP (1.6 mM) la enzima se inhibe en un 50% pero el grado en el cual esta enzima es activa en la luz (in vivo), en oscuridad u otras condiciones fisiológicas, no es conocido.

La enzima SDPasa también es depnediente del pH y de - los iones magnesio y puede ser activada con DTT con 20 mM de Mg^{++} (143) ó reducida con ferredoxina en presencia de un factor proteico que también - activa a la FDPasa (144), pero en la SDPasa se observa una mayor activación con la ferredoxina reducida (Mg^{++} 5 mM pH = 7.8).

2B) GRANOS DE ALMIDON.

Los granos de almidón se presentan con forma elipsoidal, se acumulan en las interlamelas del cloroplasto y miden 1.5 milimicras aproximadamente Fig. (17). Se observan generalmente en los cloroplastos de la vaina vascular, aunque también aparecen residuos después de varias horas de exposición en luz, en los cloroplastos del mesofilo. (145).

2C) PLASTOGLOBULI.

Los plastoglóbuli son glóbulos osmiofílicos que se encuentran en el estroma del cloroplasto, varían en número y tamaño y su - función no es aún clara, pero en general se consideran como granos almacenadores de lípidos (146) Fig. (17 y 18). El número y tamaño aumenta con el tiempo, ya que se ha encontrado una gran cantidad de plastoglóbuli en los cloroplastos degenerados. Después de la fijación con osmio, el plastoglóbuli aparece al microscopio electrónico como un cuerpo oscuro, denso,

sin estructura interna distinguible y que presenta altas cantidades de lípidos, quinonas, plastoquinonas, alfa-tocoferol-quinona y vitamina K_1, al observarse su espectro de absorción con extractos de éter de petróleo (147). Los plastoglóbuli carecen de una membrana limitante y funcionalmente presentan reservorios de lípidos lamelares, acumulados en la oscuridad, Figs. (17 y 18).

2D) ACIDOS NUCLEICOS.

ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.

Los cloroplastos contienen 0.5% en peso seco de ácido-desoxirribonucleico (DNA). Cálculos de densidad de flotación, indican diferencias entre el DNA de cloroplastos y DNA mitocondrial de la misma célula (148). El DNA de cloroplasto presenta doble hélice y relación de 1 en su composición de bases A/T = G/C .

La expresión genética en el cloroplasto se realiza por la actividad de una RNA-polimerasa dependiente de DNA. Sin embargo, la transcripción del DNA de cloroplastos en Chlamidomonas, es sensible a la inhibición selectiva de rinfomicina y la polimerasa del cloroplasto de plantas superiores no es inhibida por este antibiótico (148). El peso molecular del DNA del cloroplasto es de 4 a 11 x 10^7 y se observan 20 copias de un sólo tipo. (149), además el cloroplasto contiene toda la maquinaria para la expresión y replicación del genoma y actividad de DNA polimerasa, que es requisito para la duplicación del gene (150). Tanto esta enzima como el DNA se unen fuertemente al cloroplasto y es posible aislar el RNA mensajero radioactivo. La formación de este producto, es dependiente de los cuatro desoxirribonucleótidos tri fosfatados que están presentes como

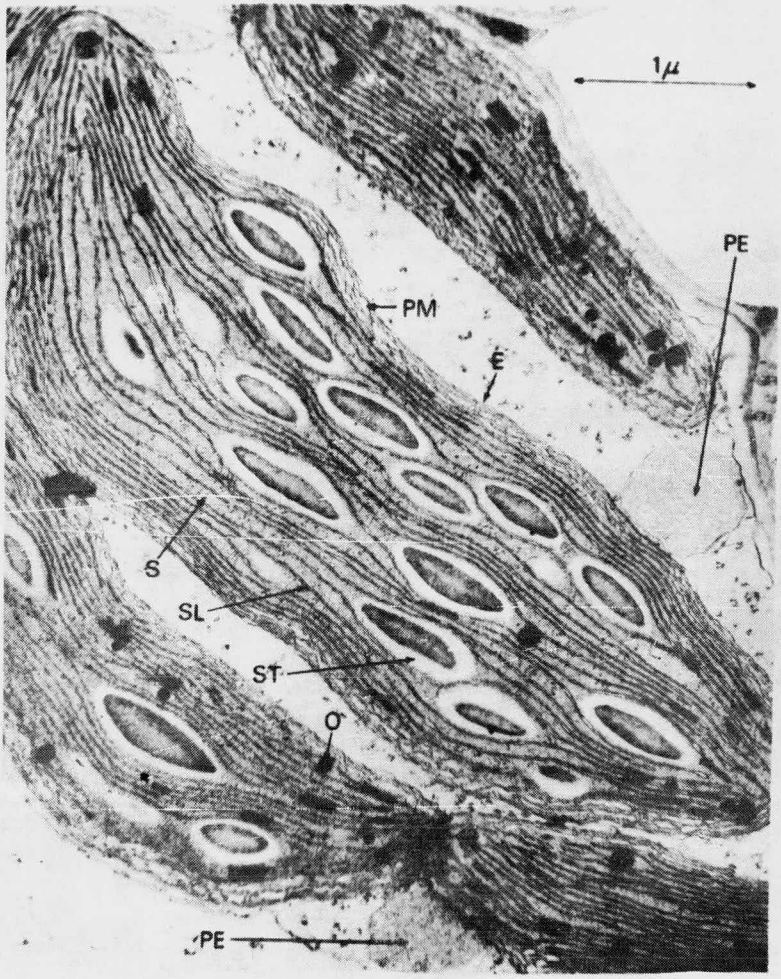


Fig. (17) MIcrofotografía electrónica de cloroplastos de la vaina vascular, en donde se muestran los granos de almidón (ST); doble membrana (E); granos osmiofílicos (O) ; estroma (S); estroma lamelar (SL); retículo periférico (PM) y peroxisomas (PE) (145).

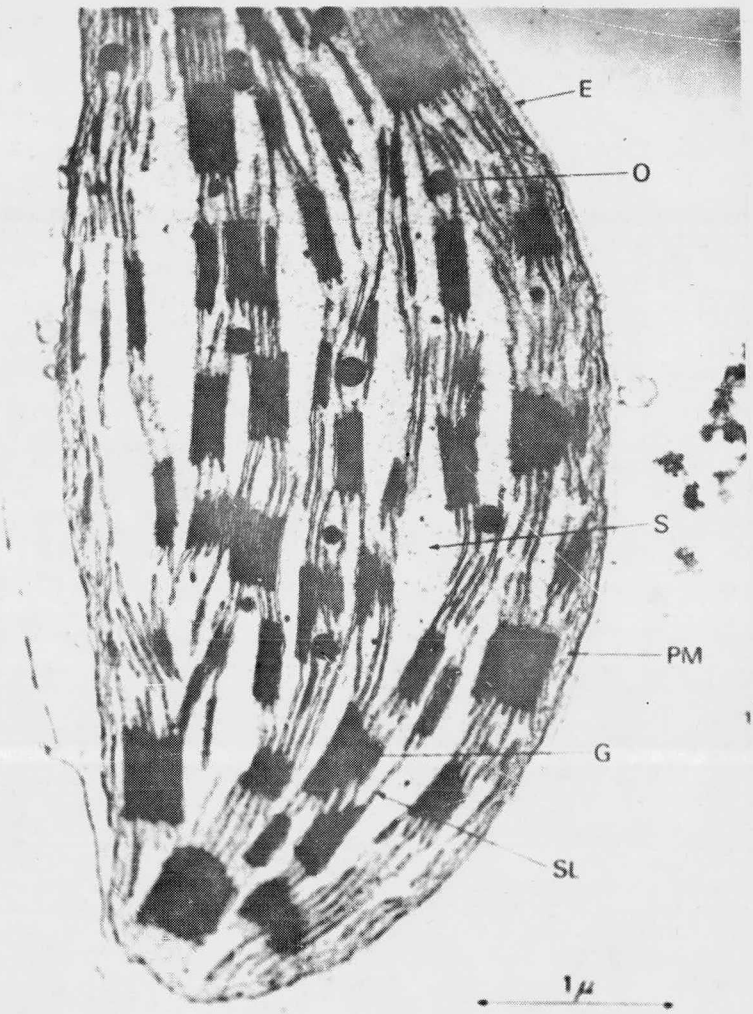


Fig. (18) Microfotografía electrónica de un cloroplasto del mesofilo de maíz. Abreviaciones: plastoglóbuli (O); doble membrana (E); grano (G); estroma (S); estroma lamelar (SL); retículo periférico (PM). (145)

sustratos y es inhibida por DNAasa y actinomicina D. La banda de los productos marcados que se obtienen en los gradientes de cloruro de cesio, hibridiza con DNA de cloroplasto en un 45%, pero no lo hace con DNA nuclear (7%). Esto indica que la polimerasa del cloroplasto es dirigida por el templado de DNA del cloroplasto.

ACIDO RIBONUCLEICO

En las microfotografías electrónicas se observan ribosomas en los cloroplastos Fig. (19) y cuando se aislan, son iguales a los ribosomas mitocondriales y bacterianos en cuanto a coeficientes de sedimentación (70S). Los polirribosomas se encuentran unidos a la lamela del cloroplasto. El RNA ribosomal (rRNA) se hibridiza con el DNA del cloroplasto y DNA nuclear (148). Mientras que los ribosomas citoplásmicos dan un rRNA que sólo hibridiza con el DNA nuclear, pero no con el DNA de cloroplasto, por lo que este DNA puede codificar solamente un pequeño número de ribosomas altamente específicos en el cloroplasto.

El rRNA difiere del citoplásmico en su composición, ya que el rRNA del cloroplasto tiene un coeficiente de sedimentación de 23S y es lábil durante el aislamiento (151). En Chlamidomonas reinhardi el rRNA del cloroplasto es de 16S y de 23S y se codifica uno detrás de otro. En los ribosomas de cloroplastos hay un 44% de RNA y el resto es de proteína. Lytlleton (152) aisló ribosomas de cloroplasto de espinaca y encontró 15 bandas de proteínas con electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas ribosomales del cloroplasto fueron muy diferentes de las proteínas ribosomales del citoplasma.

El ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) ha sido aislado de cloroplastos y también parece ser distinto del tRNA del ci

toplasma. Se ha encontrado N-formil,metionil-tRNA en cloroplastos de haba- y trigo y el tRNA muestra hibridización diferencial con DNA de cloroplasto. El cloroplasto parece tener su propio DNA, DNA-polimerasa, RNA-polimerasa, ribosomas, tRNA y enzimas que activan a los aminoácidos.

2E) PIRENOIDES.

Los pirenoides sólo se han encontrado en algas. Holdsworth (154) los aisló de Eremosphaera viridis y encontró que están compuestos de dos proteínas diferentes, pero aún no están bien caracterizadas. Los pirenoides de Anthocerotales se observan como partes especializadas del estroma (155) Fig. (20). Su estructura y función son desconocidas y hasta la fecha no se han reportado en plantas superiores.

2F) RETICULO PERIFERICO.

El retículo periférico (RP) consiste en un sistema de túbulos anastomosados y vesículas contiguas que son una prolongación de la membrana interna (156) Figs. (21).

Laetsch (157) observó que el retículo periférico sólo aparece con determinados métodos de fijación, es decir, que se observan en la fijación con glutaraldehído y/ó tetróxido de osmio en cuarto frío y que es destruído ó considerablemente alterado con permanganato, lo que sugiere que la composición del retículo periférico es diferente de la membrana del tilacoide y de la doble membrana del cloroplasto, ya que ésta última retiene su integridad con esta fijación. El retículo periférico se presenta en la mayoría de las plantas C-4 y con mayor desarrollo en los cloroplastos -

del mesofilo Fig. 21 . Sin embargo, se ha encontrado retículo periférico en plantas C-3 como el trigo, en condiciones subóptimas (158) y en -- cloroplastos del mesofilo de Dactylis glomerata (159) y Typha latifolia -- (160); estos últimos autores postulan una correlación de la presencia de - retículo periférico con la limitación de la Foto-respiración. Taylor y colaboradores (161) encuentran retículo periférico en cloroplastos de frijol de soya en donde la planta estaba sujeta a muy bajas temperaturas, concluyendo que el retículo periférico se presenta en las plantas C-3 que se encuentran en condiciones drásticas de temperatura.

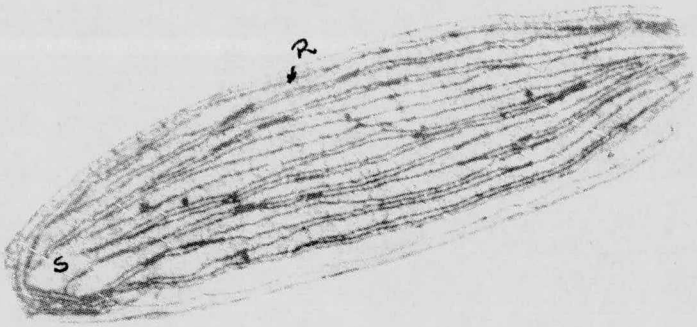


Fig. (19) Microfotografía de un cloroplasto en donde se observan los ribosomas (R) en el estroma (S). (167).

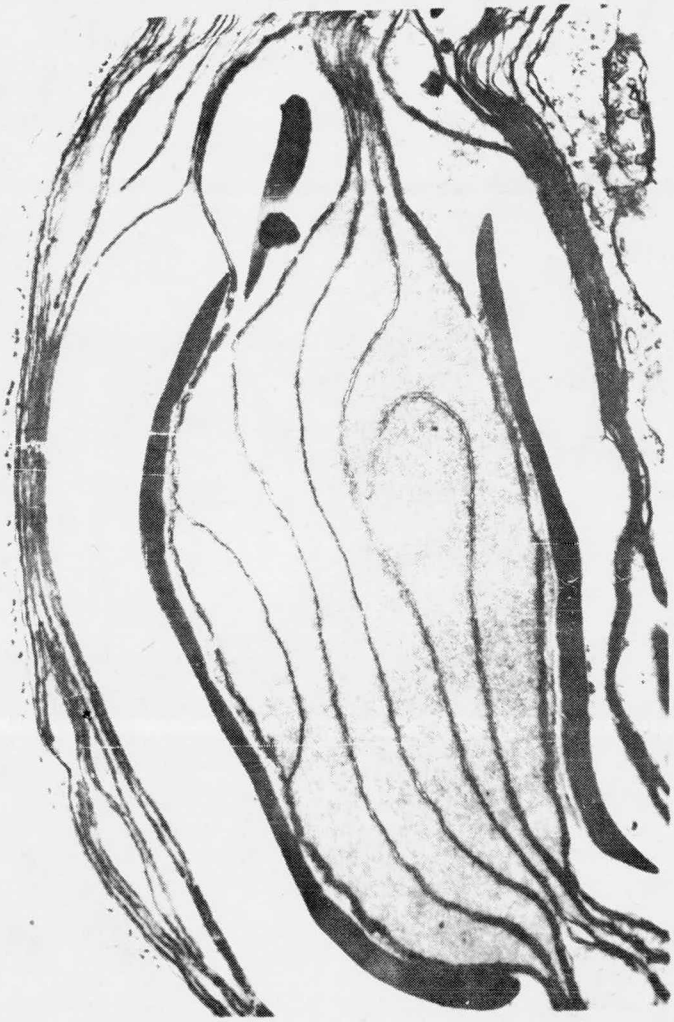


Fig. (20) Microfotografía electrónica de un cloroplasto de flagellata (alga verde) en donde se observa un contorno oscuro que el el pirenoide (Pir) C8172 X 20 000 (155).

