

## Tesis de Licenciatura

# Transporte de agua a través de vacuolas aisladas de la raíz almacenadora de remolacha (Beta vulgaris L)

Sutka, Moira Romina

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Sutka, Moira Romina. (). Transporte de agua a través de vacuolas aisladas de la raíz almacenadora de remolacha (Beta vulgaris L). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000663\\_Sutka](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000663_Sutka)

#### Cita tipo Chicago:

Sutka, Moira Romina. "Transporte de agua a través de vacuolas aisladas de la raíz almacenadora de remolacha (Beta vulgaris L)". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000663\\_Sutka](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000663_Sutka)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

# UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura



**Transporte de agua a través de vacuolas aisladas de**

**la raíz almacenadora de remolacha**

**(*Beta vulgaris* L)**

Autora: Moira Romina Sutka

Director: Dra. Gabriela Amodeo

Codirector: Dr. Mario Parisi

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biomembranas,  
Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA

Marzo de 1999

## Resumen

Se estudió el movimiento de agua en cortes transversales (pasaje axial) y longitudinales (pasaje radial) de raíz de remolacha (*Beta vulgaris*). Se realizaron experimentos con una solución extracto (contenido protoplasmático y extraprotoplasmático de la raíz) y una solución reducida a manitol de igual osmolaridad para garantizar que no hubiera cambios en la presión de turgencia de las células del tejido. El flujo de agua axial fue significativamente mayor al radial y no hubo diferencias en la utilización de una u otra solución. El flujo de agua radial respondió osmóticamente y fue inhibido por agentes mercuriales lo que sugiere que las acuaporinas estarían involucradas en el transporte de agua transcelular.

Decidimos entonces estudiar este transporte a nivel subcelular para lo cual se optimizó una técnica de aislamiento mecánico de vacuolas. Se puso a punto un sistema de perfusión controlada para inducir cambios en la tonicidad del medio. Los posibles cambios de volumen de una única célula aislada fueron seguidos a través del tiempo mediante videomicroscopía.

Las vacuolas respondieron a cambios de osmolaridad, tanto al crearse gradientes hiper (0,2M) como hiposmóticos (0,3M) disminuyendo o aumentando su volumen respectivamente con respecto a la condición inicial. La serie experimental realizada con  $\text{HgCl}_2$  reveló una inhibición del movimiento de agua con respecto al control ( $p < 0.001$ ) (que tuvo un valor de permeabilidad del orden de  $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ ). Estas evidencias preliminares indicarían que las vacuolas utilizan acuaporinas para regular su volumen.

La técnica desarrollada aporta una importante herramienta para el estudio de transporte a través de membranas celulares

**A Mamá, Papá, Esteban, Diego y Francisco.**

# Indice

<b>Indice</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Células vegetales y transporte de agua e iones.....	3
Sistema de transporte de solutos en la vacuola.....	5
Transporte activo secundario.....	5
Como es el transporte de agua a través de membranas biológicas.....	8
Permeabilidad al agua y acuaporinas.....	9
<b>Objetivos</b> .....	13
<b>Materiales y Métodos</b> .....	15
Material vegetal.....	16
Mediciones de flujo de agua en secciones de tejido de raíz de <i>Beta vulgaris</i> .....	16
Soluciones.....	17
Cambio de volumen en vacuolas aisladas.....	18
Extracción de vacuolas de células de raíz almacenadora de remolacha.....	18
Sistema de perfusión.....	19
Observación de vacuolas.....	20
Estudios de variación de volumen.....	21
Estudios de inhibición de los canales para agua.....	21
Cálculo de la permeabilidad al agua.....	21
Análisis estadístico.....	22
<b>Resultados y Discusión</b> .....	23
Flujos de agua en secciones de tejido.....	24
Vía radial vs vía axial.....	24
Movimientos de agua axial.....	25
Movimientos de agua radial.....	27
Vacuolas aisladas.....	30
Obtención de vacuolas aisladas de <i>Beta vulgaris</i> : optimización de la técnica.....	30
Cálculo del volumen de vacuolas aisladas en condiciones iniciales.....	31
Efecto de los cambios de osmolaridad: Gradiente hipotónico.....	31
Efecto de los cambios de osmolaridad: Gradiente hipertónico.....	33
Efecto del HgCl <sub>2</sub> sobre el volumen relativo de las vacuolas.....	35
<b>Conclusiones</b> .....	37
<b>Publicaciones</b> .....	40
<b>Bibliografía</b> .....	41

## **Introducción**



# INTRODUCCION

Los vegetales dependen, en gran medida, del aprovisionamiento de agua para su crecimiento y desarrollo y poseen además un estricto control del balance hídrico que les permite garantizar su supervivencia. En la planta, el agua asciende por el xilema desde la raíz hasta las hojas movilizada por el gradiente creado por la corriente transpiratoria. Al abandonar el xilema puede seguir dos rutas: una apoplástica involucrando sólo las paredes celulares y otra simplástica y transcelular que involucra tanto el citoplasma como las vacuolas (Chrispeels *et al.*, 1994). Se han realizado numerosos estudios para tratar de comprender los mecanismos fisiológicos y biofísicos que rigen las relaciones de agua en la planta. Los procesos fisiológicos investigados abarcan desde el transporte de agua a larga distancia hasta la expansión celular y osmorregulación, todos procesos que requieren el movimiento de agua a través de las membranas celulares.

## **Células vegetales y transporte de agua e iones**

La célula vegetal puede distinguirse de las demás células eucariotas por la presencia de una pared celular rígida (básicamente compuesta de celulosa), cloroplastos y una gran vacuola central cuyo tamaño varía dependiendo del estado de desarrollo de la planta.

Cuando las células de la planta están recién formadas contienen cientos de provacuolas pequeñas las cuales surgen por brotación y fusión de vesículas de la cara trans del aparato de Golgi (Marty *et al.*, 1978). A medida que la célula se expande las provacuolas se van fusionando gradualmente para formar la gran vacuola central que puede llegar a ocupar más del 90% del volumen total de la célula.

Uno de los papeles importantes de las vacuolas es incrementar el tamaño celular ya que a diferencia de las células animales lo hacen por medio de la entrada de agua, proceso que resulta más económico energéticamente a diferencia de la síntesis de proteínas.

Las vacuolas han sido ampliamente estudiadas y si bien en un principio la mayor dificultad en su obtención era debida a la rigidez de la pared celular, fueron

desarrollándose métodos que permitieron aislarlas para su posterior estudio y caracterización. Así se ha llegado a conocer la composición de su contenido, las propiedades de su membrana y sus distintos aspectos funcionales que varían dependiendo del tipo celular, órgano y estado de desarrollo y que también se encuentran regulados. Algunos de los procesos en los cuales están involucradas son:

- ❖ Compartimiento de reserva: las vacuolas pueden almacenar azúcares, polisacáridos, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos y proteínas. Todos estos metabolitos primarios pueden ser retirados de la organela y usarse para los distintos caminos metabólicos.
- ❖ Compartimientos líticos: se las asemeja con los lisosomas animales ya que la composición de enzimas hidrolíticas es casi idéntica a la que estos poseen (Boller *et al.*, 1993).
- ❖ Sustancias tóxicas: por ser organismos sésiles las plantas no pueden escapar de la exposición a sustancias tóxicas y entonces poseen un sistema excretor para la eliminación de las mismas. Pueden acumular sodio y metales pesados como por ejemplo cadmio.
- ❖ pH y homeostasis iónica: las reacciones en el citosol son extremadamente sensibles a cambios en el pH y fuerza iónica. El pH de las vacuolas de las plantas superiores varía generalmente entre 5 y 5.5 pero puede llegar a valores inferiores como por ejemplo en cítricos (2.5) y en el alga *Desmarestia* (0.6) (McClintock *et al.*, 1982). En principio hay dos bombas de protones en el tonoplasto que regulan el pH citosólico (**Figura 1**).
- ❖ Defensa contra patógenos y herbívoros: las células de las plantas generalmente acumulan en las vacuolas grandes cantidades de compuestos fenólicos, glicósidos cianogénicos o alcaloides que utilizan para alejar insectos herbívoros debido a los sabores de estas sustancias. También poseen una enzima, la quitinasa, que quiebra la pared celular de hongos (Boller *et al.*, 1984).



- ❖ **Pigmentación:** muchas vacuolas acumulan flavonoides solubles en agua llamados antocianinas que dan una coloración que varía desde el naranja hasta el púrpura.

La vacuola se considera entonces como un compartimento multifuncional y el transporte a través de su membrana es fundamental en todos los procesos mediados por las mismas.

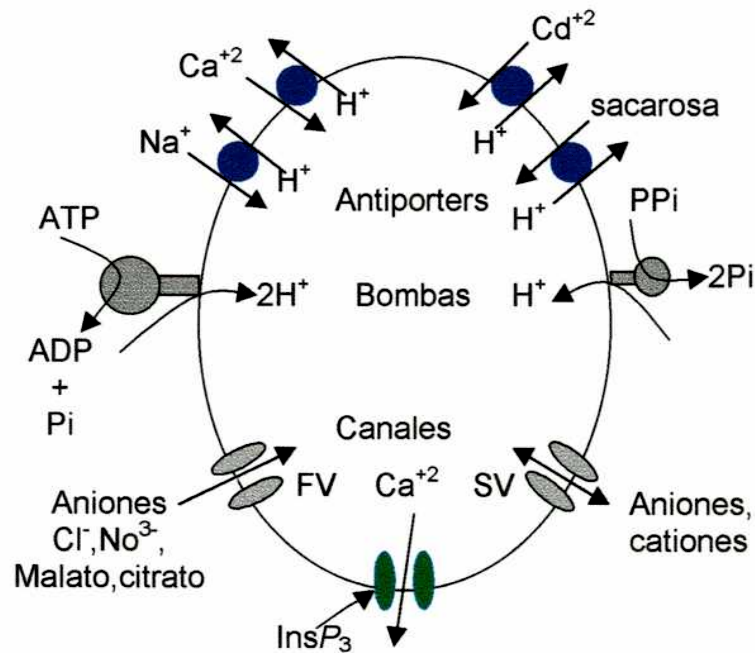
### **Sistemas de transporte de solutos en la vacuola**

La entrada de una gran variedad de solutos a las vacuolas está manejada por un gradiente electroquímico ( $\Delta\mu H^+$ ) a través del tonoplasto (**Figura 1**). Este  $\Delta\mu H^+$  es generado por dos bombas de protones: la  $H^+$ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) y la  $H^+$ -pirofosfatasa vacuolar (V-PPasa) (Rea *et al.*, 1987). Se han sugerido varias funciones para la V-PPasa, como establecer el gradiente de pH a través del tonoplasto regulando el pH citosólico, estar involucrada en el mecanismo de transporte de  $K^+$  (Davies *et al.*, 1992) y asociada con la regulación de turgencia (Rea *et al.*, 1987). El rol de la V-ATPasa, en cambio, en manejar el transporte vacuolar ha sido ampliamente aceptado.