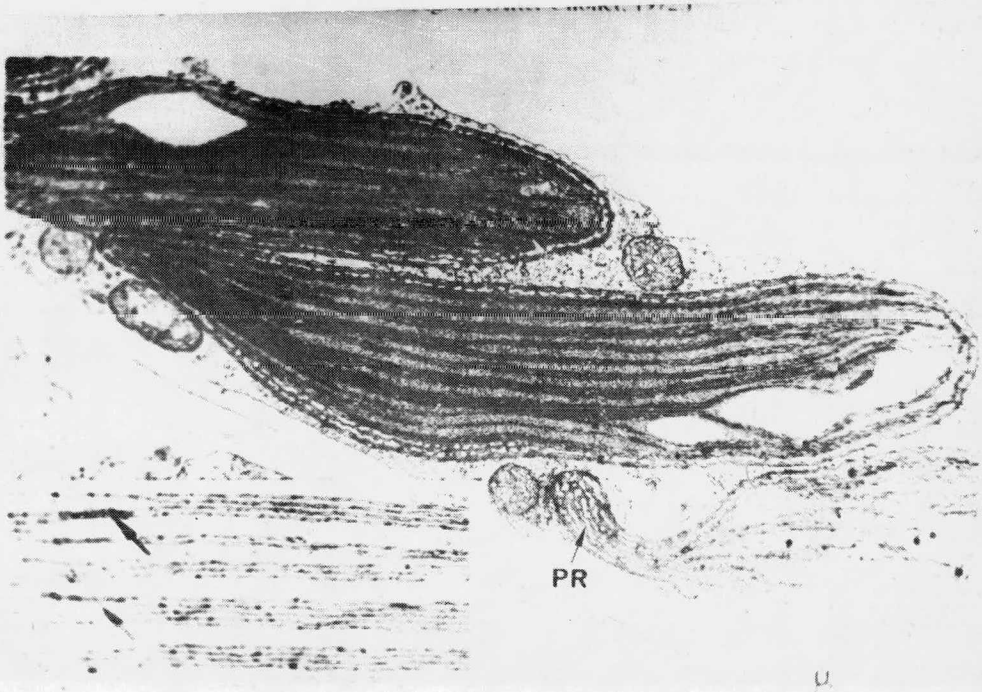
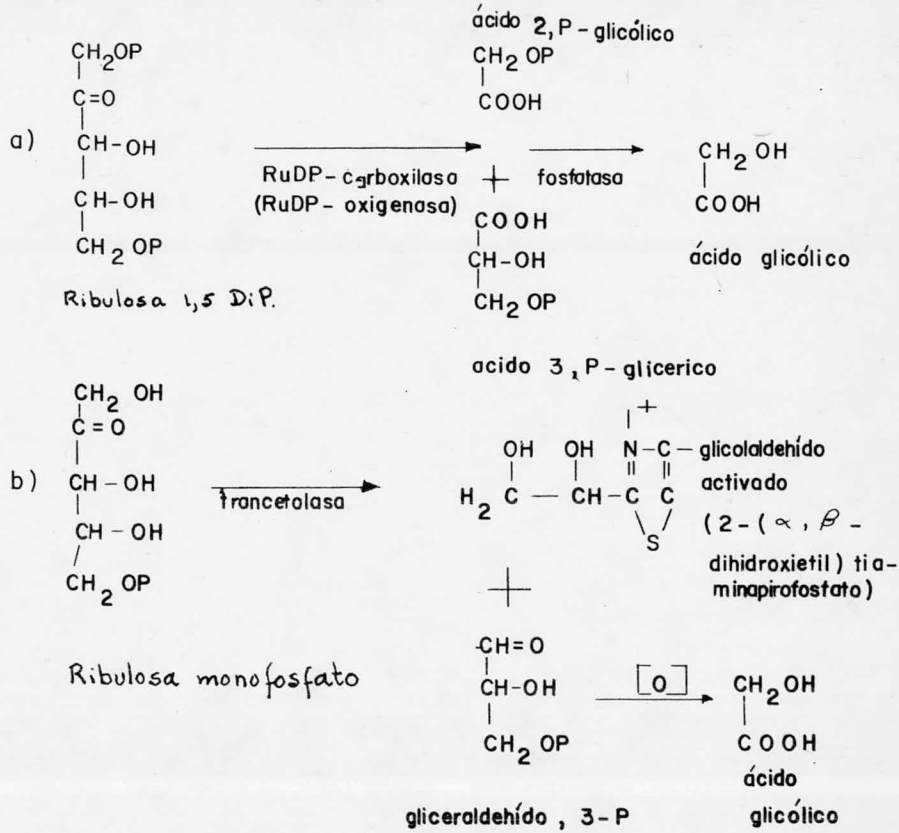


Fig. (21) Retículo periférico (PR) en el cloroplasto de una célula de la vaina vascular (162)

CAPITULO 2

F O T O R R E S P I R A C I O N

La Foto-respiración es un proceso que se define como la oxidación de los intermediarios de la fotosíntesis, con la producción de CO_2, que es estimulada por la luz. Este proceso ocurre principalmente en plantas superiores donde el CO_2 es fijado a través del metabolismo C-3 de la Fotosíntesis (en el Ciclo de Calvin). Bassham (163) encontró que uno de los primeros productos de la Fotosíntesis es el fosfoglicolato, además del ácido 3-fosfoglicérico (A-3PG). Al año siguiente Zelitch (145) detectó la oxidación rápida del fosfoglicolato a glioxilato por la glioxilato -oxidasa, a la vez que hubo un aumento en la Foto-respiración y en sus experimentos posteriores con hojas de tabaco , usó alfa-hidroxipiridín-metasulfonato como inhibidor del metabolismo del glicolato, el cual se acumula y ésto produce un aumento neto en la Fotosíntesis. Durante la biosíntesis del glicolato Fig. (22) , la RuDP se carboxila en el cloroplasto - por la acción de la RuDP-carboxilasa, dando como productos: A-3PG y glicolato. El glicolato pasa al peroxisoma contiguo al cloroplasto Fig. (23) y se oxida por la glicolato-oxidasa a glioxilato y peróxido de hidrógeno - Fig. (24), el glioxilato se amina por la transaminasa del peroxisoma a - glicina , la cual pasa a la mitocondria Figs. (23 y 24)en donde se transforma en serina y CO_2 por la serina-hidroximetil-transferasa Fig. (24),el CO_2 liberado en la reacción anterior, es el responsable de la mayor parte del CO_2 producido en la Foto-respiración (165). La serina se transporta al peroxisoma y forma glicerato, que es fosforilado para intervenir en el Ciclo de Calvin, cerrándose con ello, el Ciclo de la Foto-respiración.



Biosíntésis del ácido glicólico en especies C_3

FACULTA DE QUIMICA		U N A M	
Q. F. B.	LETICIA CORTES RIOS		
TESIS PROFESIONAL		1977	FIG 22

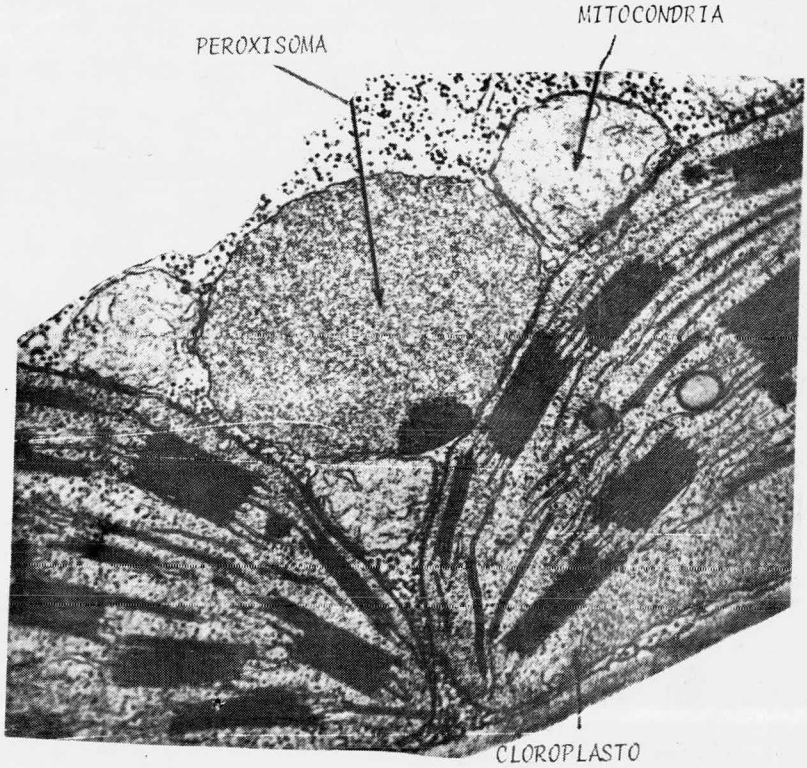
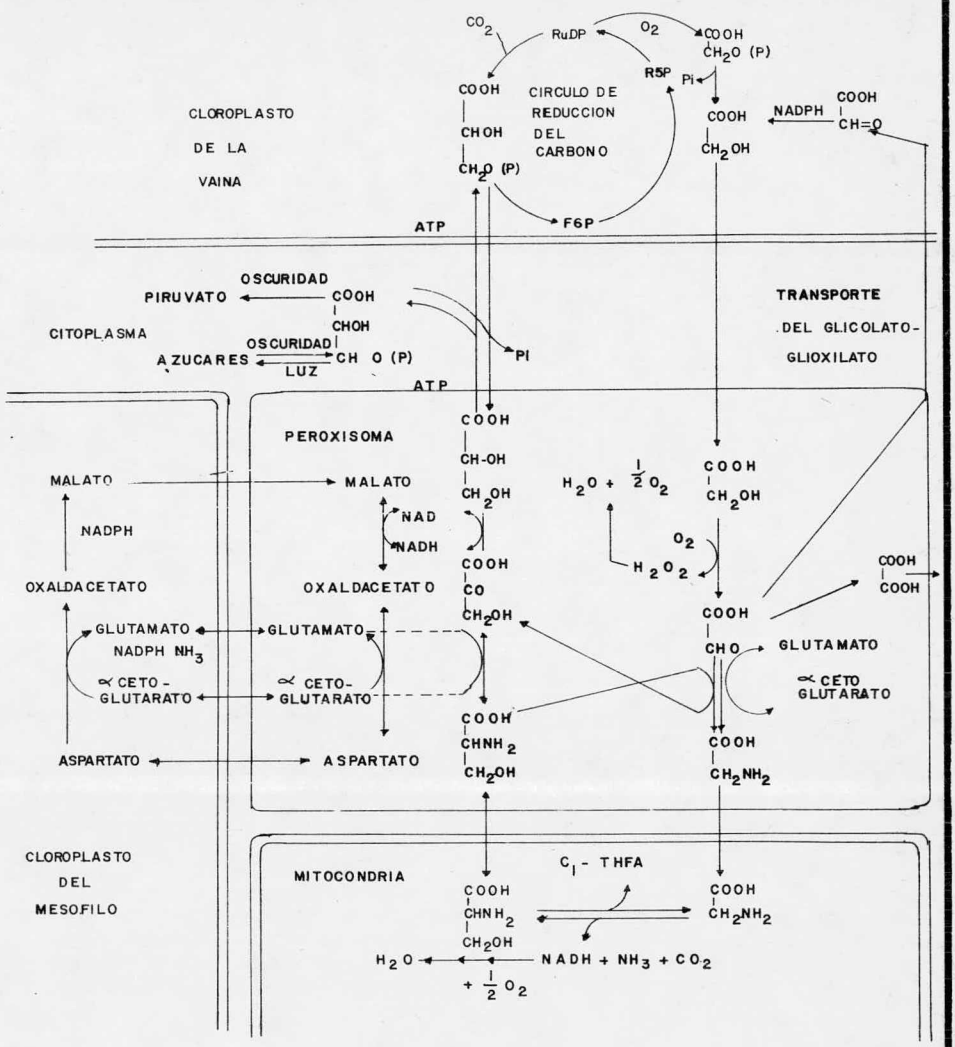


Fig. (23) Microsotografía electrónica de la sección de una hoja que muestra el peroxisoma adyacente a la mitocondria y a los cloroplastos. (145).



Vía del glicolato y glicerato para la formación de glicina y serina.

FACULTAD DE QUIMICA		U N A M
Q.F.B.	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL	1977	FIG 24

Para medir la Foto-respiración se utilizan campanas cerradas y se mide la concentración de CO_2 liberado, que generalmente es de 40 a 50 ppCO_2 en el punto de compensación, es decir el punto en el cual el proceso de la Respiración y Fotosíntesis de la planta , se equilibran mutuamente, el CO_2 expulsado en la respiración es el necesario para que la planta fotosintetice con tal intensidad que exhale O_2 suficiente para respirar. En las plantas con metabolismo C-4 no se detecta punto de compensación y el metabolismo del glicolato está inhibido, lo que produce una duplicación neta de la fotosíntesis, por la disminución de la concentración de oxígeno atmosférico de 21% a 2% , que incrementa hasta en un 45% la captación de CO_2 (164).

Bjorkman (166) postuló que la foto-respiración actúa como un mecanismo de protección contra la fotodestrucción en periodos de sequía y alta intensidad de luz. Sin embargo la mayoría de los investigadores, piensan que la foto-respiración es un proceso metabólico de desperdicio para la Fotosíntesis, ya que sin Foto-respiración, aumenta la producción de carbohidratos en las plantas C-3.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LAS CELULAS DEL MESOFILO Y DE LA VAINA VASCULAR EN PLANTAS C-4.

Las plantas C-4 presentan una anatomía peculiar en sus hojas, donde se observa, en el maíz, la presencia de una vaina de tejido vascular rodeada por una capa concéntrica de largas células con paredes rígidas - en el exterior rodeada por uno ó mas anillos de las células del mesofilo Figs. 25a y 25c (146). Las células de la vaina contienen cloroplastos sin granos (agranales) con residuos de almidón Fig. (27b) y las células del mesofilo contienen numerosos cloroplastos con grana normal y pared mas delgadaFig. 18 pag 63 . Sin embargo se ha encontrado en otras plantas tropicales, grana variable en los cloroplastos de la vaina. Las células de la vaina que no presentan dimorfismo estructural en los cloroplastos, lo presentan en el número y tamaño de las mitocondrias, así como, más crestas comparativamente con las crestas de las mitocondrias del mesofilo y numerosos microcuerpos. Otra característica estructural de las plantas C-4 es la presencia de retículo periférico Figs. 21a y 21 b (pags. 68 y 69, que se observa como prolongación de la membrana interna del cloroplasto en etioplastos y mejor desarrollado , generalmente , en el tejido mesofílico.

La arquitectura de las hojas de las plantas C-4 , permite la difusión gaseosa de las células del mesofilo hacia la pared de las células de la vaina vascular. El acceso de CO_2 está parcialmente impedido por la presencia de una capa de suberina en la pared de estas células. También se observan en las hojas de las plantas C-4 células parenquimatosas grandes, con paredes gruesas y cloroplastos de gran tamaño.

Todas las características antes citadas, constituyen la anatomía tipo Kranz descrita por Haberland, mencionada por Laetsch (167) Fig. 25a,c y varios investigadores la han usado como criterio para reconocer la presencia del metabolismo C-4. (168)

Las características de la anatomía Kranz se pueden resumir de la siguiente manera:

1).- Existencia de un cilindro sólido del tejido vascular
2).- Gran tamaño de las células de la vaina con paredes gruesas, sin espacios aéreos entre las células.
3).- Hojas formadas por granos de almidón que constituyen la mitad del volumen de la hoja y proporcionan una área superficial pequeña.
4).- Células de tejido mesofilo en contacto con células de espacios aéreos.
5).- Velocidad de transpiración muy baja (casi cero)

La eficiencia de un sistema evolucionado en la fijación de CO_2 en la periferia de estos cilindros, ha dado como resultado una rápida acumulación de materia seca y baja pérdida de agua en plantas C-4. (169)

A las células de la vaina vascular de las hojas, se les ha llamado "endodermo" ó células almacenadoras de almidón . Este tejido tiene características parecidas al endodermo de la raíz de algunos tallos.

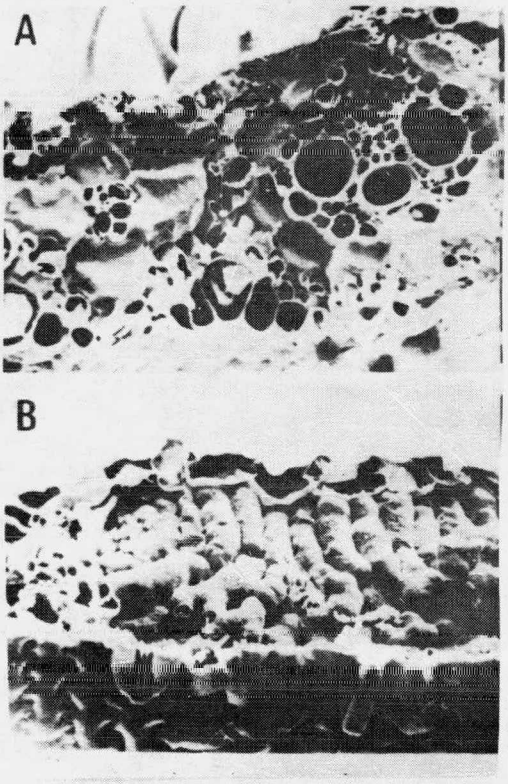


Fig. 25 (A). Microfotografía electrónica de hojas seccionadas de una planta C-4 (Panicum maximun X 163). (anatomía tipo Kranz).

Fig. 25 (B) Microfotografía electrónica de hojas seccionadas de una planta C-3 (Panicum bisulcatum).

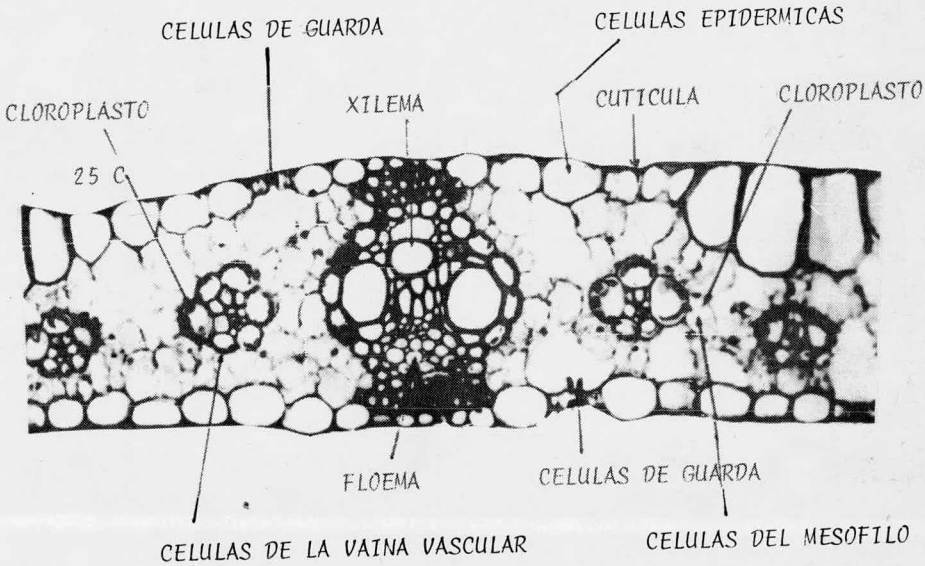


Fig. 25 (C). Sección transversal de una hoja de maíz donde se muestran los cloroplastos del tejido mesofílico y de la vaina vascular. Planta C-4 .Anatomía tipo Kranz

En las plantas C-3 se observa un parénquima en empalizada con células prismáticas agrupadas en filas apretadas y un parénquima-esponjoso de células redondeadas con espacios intercelulares y cloroplastos clásicos en un sistema membranoso diferenciado en grana e intergrana.- Fig. 25 (B)pag. 78 . Estas características varían según el régimen hídrico durante el proceso de diferenciación y según la cantidad de luz bajo la cual se desarrolla la planta. (4).

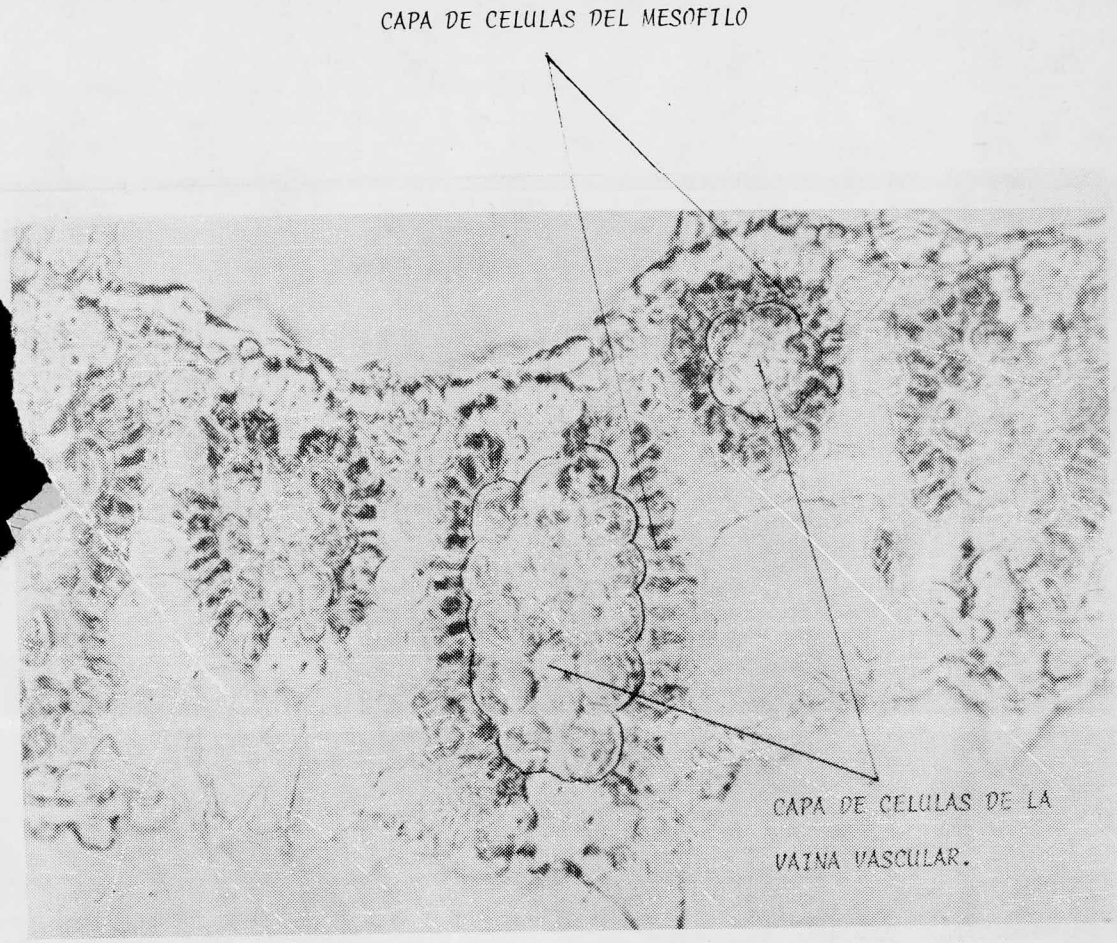


Fig. (26) Corte transversal de la hoja de una monocotiledónea C-4 (Trachypogon plumosus) (4).

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
QUIMICA

DISTRIBUCION DE ORGANELOS Y SU RELACION CELULAR EN PLANTAS C-4.

Un corte transversal de una hoja de Trachypogon plumosus monocotiledonea C-4, está representada en la Fig. (26) (4). En ella se observan más de una capa del tejido mesofílico. Esto es importante para la difusión de gases ó transporte de metabolitos. Las células de la vaina vascular son más grandes que las células del mesofilo; hay alrededor de cinco células del mesofilo por una de la vaina vascular. Estas últimas tienen un contorno regular y forman un anillo completamente cerrado al rededor del tejido vascular. Una vista global de las células del mesofilo y de la vaina, están ilustradas en la Fig. (27 a) en donde se observan espacios de aire en las células del mesofilo y en la Fig. (27 b) un cloroplasto de las células de la vaina vascular de plantas C-4.

En la Fig. (28) se observa la presencia de plasmodesmos (p) que son filamentos que ponen en contacto los protoplastos de dos células contiguas. Los plasmodesmos se encuentran empacados y miden alrededor de 325 Å a 650 Å. La capa suberizada parece inhibir el paso de colorantes a la vaina vascular, pero no se sabe si sirve como cutícula inferior ó como barrera de agua. Su este fuera el caso, el plasmodemo podría ser sólo una ruta de transporte entre las dos capas de células. También es interesante conocer si esta capa suberizada es una barrera para la difusión de gases, pues no se encuentra en dicotiledóneas C-4.

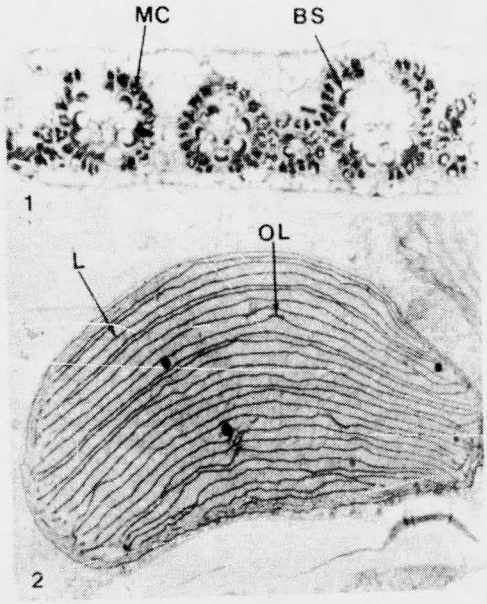


Fig. (27a) Vista global de las células del mesofilo (MC) y de la vaina vascular (BS) en una sección - transversal de la hoja de caña de azúcar.

Fig. (27b) Cloroplasto de la vaina vascular de caña de azúcar. Las lamelas se extienden a través del estroma (171).

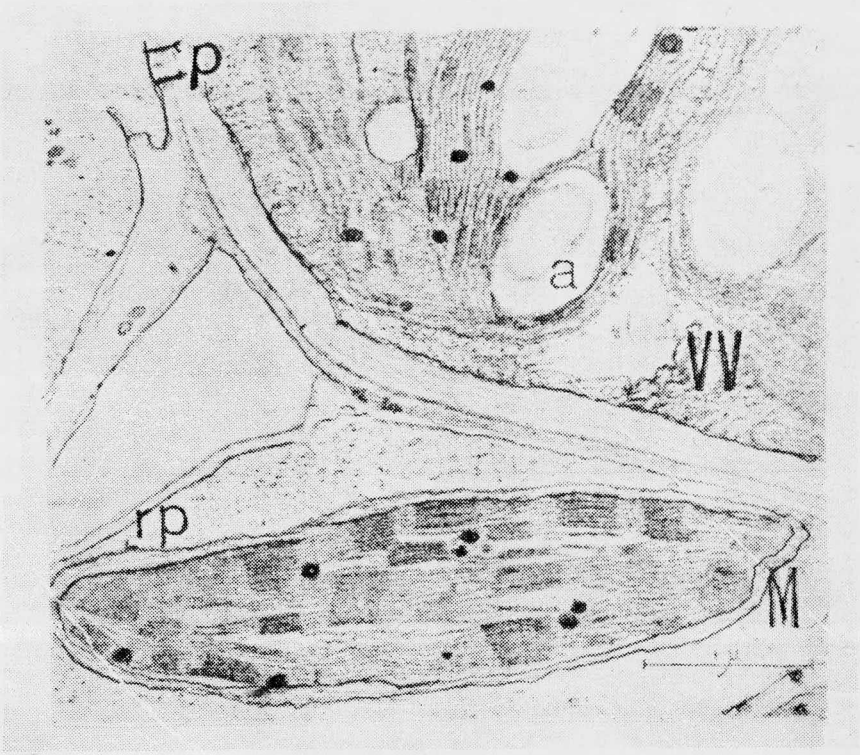


Fig. (28) Aspecto de la vaina vascular y células del mesofilo radial de una hoja de Paspalum repens , en donde se muestra un plasmodesmo (P). almidón (a); retículo periférico (rp); vaina vascular; (VV); mesofilo (M) (4).

En la Fig. (29) se observan cloroplastos de la vaina-vascular (29a) y del mesofilo (29b) de caña de azúcar, éstos últimos son-mas numerosos, pero los de la vaina son de mayor tamaño por lo que el volumen total es igual. (171)

Se encuentra un mayor número de microcuerpos y de mitocondrias en las células de la vaina. Ambos organelos están involucrados en la Foto-respiración, la que se localiza físicamente en las células de la vaina vascular de las plantas C-4. Esto explica la dificultad de detectar Foto-respiración en las plantas C-4, porque la mayoría del CO_2 liberado en la vaina vascular por Foto-respiración, es reasimilado en las células del mesofilo. (4).

CLOROPLASTOS DE LA VAINA VASCULAR.

(a)

CLOROPLASTOS DEL MESOFILO.

(b)

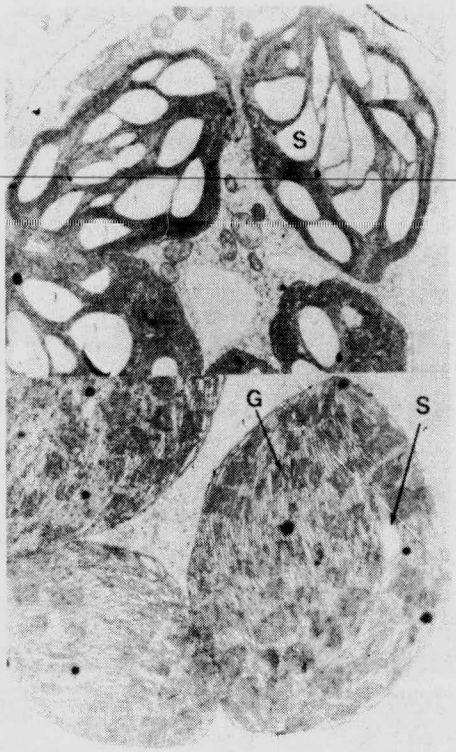


Fig. (29a) Cloroplasto de la vaina vascular después de 7 horas de luz. Obsérvense los grandes acúmulos de almidón en el estroma X 7 800 .

Fig. (29b) Cloroplstos del mesofilo después de 7 horas de luz. Obsérvese el gran número de tilacoides en cada grano y mínimas cantidades de almidón almacenado X 16 000 (171).

CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LOS CLOROPLASTOS DE LAS PLANTAS C-4.

En 1965 Kortschak, Harrt y Burr (172) reportaron que la caña de azúcar no producía A-3PG como primer producto de la Fotosíntesis, sino que se formaba malato y aspartato (ácidos dicarboxílicos de cuatro carbones) en presencia de luz. En los siguientes dos años los australianos, Hatch y Slack, trabajando en el laboratorio de investigación de una refinería azucarera, reportaron los mismos resultados cuando marcaron $^{14}CO_2$ en hojas de caña de azúcar en luz, y obtuvieron como primeros productos marcados, malato y aspartato. Sus observaciones han sido atendidas con considerable detalle y esta nueva vía es estudiada en la actualidad con mucha atención.

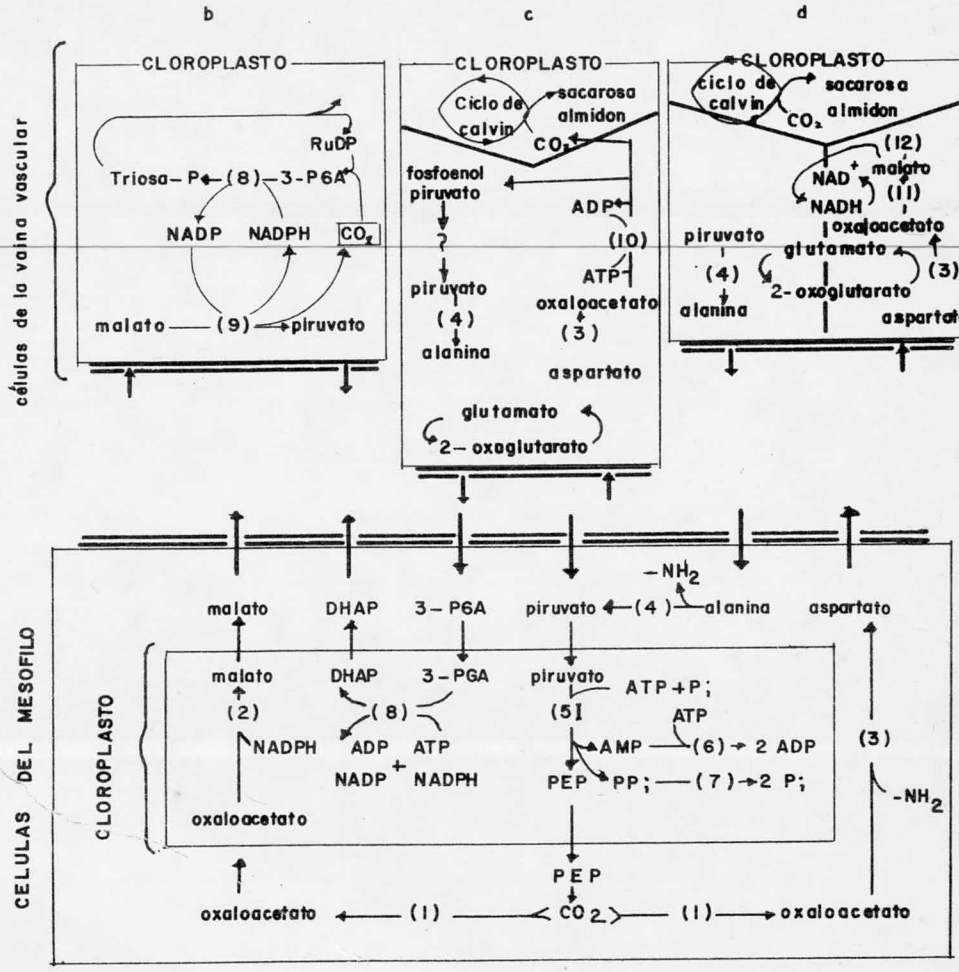
Además de la caña de azúcar otras plantas como el sorgo, maíz y algunas mono y dicotiledóneas, producen los mismos productos metabólicos y son conocidos por su alta capacidad productiva. A este tipo de plantas se les denomina plantas con metabolismo C-4 ó simplemente plantas C-4. Actualmente se define la vía C-4 como una secuencia de reacciones en las cuales, el CO_2 es transferido del carboxil 4 de los ácidos de cuatro carbones a los sustratos iniciales de las reacciones del Ciclo de Calvin (174). A diferencia de este Ciclo, en donde la carboxilación y reducción del carbono es restringido al cloroplasto , la vía C-4 incluye la operación de reacciones en el citoplasma, mitocondria y cloroplasto, así como el transporte de metabolitos intermediarios, entre los distintos compartimientos intracelulares.

En las plantas C-4, la carboxilación se inicia con la entrada del CO_2 atmosférico a través de la abertura de los estomas a las célu-

las del tejido mesofílico, y reacciona con el fosfoenolpiruvato (PEP) produciéndose ácido oxaloacético (AOA). La enzima que cataliza esta reacción es la PEP-carboxilasa que tiene una alta afinidad por el CO_2 y baja afinidad por el oxígeno; es decir que no hay competencia entre el oxígeno y el CO_2 por esta enzima (fase de carboxilación). El ácido oxaloacético (AOA) es rapidamente transformado en málico por la NADP-malato deshidrogenasa Fig. (30b) en algunas especies en aspártico Fig. (30c) y (30d); posteriormente el malato ó el aspartato es transportado del citoplasma de las células del mesofilo a las de la vaina vascular. (176)

PROPIEDADES GENERALES DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO-CARBOXILASA.

Antes de continuar describiendo la vía C-4 revisaremos algunas características de la enzima que interviene en la fase de descarboxilación de las reacciones oscuras de la Fotosíntesis C-4. La PEP-carboxilasa, presenta sensibilidad al AOA con un 50% de inhibición a 25 mM, mientras que el aspartato y el piruvato, sólo tienen poco efecto sobre ella. También el A-3PG la inhibe y la G-6P; F-6P y R5P la activan. Se ha comprobado que es una proteina alostérica , porque presenta una curva sigmoidal en su cinética. En Atriplex spongiosa; A. hastata y Sedum pueltrum, presenta un 80% ó 90% de inhibición en presencia de 5 ó 10 mM de compuestos bisulfíticos. Sin embargo su actividad no es afectada por altas concentraciones de oxígeno, pero muestra inhibición con 100 ó 200 mM de NaCl. Estos resultados se han encontrado en el mesofilo, ya que en otras partes de la planta la enzima casi no se afecta por los aniones (176).



Esquema de las vías metabólicas de los tres tipos, en las distintas especies C_4.

FACULTAD DE QUIMICA		UNAM
Q.F.B	LETICIA CORTES RIOS	
TESIS PROFESIONAL 1977		FIG 30

Las plantas C-3 y C-4 presentan diferencias en las propiedades cinéticas de la PEP-carboxilasa, por ejemplo en C-4 la Km del PEP-es de 0.59 y en C-3 de 0.1 mM, la Km en micromoles min^{-1} mg^{-1} clor de PEP + Mg es de 0.5 en C-4 y de 0.097 en C-3. También en el metabolismo CAM y otros organismos autótrofos, se presentan valores distintos en los parámetros anteriores. En general la enzima utiliza derivados de adenín nucleótidos mas-eficientemente que otros nucleótidos y requiere de un ión metálico divalente(Mg^{++}) para su actividad (177).