#### *Transporte activo secundario*

**Antiporters:** varios antiporters han sido demostrados en el tonoplasto los cuales utilizan el gradiente de pH para manejar la entrada de  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  y azúcares por intercambio con protones. El antiporter  $Ca^{+2}/H^+$  es muy activo en la mayoría de las plantas y se ha evidenciado que el intercambio es electroneutro permitiendo que el  $Ca^{+2}$  se acumule contra un potencial de membrana positivo (Blackford *et al.*, 1990).

Si bien el intercambiador  $Na^+/H^+$  ha sido documentado en una serie de especies (Barkla *et al.*, 1994), es abundante en las plantas halófitas debido a que la acumulación de sodio en la vacuola es uno de los principales medios por el cual las plantas tolerantes a la sal evitan el efecto negativo de la salinidad.



**Figura 1: Sistemas de transporte en la membrana vacuolar de las células de las plantas.** Dos bombas electrogénicas manejadas por ATP y pirofosfato (PPI) generan el gradiente electroquímico para el transporte secundario de otros solutos hacia el interior de la vacuola. SV, slow activated vacuolar channels; FV, fast activated channels;  $\text{InsP}_3$ , inositol trifosfato. (adaptado de Taiz, 1992)

Se cree que la acumulación de azúcares en muchas células de plantas se debe a la acción conjunta de transportadores de membrana plasmática y tonoplasto. De todas maneras, en las células especializadas para el almacenamiento de azúcares como las de *Beta vulgaris*, la entrada a la vacuola se da principalmente por el antiporter sacarosa/ $\text{H}^+$  del tonoplasto (Briskin *et al.*, 1985).

### Canales

La técnica de patch-clamp ha permitido la caracterización de numerosos canales en las membranas de las plantas. Se han identificado dos tipos principales de canales regulados por voltaje: canales del tipo SV ("slow activated vacuolar channels") y los del tipo FV ("fast activated vacuolar channels"). Los primeros tienen una selectividad iónica muy baja (Hedrich *et al.*, 1986, 1987; Coyaudo *et al.*, 1987; Amodeo *et al.*, 1994) que parece variar en los diferentes tejidos (Hedrich *et*

*al.*, 1988) y se activan con concentraciones relativamente altas de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático ( $>0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Los del tipo de FV se activan con voltajes positivos (Pantoja *et al.*, 1992) y bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático ( $<0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Este canal funciona durante el bombeo activo de protones y probablemente constituye la principal vía de entrada para aniones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , malato y citrato. Ambos canales son relativamente inespecíficos permitiendo el paso de cationes y aniones a través de ellos. Sin embargo, la permeabilidad a los cationes es entre 2 y 10 veces mayor que para los aniones (Hedrich *et al.*, 1989).

El calcio juega un importante papel en procesos de acoplamiento estímulo-respuesta. Por el tamaño de la vacuola y la concentración de este ion en su interior se argumenta que esta organela sirve como fuente para el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Se han descrito dos tipos de canales selectivos para  $\text{Ca}^{+2}$  en el tonoplasto: los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje (Pantoja *et al.*, 1992) y los activados por agonistas. Estos últimos requieren la participación de moléculas marcadoras intermediarias como CaM, inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) o  $\text{ADP}_c$  (este no se ha encontrado todavía en células de plantas).

Canales selectivos para malato: el malato se acumula en las vacuolas de la mayoría de las plantas, y tiene múltiples funciones, es una forma de almacenar  $\text{CO}_2$ , como balance de cargas y como osmolito involucrado en el mantenimiento de la turgencia celular, también es importante en el mantenimiento del pH citoplasmático en las plantas tipo CAM.

En las vacuolas, no solamente los canales serían los responsables del flujo iónico sino que también surgen evidencias de otros sistemas como un cotransporte de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  que involucra la  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa (Davies *et al.*, 1992). Si bien todos estos transportadores iónicos están muy bien estudiados no hay evidencia concreta de que estén acoplados al transporte de agua.



*al.*, 1988) y se activan con concentraciones relativamente altas de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático ( $>0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Los del tipo de FV se activan con voltajes positivos (Pantoja *et al.*, 1992) y bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático ( $<0,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Este canal funciona durante el bombeo activo de protones y probablemente constituye la principal vía de entrada para aniones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , malato y citrato. Ambos canales son relativamente inespecíficos permitiendo el paso de cationes y aniones a través de ellos. Sin embargo, la permeabilidad a los cationes es entre 2 y 10 veces mayor que para los aniones (Hedrich *et al.*, 1989).

El calcio juega un importante papel en procesos de acoplamiento estímulo-respuesta. Por el tamaño de la vacuola y la concentración de este ion en su interior se argumenta que esta organela sirve como fuente para el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  citoplasmático. Se han descrito dos tipos de canales selectivos para  $\text{Ca}^{+2}$  en el tonoplasto: los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje (Pantoja *et al.*, 1992) y los activados por agonistas. Estos últimos requieren la participación de moléculas marcadoras intermediarias como CaM, inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) o  $\text{ADP}_c$  (este no se ha encontrado todavía en células de plantas).

Canales selectivos para malato: el malato se acumula en las vacuolas de la mayoría de las plantas, y tiene múltiples funciones, es una forma de almacenar  $\text{CO}_2$ , como balance de cargas y como osmolito involucrado en el mantenimiento de la turgencia celular, también es importante en el mantenimiento del pH citoplasmático en las plantas tipo CAM.

En las vacuolas, no solamente los canales serían los responsables del flujo iónico sino que también surgen evidencias de otros sistemas como un cotransporte de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  que involucra la  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa (Davies *et al.*, 1992). Si bien todos estos transportadores iónicos están muy bien estudiados no hay evidencia concreta de que estén acoplados al transporte de agua.



## Cómo es el transporte de agua a través de membranas biológicas

La mayor cantidad de agua en las células se encuentra en forma libre o unida a la superficie de macromoléculas u organelas.

Desde el trabajo de Hodgkin y Keynes (Hodgkin *et al.*, 1953) quienes demostraron que los iones  $K^+$  intracelular tienen un coeficiente de difusión y movilidad igual al encontrado en una solución libre se considera que el compartimento celular puede estudiarse como una solución cuando nos referimos al agua y pequeños iones inorgánicos ( $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $Na^+$ ).

Las células pueden ser hiperosmolares con respecto al medio circundante (en general otras células) y esto puede explicarse ya que la hiperosmolaridad es el resultado de dos tipos de mecanismos de transporte: uno pasivo y otro activo (acoplado al transporte de iones).

A principios de este siglo Nernst estableció el término de membrana semipermeable (Nernst *et al.*, 1908) cuando postuló que el agua, contrariamente a los iones, podía atravesar libremente una membrana. Hace algunos años se observó en ciertos tejidos un alto coeficiente de permeabilidad osmótica (que considera el agua que atraviesa la membrana en respuesta a un gradiente osmótico) lo que hacía pensar en la existencia de una vía alternativa específica para el pasaje de agua a través de la membrana independiente de la bicapa lipídica (Parisi *et al.*, 1985). Preston y colaboradores describieron el primer canal específico para el pasaje de agua en 1992 observando un aumento notable de la permeabilidad al agua al expresar el ARNm de la proteína CHIP28 de eritrocitos humanos en oocitos de *Xenopus laevis* (Preston *et al.*, 1992).

Actualmente se considera que existen varias vías para el pasaje de agua (**Figura 2**):

1. Transporte pasivo a través de la membrana que se produce vía bicapa lipídica.
2. Proteínas específicas descritas que reciben el nombre de acuaporinas (Agre *et al.*, 1993).
3. Transporte activo de agua, que es un transporte acoplado al flujo de iones a través de la membrana. Como ejemplo de cotransportadores de agua podrían

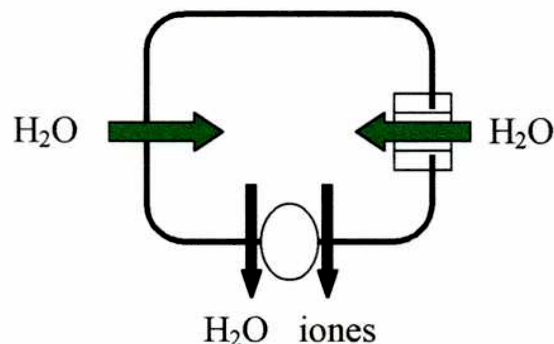
mencionarse  $K^+/Cl^-/H_2O$  (Lauf *et al.*, 1985),  $Na^+/K^+/2Cl^-/H_2O$  (Lang *et al.*, 1993) y  $Na^+$ /solutos orgánicos/ $H_2O$  (Loo *et al.*, 1996).

De lo expuesto, podemos entonces concluir que si bien la composición lipídica de la bicapa ofrece posibilidades para variar la permeabilidad al agua, el mayor cambio en el flujo se debe al número de canales insertos en la membrana y a sus posibles mecanismos de regulación.

### Permeabilidad al agua y acuaporinas

El coeficiente de permeabilidad difusional ( $P_d$ ) describe el flujo de moléculas de agua que se da a través de una membrana por difusión en ausencia de una fuerza impulsora (Finkelstein *et al.*, 1987).

El coeficiente de permeabilidad osmótica ( $P_f$ ), en cambio, describe el movimiento de agua en respuesta a un gradiente de presión osmótica.



**Figura 2: Vías para el pasaje de agua a través de la membrana.** En verde, los mecanismos pasivos: difusión a través de la bicapa lipídica y proteínas específicas. En negro, mecanismo activo: transporte acoplado al flujo de iones.

El  $P_d$  estima de alguna manera la capacidad de una membrana para el pasaje de agua y cuando se lo compara con el  $P_f$  ( $\sigma = P_f / P_d$ ) provee información acerca de los mecanismos biofísicos de este movimiento.

La fase lipídica de la membrana fue considerada desde siempre como la principal vía de pasaje de agua en las células. El transporte de agua a través de este camino está basado en la solubilidad y difusión de las moléculas de agua en los lípidos de la membrana y se caracteriza por tener iguales valores de  $P_d$  y  $P_f$  y una alta energía de activación de Arrhenius ( $E_a=14-16 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) (Haines *et al.*, (1994).

En la década del cincuenta ya existía la teoría acerca de la presencia de "poros acuosos transmembrana" y se obtuvo la primera evidencia experimental cuando Koefoed-Johnsen y Paganelli-Solomon encontraron un cociente  $P_f/P_d$  mayor a 1 trabajando con eritrocitos humanos. A la vez este proceso de transporte también mostraba una baja  $E_a$  (menor a  $5 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) sugiriendo la existencia de un flujo masivo a través del poro si este existiera (Macey *et al.*, 1997).

Ya en la década del sesenta se discutía acerca de la existencia de estos mismos poros en las membranas de plantas (Dainty *et al.*, 1963; Ray *et al.*, 1960) pero los experimentos realizados en ese momento, mediciones de  $\sigma$  y  $E_a$ , demostraron lo contrario posiblemente por los métodos utilizados y por la incorrecta interpretación de los resultados, que eran entonces los primeros en este tema.

Actualmente dos de los criterios que se utilizan para definir funcionalmente estos canales son el  $\sigma (P_f / P_d) > 1$  (en general 5 ó 6) y la baja  $E_a$ .