DIVISION DE LAS PLANTAS C-4 DE ACUERDO A SUS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.

En la fase de carboxilación todas las plantas C-4 lle--van a cabo el mismo mecanismo bioquímico en las células del mesofilo, pero-en la fase de descarboxilación, se han encontrado hasta la fecha, tres mecanismos metabólicos distintos, de aquí se propuso (175 y 178) que las espe--cies C-4 se podía clasificar en tres grupos distintos de acuerdo con los niveles elevados de una enzima específica. Estos son los siguientes:

TIPO	ENZIMA ESPECIFICA	OTRAS ENZIMAS QUE INTERVIENEN
I	Enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP)	Malato deshidrogenasa y todas las enzi--mas del Ciclo de Calvin.
II	Fosfoenol-piruvato carboxiquinasa (PCK)	Piruvato-fosfatoquinasa; AMP-quinasa y todas las enzimas del Ciclo de Calvin.
III	Enzima málica dependiente de NAD (EM-NAD).	Todas las enzimas del Ciclo de Calvin.

En el grupo I (tipo I) la enzima que interviene como descarboxilasa, es la enzima málica dependiente de NADP (EM-NADP) Fig. 30b pag.-89 y se encuentra localizada en los cloroplastos de la vaina vascular de la - plantas C-4 (179). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

$$\text{MALATO} + \text{NADP} \longrightarrow \text{NADPH} + \text{PIRUVATO} + CO_2$$

Una parte del piruvato regresa a los cloroplastos del mesofilo donde se transforma en PEP, por la acción de la piruvato-fosfodiquinasa, el resto del piruvato se queda en la vaina vascular y el otro producto -- que es el CO_2, entra al Ciclo de Calvin (179).

En el segundo grupo de especies C-4, las plantas presen-- tan baja o nula actividad de la enzima málica dependiente de NADP. En éstas,- el AOA es transformado en aspartato en el cloroplasto del mesofilo y poste--- riormente acarreado a las células de la vaina vascular, donde es transaminado, para regenerar AOA Fig. (30c)(pag. 89). El AOA resultante es descarboxilado - por la PEP-carboxiquinasa, para dar como productos PEP y CO_2 . El CO_2 entra - en el Ciclo de Calvin en los cloroplastos de la vaina, mientras que el PEP es transformado en alanina en el citoplasma por la alanina-aminotransferasa. Posteriormente este metabolito regresa al mesofilo donde es convertido a PEP por otra alanina aminotransferasa de las células del mesofilo, pasando, desde luego por piruvato. Fig. 30c (pag, 89). (175).

La elevada actividad de la EM-NADP está asociada con la e- levada actividad de NADP-malato deshidrogenasa, mientras que aquellas especies distinguidas por su alta actividad, de cualquiera de las otras dos carboxila-- sas, contienen invariablemente alta actividad de aspartato aminotransferasa y- alanina aminotransferasa.

El grupo ó tipo III de las plantas C-4 (Atriplex spongiosa), contienen bajos niveles de EM-NADP y PCK. En este grupo se propone que el aspartato es transportado a la vaina vascular y transaminado a AOA-el cual es reducido a malato y descarboxilado por una enzima específica dependiente de NAD, localizada en la mitocondria (178) Fig. (30d) pag. 89. El CO_2 resultante es fijado por la RuDP-carboxilasa, para entrar al Ciclo de Calvin, el otro producto es el piruvato que es transaminado a alanina. En estas condiciones regresa a las células del mesofilo donde es nuevamente - transaminado y fosforilado a PEP. (176). En este grupo la enzima málica dependiente de NAD, junto con la mayoría de las isoenzimas de la aspartato-- aminotransferasa y NAD-malato deshidrogenasa, están localizadas en la mitocondria de las células de la vaina y se propone (176) la siguiente vía para la descarboxilación de los ácidos C-4.

$$\text{ASPARTATO} \longrightarrow \text{AOA} \longrightarrow \text{MALATO} \longrightarrow CO_2 + \text{PIRUVATO}$$

Para la máxima actividad de descarboxilación, estas partículas requieren la presencia de aspartato, alfa-cetoglutarato y fosfato,- así como malato y en ausencia de estos compuestos, la actividad se reduce a 0.3 y 0.8 micromoles min^{-1} mg^{-1} Clor . La velocidad para la descarboxilación de los ácidos C-4 es mucho más grande que la actividad respiratoria en estas partículas (179).

Se sugiere la siguiente secuencia de reacciones para la descarboxilación del aspartato en la mitocondria:

1) ASPARTATO + ALFA-CETOGLUTARATO $\xrightarrow{\text{aspartato aminotransferasa}}$ AOA + GLUTAMATO

2) AOA + NADH $\xrightarrow{\text{deshidrogenasa málica}}$ MALATO + NAD^+

3) MALATO + NAD^+ $\xrightarrow{\text{enzima málica}}$ CO_2 + PIRUVATO + NADH

En la Tabla IV se resumen algunas características distintivas entre las plantas C-3 y C-4 (12).

CARACTERISTICAS	PLANTAS C-4	PLANTAS C-3
Enzima inicial en la fijación de CO_2.	PEP-carboxilasa	RuDP-carboxilasa
Anatomía Kranz	Presente	Ausente
Concentración de CO_2	10 ppm	30-150 ppm
Luz solar	Saturación	40 kilolux
Temperatura óptima	30-35°C	15 a 20°C
Velocidad fotosintética	48-80	15-35
Fotorrespiración	Muy baja	Activa
Radio 13C/12C	-9 a -18	-23 a -36

TABLA IV ALGUNAS CARACTERISTICAS DISTINTIVAS DE PLANTAS C-4 y C-3. (12)

CAPITULO 3

TRANSPORTE DE ANIONES C-4

I CONCEPTO SOBRE TRANSPORTE DE IONES.

II COMPARTAMENTALIZACION Y RADIOTRAZADORES CINETICOS.

III TRANSPORTE INTERCELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4.

IV BALANCE DE CARGA Y GRUPOS AMINO DURANTE EL TRANSPORTE INTRACELULAR C-4.

V TRANSPORTE INTRACELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4.

VI TRANSPORTE DE METABOLITOS EN RELACION A LA ACTIVIDAD FOTOQUIMICA DE LOS CLOROPLASTOS.

VII MECANISMO DEL TRANSPORTE DE ANIONES EN LOS CLOROPLASTOS CON METABOLISMO C-4.

VIII EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DEL TRANSPORTE DE ANIONES EN PLANTAS C-3.

TRANSPORTE DE ANIONES EN LA FOTOSINTESIS C-4

I CONCEPTO SOBRE TRANSPORTE DE IONES.

Revisaremos brevemente el concepto de transporte de iones, que involucra: Una reacción de intercambio que muestra selectividad y que es dependiente del metabolismo para la cual se ha propuesto el siguiente modelo:

$$R + M_{ex} \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} MR$$

$$MR \underset{K_4}{\overset{K_3}{\rightleftharpoons}} R' + M_{in}$$

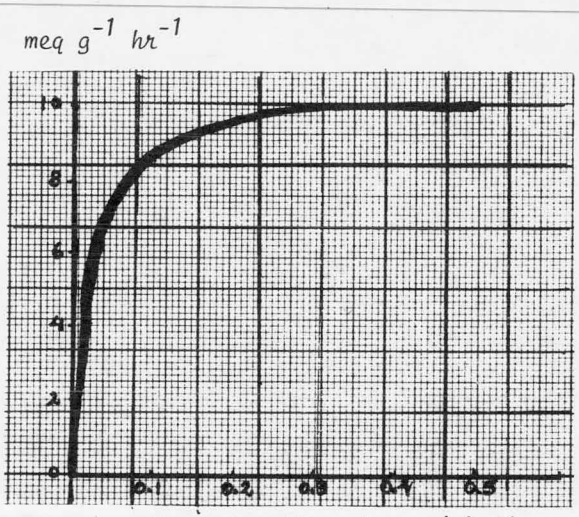
donde R y R' representan diferentes estados químicos del acarreador de la membrana; M es el ión; MR es el complejo ión-acarreador y K_1, K_2, K_3 y K_4, son constantes de velocidad. Este modelo es análogo al de la cinética enzimática del tipo Michaelis-Menten; para obtener la velocidad, se utiliza la fórmula:

$$v = \frac{V\ (s)}{Km + (s)}$$

donde V = velocidad máxima y (s) es la concentración del ión fuera de la membrana y Km es la constante de Michaelis, por lo que se asume que K_4 es-

insignificante, ya que el transporte de iones , provoca una reacción reversible.

Para probar la validez de esta hipótesis se determinó la captación del ión a diferentes concentraciones externas, observándose una curva hiperbólica, como la de la gráfica 1. (Epstein y Hagen) (183)

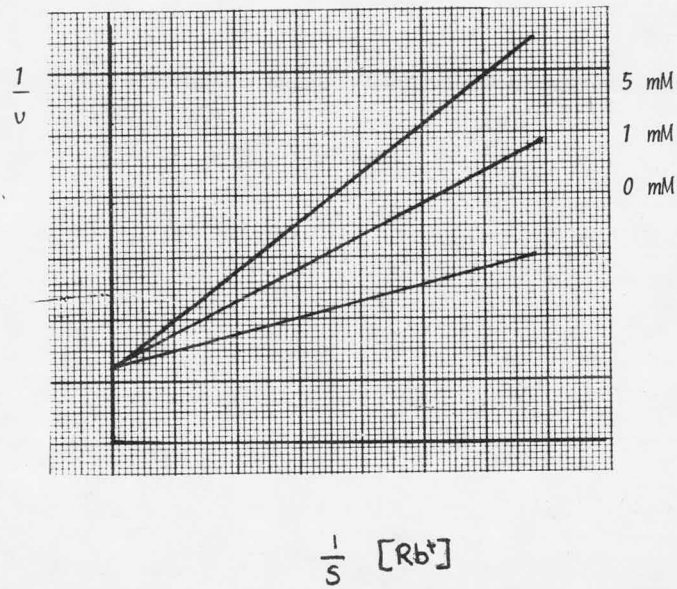


Gráfica 1 : Velocidad de captación del ión vs. concentración ex.

Teoricamente los sitios receptores del acarreador (ó enzima), son saturados con el ión (ó sustrato) al incrementarse la concentración externa del mismo. Más aún se obtiene una linea recta en la gráfica de Lineweaver-Burk, que grafica las dobles inversas de la velocidad del sustrato, obteniéndose la inversa de la V max en el intercepto, como se ob

serva en la gráfica 2.

Captación del ión K^+



Gráfica 2 Gráfica de Lineweaver-Burk en donde se muestra inhibición competitiva, (s) corresponde a las concentraciones externas de un ión ; el 1 , 5 y 0 se refieren a las concentraciones de un ión compitiendo por su sustrato. Los valores son hipotéticos. En la inhibición no-competitiva , las lineas caen en el punto de intersección medio, indicando que hay más de un sitio reactivo.

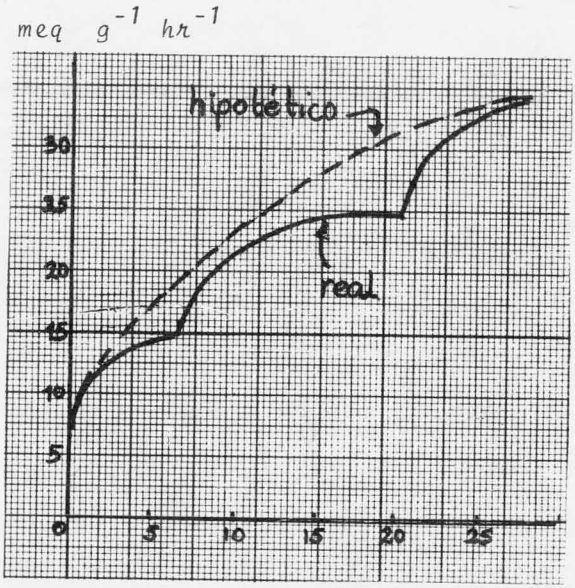
Según la teoría de la cinética enzimática, cuando un ión como el Rb^+, compite especificamente por un sitio del acarreador de K^+, se obtienen lineas rectas con intercepción en el mismo punto, del cual se calcula 1 / V max (Gráfica 2). Los iones que no compiten por este sitio es-

pecífico, por ejemplo Li^+ en la captación de Rb^+, puede inhibir la captación de Rb^+ , pero no interceptar en el mismo punto, dando una inhibición no competitiva. En experimentos posteiores se encontraron evidencias sobre sitios específicos para la captación de aniones, particularmente en eritrocitos, bacterias y en otros sitios de captación para sustancias orgánicas como por ejemplo: Azúcares y aminoácidos, cuyos posibles acarreadores muestran especificidad por conformación molecular y estereisomerismo. Se puede concluir que los estudios cinéticos son un arma útil para el estudio de los acarreadores en las membranas

El modelo original de un acarreador, fue concebido originalmente en una forma simple, los resultados experimentales de Epstein (183b) en la curva de captación de iones, mostraron más de una serie de hipérbolas rectangulares como se observa en la gráfica 3 pag. 100. En ella se muestran las velocidades de captación con inflexiones múltiples (líneas continuas). Estas Observaciones le permitieron a Epstein postular un mecanismo dual de captación, según la concentración externa del ión usada , abajo de 0.5 mM el sitio de transporte está localizado en el plasmalema, mientras que a altas concentraciones, se encuentra en el tonoplasto (184). Laties (184) indica que dos acarreadores están implícitos y podrían estar operando en serie. Nissen (185) concluye que las inflexiones múltiples en la curva de captación de iones en serie o en paralelo, puede ser consistente con un modelo de un acarreador simple multifásico en cada membrana del plasmalema y tonoplasto.

En vista de las interpretaciones contradictorias de los datos cinéticos basados en la hipótesis del acarreador , no es posible tener hasta el momento un modelo correcto.

GRAFICA 3



Velocidad de captación del ión K^+

Concentración externa mM. $[Rb^+]$

Gráfica 3 .- Representación de la isoterma de absorción con múltiples inflexiones (linea continua). La linea discontinua muestra una parábola, por lo que todas las isotermas muestran una curva de adsorción , según la ecuación de Freundlich.

Recientemente han surgido conceptos significativos,-- que han ayudado a aclarar esto como:

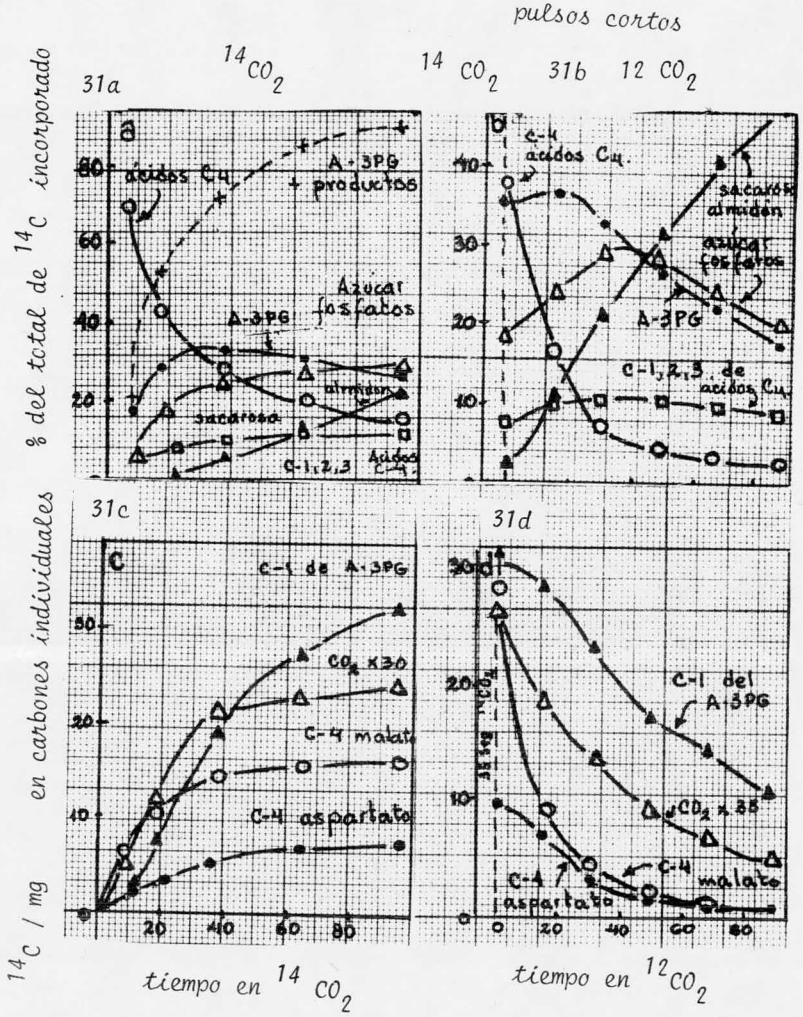
a).- La teoría de selectividad de iones determinada por la fuerza - del campo eléctrico y la hidratación del ión. (186,187).

b).- La teoría de la cooperatividad positiva y negativa, tomando como modelo la cinética enzimática. (188).

II COMPARTAMENTALIZACION Y RADIOTRAZADORES CINETICOS EN PLANTAS C-4.