Recién en 1992 (Preston *et al.*, 1992) fue descubierto el primer canal específico para el pasaje de agua a través de la membrana. A partir de entonces se han buscado intensamente en otros sistemas, encontrándose hasta hoy en vertebrados, plantas superiores, insectos y bacterias (Preston *et al.*, 1992, Maurel *et al.*, 1993; Le Cahérec *et al.* 1996; Calamita *et al.*, 1995). Estas proteínas recibieron el nombre de acuaporinas (Agre *et al.*, 1993) y forman parte de la familia de canales transmembrana MIP (del inglés, Membrane Intrinsic Protein). En los vegetales pueden distinguirse tres subclases dentro de las MIP. Las dos primeras contienen a las TIP (del inglés: Tonoplast Intrinsic Protein) y a las PIP (del inglés: Plasma Membrane Intrinsic Protein) encontradas en tonoplasto y membrana plasmática respectivamente. La tercera clase está formada por la



nodulina 26 que se expresa en la membrana peribacteroidal de los nódulos simbiotes que se forman en la raíz de las leguminosas en asociación con la bacteria *Rhizobium* (Fortin *et al.*, 1987). De todas formas no se han encontrado homólogas de esta última en plantas no leguminosas.

Todas las acuaporinas conocidas tienen un peso molecular que varía entre 25 y 30 KDa aproximadamente (Verkman *et al.*, 1996). Su secuencia aminoacídica contiene residuos altamente conservados como por ejemplo el motivo NPA. Los extremos carboxi y amino terminal se encuentran del lado citoplasmático (Smith *et al.*, 1991).

El pasaje de agua dentro del canal es manejado pasivamente por un gradiente osmótico. La baja energía de activación ( $3.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) para el transporte de agua mediado por acuaporinas sugiere que el agua atraviesa el poro en hilera (Jung *et al.*, 1994). Estas proteínas forman un poro muy estrecho que solo permite el pasaje de moléculas de agua excluyendo el pasaje de iones u otros metabolitos pequeños. Se supone, que dentro del canal el agua interacciona con grupos polares, lo que hace razonable pensar que junto con la limitación del tamaño esto podría restringir la permeabilidad a los iones y moléculas grandes. Una excepción a la regla de selectividad ha sido demostrada por la proteína homóloga a la de bacteria Glpf que transporta glicerol pero no agua (Maurel *et al.*, 1994).

Los compuestos mercuriales se han usado ampliamente como inhibidores de la capacidad de las acuaporinas para transportar agua, tanto en animales (Preston *et al.*, 1991) como en plantas (Daniels *et al.*, 1996). Esto se debe a que el  $\text{HgCl}_2$  interacciona con residuos específicos de cisteína (Cys 189, en la acuaporina 1 de la membrana de eritrocitos y Cys 116-118, en la  $\gamma$  y  $\delta$  TIP de *Arabidopsis*). Una serie de mutaciones puntuales dirigidas sobre la Cys 189 mostraron que residuos de gran tamaño obstruyen el flujo osmótico de agua mientras que los pequeños no lo hacen, indicando que este sitio podría corresponder a un 'estrechamiento' del poro acuoso que es crítico para mantener el plegado de la proteína y tránsito a través del Golgi (Preston *et al.*, 1993). Los



efectos producidos por el  $\text{HgCl}_2$  son reversibles por tratamientos con agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol.

Particularmente en vegetales las acuaporinas han sido identificadas tanto en la membrana plasmática como en la de la vacuola (tonoplasto) (Maurel *et al.*, 1993) y pueden expresarse en determinados tejidos o inducirse frente a alguna condición fisiológica (Maurel *et al.*, 1997; Hejnowicz *et al.*, 1996).

En *Beta vulgaris* se han encontrado acuaporinas (TIPs) en el tonoplasto de células parenquimáticas de raíz (Marty-Mazars *et al.*, 1995).

Hasta el momento, el estudio de las acuaporinas se ha enfocado fundamentalmente a través de su caracterización molecular, estructural y estudios acerca de su localización. Son muy pocos los trabajos de la literatura referidos a su función. Por ejemplo, Maggio *et al.* encontraron en tomate una reducción reversible de la conductividad hidráulica después del tratamiento con agentes mercuriales (Maggio *et al.*, 1995) demostrando su participación en el movimiento de agua a través de la raíz. Por otro lado, Kaldenhoff *et al.* construyeron protoplastos transgénicos de *Arabidopsis* con el antisense de la acuaporina PIP1 los cuales presentaron un cambio de volumen menos rápido que el control (Kaldenhoff *et al.*, 1995).

Como vimos las vacuolas están involucradas en la osmoregulación y almacenamiento de sustancias y metabolitos polares cuya acumulación aumenta la presión osmótica regulando así la turgencia celular (Wink *et al.*, 1993). La vacuola resulta entonces un modelo ideal para estudiar los mecanismos que determinan el movimiento de agua.

## **Objetivos**

## OBJETIVOS

Ingresé al Laboratorio de Biomembranas para desarrollar mi tesis de Licenciatura participando en el proyecto que estudia el movimiento de agua en sistemas vegetales y el papel que juegan las acuaporinas. Esto permitió familiarizarme con las técnicas que se emplean en el laboratorio, participara en responder algunos interrogantes y trabajara en la puesta a punto de una técnica para medir el cambio de volumen en vacuolas aisladas.

Básicamente los objetivos se ampliaron y complementaron a los originalmente propuestos en mi plan de Tesis a:

### *En el nivel de la raíz de Beta vulgaris*

1. Estudiar los movimientos de agua en secciones de raíces sometidos a gradientes hidrostáticos y osmóticos en cortes axiales y radiales utilizando una solución extracto.
2. Comparar el efecto de una solución reducida a manitol e iones con la utilizada en las mediciones anteriores también para cortes axiales y radiales y para gradientes hidrostáticos y osmóticos.

### *En el nivel subcelular*

1. Profundizar nuestros estudios del movimiento de agua a nivel subcelular en vacuolas aisladas de la raíz almacenadora de la remolacha (*Beta vulgaris*).
2. Optimizar la técnica de aislamiento de vacuolas para la medición de cambios de volumen a través de videomicroscopía.
3. Estudiar la respuesta del cambio de volumen de vacuolas en función del tiempo frente a cambios hiper e hipotónicos inducidos en el medio.
4. Analizar si la respuesta obtenida es inhibible por agentes mercuriales conocidos como inhibidores de acuaporinas.

## **Materiales y Métodos**



# MATERIALES Y METODOS

## 1. Material vegetal

Las remolachas (*Beta vulgaris* L.) fueron crecidas a campo (Pantaleone Hnos, Pilar, Pcia de Buenos Aires) cosechadas luego de 90 días, transportadas al laboratorio y mantenidas en condiciones de humedad con un suelo fértil comercial apropiado hasta la realización de los experimentos. En general, el material recolectado era utilizado dentro de la semana.

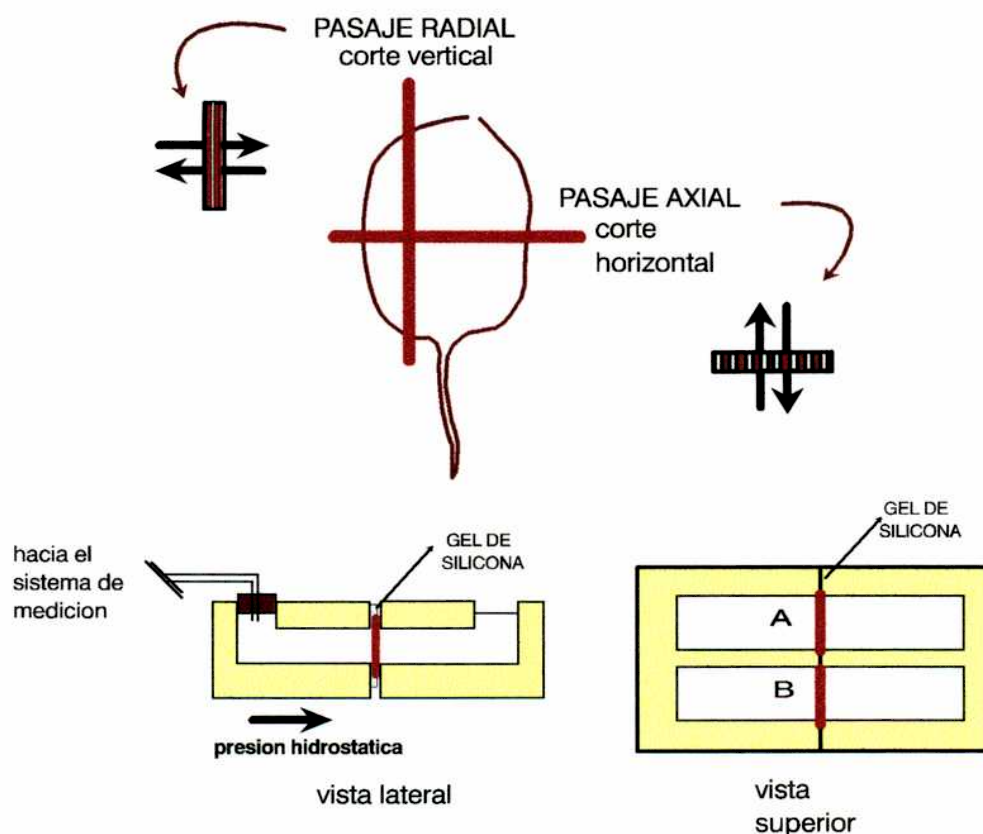
## 2. Mediciones de flujo de agua en secciones de tejido de raíz de *Beta vulgaris*

Para los experimentos de flujo de agua, se separaba la raíz y se realizaban cortes ya sea en sentido longitudinal o transversal (20x20x2mm de espesor) de manera tal que al montarlo en la cámara experimental quedara expuesta una superficie final de 1.5 cm<sup>2</sup>.

En experimentos diferentes se podían obtener cortes verticales u horizontales con la finalidad de poder comparar flujos de agua en el sentido radial y axial respectivamente. La cámara está diseñada para correr simultáneamente dos experimentos utilizando dos fragmentos obtenidos de la misma raíz. Al montarlos, se sellan sus bordes con gel de silicona para evitar pérdidas. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente e inmediatamente después de producirse los cortes sobre la raíz, evitando el daño o la desecación del tejido (Bell y Leigh, 1996).

En la **Figura 3** podemos observar un esquema simplificado de la metodología utilizada para obtener los valores de flujo neto de agua de los experimentos. El tejido se ubica en una cámara de Ussing modificada, quedando definidos dos compartimentos independientes. Así, ambas caras del tejido se encuentran bañadas por solución fisiológica. Uno de los compartimentos está a presión atmosférica mientras el otro se encuentra herméticamente sellado. Este está conectado por un catéter de polietileno a una cámara secundaria que posee una membrana de látex plegada e impermeable que determina otros dos compartimentos separando la solución fisiológica de una solución que contiene un colorante opaco (negro vilmacid 10B 2 mg/ml) que se conecta por un segundo catéter a una varilla de vidrio hueca que posee el diámetro de un capilar y que se encuentra abierta a la atmósfera en el extremo opuesto. Cualquier movimiento de agua a través del tejido producirá un movimiento proporcional en la solución del

colorante opaco que se encuentra dentro de la varilla. Debido a que la varilla está inserta en el aparato de medición, esto permite captar movimientos del menisco con una precisión de 72 micrones (lo que equivale a un volumen de 50 nl). Así, se pueden observar los cambios en el flujo de agua a través del tejido. Los datos obtenidos son almacenados en una computadora y posteriormente analizados con el software adecuado. Los aparatos de medición se calibran inyectando en el sistema volúmenes de agua conocidos. Las posibles diferencias de registro existentes entre los dos aparatos de medición, se eliminan alternando los experimentos control y experimental dentro de las distintas series.



**Figura 3: Diagrama esquemático del sistema empleado para medir flujos netos de volúmenes en cortes de raíz de remolacha** (no está a escala). Las secciones de tejido fueron montadas entre dos hemicámaras. La presión hidrostática se aplicó en el lado cerrado. Pueden correrse dos experimentos simultáneamente.

## 2.1. Soluciones

2.1.1. Solución Extracto (SE): El medio de incubación fue preparado a partir de un extracto de raíces filtrado con 4 capas de gasa (Syra) y centrifugado a 4500g durante

20 min. Luego de centrifugar se descarta el pellet transvasándose el extracto a otro recipiente. Esta solución posee una osmolaridad de  $604 \pm 5 \text{ mOsm.kg}^{-1}$  medida en un Osmómetro de presión de vapor Wescor (Wescor, Logan UT USA) y un  $\text{pH}=6 \pm 0.08$ . Además se obtuvieron las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  utilizando un espectrómetro Hitachi U-100. Los valores obtenidos fueron de  $51 \pm 4$  y  $104 \pm 10 \text{ mol.m}^{-3}$  respectivamente.

2.1.2. Solución Manitol (SM): Se preparó una solución con la misma osmolaridad que la solución SE

D-manitol 300 mM,

KCl 100 mM

NaCl 50 mM,

$\text{CaCl}_2$  1 mM

TRIS-MES 10 mM

pH 6

2.1.3 Soluciones hipertónicas: Para crear un gradiente osmótico se aumentó la osmolaridad tanto de la SE como de la SM agregando manitol. De esta manera, para crear un gradiente de 300 mOsm se llevó la solución seleccionada a una osmolaridad final de 900 mOsm.  $\text{Kg}^{-1}$ .

### **3. Cambio de volumen en vacuolas aisladas**

#### **3.1 Extracción de vacuolas de células de raíz almacenadora de remolacha:**

Las vacuolas se obtuvieron optimizando un método desarrollado por Leigh *et al.* , 1976. Básicamente se introdujeron una serie de modificaciones para mejorar el rendimiento de la técnica. La obtención de vacuolas se realiza en tres etapas

- a) obtención de secciones de tejido
- b) preincubación
- c) liberación de las vacuolas

Inicialmente la raíz fue separada del resto de la planta y un trozo de esta cortada en secciones de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ . Estos se incubaron durante 20 minutos en una solución de sacarosa 2 M. Luego el tejido fue removido de la solución y secado sobre papel absorbente.



Los trozos de raíz fueron finamente fragmentados con la ayuda de un bisturí en una caja de Petri conteniendo 5 ml de la solución A (ver 3.2). Se recogió una muestra de 500  $\mu$ l de la solución, que ahora contenía las vacuolas y se transfirió a la cámara de perfusión.

### **3.2 Soluciones:**

Solución de extracción: se utilizó una solución de sacarosa 2 M.

Para mantener las vacuolas una vez aisladas se utilizó una solución (A) que contenía:

800 mM manitol,

1 mM EDTA

50 mM Tris-Mes (pH 7.2).

Para los experimentos hipertónicos la solución utilizada (B) contenía :

1 M de manitol

1 mM EDTA

50 mM Tris-Mes (pH 7,2).

Para los experimentos hipotónicos la solución usada (C) poseía:

500 mM de manitol,

1 mM EDTA

50 mM Tris-Mes (pH 7,2).

En las series experimentales realizadas con mercurio se utilizó una solución 0.3 mM  $\text{HgCl}_2$  (D) para la incubación de las vacuolas y las soluciones A y B más el agregado de la misma concentración de  $\text{HgCl}_2$  para la perfusión.

### **3.3 Sistema de perfusión: (Figura 4)**

Consta de dos tubos que contienen las distintas soluciones experimentales. Ambos se encuentran conectados independientemente por medio de catéteres con una llave que permite seleccionar la solución que finalmente llega a la cámara a través de una aguja. Existe además otra llave que permite regular el caudal de perfusión el cual se estableció en 430  $\mu$ l/min.

Una bomba de perfusión conectada por un catéter a una aguja retira la solución excedente de la cámara.

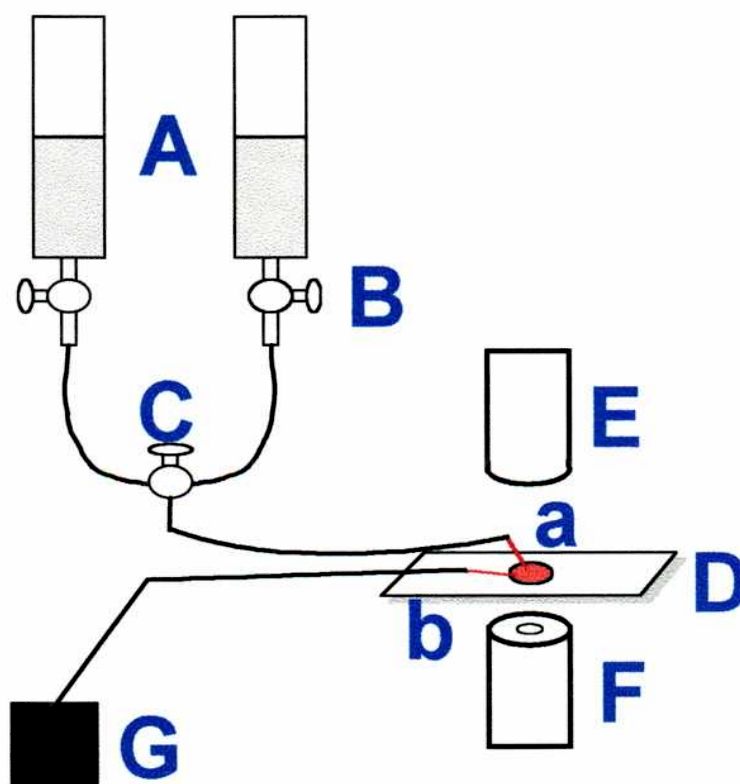


### 3.4 Observación de vacuolas:

Para la observación de las vacuolas, una alícuota de la solución que las contenía se transfirió a una cámara de 500 µl de volumen montada sobre un cubreobjetos. Se observaron las vacuolas utilizando un microscopio invertido con un aumento de 300 X.

Los posibles cambios de volumen de una vacuola individual elegida al azar se siguieron mediante videomicroscopía. Para ello, una cámara digitalizadora (con una resolución de 192 pixeles (horizontal) x 165 pixeles (vertical)) montada en el microscopio permitió la adquisición de una imagen con intervalos establecidos de tiempo. Los diámetros de las vacuolas fueron medidos utilizando el software Optimetric 1.0 (Bioscan, USA). Dado que las vacuolas son aproximadamente esféricas, el volumen se calculó a partir de los diámetros obtenidos considerando el volumen de una esfera:

$$\text{Volumen de la esfera} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (\text{diámetro medido}/2)^3$$



**Figura 4: Sistema de perfusión.** A: soluciones experimentales; B: llave para regular flujo de perfusión; C: llave para seleccionar solución; D: cámara con solución con vacuolas con capacidad de 500µl; E: fuente de iluminación; F: objetivo; G: bomba de perfusión; a: aguja para ingresar solución a la cámara; b: aguja para sacar solución de la cámara.

Las vacuolas pueden visualizarse fácilmente al microscopio debido a que poseen pigmentos naturales tales como betacianinas.

### **3.5 Estudios de variación de volumen:**

Se estudiaron las propiedades de permeabilidad al agua de las vacuolas aisladas de la raíz de remolacha. Para esto, una vez transferida la alícuota de la suspensión de vacuolas a la cámara se dejaron transcurrir cinco minutos para que las vacuolas sedimentaran. Posteriormente se eligió una al azar y se tomaron las imágenes.

Para la serie de experimentos hipertónicos se tomaron imágenes con la solución A cada un minuto durante seis minutos y se hizo el cambio de medio para perfundir con solución B. Se tomaron imágenes cada 30 segundos durante 10 minutos y se cambió para perfundir nuevamente con la solución A tomándose imágenes cada 30 segundos 6 minutos más.

Para la serie de experimentos hipotónicos los tiempos utilizados fueron los mismos solo que a los seis minutos el cambio se hizo por la solución C.

### **3.6 Estudios de inhibición de los canales para agua:**

Para testear el efecto del mercurio sobre el transporte de agua utilizamos compuestos mercuriales conocidos como inhibidores específicos de canales para agua (Meyer et al., 1987). Se incubaron las vacuolas durante 5 minutos en la solución D y luego se perfundió con soluciones A y B más el agregado de 0.3 mM de  $\text{HgCl}_2$  siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos hipertónicos.

### **3.7 Cálculo de la permeabilidad al agua:**

La medida de la permeabilidad osmótica se realizó a partir de los cambios de volumen de las vacuolas en función del tiempo en respuesta a un gradiente osmótico. La medición de los cambios de volumen de las vacuolas se realizó a través de videomicroscopía. Estas se ubican en la cámara de perfusión y se visualizan a través de un microscopio (magnificación 300x). El sistema permite registrar imágenes de las células a partir de una cámara CCD y una interfase a computadora. Los diámetros de las células se midieron a partir de las imágenes grabadas utilizando un sistema de calibración interna.

El flujo de volumen de agua a través de una membrana ( $J_v$ ;  $\text{cm}^3/\text{s}$ ) se determinó a partir de la pendiente inicial de la curva de  $V/V_0$  en función del tiempo.

$$J_v = V_0 d(V/V_0) / dt$$

Donde  $V_0$  se toma como el volumen inicial de la vacuola. El coeficiente de permeabilidad osmótica ( $P_f \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se calculará a partir de la siguiente relación:

$$J_v = P_f \cdot S \cdot V_w (Osm_e - Osm_i)$$

donde  $V_w$  es el volumen molar parcial del agua ( $18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ),  $S$  la superficie de la vacuola y  $Osm_e$  y  $Osm_i$  son las osmolaridades externa e interna respectivamente.

### 3.8 Análisis estadístico

Para los experimentos realizados se utilizó principalmente el test de Student para muestras pareadas, (antes-después). Los datos obtenidos se compararon a través de sus valores medios y el error estándar de la media (SEM).