La cinética de experimentos con radiotrazadores, ha -- proporcionado evidencias para la operación de la vía C-4. (189). Hatch y Slack (140), proveen un arma experimental indispensable, para el entendi-- miento de los procesos que la componen. Cuando se equilibra la vía C-4 --- con aire normal y $^{14}CO_2$, se encuentra que los ácidos dicarboxílicos de 4 carbones: Oxaloacetato, malato y aspartato, aparecen como productos iniciales y como intermediarios primarios de la vía C-4. Los ácidos C-4 marcados muestran una curva de incorporación cóncava hacia abajo, la cual es posi-- ble extrapolarla a un 100% con ^{14}C, incorporado a tiempo cero. Fig. (31a). Por otro lado las curvas para el A-3PG y sus proudctos, muestran una curva de incorporación convexa hacia arriba, que es posible extrapolar a cero, - con el valor de ^{14}C incorporado a tiempo cero. La incorporación de la ra-- dioactividad en el ácido 3-fosfoglicérico (A-3PG) y sus productos, mues--- tran una fase logarítmica, mientras que el marcaje de los ácidos C-4 es lineal. Se han observado cinéticas similares en experimentos con pulsos cortos. (Fig. 31b).

Cuando se marcan los ácidos C-4 y el A-3PG en un átomo



Figs. 31a-31d. Análisis de radiotrazadores cinéticos en el metabolismo C-4 de Z, mays . Hatch 1971.

de carbono específico, se observa que el carboxilo del C-4, de los ácidos C-4, mantiene una actividad específica constante, en un período de tiempo menor que el carboxilo C-1 del A-3PG . Fig. (31c)pag. 102 . En experimentos de pulsos cortos con los ácidos C-4, se pierde rapidamente la marca - en el carbono 4, comparada con el carbono 1 del A-3PG, el cual muestra una fase logarítmica inicial pronunciada (Fig. 31d pag. 102). Las Figs. -- 31c y 31d, muestran que existe un almacén libre de intermediarios marca-- dos, con cinéticas de marcaje típicas , para intermediarios marcados en - el carbono 4 de los ácidos C-4 y C-1 del A-3PG; de estos resultados se deduce la siguiente secuencia metabólica de la vía C-4.

CO_2 externo -----→ C-4 de ácidos C-4 ---------→ almacén de intermediarios - de CO_2 -----→ C-1 de A-3PG ----------→ productos.

La medida directa del almacén de los intermediarios - de CO_2 por análisis de radiotrazadores cinéticos (Figs. 31c y 31d), muestran que existen cantidades mucho mayores que las observadas por simple - difusión de CO_2 del aire y que sólo se producen en la luz (Hatch,1971) - (141).

La anterior secuencia de reacciones implica que la -- vía C-4 es una serie de reacciones de carboxilación y se define el proceso en términos cinéticos. Las evidencias directas con radiotrazadores de la fijación del CO_2 en el Ciclo de Calvin, son escasas (142, 143). Las observaciones anteriores son apoyadas por los datos de fijación de CO_2 a -- través del tiempo, para diferentes especies C-4, mostrando que las curvas para los ácidos dicarboxílicos C-4 y A-3PG, más los productos, extrapolan aproximadamente a 100% y 0% respectivamente como se grafica en la Fig.31a

Se ha sugerido que más del 15% del carbón fijado por Digitaria sanguinalis, es incorporado directamente en el Ciclo de Calvin. (144,145), pero este dato hace falta demostrarlo por análisis cinéticos.- Sin embargo a 10 000 ppm de CO_2 , se han obtenido evidencias de carboxilación directa de la RuDP en Pennisetum purpúreum (146). Se han hecho pocas observaciones de la incorporación de $^{14}CO_2$ directamente al A-3PG en las plantas C-3 por análisis de trazadores radioactivos, en las cuales los ácidos C-4, comprenden una de las variables, pero existe muy baja proporción de los productos iniciales y muestran una respuesta cinética muy diferente de la descrita en la Fig. 31 pag. 102 (147).

Los cambios del tamaño del almacén de intermediarios durante el susministro de CO_2 y de las transiciones luz-oscuridad, también confirman la secuencia metabólica ilustrada anteriormente. En las hojas de Zea mays (planta C-4), los ácidos dicarboxílicos , presentan una fase logarítmica antes que los almacenes de A-3PG y RuDP respondan a la transferencia a CO_2 puro, seguido por la Fotosíntesis en el estado de equilibrio (148). Estos experimentos implican una fuente interna sustancial de CO_2 para el Ciclo de Calvin y muestran la relación precursor-producto, entre el aspartato y PEP. Cuando las hojas son mantenidas en CO_2 libre de aire, no se observan cambios sustanciales en los almacenes de A-3PG y RuDP, comparados con los de las plantas C-3 (148). Sin embargo en estos experimentos no puede distinguirse la fuente de CO_2 fijada, si viene del Ciclo de Calvin ó del almacén de los ácidos C-4.

Desde el punto de vista bioquímico y fisiológico, la vía C-4 de los ácidos dicarboxílicos, es más completa que la vía de reducción de las pentosas fosfato ó Ciclo de Calvin.

Una de las características del transporte en la vía C-4, es el intercambio de intermediarios fotosintéticos entre células adyacentes y dentro de la célula. Las evidencias sobre el transporte, serán examinadas en relación a los datos disponibles en el contexto de procesos de transporte similares en otros tejidos.

Para definir la vía C-4 con estudios de radiotrazadores, se requiere información acerca de las enzimas que intervienen en la distribución de los componentes de las reacciones entre y dentro de las células del mesofilo y de la vaina vascular.

El punto medular del problema técnico es distinguir entre las enzimas u organelos derivados de los dos tipos de células fotosintéticas, la vaina y el mesofilo. Una de las soluciones a este problema, incluye el fraccionamiento por densidad, en medios no acuosos de extractos de hojas (181). Para el maíz en particular, éste método proporciona una separación completa de los cloroplastos del mesofilo y de la vaina vascular y da información sobre las enzimas asociadas en cada tipo de cloroplasto, así como su origen celular. Bjorkman y Gauhl (182) encuentran que las células del mesofilo son relativamente frágiles y las de la vaina muy resistentes a la ruptura. Ellos obtuvieron un buen grado de separación por molienda diferencial del tejido de la hoja.

Un procedimiento más versátil sobre la separación de células, se obtiene usando celulasa y pectinasa para degradar la pared celular del tejido mesofílico, obteniéndose los protoplastos de estas células (199), posteriormente con tiempos más largos de incubación, se obtuvieron los protoplastos de las células de la vaina.

III TRANSPORTE INTERCELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4.

El complejo Kranz contiene los componenetes estructurales esenciales de la vía C-4 . Haberland (200) especuló sobre la posibilidad de una división de labor entre las células de la vaina y del mesofilo en el complejo Kranz. Posteriormente Rhoades y Carvalho (201), detectaron el sitio de síntesis de almidón en la vaina vascular de las plantas C-4. - Actualmente con los experimentos sobre compartamentalización intercelular de la vía C-4, se encuentra que las enzimas de la síntesis de los ácidos - C-4, están en las células del mesofilo y las enzimas de descarboxilación y del Ciclo de Calvin, en las células de la vaina vascular. La confirmación cualitativa más interesante de la separación física de las dos carboxilasas fue encontrada cuando se usó CO_2 radioactivo a través del estoma y bicarbonato radioactivo a través del sistema vascular de especies C-4 (sorgo y Amarantus). Se encontró que a los 3 seg. el CO_2 radioactivo , es fijado en los ácidos C-4 del mesofilo, mientras que el A-3PG y compuestos fosforilados se obtuvieron como principales productos, cuando se suplió bicarbonato marcado por 3 seg a la vaina vascular (202). La división de labor visualizada por Haberland (200), parece ser que involucra cooperatividad a --- cualquier nivel celular.

Para el estudio del transporte C-4, es útil tomar en - cuenta dos parámetros: El flujo metabólico (J_M) entre las células del mesofilo a la vaina vascular y el coeficiente de difusión (D) de los metabolitos involucrados.

El transporte intercelular de los ácidos C-4 ó metabolitos C-3, puede ser a través de dos vías, las cuales requieren flujos mínimos de los compuestos que los constituyen, a través de la interfase en--

tre las células del mesofilo y de la vaina vascular para efectuar la Fotosíntesis. Para calcular la velocidad del transporte en el área de superficie en las células del mesofilo, se utiliza la siguiente ecuación:

$$J_M = \frac{P}{2\ r\ \ell}$$

unidades = micromoles s^{-1} cm^{-2}, donde J_M = flujo mínimo; P = Fotosíntesis neta; r = radio y ℓ - lon gitud de las células del mesofilo. Si el flujo se efectúa a través del plasmodemso, entonces J_M puede ser corregido por un factor alfa, correspondiente al área de la interfase, ocupado por el plasmodesmo. En la tabla V se muestran los flujos J_M corregidos al usar alfa = 3×10^{-2} (203). Las estimaciones de alfa, en maíz son comparables con las de la vaina vascular de trigo con alfa = a 2.8×10^{-2} (204).- El almacén de los ácidos C-4 en la Fotosíntesis, puede ser estimada con presición, haciendo experimentos con trazadores radioactivos (191) y estos se han encontrado acumulados en el citoplasma de las células del mesofilo (205). El flujo puede ser estimado de los gradientes de concentración resultando la siguiente ecuación: (206).

$$J_C = \frac{D\ (C\,m - C\,b)}{m\ (I\,n - \frac{r\ m}{r\ b})}$$

donde J es el flujo, D es el coeficiente de difusión de compuestos de peso molecular y carga similares a los ácidos C-4 y metabolitos C-3 (con un valor de 8×10^{-6} s^{-1} cm^{-2}) (207); C m y C b, son las concentraciones de los ácidos C-4 en el mesofilo y la vaina vascular respectivamente; r m y

r b , son el radio promedio de la capa de cloroplastos en las células del mesofilo y la vaina vascular relativo a la fibra del vaso central. Los valores J_C en la tabla V, son mucho mayores que los valores de J_M mencionados con anterioridad, pero solamente 2 ó 3 veces mayores que los valores-calculados de J_{MP} en plasmodesmos que co ntienen el 3% del área de la interfase celular.

El gradiente de concentración requerido para mantener el flujo de los ácidos C-4, necesarios para efectuar la Fotosíntesis, puede ser calculado rearreglando la ecuación 2 y sustituyendo J_{MP} por J_C . En la tabla V se muestran los datos del gradiente de concentración requerido en los ácidos C-4 en el mesofilo de Z. mays y de Amarantus, es de - 25 y 50 % respecitvamente del requerido, por lo que se deduce que una proporción significativa del almacén de los ácidos C-4 reside en las células de la vaina vascular durante la Fotosíntesis C-4. Los datos de autorradiografía para A. spongiosa , muestra bastante CM (concentración máxima)-- en las células de la vaina vascular, después de 2 seg de exposición al $^{14}CO_2$, obteniendo el 90% de la marca de los ácidos C-4 . (208).

Tres puntos importantes son mantenidos en relación a-los flujos mínimos de los ácidos C-4 de las células del mesofilo a las células de la vaina vascular durante la Fotosíntesis C-4.

1) Los flujos pueden ser mantenidos por simple difusión, como lo dedujo - Osmond (208). El coeficiente de difusión aparente para los ácidos C-4, estimados previamente (2 a 16 X 10^{-6} s^{-1} cm^{-1}), son cercanos a los valores publicados.

2) Los flujos evidentemente requieren de concentraciones menores que los - gradientes de potencial creados; si los ácidos C-4 estuvieran confinados a las células del mesofilo.

3) Los flujos involucran movimientos principalmente a través del plasmodesmo y no a través de la interfase de toda la célula. Esto está apoyado -- por el hecho de que los flujos potenciales J_C , son alrededor de 100 veces- mayores , que los flujos estimados, requeridos para efectuar la Fotosínte-- sis, asumiendo que existe movimiento sobre la superficie celular total (J_M).

A. edulis y otras dicotiledóneas no tienen lamelas de - suberina identificable en la pared celular, entre las células del mesofilo y de la vaina vascular, de tal manera que la pared celular de la membrana- plasmática, puede hacer alguna contribución al flujo total del metabolito. Otra característica de estas plantas, es la separación grande que existe - entre los cloroplastos del mesofilo y los de la vaina vascular (173) y como consecuencia, los metabolitos tendrían que moverse a una gran distancia. La gran resistencia de difusión impuesta por la longitud de la vía de difusión, puede ser compensada por la resistencia de la pared celular de - las células mesofilo-vaina y por mayor concentración de gradientes de metabolitos (Tabla V).

Un análisis similar del flujo de metabolitos C-3, propuesto para operar entre células de la vaina al mesofilo, es difícil de demostrar , ya que estudios con radiotrazadores , nos dan evidencias direc-- tas para estimar el tamaño del almacén, que es muy grande. Sin embargo en- estas especies hay transporte de alanina (Tipo PCK, tipo EM-NAD), los da--

TABLA III. Propiedades del transporte intercelular de los ácidos C-4 y -- Co_2 durante la fotosintesis. C-4.

PARAMETROS	SIMBOLOS DE LAS ECUACIONES Y UNIDADES.	Z. mays	A. edulis
Fotosíntesis neta por vol. de hoja.	P micromol/S/cm^{-3}	0.185	0.180
Superficie de las células de la vaina vascular	2 rl cm^2/cm^3	125	220
Flujo de ácidos C-4 requerido en la sup. total.	J_M micromol/S/cm^2	1.48×10^{-3}	0.82×10^{-3}
Flujo de ácidos requerido en la vía plasmodesmo	J_M micromol/S/cm^2	0.049	0.027
Medida del almacén de ácidos C-4 involucrados en la Fotosíntesis.	micromol/cm^3	1.85	1.82
Concentración máxima de ácidos C-4 en el mesófilo	Cm micromol/cm^3	38	60
Radio de la capa del cloroplasto de las células del mesófilo	r_m cm	0.006	0.008

PARAMETROS	SIMBOLOS DE LAS ECUACIONES Y UNIDADES.	Z mays	A. edulis
Radio de la capa del cloroplasto de las células de la vaina vascular	r_b (cm)	0.0045	0.0025
Flujo de ácidos C-4 calculados según la ecuación 2	J_c micromol/cm^2	0.178	0.052
Gradiente de ácidos C-4	Cm-Cb micromol/cm^3	12.5	31.3
Concentración de CO_2 + HCO_3	micromol/cm^3	0.6	2.0
Flujo de retorno de CO_2 + HCO_3. según Ec. 2	micromol/3/cm^3	0.0035	0.0022

tos cuantitativos y cinéticos de alanina marcada, se mueven paralelamente a los ácidos C-4 en C-1, C-2 y C-3 (209) . Estos datos sugieren que el almacén de alanina en la Fotosíntesis y de los ácidos C-4, son comparables - en tamaño , y los gradientes de concentración y flujos de estos intermediarios, podrían ser comparables.

Los modelos propuestos requieren que los flujos de los ácidos C-4 y metabolitos C-3 , sean iguales , pero de dirección opuesta. - La difusión de metabolitos en direcciones opuestas, no presenta dificultades, pero alguna interacción entre la difusión y el flujo de agua en este sistema, podría estar involucrada. El flujo de ácidos C-4 es opuesto al de los metabolitos C-3, o sea del tejido vascular a las células del mesofilo.

IV BALANCE DE CARGAS Y GRUPOS AMINO DURANTE EL TRANSPORTE INTERCELULAR C-4.

El transporte intercelular de los metabolitos C-4 y C-3 propuestos para operar en la vía C-4 Fig. 30 pag. 89. es consistente con un balance de carga de grupos amino. Sin embargo examinando los esquemas de la Fotosíntesis C-4 en la Fig. 30, se muestra que los procesos más simples de intercambio de metabolitos C-4 y C-3 intercelular, son posibles en las especies PCK, el oxaloacetato formado en las células del mesofilo, puede ser transferido directamente a las células de la vaina vascular y descarboxilados por la vía de la PEP-carboxiquinasa, siendo regresado el PEP a las células del mesofilo. Por otro lado en las especies EMNAD, el malato sintetizado en las células del mesofilo, deberían ser directamente descarboxilados por la enzima málica dependiente de NAD, en -

las células de la vaina vascular , el piruvato que resulta de esta reac-- ción, es regresada a las células del mesofilo. Ambas alternativas reempla zan a los sitemas de flujo aspartato-alanina y por lo tanto reemplazarían la necesidad de usar una secuencia compleja de interconversiones de amino ácidos-cetoácidos Fig. 32 pag. 114 y Fig. 30 pag. 89 .