## **Resultados y Discusión**

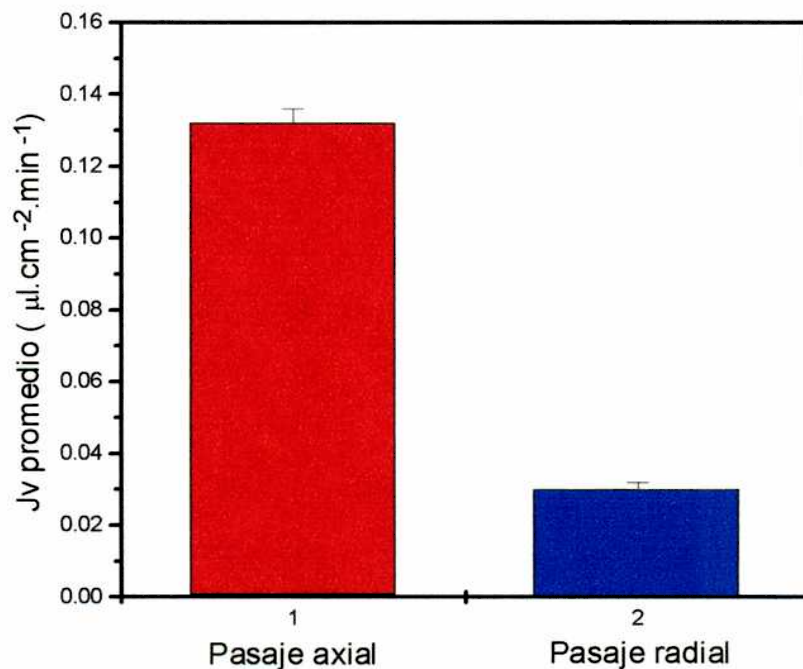


## RESULTADOS Y DISCUSION

### Flujos de agua en secciones de tejido

#### 1. Flujos de agua en cortes transversales y longitudinales: vía radial vs vía axial

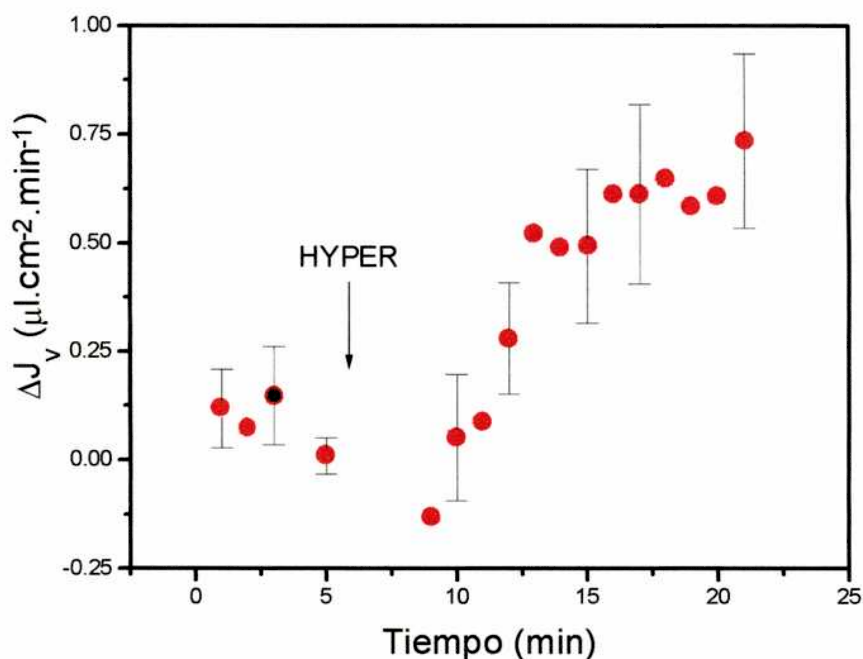
Previamente (Amodeo *et al.*, 1997; Vallejo, 1998) se estudiaron los movimientos de agua en secciones transversales y longitudinales de tejido de raíz de remolacha para comparar las características de la vía axial y radial de transporte al aplicar un gradiente hidrostático u osmótico (**Figura 5**).



**Figura 5:** Comparación de los promedios de los flujos de agua en cortes transversales (pasaje axial) y longitudinales (pasaje radial)  $\pm$  SEM. Se utilizó la solución SE descrita en materiales y métodos y se aplicó un gradiente de presión hidrostática de  $0.3 \text{ MPa m}^{-1}$ ,  $n=8$ .

Cuando se comparó al flujo axial con el radial se observó que el flujo axial era significativamente mayor que el radial, debido a que de acuerdo a como se practicara el corte de la sección de tejido resulta más expuesto o no el sistema vascular. Al analizar los flujos inducidos en la vía axial ya sea aplicando un gradiente hidrostático u osmótico, no se observaron diferencias significativas.

Por el contrario, el flujo radial osmóticamente inducido fue significativamente mayor al inducido hidrostáticamente (**Figura 6**).



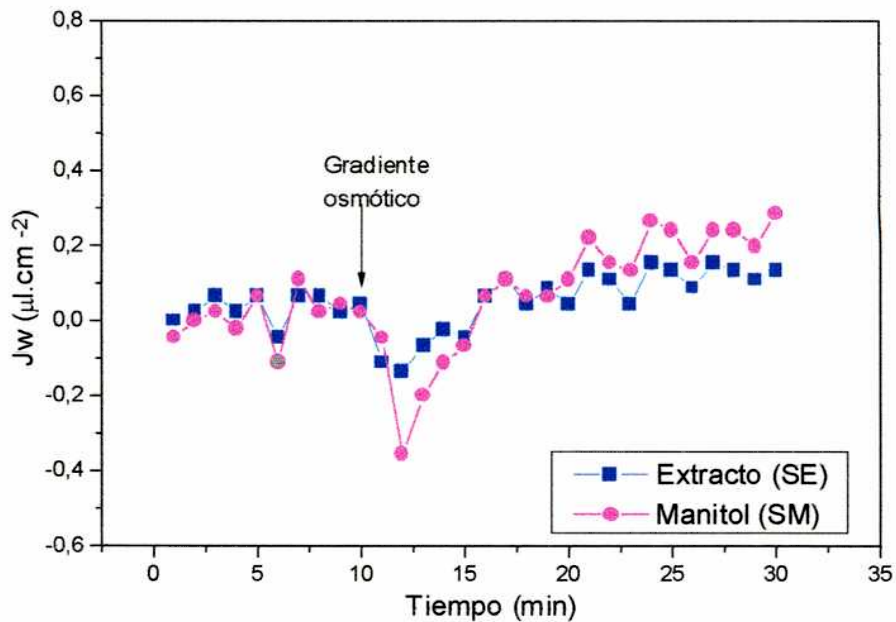
**Figura 6:** Aumento del flujo de agua en el pasaje radial inducido por un gradiente de manitol. Los valores de cada uno de los tiempos experimentales están normalizados y muestran los promedios  $\pm$  SEM de 6 experimentos.

Estos resultados nos llevaron a investigar con mayor profundidad esta vía ya que a través de ella es posible estudiar los mecanismos más finos de transporte al poder separarlos del pasaje por la vía apoplasto (que incluye además al sistema vascular).

## **2. Flujos de agua inducidos por gradiente de presión hidrostáticos: (cortes axiales)**

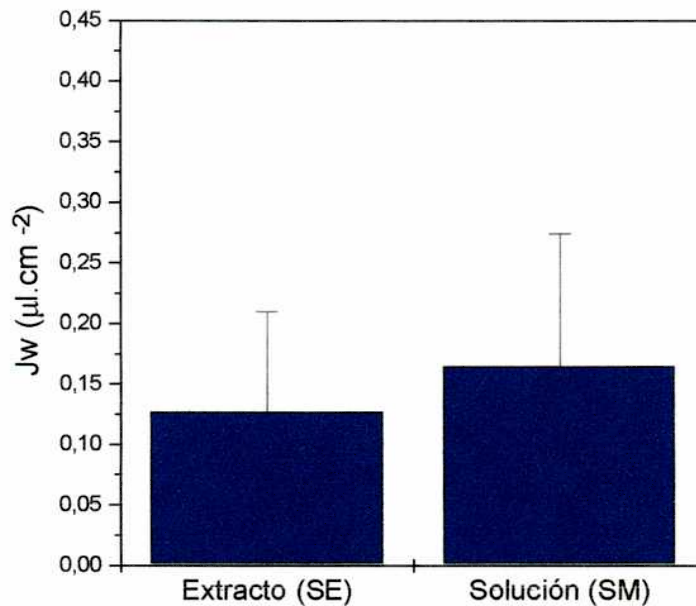
Los experimentos anteriores fueron realizados con la solución extracto (SE) de acuerdo a como se detalla en **Materiales y Métodos**. Esta solución fue elegida con las intenciones de buscar una solución que se acercara lo mejor posible a la composición del medio extraprotoplasmático de la raíz. Para descartar cualquier efecto que pudiera resultar de la preparación de la misma se realizaron una serie de experimentos en los cuales se utilizó simultáneamente la solución extracto y una solución manitol con la misma osmolaridad. En la **Figura 7** se muestra un experimento tipo. Durante los primeros 10 minutos el

sistema estuvo sometido únicamente a una presión hidrostática de  $0.3 \text{ MPa m}^{-1}$  y luego se le aplicó además un gradiente osmótico de  $300 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$ .



**Figura 7: Experimento representativo de la dinámica del flujo axial con solución extracto (SE) o solución manitol (SM).** La flecha indica el momento en que se aplicó un gradiente de osmolaridad de  $300 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$ .

De acuerdo a como habíamos visto en el punto anterior, en los cortes axiales no hay diferencias entre el gradiente hidrostático y el osmótico. En esta vía nos interesa entonces estudiar el pasaje de agua por la vía apoplástica. Por lo tanto se analizaron los promedios del flujo de agua inducido por la presión hidrostática al realizar el experimento con solución extracto o solución manitol. En la **Figura 8** se comparan los promedios de ambos flujos y se observa que no existen diferencias significativas.

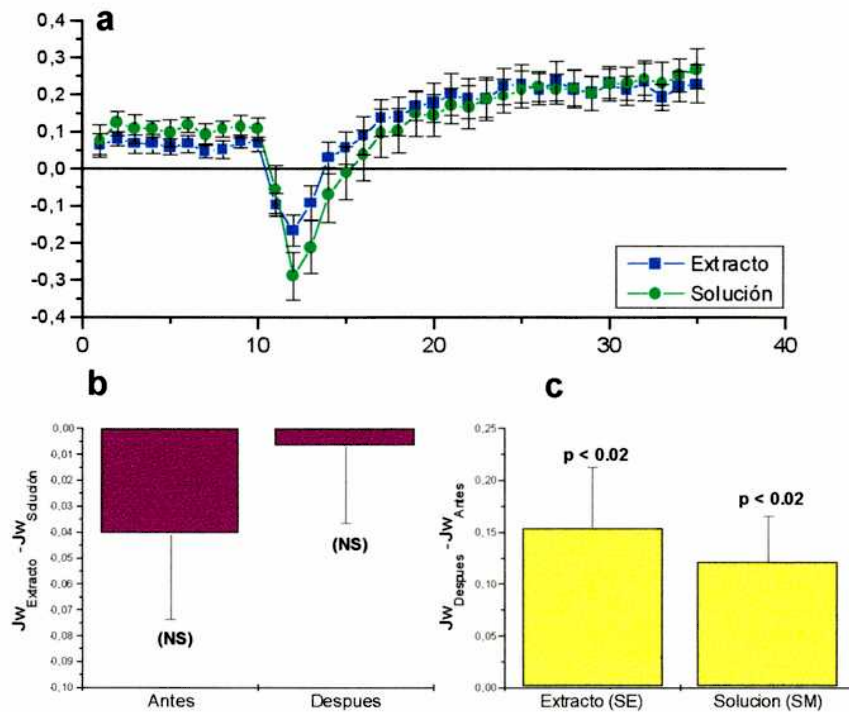


**Figura 8: Flujo de agua en cortes axiales sometidos a presión hidrostática.** Las columnas muestran el valor medio de flujo durante los primeros diez minutos de registro de seis experimentos pareados realizados con SE o SM. La presión hidrostática aplicada fue de  $0.3 \text{ MPa} \cdot \text{min}^{-1}$ . Los datos graficados son  $\pm \text{SEM}$ .

### 3. Flujos de agua inducidos por gradiente de presión osmótica: movimientos de agua radial

Como se mostró en el punto 1, en la vía radial el flujo osmóticamente inducido fue significativamente mayor que el inducido hidrostáticamente. Nuevamente realizamos experimentos para comprobar si había diferencias en la utilización de una u otra solución en estas condiciones. Para esto llevamos a cabo una serie experimental donde se estudió el flujo de agua en función del tiempo en secciones longitudinales de tejido con la SM y la SE simultáneamente. En la **Figura 9** se muestra un promedio de seis experimentos en los cuales se aplicó únicamente una presión hidrostática de  $0.3 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{-1}$  durante los primeros 10 minutos y luego se aplicó además un gradiente osmótico de  $300 \text{ mOsm} \cdot \text{Kg}^{-1}$ .





**Figura 9: Estudio del flujo de agua radial con solución extracto y solución manitol:** a) dinámica del flujo de agua radial; se muestran los valores medios de seis experimentos  $\pm$  SEM. b) diferencia entre el flujo con SE y el flujo con SM, antes y después del agregado del gradiente hipertónico. Los valores obtenidos son el promedio de 5 puntos "antes" y 5 puntos "después". c) diferencias entre el flujo antes y después de la inducción por agregado de manitol con la solución SE o SM. Los valores fueron obtenidos por el mismo análisis que en el inciso b.

No se observaron diferencias significativas en el flujo inducido tanto osmótica como hidrostáticamente entre las dos soluciones (**Figura 9 b**).

En la **Figura 9 c** se muestran las diferencias de los valores de flujo obtenidos para ambas soluciones antes y después de aplicar el gradiente osmótico. Se observó un flujo osmótico significativamente mayor que el hidrostático tanto con SE como con SM.

Resumiendo, la **Tabla 1** compara los resultados obtenidos cuando se aplicaron gradientes hidrostáticos y osmóticos a cortes transversales y longitudinales respectivamente ya sea empleando la solución manitol o el extracto para poder descartar cualquier efecto resultante de utilizar una solución preparada a partir de un homogenato.

	SE	SM	t-Test
Gradiente hidrostático, pasaje axial ( $\Delta P = 0.3 \text{ MPa m}^{-1}$ )	$0.12 \pm 0.02$	$0.10 \pm 0.03$	ns
Gradiente osmótico, pasaje radial ( $\Delta \text{Osm} = 300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ )	$0.22 \pm 0.04$	$0.23 \pm 0.04$	ns

**Tabla 1:** Efectos comparativos de los valores de flujo de agua (expresados en  $\mu\text{l.cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) hallados cuando se emplearon las soluciones de manitol (SM) y del extracto de raíces (SE).

La solución extracto utilizada es equivalente al potencial agua extracelular de raíces almacenadoras de remolacha maduras *in vivo* ( $600 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ ), de acuerdo a lo informado por diferentes autores (Perry *et al.*, 1987; Bell y Leigh, 1996). Utilizar una solución de estas características era esencial para nuestros experimentos porque se deseaba que no se produjeran cambios de presión osmótica en los cortes de tejido. Era importante que en las condiciones controles, las células no percibieran un cambio de turgencia, evitando así que se produjera un ajuste del contenido de sus solutos en el interior celular.

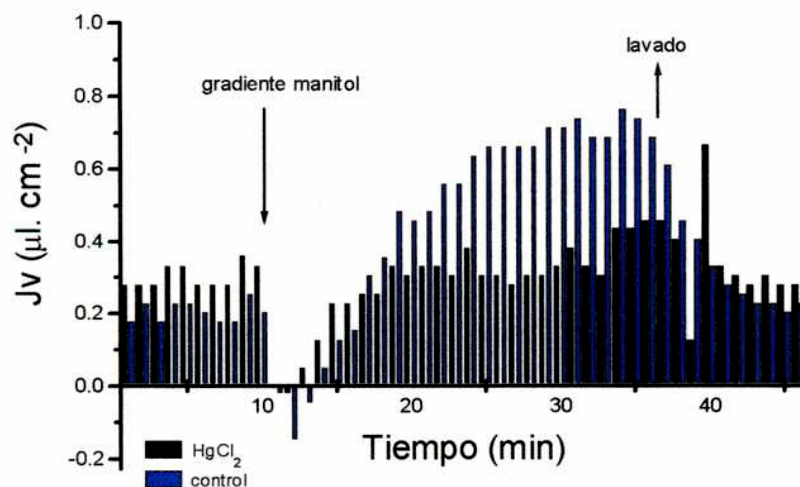
Esta solución preparada puede ser descripta entonces como una mezcla de material protoplasmático y extra-protoplasmaico, a la que se definió como solución extracto o experimental (SE) con una presión osmótica de  $604 \text{ mOsm}$ . Cuando se aplica un gradiente osmótico, la osmolaridad alcanza un valor final de  $900 \text{ mOsm}$  con el agregado de manitol a esta solución preparada. De acuerdo a Perry *et al.*, 1987; Bell y Leigh, 1996 tanto la composición protoplasmática como la extraprotoplasmática varía de acuerdo a la zona del tejido considerada del parénquima de la raíz madura. Está descripto por ejemplo que las células cercanas a los vasos vasculares presentan concentraciones más altas en azúcares que en potasio si se las compara con las células de parénquima de los extremos (Bell *et al.*, 1996). Debido a que era importante evitar fluctuaciones en la turgencia celular decidimos tomar una solución de compromiso que consideramos la más apropiada para el tipo de experimentos que deseábamos encarar. Comparamos entonces esta solución con una preparada con manitol que reúne las mismas condiciones desde el punto de vista de la osmolaridad y verificamos que no se observaban

diferencias significativas entre ambas ya sea en cortes axiales como radiales. Esto nos permitió descartar efectos resultantes de utilizar una solución preparada a partir de un homogenato.

## **Vacuolas aisladas**

### **1. Obtención de vacuolas aisladas de *Beta vulgaris*: optimización de la técnica**

En los experimentos llevados a cabo a nivel de cortes de secciones de raíz se evidenció que cuando se realiza un corte radial se puede discriminar la vía célula a célula de la apoplástica. Los resultados son complementarios con la evidencia de que en presencia de  $\text{HgCl}_2$  el flujo de agua inducido por gradiente ósmótico se inhibe. La **Figura 10** muestra los resultados obtenidos en esta condición y que son complementarios a los experimentos descritos en este Seminario (Vallejo, 1998).



**Figura 10:** Efecto del mercurio en el movimiento de agua en la vía axial. Se llevaron a cabo experimentos pareados incubando un corte en condiciones control y otro previamente incubado con  $\text{HgCl}_2$  1 mM. A los diez minutos se realizó un gradiente de manitol agregando a la solución SE manitol para llegar a una osmolaridad final de 900 mOsm  $\text{Kg}^{-1}$ .



Teniendo en cuenta estos resultados obtenidos decidimos profundizar y analizar el papel que cumplen las vacuolas dentro del transporte de agua en la vía célula-célula ya que si bien está descripta la presencia de canales de agua en las mismas no se han reportado hasta la fecha su funcionalidad. Para esto utilizamos una técnica de aislamiento mecánico que pusimos a punto en el laboratorio y que fue descripta en materiales y métodos.

Básicamente el método permite la obtención de vacuolas sin necesidad de recurrir a digestiones enzimáticas. En el protocolo, existen dos pasos que resultan esenciales para garantizar que se libere una gran cantidad de vacuolas. El primero consistió en la preincubación, que implica plasmolizar inicialmente el tejido. Cuando se realizaron aislamientos sin este paso, el rendimiento resultó extremadamente bajo. Además las pocas vacuolas obtenidas perdían rápidamente su contenido (cambio de coloración) o estallaban con facilidad.

En segundo lugar resultó también importante el corte de las secciones de tejido ya preplasmolizadas. Este corte debía llevarse a cabo con material extremadamente filoso (hoja de afeitar o bisturí) para garantizar un corte que fuera netamente definido, sin que arrastre tejido.

En último lugar, el tomar alicuotas de solución con vacuolas liberadas y trasladarlas a la cámara con perfusión minimizó la presencia de tejido seccionado en esta última y el sistema de perfusión motado garantizó la eliminación de debris o restos de material muerto.