Las alternativas anteriores son inoperables por las - siguientes razones; existen fuertes evidencias por estudios hechos con -- trazadores radioactivos en células y hojas intactas, así como con estudi- os enzimáticos, de que existen los aminoácidos como intermediarios de la Fotosíntesis. y los estudios con radiotrazadores indican que el almacén - de ácido oxaloacetico (AOA) en diferentes variedades de especies C-4, ra- ramente es mayor del 5% y frecuentemente menor que los almacenes de mala- to y aspartato. Bajo estas circunstancias, el oxaloacetato (AOA) podría - ser inadecuado para proveer el gradiente de concentración para efectuar - velocidades apropiadas de flujo hacia las células de la vaina vascular .- Para las especies EM·NAD, si el malato derivado de las células del mesofi lo fuera descarboxilado por la enzima NAD-málica, entonces un sistema al- ternativo para la oxidación de NADH a NAD^+ , debería ser requerido para - la reducción de otro compuesto diferente a la reducción del oxaloacetato a malato Fig. 30 . La naturaleza de tal sistema operando en mitocondria a velocidades medibles con la Fotosíntesis, no es aparente. Por estas razo- nes la s íntesis y transporte de aspartato, provee una explicación más ra cional a los datos. Cuando el aspartato es transferido a ls células de la vaina vascular, la alanina es producida y regresada al mesofilo, en vez- de piruvato, ésto mantendría el balance de grupos amino intracelular, así como el acoplamiento para las reacciones de transaminación dentro de la - células Fig. (32)

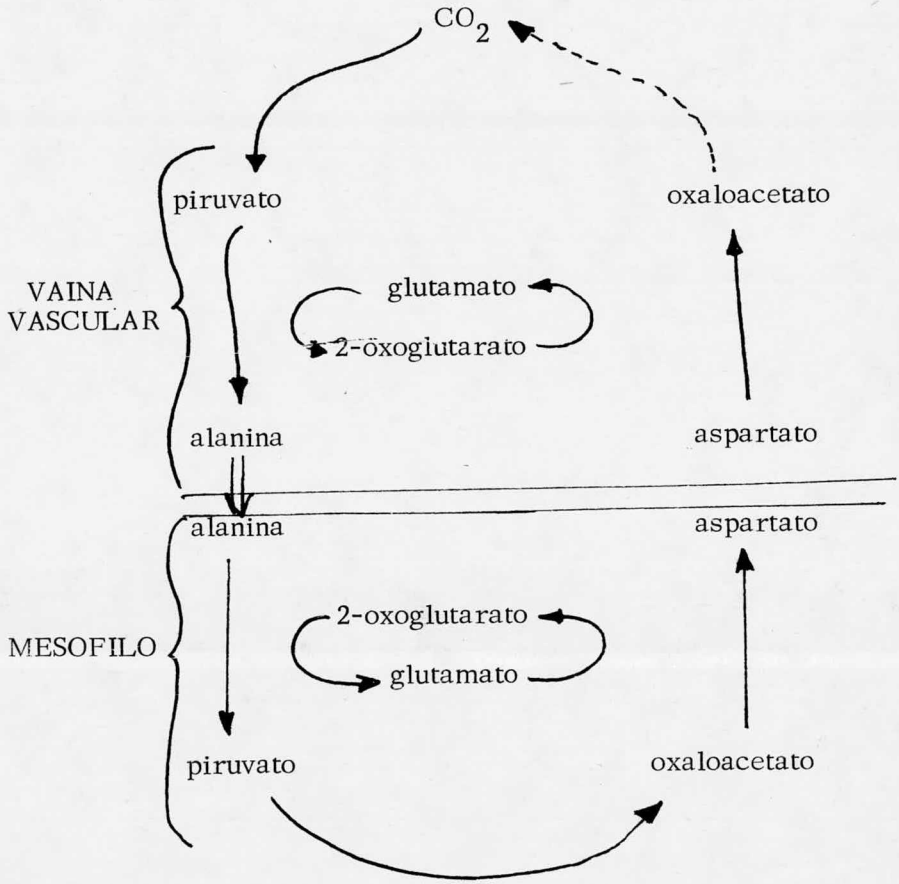


Fig. (3). Catalización de la aminotransferasa transformación en especies EM-NAD y PCK.

TABLA V. *Velocidad mínima del transporte de metabolitos en cloroplastos - intactos del mesófilo y motocondria de la vaina de plantas C-4.*

Velocidades de reacción dadas en micromoles min^{-1} $mg.^{-1}$ *Clor.*

ORGANELOS Y PROCESOS	Z. Mays	A. spongiosa
CLOROPLASTOS DEL MESOFILO		
Relación		
Influjo de piruvato/ Eflujo de PEP.....	1.5	3.8
Influjo de AOA.....	2.5	3.0
Eflujo de malato.....	3.1	1.2
Eflujo de A-3PG.....	1.6	4.5
Eflujo de DHAP.....	- -	4.4
MITOCONDRIA DE LA VAINA VASCULAR		
Influjo de ácidos C-4	0.03	5.8

Los esquemas presentes en la vía C-4 Fig. 30, necesitan grandes flujos intercelulares de los ácidos dicarboxílicos, monocarboxílicos y otros metabolitos tales como A-3PG y DHAP. Flujos comparables de metabolitos de los cloroplastos y mitocondria en las especies tipo EM-NAD, también son requeridos durante la operación total de la vía C-4 , la que precisa la existencia de un balance de cargas entre los compartimientos intercelulares y las células. Visualizando de una manera simple existe un aparente desbalance de cargas negativas a través del espacio intercelular entre las células del mesofilo y la vaina vascular con los flujos acoplados a los aminoácidos C-4 $^{--}$ y a los ácidos C-3^{-} y también de A-3PG $^{---}$ y DHAP^{--} en direcciones opuestas. Sin embargo en términos de cargas negativas, en metabolitos solamente hay un balance entre células, si es considerada la secuencia metabólica completa. Así para la vía de los ácidos C-4/C-3, el balance es mantenido cuando se toma en cuenta que una de las cargas del grupo carboxilo en los ácidos C-4,se deriva inicialmente del CO_2 en el mesofilo y finalmente aparece como CO_2 en las células de la vaina vascular. Por otro lado el balance de cargas negativas, es satisfecho si la vía de A-3PG/DHAP es considerada en términos de su metabolismo completo por la vía de las pentosas-fosfato. Por otro lado , enfatizaremos que un análisis en el balance de cargas completo de estos flujos, podría requerir la consideración de protones u otros movimientos de contraiones , así como componentes de las reacciones de fosforilación y piridín nucleótidos, mediados por reacciones de óxido-reducción.

V TRANSPORTE INTRACELULAR EN LA FOTOSINTESIS C-4

Dentro de ambas células, la del mesofilo y la de la vaina vascular, existe un proceso complejo que involucra el movimiento de metabolitos entre el citoplasma, el cloroplasto y la mitocondria, y que son esenciales en el flujo de carbono, en la Fotosíntesis C-4 Fig.30 como se ha dicho anteriormente pags. 87,88 y 90, las reacciones en las células del mesofilo para la formación de los ácidos C-4 basicamente son similares en todas las especies C-4 e involucran sistemas de transporte similares. Sin embargo en las células de la vaina vascular hay diferencias sustanciales en el sitio de descarboxilación de los ácidos C-4 y mecanismo, requiriendo de diferentes procesos de transporte en las diferentes especies C-4.

El transporte de piruvato en los cloroplastos del mesofilo y su conversión a PEP, depende de la fotofosforilación en experimentos realizados en Z. mays; A. spongiosa y D. sanguinalis (176). Las velocidades máximas de captación de CO_2 encontradas en los metabolitos, fueron comparables al flujo neto de carbono durante la Fotosíntesis efectuada en hojas de estas plantas (Tabla VI) . Huber y Edwards (210) mostraron que los cloroplastos del mesofilo, tienen una alta afinidad para piruvato (Km 0.1 mM), comparable con la Km de la piruvato Pi diquinasa , in vitro (181). El rápido transporte del piruvato, es otra característica distintiva de los cloroplastos del mesofilo de las plantas C-4, sin embargo en cloroplastos de espinaca C-3, el transporte del piruvato se realiza a velocidades más lentas (211).

El metabolismo del piruvato, por el sistema piruvato to Pi diquinasa en cloroplastos intactos del mesofilo, también requiere

captación de ortofosfato. Es concebible que pudiera existir un intercambio ortofosfato/fosfoenolpirúvico, mediado por un translocador de fosfatos como sucede en los cloroplastos de las especies C-3 (188), aunque actualmente el mecanismo de la captación del piruvato, es un problema interesante y está aún sin resolver.

El intercambio en la captación de ácido oxaloacético (AOA) y excresión de malato en los cloroplastos del mesofilo, implican la existencia de un translocador similar al de dicarboxilatos en los cloroplastos de espinaca (188). La velocidad mínima de captación de AOA y el eflujo de malato, son comparables a la velocidad neta de la Fotosíntesis en las hojas de estas plantas (Tabla VI) (186) . Los cloroplastos de estas especies, también tienen una capacidad sustancial para el transporte de A-3PG , que es dependiente de la evolución del oxígeno y que va acompañada de la formación y eflujo de la DHAP (Tabla VII) . Posiblemente esta translocación, implica que la vía del A-3PG y la DHAP sean similares a la translocación de fosfato como sucede en las plantas C-3, esto implica un recambio de Pi-A-3PG y Pi- DHAP.

En las especies tipo EM-NADP de plantas C-4 , la descarboxilación del malato, tiene lugar en los cloroplastos de la vaina. Sin embargo una mezcla de plastidios preparados a partir de hojas inmaduras de maíz, fueron capaces de asimilar CO_2 por el Ciclo de Calvin. Del esquema de la Fig. 30, uno puede predecir que los cloroplastos de la vaina en este tipo de especies, puede ser capaz de transportar malato e intercambiarlos por piruvato, sin embargo el sistema de transporte de malato de estos cloroplastos, puede ser similar al translocador de dicarboxilatos en los cloroplastos del mesofilo (C-4) y de espinaca (C-3) (212). A semejanza de los cloroplastos del mesofilo, el movimiento de piruvato a los cloroplas--

tos de la vaina vascular, difieren del sistema de intercambio lento para estos compuestos, en cloroplastos de espinaca. El eflujo complementario- de malato e influjo de piruvato de los cloroplastos del mesofilo; y el - influjo de malato y eflujo de piruvato de los cloroplastos de la vaina - vascular en las plantas C-4, puede ser que represente un sistema único - de transporte que no puede ser igualado al movimiento de metabolitos de- plantas C-3. (189).

En las plantas C-4 tipo EM- NAD , la distribución de enzimas, indica una secuencia del metabolismo más complejo, que involu-- cra a la mitocondria como el sitio principal de descarboxilación Fig. 30 pag. 89 . La mitocondria de estas plantas descarboxila a los ácidos C-4, a velocidades mayores al flujo de carbono durante la Fotosíntesis C-4 (Tabla VI) . La descarboxilación in vitro, requiere la adición simultánea de aspartato, alfa-ceto glutarato, malato y ortofosfato (176), que - involucra el consumo neto de aspartato y la producción de piruvato. Como se muestra en la Fig. 30, se requiere una vía de alfa-ceto glutarato/glutamato , para las reacciones de aminotransferasa responsables de la utilización del aspartato y la formación de alanina. En mitocondrias aisladas, al agregar malato, se requiere establecer el Ciclo NAD^+ -NADH , con la enzima málica del NAD y la NAD-malato deshidrogenasa. El ortofosfato- puede ser requerido en un sistema de acarreador para malato, similar a - los que opera n en otras mitocondrias (213), puesto que ninguna de las - enzimas involucradas en la descarboxilación, requiere ortofosfato. Alternativamente malato y ortofosfato, pueden facilitar el transporte de as-- partato y alfa-ceto-glutarato, hacia dentro de la mitocondria, como se - ha descrito en otros sistemas (214). En las plantas C-4, las actividades

ORGANELOS Y PROCESOS	VELOCIDAD DE REACCION	
	Z. mays	*A. spongiosa*
	micromoles min^{-1} mg^{-1} Clor	
Cloroplastos del mesofilo		
Influjo de piruvato/eflujo de PEP	1.5	3.8
Influjo de AOA	2.5	3.0
Eflujo de malato	3.1	1.2
Influjo de A-3PG	1.6	4.5
Eflujo de DHAP	-	4'4
MItocondria de la vaina vascular		
Influjo de ácidos C-4	0.03	5.8

TABLA V'. VELOCIDAD DEL TRANSPORTE DE METABOLITOS EN CLOROPLASTOS DEL MEMESOFILO Y MITOCONDRIA DE LA VAINA VASCULAR DE PLANTAS C-4. (189).

de descarboxilación son diez veces mayores a las que se efectúan en procesos oxidativos en la respiración (215).

Experimentos realizados in vivo con las plantas C-4 Tipo EM-NADP y EM- NAD , deben ser interpretados para mostrar la gran importancia de la movilidad de los ácidos C-4 entre compartimientos intracelulares . Por ejemplo en sorgo bicolor y Atriplex spongiosa, lo s ácidos C-4 - marcados por el metabolismo del succinato ^{14}C en la oscuridad (almacén mitocondrial de succinato ó almacenes mitocondriales y citoplásmicos), son- convertidos rapidamente a productos fotosintéticos en la luz (215). Estos- eventos involucran a los sistemas de descarboxilación de los ácidos C-4 de la mitocondria y cloroplastos más que al Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En las plantas C-3 , los mismos experimentos de luz, a oscuridad, muestran poca transferencia de marca de los ácidos C-4, derivados de succinato a productos fotosintéticos.

Los estudios de distribución de enzimas, han fallado - en la localización de la PEP-carboxiquinasa, las reacciones de descarboxilación de las plantas C-4 tipo PCK, no se encuentran en ningún organelo de las células de la vaina vascular (Tabla VII) . La descarboxilación probablemente tiene lugar en el citoplasma de estas células y la fijación del - CO_2 por los cloroplastos de la vaina vascular se presume que sea análogo - al de las plantas C-3 , Sin embargo en las plantas C-4 tipo PCK, se conoce parcialmente este mecanismo y en este momento existen problemas sustanciales que deben ser resueltos, tales como la fuente de ATP para la PEP-carboxiquinasa y el mecanismo de la formación de piruvato a partir de PEP.

TABLA VII. ACTIVIDAD Y LOCALIZACION DE LAS ENZIMAS DE LA VIA C-4 EN LOS SUBGRUPOS.

Unidad de actividad = 1 micromol/min.

Abreviaturas:

M = mesófilo

CV = células de la vaina vascular

Cit. = Citoplasma

Clor = Cloroplasto

Mito = Mitocondria

ENZIMAS	ACTIVIDAD	LOCALIZACION Tipo celular dentro de la célula.		ACTIVIDAD EN c-3
PEP-carboxilasa	15.40	M	cito	0.4 - 1.5
Piruvato, Pidi-quinasa	3.10	M	cloro	0
Adenilato quinasa.	17.45	mayor en M	cloro en M.	0.5 - 1.0
Pirofosfatasa.	20.60	mayor en M	cloro en M.	2 - 4
3-PGA a triosa P-enz..	similar a C-3	ambos	cloro	--
Otras enzimas				
PCK	similar a C-3	C.V.	cloro	--

VI TRANSPORTE DE METABOLITOS EN RELACION A LA ACTIVIDAD FOTOQUIMICA DE LOS CLOROPLASTOS.

A partir de las primeras concepciones sobre los procesos cooperativos entre las células de la vaina vascular y del mesofilo en la Fotosíntesis C-4, se ha reconocido el transporte intercelular del malato en las especies tipo EM-NADP , donde contribuyen el CO_2 y el potencial de reducción de las células de la vaina vascular (216). La posibilidad de que el NADPH formado en esta vía contribuya directamente a los requerimientos del Ciclo de reducción del carbono, ha sido correlacionado con las características estructurales de los cloroplastos de la vaina en esas especies . El dimorfismo de los cloroplastos (180) y la presencia de tilacoides no apresados en los cloroplastos, son deficientes en actividad de FSII ,razón por la cual se haya hecho una revisión de las formas de transporte de electrones en las reacciones luminosas (en cloroplstos de mutantes de tabaco C-3), pero investigaciones más recientes sobre las propiedades fotoquímicas de los cloroplastos aislados de las plantas C-4, han confirmado las deficiencias de FSII en las células de la vaina vascular, particularmente en las especies EM- NADP (218). Sin embargo las plantas de este tipo muestran un desarrollo nomral del grana en ambos tipos celulares (175). En experimentos con pulsos cortos (219) se ha observado que la EM-NADP puede contribuir con $NADPH_2$ para la reducción del carbono en cloroplastos de las células de la vaina deficientes en FSII. La actividad para FSI es normal para todas las especies.

Una mejor comprensión en el desarrollo de la regulación de este complejo sistema de cooperatividad en la Fotosíntesis, es muy importante para los estudios sobre el metabolismo C-4.

MECANISMO DEL TRANSPORTE DE ANIONES EN LOS CLOROPLASTOS CON METABOLISMO C-4.

Las reacciones que operan en el mesofilo , son comunes a todas las plantas C-4. El papel básico de las células del mesofilo, es la asimilación del CO_2 en los ácidos C-4 , para ser transportados a las células de la vaina. El CO_2 es asimilado en el citoplasma por la vía de la PEP-carboxilasa y el PEP es transportado a las células de la vaina, donde se transforma en piruvato, el cual es un anión capaz de atravesar la membrana interna del cloroplasto mediante un translocador de fosfatos.

La ruta de utilización del AOA , varía según el grupo ó tipo de especie C-4. En el tipo EM-NADP , el AOA es reducido a malato por la vía de la NADP-malato deshidrogenasa y el malato se mueve a las células de la vaina en donde se descarboxila produciendo piruvato, que es regresado como en el caso anterios a la células del mesofilo, como se observa en el esquema de la Fig 30.En otros grupos el aspartato remplaza al malato y este ácido se mueve a las células de la vaina en donde es descarboxilado . La alanina que es un"compuesto C-3" , retorna al mesofilo, cuando el aspartato es transferido a ls células de la vaina, de tal manera que el balance de los grupos amino se mantiene. De estas evidencias podemos concluir que el ácido 3-fosfoglicérico formado en las células de la vaina, puede regresar a las células del mesofilo, por reducción de la dihidroxiacetona fosfato.

La función básica fotosintética de las células de la vaina, es la descarboxilación de los ácidos C-4 y la reasimilación del CO_2 formado en el Ciclo de reducción de las pentosas-fosfato .Todas estas reacciones

ocurren en diferentes compartimientos, como se mencionó en la descripción de los tipos de especies C-4.

Después de la revisión de datos sobre el estudio de las carboxilasas, se concluye que la PEP-carboxilasa, actúa solamente en el mesófilo y la RuDP-carboxilasa y otras enzimas del Ciclo de Calvin, en las células de la vaina vascular, ya que en los cloroplastos del mesofilo, se realizan las reacciones dependientes de luz; en cambio las reacciones que se efectúan en la oscuridad, no se llevan a cabo en estas células, porque carecen de la RuDP-carboxilasa y otras enzimas del Ciclo de Calvin, que sí existen en la vaina vascular..