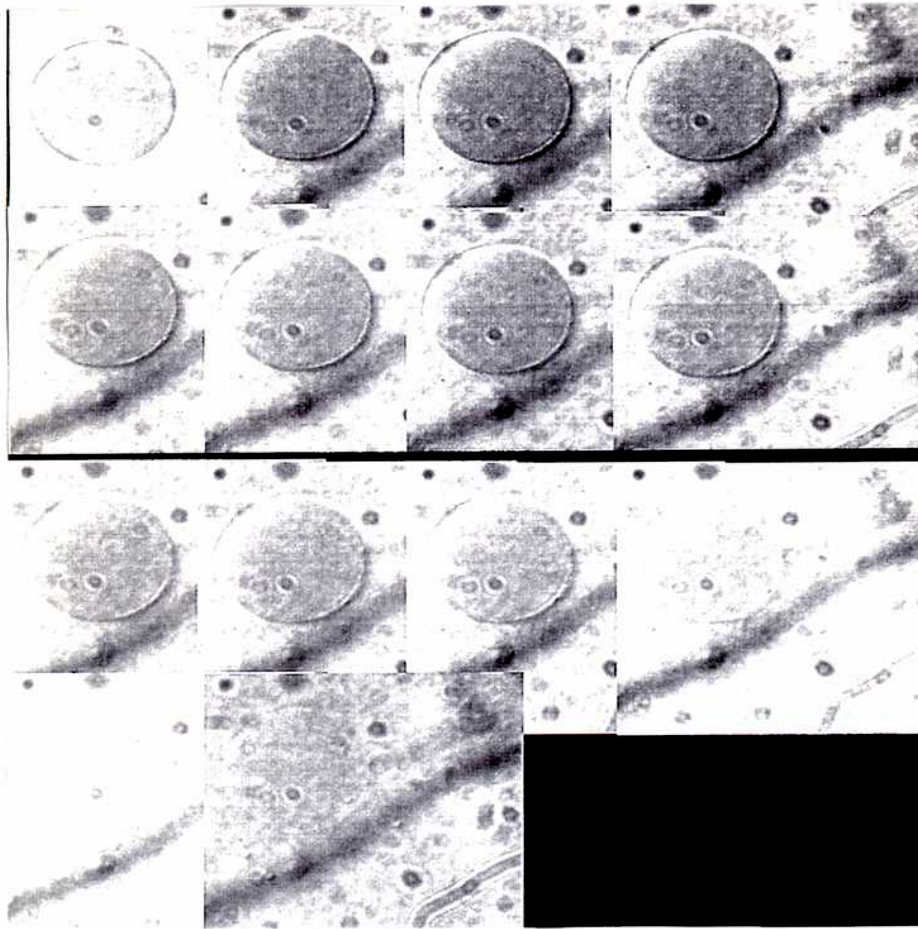
## **2. Cálculo del volumen de vacuolas aisladas en condiciones iniciales**

Para calcular el volumen promedio de las vacuolas se realizaron dos series experimentales en las cuales se midieron los diámetros de todas las vacuolas obtenidas de un aislamiento y se calcularon los volúmenes correspondientes. Estas resultaron tener un valor promedio igual a  $16590.2 \pm 2694,8$  y  $13786,2 \pm 1979,2 \mu\text{m}^3$  para las distintas series y representa el volumen de vacuolas incubadas en la cámara de perfusión y mantenidas en condiciones isotónicas.

## **3. Efecto de los cambios de osmolaridad sobre el volumen de las vacuolas: gradiente hipotónico**



En la **Figura 11** se observa una secuencia de imágenes digitalizadas y archivadas en la computadora de una vacuola que es seguida en el campo y cuando se le efectúa un shock osmótico. Cuando el gradiente de osmolaridad es muy pronunciado las vacuolas estallan, tal cual se observa en la secuencia. En la puesta a punto de la metodología fue importante que la vacuola seleccionada no se desplazara debido al movimiento de solución originado por el sistema de perfusión. Se debió entonces regular el sistema de perfusión y encontrar las condiciones adecuadas para que las vacuolas se fijaran al cubreobjetos, que era la base de la cámara utilizada.

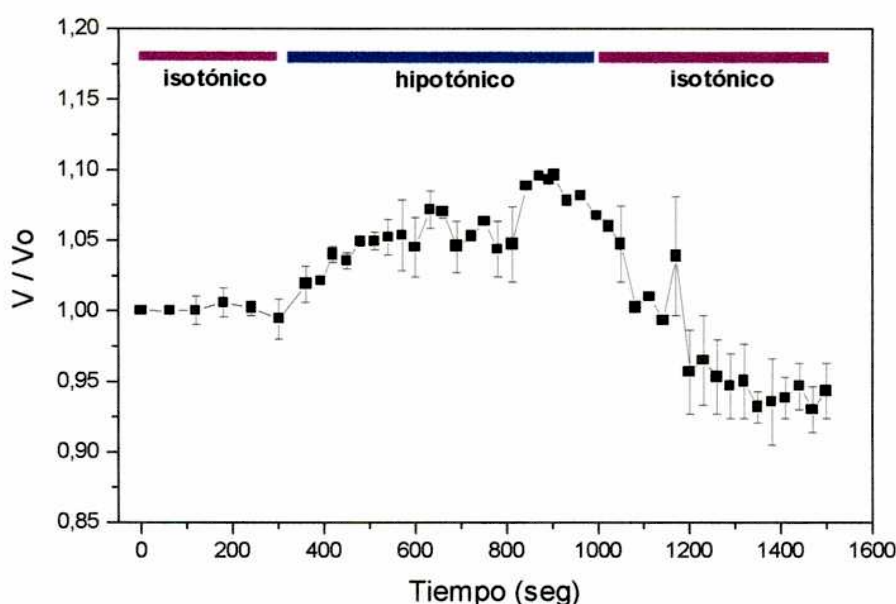


**Figura 11: Imágenes digitalizadas de una vacuola que es seguida cuando se le aplica un gradiente hipotónico.** Se muestran imágenes adquiridas a intervalos de diez segundos luego de aplicar un gradiente osmótico de  $400 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ .

Para estudiar el comportamiento en un medio hipotónico se llevó a cabo una serie experimental en la cual se sometió inicialmente a las vacuolas a una

osmolaridad de 0.8M con la solución A, la que luego fue reemplazada por la solución C. Después de 10 minutos vuelve a perfundirse con la solución A para ver si era posible revertir el efecto.

Se observó un aumento significativo del volumen de las vacuolas con respecto a la situación inicial y que el efecto pudo revertirse al volver a la condición isotónica (**Figura 12**).

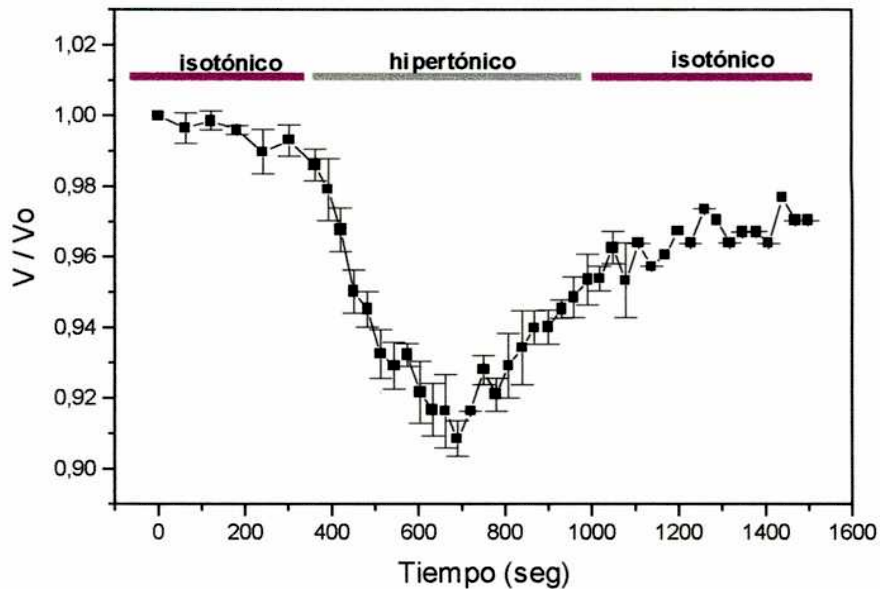


**Figura 12: Variación del volumen relativo de vacuolas en función del tiempo en presencia de un gradiente hipotónico.** Se muestran los valores medios de 3 experimentos. Las barras indican la osmolaridad del medio con respecto al interior de la vacuola.

#### **4. Efecto de los cambios de osmolaridad sobre el volumen de las vacuolas: gradiente hipertónico**

Para estudiar el comportamiento de las vacuolas frente a gradientes hipertónicos se llevó a cabo una serie experimental en la cual las vacuolas inicialmente estaban en la solución A y luego de tomar imágenes durante seis minutos se comenzó a perfundir con la solución B logrando un gradiente de 0.2 M. Se observó una disminución significativa del volumen de las vacuolas con respecto al inicial (**Figura 13**).

Luego de diez minutos se volvió a cambiar el medio y se perfundió nuevamente con la solución A durante seis minutos más.



**Figura 13: Variación del volumen relativo de vacuolas en función del tiempo en presencia de un gradiente hipertónico.** Se muestran los valores medios de 5 experimentos. Las barras indican la osmolaridad del medio con respecto al interior vacuolar.

Se observó una disminución significativa del volumen relativo de las vacuolas al aplicar el gradiente hipertónico. Es interesante observar que a diferencia de lo esperado, el cambio de volumen no se mantiene sino que por el contrario comienza a disminuir incluso antes de volver a perfundir con la solución isotónica. Una explicación de este fenómeno sería la presencia de un mecanismo de autoregulación.

Se calculó la permeabilidad osmótica de acuerdo a como se detalla en Materiales y Métodos y se obtuvo un valor de  $5.35 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ . Estos valores son similares si se los compara con los hallados en vacuolas de *Allium cepa* ( $4-54 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ ) (Url, 1971). Maurel *et al.* (1997) halló que la permeabilidad en vesículas aisladas de tonoplasto muy superior  $6.5 \cdot 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$ , pero el aislamiento de las vesículas combinado con la técnica empleada (stopped-flow) son condiciones muy diferentes a las empleadas en nuestro caso.

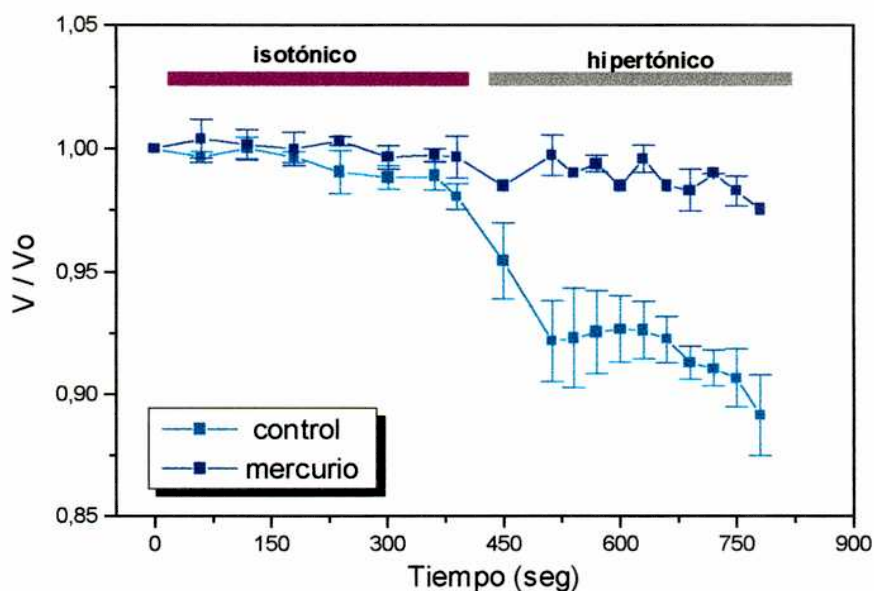


En general los valores de Pf reportados cuando no existe una vía de pasaje al agua por canales específicos se encuentran entre  $10^{-4}$ - $10^{-5}$ .

#### 4. Efecto del $\text{HgCl}_2$ sobre el volumen relativo de las vacuolas

Para evaluar el efecto del cloruro de mercurio sobre el volumen de las vacuolas se realizó una serie experimental con el mismo protocolo que se utilizó en el punto 2 salvo que las vacuolas fueron incubadas 5 minutos en  $\text{HgCl}_2$  y con perfusión de acuerdo a como se indica en Materiales y Métodos.

No se observaron diferencias significativas entre el volumen de las vacuolas tratadas con respecto al control durante las condiciones isosmóticas. Al aplicar el gradiente hipertónico se encontró una diferencia significativa del volumen de las vacuolas tratadas con respecto al control ( $p < 0.001$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14:** Efecto del  $\text{HgCl}_2$  en la dinámica del volumen relativo de las vacuolas. Las tratadas fueron incubadas durante 5 minutos con 0.3 mM de  $\text{HgCl}_2$  y luego perfundidas con las soluciones A y B (usadas para el control) más el agregado de la misma concentración de  $\text{HgCl}_2$ .

Se observó que el flujo de agua a través del tonoplasto fue inhibido por compuestos mercuriales lo que estaría a favor de suponer que se están

inhibiendo canales específicos para el transporte de agua. Hay descriptas en tonoplasto de parénquima de raíz de remolacha acuaporinas pero hasta el momento no se han reportado estudios funcionales. Aunque estos estudios deben ser profundizados, muestran evidencias de la actividad funcional de estos canales.

Es importante destacar que la técnica puesta a punto en el laboratorio permite el seguimiento de una única vacuola a lo largo del tiempo, no fue reportada en la literatura. Los intervalos de tiempo para la toma de imágenes pueden fijarse de acuerdo al tipo de estudio que se realice. Además puede observarse el comportamiento de las vacuolas en diferentes condiciones ya que la perfusión es controlada.

## **Conclusiones**

## CONCLUSIONES

Se estudió el movimiento de agua en el nivel tisular y subcelular utilizando como material vegetal a la raíz almacenadora de remolacha *Beta vulgaris* y vacuolas aisladas de la misma.

### *En el nivel tisular*

Se estudiaron los pasajes de agua axial y radial en cortes transversales y longitudinales respectivamente sometidos a gradientes osmóticos e hidrostáticos empleando una solución preparada y con osmolaridad similar a la de la savia de la raíz. Únicamente los cortes que exponían la vía radial presentan una respuesta osmótica.

Se verificó que la solución empleada para los experimentos de flujo de agua tanto en cortes longitudinales como transversales tenía una respuesta similar a una preparada con manitol e idéntica osmolaridad. Utilizar una solución de estas características era esencial para nuestros experimentos porque se deseaba que en las condiciones controles, las células del tejido no percibieran un cambio de turgencia, evitando así que se produjera un ajuste del contenido de sus solutos en el interior celular.

### *En el nivel subcelular*

Se optimizó una técnica que permite aislar en forma mecánica vacuolas de la raíz de la remolacha. Las vacuolas son fácilmente distinguibles por su pigmentación natural.

Se desarrolló una nueva técnica para el seguimiento por videomicroscopía del cambio de volumen de vacuolas individualizadas. El sistema montado permite el cambio de la solución que baña la vacuola mediante perfusión controlada.

Las vacuolas responden a cambios de osmolaridad tanto en respuesta a gradientes hiper como hipotónicos y los valores de permeabilidad encontrados son de orden de  $10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$ .

Se encontró que al incubar y perfundir el sistema con mercurio se inhibe el cambio de volumen en forma significativa en respuesta al gradiente osmótico. Estas evidencias son preliminares (alta permeabilidad osmótica e inhibición a compuestos mercuriales) e indicarían que las vacuolas están utilizando a los canales de agua para ajustar su volumen. Junto con los resultados obtenidos a



nivel tisular se intenta aportar evidencias del papel que juega la vía celular en el movimiento de agua en la raíz.

La técnica desarrollada aporta una interesante herramienta para el estudio biofísico y fisiológico de fenómenos de transporte a través de membranas celulares.

Gary Mueller



## **Comunicaciones Científicas en Congresos Nacionales e Internacionales y Publicaciones relacionadas con el tema de Tesis presentado:**

### **Presentaciones a Congresos**

**Water movements associated to hydrostatic and osmotic gradients in the storage root of sugar beet (*Beta vulgaris*).** Amodeo Gabriela, Dorr Ricardo, Vallejo Augusto, Sutka Moira, Parisi Mario. *Plant Biology 1997 Meeting*. Vancouver, Canada, 2 al 7 de agosto de 1997.

**Water permeability studies in plant tissues and vacuoles: responses to hydrostatic and osmotic gradients in the storage root of sugar beet** Amodeo Gabriela, Dorr Ricardo, Vallejo Augusto, Sutka Moira y Parisi Mario. *III Congreso Iberoamericano de Biofísica*, Buenos Aires 20 al 23 de setiembre de 1997.

**Permeabilidad al agua de vacuolas aisladas de células de la raíz almacenadora de la remolacha.** Sutka Moira, Vallejo Augusto, Dorr Ricardo Parisi Mario y Amodeo Gabriela *XXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Biofísica*. La Plata, 6-8 de diciembre de 1998.

### **Publicaciones**

**Gabriela Amodeo, Ricardo Dorr, Augusto Vallejo, Moira Sutka and Mario Parisi.** Radial and Axial Water Transport in the Sugarbeet Storage Root. *Journal of Experimental Botany* (1998) en prensa.

## BIBLIOGRAFÍA

- \* Agre P, Sasaki S y Chrispeels MJ (1993) *Am J Physiol* **265**:F461
- \* Amodeo G, Dorr R, Vallejo A, Sutka M y Parisi M. (1997) *Plant Biology 1997 Meeting*. Vancouver, Canadá, 2 al 7 de agosto de 1997
- \* Amodeo G, Escobar A y Zeiger E (1994) *Plant Physiol.* **105**:999-1006
- \* Barkla BJ, Apse MP, Manolson MF y Blumwald E (1994) *See Ref. 21*, pp. 141-153
- \* Bell CI y Leigh RA. (1996) *Plant, Cell and Envir.* **19**:191-200
- \* Blackford S, Rea PA y Sanders D (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:9617-9620
- \* Boller T y Vogeli U (1984) *Plant Physiol.* **74**:442-444
- \* Boller T y Wiemken A (1986) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**:137-164
- \* Briskin DP, Thornley WR y Wyse RE (1985) *Plant Physiol.* **78**:871-875
- \* Coyaud L, Kurkdjian A, Kado R y Hedrich R (1987) *Biochem Biophys Acta* **902**:263-
- \* Chrispeels MJ y Maurel C (1994) *Plant Physiol* **105**:9-13
- \* Dainty J (1963) *Adv. Bot. Res.* **1**:279-326
- \* Daniels MJ, Chaumont F, Mirkov TE y Chrispeels MJ (1996) *Plant Cell* **8**:587-599
- \* Davies JM, Poole RJ, Rea PA y Sanders D (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**:117011-11705
- \* Finkelstein A. (1987) *Distinguished Lecture Series of the Society of General Physiologists Vol 4* New York:Wiley 228pp cita en anual review 1997de maurel
- \* Fortin MG, Morrison NA y Verma DPS (1987) *Nucleic. Acids. Res.* **15**:813-824
- \* Haines TH (1994) *FEBS Lett.* **346**:115-122
- \* Hedrich R y Neher E (1987) *Nature (London)* **329**:833- 835
- \* Hedrich R y Schroeder JI (1989) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **40**:539-569
- \* Hedrich R, Barbier-Brygoo H, Felle H, Flügge UI, Lüttge U, Maathius FJM, Marx S, Prins HA, Raschke K, Schnabl H, Schroeder JI, Struve I, Taiz L y Ziegler P (1988) *Botanica Acta* **101**:7- 13
- \* Hedrich R, Flügge UI y Fernandez JM (1986) *FEBS Lett.* **204**:228-232
- \* Hejnowicz Z y Sievers A (1996) *J Plant Physiol* **147**:516-520
- \* Hodgkin AL y Keynes RD (1953) *J Physiol. (London)* **119**:513-528
- \* Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB y Agre P (1994) *J Biol. Chem.* **269**:14648-14654
- \* Kaldenhoff R, Kölling A, Meyers J, Karmann U, Rupell G y Ritcher G (1995) *Plant J* **7**:87-95
- \* Lang F, Ritter M, Völkl H y Häussinger D (1993) *Renal Physiol Biochem* **16**:48-65
- \* Lauf PK (1985) *J Memb Biol* **88**:1-13
- \* Le Cahérec F, Bron P, Verbavatz JM, Garret A y Morel G (1996) *J. Cell. Sci.* **109**:1285-1295
- \* Leigh RA y Branton D. (1976) *Plant Physiol.* **58**:656-662
- \* Loo DDF, Zeuthen T, Chandy G y Wright EM (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:13367-13370
- \* Maurel C, Reizer J, Schroeder J, Chrispeels MJ y Saier MH. (1994) *J biol Chem* **269**:11869-11872
- \* Macey RI. (1984) *Am. J. of Physiol.* **246**:C195-203



- \* Marty F, (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**:852-856
- \* Marty-Mazars D, Clémencet MC, Dolzome P y Marty F. (1995) European J Cell Biol **66**:106-118
- \* Maurel C, Chrispeels M, Lurin C, Tacnet F, Geelen D, Ripoche P y Guern J (1997) J Experim Bot **48**:421-430
- \* Maurel C, Reizer J, Schroeder J y Chrispeels M(1993) The EMBO Journal **12**(6) 2241-2247
- \* Maurel C, Tacnet F, Güclü, Guern J, y Ripoche P (1997) PNAS **94**: 7103-7108.
- \* Maurel C (1997) Ann Rev of Plant Physiol Plant Mol Biol **48**: 399-429
- \* McClintock M, Higinbotham N, Uribe EG y Cleland R (1982) Plant Physiol. **70**:771-774
- \* Nernst (1908) Pflügers Archiv Physiol **122**:275-284
- \* Paganelli CV y Solomon AK (1957) J Gen Physiol. **41**:259-277
- \* Pantoja O, Gelli A, y Blumwald E (1992) Plant Physiol **100**:1137-1141
- \* Pantoja O, Gelli A, y Blumwald E (1992) Science **255**:1567-1570
- \* Parisi M y Bourget J (1985) Biol Cell **55**:155-158
- \* Perry CA, Leigh RA, Tomos AD, Wyse RE y Hall JL (1987) Planta **170**:353-361
- \* Preston GM y Agre P (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:11110-11114
- \* Preston GM, Carroll TP, Guggino WB y Agre P (1992) Science **256**:385-387
- \* Preston GM, Jung JS, Guggino WB y Agre P (1993) J. Biol. Chem. **268**:17-20
- \* Rea PA y Poole RJ (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **44**:157-180
- \* Rea PA y Sanders D (1987) Plant Physiol. **71**:131-141
- \* Smith BL y Agre P (1991) J. Biol. Chem. **266**:6407-6415
- \* Taiz L (1992) J. Exp. Biol. **172**:113-122
- \* Url, WG (1971) Protoplasma **72**:427-447
- \* Vallejo, Augusto (1998) Tesis para la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas; Universidad de Buenos Aires.
- \* Verkman AS, van Hoek AN, Ma T, Frigeri A y Skach WR (1996) Am. J. Physiol. **270**:C12-30
- \* Wink M (1993) J. Exper. Bot. **44**:231-246
- \* Zeuthen T (1992) Biochem Biophys Acta **1113**:229-258