Otra de las conclusiones importantes de esta revisión es el hecho de que los ácidos C-4 se mueven hacia las células de la vaina con diferentes mecanismos de descarboxilación , los cuales dan las bases para la agrupación de las plantas C-4 en tres grupos distintivos.

Para el primer grupo, (EM-NADP) el malato derivado de las células del mesofilo, es descarboxilado en las células de la vaina. Ambas células contienen actividad de esta enzima, pero es más acentuada en la vaina. Los otros dos tipos carecen de alta actividad de esta enzima, pero presentan elevada actividad de otra enzima que es la aspartato y alanina aminotransferasa, que se distribuyen igualmente en los dos tipos. En las especies del 2o. grupo, la descarboxilación de los ácidos C-4 ocurre mediante la intervención de la PEP-carboxiquinasa(tipo PCK). En ambas células la actividad y localización de la enzima es adecuada para los procesos de descarboxilación mostrados en la Fig. (30) del capítulo anterior.

VIII EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DEL TRANSPORTE DE ANIONES EN PLANTAS C-3.

Para tener mejor idea sobre el transporte de aniones - en las células de la vaina vascular que mueve intermediarios del Ciclo de Calvin hacia las células del mesofilo, revisaremos brevemente los estudios efectuados en cloroplastos de plantas C-3, ya que podemos concluir que los cloroplastos de la vaina, operan semejante a los C-3. Los estudios de permeabilidad de la doble membrana en cloroplastos aislados por métodos acuosos y no acuosos, indican que ciertos aniones como el A-3PG, la DHAP y algunos ácidos dicarboxílicos, traspasan la doble membrana (220).

Heldt y Sauer (221) para localizar la barrera de permeabilidad de la doble membrana, aislaron y midieron la permeabilidad de - muchos compuestos y encontraron que penetraban todos los compuestos de bajo peso molecular como nucleótidos, derivados de fosfato, ácidos dicarboxilicos, sacarosa. Estos mismos autores dedujeron de sus experimentos que - ciertos aniones como el A-3PG y el malato, son captados por el cloroplasto que los concentra en contra de un gradiente. Esta propiedad se pierde cuando los cloroplastos son rotos osmóticamente (Tabla VIII), indicando que - la captación es efectuada por la membrana interna, ya que como se dijo antes, la membrana externa es permeable a estos metabolitos. Por lo tanto la captación de A-3PG y de malato del espacio intermembranal a través de la - membrana interna hacia el estroma, es mediado por un transportador.

TABLA VIII CAPTACION DE ANIONES EN CLOROPLASTOS DE ESPINACA.

	Cloroplastos intactos	Cloroplastos rotos
ácido fosfoglicérico	13.7	1.5
malato	13.0	0.5

De la tabla anterior podemos concluir que el A-3PG y el malato, se encuentran dentro del cloroplasto y atraviesan la membrana interna.

TRANSPORTE ESPECIFICO DE ANIONES.

El transporte a través de la membrana interna se le llamara en lo siguiente " transporte en el cloroplasto " . Se han propuesto tres mecanismos de transporte específico para los aniones:

a).- Translocador de fosfatos

b).- Translocador de dicarboxílicos

c).- Translocador de ATP.

En la Fig. (33a) se muestra el transporte de compuestos radioactivos. Se observa que el transporte de A-3PG y Pi es muy rápido en cambio el de hexosas-foafato es lento.

La medida del intercambio de metabolitos, es una herramienta útil para dilucidar la especificidad del transporte a través de la me membrana interna . Por esta razón los cloroplastos son incubados a 4° C durante 2 min , con los metabolitos radioactivos ^{32}Pi y ^{14}C-A-3PG y lavados.

Los experimentos de la tabla IX muestran que en los cloroplastos ocurre la liberación de los compuestos radioactivos en presencia de otros aniones. Y por lo tanto podemos concluir que existe un acarrea--

dor específico , al cual se le llamó " translocador de fosfatos " que facilita el intercambio de Pi . A-3PG y DHAP a través de la membrana interna (222).

Aniones adicionados 0.5 mM	Sustancias radioactivas liberadas nmoles mg^{-1} clor 20 seg $4^{o}C$	
	^{32}P	^{14}C-A-3PG
Fosfato inorgánico	47.0	11.1
dihidroxiacetona fosfato	57.3	13.1
gliceraldehído fosfato	48.1	8.9
fosfoenolpiruvato	11.2	0.4
ATP	3.0	0.8
malato	0.2	0.6
succinato	0.8	0.9
acetato	1.0	0.6

TABLA IX LIBERACION DE FOSFATO INORGANICO DE CLOROPLASTOS AL ADICIONAR VARIOS ANIONES.

Los datos anteriores son interesantes ya que se ha encontrado que el A-3PG y la DHAP son los primeros productos de la Fotosíntesis en cloroplastos aislados y son exportados hacia el exterior del cloroplasto. Por lo tanto in vivo, el fosfato del citoplasma es transportado al interior del cloroplasto en intercambio con A-3PG y DHAP generado en la Fotosíntesis.

Es pertinente hacer notar, que el translocador de fosfatos tiene una función importante en la exportación de productos de la Fotosíntesis , del cloroplasto al citoplasma.

TRANSLOCADOR DE ACIDOS DICARBOXILICOS.

El transporte de los ácidos dicarboxílicos, se muestra en la Fig.(31b) . En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos por intercambio de malato radioactivo con diferentes aniones, observándose la liberación de malato C^{14} en presencia de los diferentes aniones en el medio de incubación (222).

ANIONES ADICIONADOS	MALATO ^{14}C LIBERADO 10^{-9} moles mg^{-1} Clor
malato	40.3
aspartato	40.8
oxaloacetato	26.7
piruvato	0.6
3-fosfoglicerato	0.2
fosfato inorgánico	0.6
dihidroxiacetona fosfato	1.1

TABLA X Transporte de ácidos dicarboxílicos.

Captación en el espacio impermeable de sacarosa

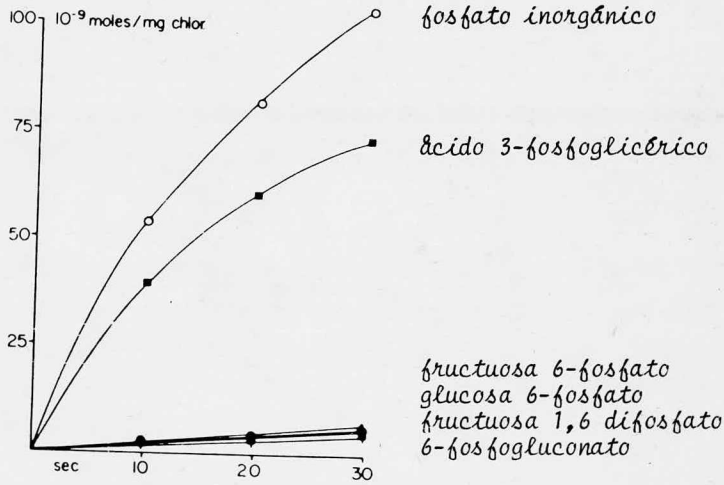


Fig. 33a Transporte de metabolitos marcados radioactivamente en el espacio impermeable sacarosa en cloroplastos de espinaca. (212)

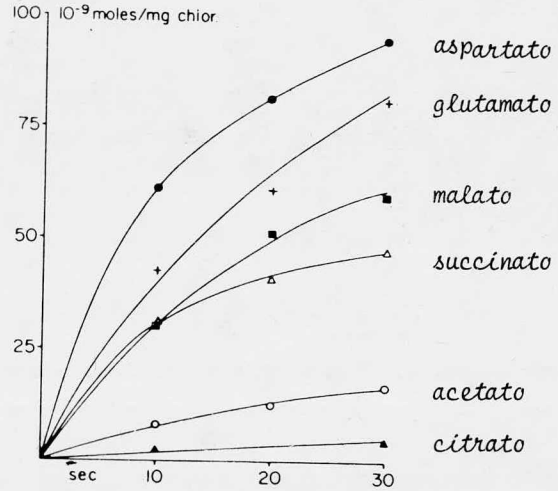


Fig. 33b Transporte de ácidos carboxílicos marcados radioactivamente en el espacio impermeable de sacarosa de cloroplastos de espinaca. (212)

De los datos anteriores se puede concluir que hay un acarreador específico que facilita el intercambio de ácidos dicarboxílicos a través de la membrana interna del cloroplasto. Al acarreador le llamaron (223) " translocador de dicarboxílicos" y parece ser específico para malato, aspartato y AOA. El translocador de dicarboxílicos puede unir el metabolismo de los ácidos dicarboxílicos del estroma, al citosol y viceversa, esto es importante en la transferencia de equivalentes reductores de un compartimiento a otro. Por ejemplo el intercambio de malato con oxaloacetato ó con aspartato (224).

TRANSLOCADOR DE ATP

Strotmann y Heldt (201) encontraron intercambio de adenín nucleótidos en cloroplastos. La especificidad de este transporte por nucleótidos se muestra en la tabla zXI.

Nucleótidos	Actividad de translocación (20°C) micromoles mg^{-1} Clor hr.
ATP	2.04
ADP	0.24
AMP	0.07
CTP	0.03

TABLA IXI TRANSPORTE DE ATP.

Más detalles ver ref (222).

C O N C L U S I O N E S

La presente revisión bibliográfica describe las evidencias relativas al transporte de aniones que atraviesan la membrana de los dos tipos de cloroplastos del mesofilo y de la vaina vascular, con lo que en la vía metabólica C-4 , se concluye que los siguientes aniones: el malato, el aspartato, el piruvato, el ácido fosfoglicérico y dihidroxiacetona fosfato,atraviesan la membrana de los cloroplastos durante la Fotosíntesis C-4, mediante translocadores específicos. El ácido 3-fosfoglicérico y la dihidroxiacetona fosfato, lo hacen mediante un translocador específico de fosfatos y el malato , el aspartato (ácidos dicarboxílicos)y el piruvato lo hacen por medio de un translocador de dicarboxilatos.

Los aniones: malato y aspartato, son los primeros productos estables que intervienen en las reacciones oscuras de la Fotosíntesis C-4 y se transportan mediante los translocadores de dicarboxilatos de los cloroplastos del tejido mesofílico de la planta al citoplasma y de este al cloroplasto, citoplasma ó mitocondria de las células de la vaina vascular , según los tipos I, II y III correspondientes a la enzima específica en que se han dividido las plantas C-4.

La translocación de los aniones en las plantas C-4 se fundamenta sobre los estudios de transporte de metabolitos en las plantas C-3, aunque existen diferencias como ya se establecieron en los capítulos correspondientes de esta revisión.

El estudio del mecanismo de la Fotosíntesis C-4 será en el futuro, de gran importancia, ya que las plantas con mayor productividad de carbohidratos como maíz, sorgo y caña de azúcar, llevan a cabo esta vía metabólica y es posible pensar en la posibilidad de que conociendo en su totalidad este mecanismo, se pudieran transformar las plantas C-3 para aumentar su productividad en beneficio de la alimentación mundial y coadyuvando a la solución de uno de los problemas más grandes a a los que se enfrentará la humanidad en el futuro.

(1).- Tolbert, N.E.
Current Topics in Cellular Regulatión pps.21-50
Academic Press New York.

(2).- Laetsh, W.M.
Sci. Progr.Oxford 57:323-49 (l969).

(3).- Johnson, H.S.;Hatch, M.D.l968
Phytochem 7:375-80

(4).- Medina Ernesto;Bifano Tatiana;Milena Delgadol976
Interciencia Vol.L No. 2

(5).- Buchanan, B.B and Schurman l963
J.Biol Chem 248:4956-4964

(6).- Bassham, J.A. ;Kirk, M.Jensen, R.G l968
BiochimBiophys acta l53:2ll-l8

(7).- Bassham, J.A;Benson, A.A; Lorel, D.Kay l954
J Am Chem Soc. 76:l760_70

(8).- Gitler, Carlos Perfiles de la BIoquímica en México l974, 343-

(9).- Secrest, J.P;Jackson, R.L.;Marchesi, V.T.l972
BiochemBiophys Res Commun 49:964

(10).- Spatz, L; Strittmatter, P. l97l
Proc. Nat Acad Sci. 68:1042

(11).- Ito, A;Sato, R.J., l968
Biol Chem 243:5922

(12.- Rudy, B;Gitler, C., l972
Biochem, Biophys Acta 288:231

(13).- Kornberg,R.D.;McConnel,H.M,ℓ971 Biochemestry 10:1111-

(14).- Gottere,G.S.,Biochemestry 6:2147 (ℓ967).

(15).- Frye,L.D.;Edidin,M.J.,1970,J.Cell Scie 7:319-

(16).- McConnell,H.M;Gaffney,B.Quart,1970 Rev.Biophys 3:91-

(17).- Heldt,H.W. Sauer;Rapley,L. 1971 Reprint from ¡¡ndInte nationak Congress on Photosynthesis,Stresa.

(18).- Heldt,H.W.;Sauer,F.1970 Biochem Biophys Acta 234:83-97

(19).- Park,R.B.;Sane,P.V.,1971 Ann Re.Plant.Physiol 22:395-430.

(20).-Mackender,R.O.;Leech,R.M. Reprint from IInd. Interna tional Congress on Photosynthesis, Stresa,1971

(21).- Trebst,A.,1974 Ann.Rev. Plant.Physiol 25:423-58

(22).- Hall,D.O.,1972 Nature 235: 125-26

(23).- Hill,R.1937 Nature 139:881-82

(24).- Arnon,D.I. Whatley.F.R.,,Allen,M. B. ℓ955 Bichim Bio-phys,Acta 16:607-8

(25).- Dilley,R.A.;Peters,G.A.;Shan,E.R.,1972 J.Membrane Bio 8:163-80

(26).- Park,R.B.;Sane,P.V. Ann.Rev.Plant Physiol,1971 22:395

(27).- Witt,H.T, Rumberg,B.Junge W.,1968 Ver ref.147:262-306

(28).- Hauska,G.A.,1972 Angew Chem 84:123=24

(29).- Hill,R. 1937 Nature 139:881-82

(30).- Trebst,A. Pistorius,E. Z.Naturforch 20b:143-47

(31).-Arnon, D.I. 1965 Science 149:1460=70

(32).- Shin,M.;Tagawa,K. ;Arnon,D.I.1963Biochem Z. 338:84-96

(33).- Avron,M. Jagendorf,A.T. 1956 Arch Biochem Biophys 65:475-90

(34).- Keister.D.L.; San Pietro A. Stolzembach,F.E. 1962 Arch Biochem Biophys 98:235-44

(35).- Foust,P.G. Mayhew,S.G.;Massey,V.1969 J Biol Chem 244:964-70

(36).- Hiedeman,Van Wyk,D.;Kannangara,C.G.1971 Z. Naturforsch,26b:43-50

(37).- Hiyama T.;Ke, B. 1971 Proc Nat Acad Sci USA 68:1010-13

(38).- Yocum,C.F. San Pietro,A. 1972 Arch Biochem Biophys 152-57

(39).- Honeycutt,R.C. Krogmann,D.W. 1970 Biochim Biophys Acta 197:267=75

(40).- Regitz,G.;Berzborn,R; Trebst,A. 1970Planta 91:8-17

(41).- Selman,B.R. Giaquinta,R.T. Dilley, R.A. In press

(42).- Brand, J.;Krogmann,D.W.; Crane,F. 1971 Plant Physiol 47:135-38

(43).- Menke,W. 1972 Arbeitsgermeinsch,Forsch Landes NRW 171-:1-25

(44).- Berzborn,R.J. 1972 Physiol Chen 353:693-

(45).- Keister,D.L., San Pietro,A. ;Stolzenbach,F.E. 1962 Arch Biochem Biophys 98:235-44

(46).- Berszborn,R.J. 1968 Z. Naturforsh 23b:1096-1104

(47).- Foust,P.G; Mayhew,S.G. Massey 1969 J Biol Chem 244:294-70

(48).- Hiedemann-Van Wyn;Kannangara,C.G. 1971 Z. Naturforsch 26b:46=50

(49).- Racker,E.; Hauska,G.A. Lien ,S Berzborn, R.J. Nelson N. ver Ref.(78) 872:1097-1113

(50).- Koening,F.; Menke,W. Craubner,H. Schid, G.H.;Radunz,A. 1972 Z. Naturforsch 27b: 1225-38

(51).- Briantais,J.M.;Picaud, M. 1972 FEBS LETT 20: 100-4

(52).- Arntzen,C. J.; Dilley,R.A. ; Crane, F.L. 1969 J Cell Biol 43:16-31

(53).- Muhlethaler,K.1971 Int Rev Cytol 31-19

(54).- Branton, D., Park, R.B. 1967 J Ultrastruct Res 19:283-303

(55).- Dilley,R.A. 1970 Arch Biochem Biophys 137:270-83

(56).- Briantais,J.M. 1969 Physiol Veg 7:135=80

(57).- Duysens,L.N.M. 1969 Progr Biophys ?Mol Biol 14:1-104

(58).- Muller, A. ;Witt, H. T. 1961 Nature 189:944-45

(59).- Levine, J. Reimann, B. E. 1969 Ann Rev Plant Physiol 20:289-304

(60).- Haehnel, W. 1973 Biochim Biophys Acta 305:618=31

(61).- Haehnel, W. 1974 Abstr Int Cong Biochem Stockholm 217=

(62).- Biggins, J. 1963 Biochemestry 12:1165-70

(63).- Larkum, A.W. D; Bonner, W. D. 1972 Biochim Biophys Acta 256:385-95

(64).- Brand, J. ;San Pietro, A. Mayne, B. C. 1972 Arch Biochem Biophys 152:426-28

(65).- Ouitrakul, R. Izawa, S. Biochim Biophys Acta 305:105-18

(66).- Kiminura, M. Katoh, S. Biochim Biophys Acta 325:167-74

(67).- Brand, J., San Pietro, A. Mayne, B.C. 1972 Arch Biochem Biophys 152: 426-28

(68).- Kimimura. M. Katoh, S. 1973 Biochim Biophys Acta 325:167-74

(69).- Arnon, D.I. Whatley, F.R. Allen, M.B. 1955 Biochim Biophys Acta 16:607-8

(70).- Avron, M; Neumann, J 1968 Ann Rev Plant Physiol 19:137-66

(71).- Bamberger, E.S. Rottenberg, H. Aron, M. 1973 Eur. J. Biochem 34: 557-63

(72).- Bohme, H; Cramer, W.A, 1971 FEBS LETT 15:349-51

(73).- Arnon, D.I 1972 Structure and Function of Oxidation Reduction Enzymes ed A. Akcson, A. Ehrenberg 237-56 Oxford, New York Per.

(74).- Nelson, N.; Neumann, J. ;1972 J Biol Chem 247:1817-24

(75).- Bohme, H; Cramer, W,A. 1972 Biochim Biophys Acta 283:302-15

(76).- Witt. H.T. 1971 Quart Rev Biophys 4:365=77

(77).- Schiephake, W; Junge, W.;Witt, H.T.1968 Z. Naurforsch 23b:1571-78

(78).- Hauska,G.A, Mc Carty, R.E. Berzborn, R.J.; Racker.1971 J. Biol Chem 246:3524-31

(79).- Hauska, G.A. Trebst, A.; Drawel, W. 1973: Biochim Biophys Acta 305:632-41

(80).- Brand, J. Basynski, T.; Vrane, F.L.; Krogmann, D. W. 1972 J.Biol Chem 247:2814-19

(81).- Brand, J. ;
San Pietro, A. Mayne, B.C. 1972 Arch Biochem Biophys 152:426-28

(82).- Bran, J. ; San Pietro, A, 1973 Biochim Biophys Acta 325:255-65

(83).- Berg. S. Cipollo, D. Armstrong, B.,Krogmann, D.W.1973 Biochim Biophys acta 305:372-83

(84).- Berg, S; Doge S. Krogmann, J. W. Dilley, R.A.
ref 109

(85).- Amesz, J. 1973 Biochim Biophys Acta 301:35-51

(86).- Stiehl, H.H; Witt, H.T. 1969 Z. Naturforsch 24b:1588-98

(87).- Kohl, Dotl, Wood. P.M.1969 Plant Physiol 44:1439-45

(88).- Cramer, W.A.; Bohme, H. 1972 Biochim Biophys Acta 256:358-69

(89).- Ke, B. , Vernon, J. P. ; Chaney, T.H. 1972 Biochim Biophys Acta 256:345-57

(90).- Knaff, D.B.; Arnon, D. I. 1969 Proc Nat Acad Sci USA 63:963-69

(91).- Okayama, S.; Butler, W.L. 1972 Plant Physiol 49:769-74

(92).- Cramer, W. A; Butler, W. L. 1969 Biochim Biophys Acta 172:503=10

(93).- Amesz, J.; Van den Bos, P. Dirks, M.P. 1970 Biochim Biophys Acta 197:324-27

(94).- Radünz, A.; Berzborn, R. 1970, Z. Naturforsch 25b:412-19

(95).- Schliephake, W.; Junge., W. Witt, H.T. 1968 Z. Naturforsch 23b: 1571-78

(96).- Reinwald, E.; Stiehl, H.H.; Rumberg, B. 1968 Z. Naturforsch 23b 616-17

(97).- Cheniae, G.M. 1970 Ann Rev Plant Physiol 21:467=98

(98).- Renger, G. 1970 Z. Naturforsch 25b:966-71

(99).- Bennoun, P.Joliot, A. 1969 Biochim Biophys Acta 189:85-94

(100).- Izawa, S.; Heath, R.L.; Hind, G. 1969 Biochim Biophys Acta 180: 388-98

(101).- Yamashita, T.; Butler, W. L. 1968 Plant Phisyol 43:1978-86

(101).- Katoh, S.; San Pietro, A. 1967 Arch Biochem Biophys 122:144-52

(103).- Malkin,R. Bearden, A.J., 1971 Proc Nat Acad Sci USA 68:16-19

(104).- Giaquinta, R.T.; Dilley, R.A., Anderson, B.J. 1973 Biochem Biophys Res Comunn 52:1410-17

(105).- Braun, B.Z; Govindjee 1972 FEBS LETT 25:143-46

(106).- Selman , B.R.,; Bannister, T.T. 1971 Bochim Biophys Acta 253:428-3

(107).- Mc Carty, R.E.; Racker, E. 1966 Biookhaven Synm Biol 19:202-24

(108).- Dilley, R.A., 1968 Biochemestry 7:338=46

(109).- Selman, B.C.; Bannister, T.T.; Dilley R.A. 1973 Biochim Biophys Acta 292:566-81

(110).- Howell, S. H. Moudrianakis E.N. 1967 Proc Nat Acad Sci USA 58:126

(111).- Kannangara C. G.; Van Wy K.D; Menke W. 1970 Z. Naturforch 25b: 613-18

(112).- Schumway, L. K. Park, R.B. 1969 Exp Cell Res 56:29-32

(113).- Neuman, J. 1973 FEBS LETT 36:61-64

(114).- Hind, G. Jagendorf A.T. 1965 J. Biol Chem 240:3195-3201

(115).- Junge, W., Rumberg, B. Schroder, H.1970 Eur.J. Biochem 14:575-81

(116).- Saha, S.; Ouitrakul, R. Izawa Good. ,N.E. 1971 J Biol Chem 246: 3204-9

(117).- Trebst, A.; Reimer, S. 1973 Biochim Biophys Acta 305:129-39

(118).- Schwartz, M; 1971 Ann.Rev Plant Physiol 22:469-84

(119).- Rumberg, B. Schorder 1972 Naturwissenshcalften 254: 36

(120).- Clanton 1973 Ann Rev Plant Physiol 24:253-86

(121).- Calvin, M.J.; Bassham A. 1962 "The Photosynthesis Crbon Compounds" Benjamin New York.

(122).- Arnon, D.I. 1967 Phisiol Rev 47:317

(123).- Gibbs,M. 1967 Ann Rev Biochem 36:757

(124).- Hatch, M.D. Slack, C.R., 1966 Biochem J 101:103

(125).- Heldt, H.W; Werden, K.; Milovancev, M; Geller, G. 1973 Biochim Biophys ACta 314:224-241

(127).- Lilley, R. Mc C , Walker, D.A. 195 Plant Physiol 55:1087-92

(128).- Werden, K. Heldt, H.W.; Milovancey, M. 1975 Biochim Biophys Acta 396:276-292

(129).- Pedersen, T.A.;Kirk, M. ; Bassham, J.A. 1966 Plant Phisiol 19: 219-231

(130).- Stokes, D.M.; Walker, D.A. 1972 Biochem J 128:1147-57

(131).- Bahr, J.T.; Jensen, R.G. 1974 Plant Physiol 53:39-44

(132).- Paulsen,J.M.;Lane, M.D. 1966 Biochemestry 5:2350-57

(133).- Jensen, R.G. q 1971 Biochim Biophys Acta 234:360-70

(134).- Jensen, R.G.; Bahr,J.T. 1974 Procceding Third International Congress on Photosynthesis, Revohot, Israel Vol II pp 1411-20 Elsevier Publish, Co; Amsterdam.

(135).- Buchanan, B.B.; Schurmann, P. 1973 J Biol Chem 248:4956-64

(136).- Chu,D.K.; Bassham 1974 Plant Physiol 54:556-59

(137).- Bahr, J.T.; Jensen 1974b Arch Biochem Biophys 164:408-13

(138).- Ogren, W.L.; Bowes, G. 1971 Nature 230:159-60

(139).- Badger, M.R.; Andrews, T.J.; Osmond, C.B. 1974 Proceeding Third International Congress on Photosynthesis Vol. II pp 1421-29

(140).- Preiss, J.M. ;Biggs, L; Greenberg, E. 1967 J Biol Chem 242:2292-2294.

(141).- Garnier, R.V.; Latzko, E. 1971 In Procceding II international Congress on Photosynthesis Research Vol III pp 1839-45

(142).- Baier, D. ; Latzko, 1975 Biochim Biophys Acta 396:141-48

(143).- Anderson, L. E. 1974 Biochem Biophys Res Commun 59:907-13

(144).- Schurmann, P; Buchanan 1975 Biochim Biophys Acta 376:189-92

(145).- Zelitch, Israel Photosynthesis and Photorespiration and Plan Productivity Academic Press 1977 New York and London

(146).- Bahr, R.; Arntzen, C.J. 1969 Plant Physiol 44:591

(147).- Lichtenthaler, H.K. ; Sprey, B. 1966; Z. Naturforsch 21b:690

(148).- Tewari, K.K. 1971 Ann Rev Plant Physiol 22:141-73

(149).- Wong, F.:Wildman, S.G. 1972 Biochim Biophys Acta 295:5

(150),- Spencer, D.; Whitfeld, P.R. 1967 Biochem Biophys Res Commun 28:538

(151).- Ingle, J. 1968 Plant Physiol 43:1448

(152 .- Lyttleton, J.W. 1968 Biochim Biophys Acta 154:145

(153).- Dyer, T.A.;Leech, R.M. 1968 Biochem J. 106:689

(154).- Holdsworth, R.H. 1971 J Cell Biol 51:199

(155).- Menke,W 1966 Biochemistry of Chloroplast Goodwin, T.W. 1966 New York and London

(156).- Rosado-Albeiro, J.Weier, T ; Skocking, C.R. 1968 Plant Physiol 43 1325

(157).- Laetsch, W.M. 1971 In Photosynthesis and Photorespiration (M.D. Hatch; C.B. Osmond; R.D. Slayter) pp 323 Willey New York

(158).- Bisalputra, T.; Downtown, W.J.S. ; Treguna, E.B. 1969 Can J Bot 47:15

(159).- Hilliard, J. H.; West, S.H. 1971 Planta 99:352

(160).-Gracen, V.E.; Hilliard, I.H. Brown, R.H.; West S.H. 1972 Planta 107:189

(161).- Taylor, A.O.; Craig, A.S. 1971 Plant Physiol 47:719

(162).- Chollet, R. 1972 Ph. D. Thesis University of Illinois Ref. : Arntzen, Charles, J. Britais Jean Marie. Bioenergetics of Photosynthesis Godvindjee, Academic Press in Cell Biology 1975 pp 51-113

(163).- Bassham, J. A. ; Calvin, M. 1957 The Path of Carbon in Photosyn thesis Englewood pp 104

(164).- Lorimer, G.H.; Andrews, T.J.; Tolbert; N.E. 1973 Biochemestry 12:18-23

(165).- Tolbert, N.E. 1971 Ann Rev Plant Physiol 22:45

(166).- Bjorkman, O.; Boordman, N.K. Anderson, J.M.; Thorne, S.W.; Goodchild, D.J. ; Pyolitis, N.A 1972 Carnegie Inst Yeark Book 71:115

(167).- Letsch, W. M.; Price, I. 1969 Amer J Bot 56:77

(168).- Crookston, R.; Moss, D. 1970 Plant Physiol 56:564-67

(169).- Black, C.C. ; Goldstein; L.D. ;Ray, T.B.; Kestler, D.P.; Mayne B.C. pp 113-139 CO_2 Metabolism and Plant Productivity 1976 University Park Press.

(170).- Plack, C.C. 1973 Ann Rev Plant Physiol 24:253-86

(171).- Laetsch, W.M. 1969 Progress in Photosynthesis Research Vol I pp 36-46

(172).- Kortschak, H.P. ; Hartt, C.E; Burr, G.O. (1965) Plant Physiol

(173).- Downtown, W.J.S. 1971 Chloroplsts and Mitochondria of bundle sheat cells in relation to C-4 Photosynthesis In.M.D. Hatch C,O. Osmond and R.O. Stalyer Photosynthesis and Photorespi ration pp 5419-425 Wiley Interscience , New York.

(174).- Hatch, M.D.; Salck C.R. 1970 Progress in Phytochemistry pp 35-106 Wiley Interscience London.

(175).- Gutierrez.M.R. ; Kanai, S.C. ; Huber, S.B.; Ku; Edwards G.E. 1974b Z. Pflanzenphysiol 72:305 -319

(176).- Kagawa, T; Hatch 1974a Biochem Biophys Res Commun 59:1326-1332

(177).- Hatch, M.D.; Kagawa, D.T. ; Craig 1975 Aus J. Plant Physiol 2:111-128

(178).- Hatch, M.D.; Kagawa, D.T. 1975 Archives of Biochemestry and Biophysics 167:687-696

(179).- Hatch, M.D. The C-4 Photosynthesis Mechanism and Function pp-59-81 CO_2 mtabolism and Plant Productivity Burris, and Black, C.C. University academic press.

(180).- Hodge, A. J.; Mc Lean, J. D.; Mercer, F.V. (1955) Biophyis Biochem Cytol 1:605

(181).- Slack, C.R; Hatch.M.D. Goodchild D.J. 1969 Biochem J 114:489-498

(181).- Bjorkman ,O; Gauhl, E. Planta 88:197-203 1969.

(183a).-Epstein, E. Hageen, C.E.Plant Physiol 27: 457-474 (1952).

(183b).-Epstein, E. Nature 212: 1324-27 1963.

(184).- Laties, G.G., Honda, S.I. Hongladarom J. exp Bot 17: 460-472,1966

(185).- Nissen, M. Aronoff Fed. Proc. 25:736; 1966.

(186).- Diamond, J. M y Wright E.M. Ann Rev Physiol 31: 581-646 1966.

(187).- Eisemman, J.M. " Transport and Metabolism, Academic Press, New York pp. 163-179 1961.

(188).- Koshland, D.E. Jr. The EnzymesVol. I Academic Press New York,1970

(189).- Kortschak, H.P. Hart, C.E. Burr, G.O. Plant Physiol 40:209-213 1965.

(190).- Hatch, M.D. Slack, C.R. Biochem J. 101: 103-111 (1966).

(191).- Hatch, M.D. Biochem J. 125: 425-432 ,1971a.

(192).- Johnson, H.S. Hatch, M.D. , Biochem J. 119: 273-280 (1970).

(193).- Galmiche J.M. Plant Physiol 51: 512-519 ,1973

(194).- Hatch, M.D., CO_2 Metabolism and Plant Productivity R.H. Burris and C.C. Black. University Park, Press Baltimore.

(195).- Edwards, D.E. , Black C.C. Photosynthesis and Photorespiration (53-168) New York, Wiley Interscience, 1971.

(196).- Coombs, J. Baldry C.W. Bucke, C. Planta 11: 95-107.

(197).- Osmond, C.B. Troughton, J.H. Goodchild D.J. .Z.Pflanzenphysiol 61: 218-273 (1969).

(198).- Farineau J. In Photosynthesis and Photorespiración pp.202-210 New York Wiley -Interscience. 1971.

(199).- Goodwin Biochemestry of Chloroplast Vol I Academic Press, 1966 New York and London.

(200).- Haberland, G; Physiological Plant Anatomy , 1884.

(201).- Rhoades y Carvahlo, Torrey Botan Club 71: 335-346, 1944.

(202).- Farineau . Ver ref. 173 pp. 202-210 del mismo libro.

(203).- Tyree, M.T.; J. Theoet Biol 26: 181-241. 1970.

(204).- Ku, S.B.; Gutierrez M. Edwards G.E. Planta 119: 267-278

(205).- Berry, J.A.; Downton, W.J.S. Tregunna. E.B. Can J. Botany 777-786 (1970).

(206).- Pitman . Australian , J. Biol Sci. 18: 10-24 1965

(207).- Weast R.C. Handbook of Chemestry and Physics 49 th ed. Cleveland: Chemical Rabber, Company , 1963.

(208).- Osmond, C.B. Australian J. Biol Sci. 24: 159-163 (1971a).

(209).- Chen, T. M. ; Brown. R.H.; Black C.C. Plant Physiol 47: 199-203. -203 (1971).

(210).- Huber; S.C. ; Edwards. G.E. Plant Physiol 55: 835-844

(211).- Heber, U. Krause, G.H. Ver ref. 175 ppg. 218-225 .

(212).- Heldt , Proc, 3er. Intern. Congress on Photosynthesis Research 1975.

(213).- Chapell, J.B. Haarofff, K.N. Biochemistry of Mitochondria New York, Academic Press, 1967.

(214).- Palmer J.M. Hall, D.O. Preogress in Biophysics and Molecular Biology Vol. 24 pp. 125-176 New York Pergamen Press, 1972.

(215).- Chapman, E,A,; Osmond, C. B. Plant Physiol 53: 893-898,1974.

(216).- Karpilov, Y. Z. Proc. Model Inst. Vegetable Res. 11: 1-34,1969

(217).- Homan, P.H.; Schmid, G.H. Plant Physiol 42: 2619-32 , 1967

(218).- Ku, S.B; Gutierrez, M. Kanai, R. Edwards , Z. Pflanzenphysiol 72: 320-337 (1974b).

(219).- Osmond, C.B.; Allaway, W.G.; Plant Physiol 1: 503-511 1972

(220).- Heber, U.; Hallier, U.W.; Hudson, 1967 .Z. Naturforsch,22b 1200.

(221).- Heldt, H.W. Sauer, F. Biochim Biophys Acta 234-83 , 1971.

(222),- Heldt, H.W.; Rapley L. FEBS LETT 7: 139 , 1970.

IMPRESO Y HECHO EN MEXICO
Printed and made in México
Talleres de Editorial Quetzalcóatl, S. A.
Medicina No. 37-local 1 y 2
Col. Copilco Universidad
México 20, D. F.
Tels: 48-61-80 48-58-56