



Metaloenzimas de Plantas

AUTOR

Enrique J. Baran

PUBLICADO POR



ANCEFN

Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Metaloenzimas de Plantas

AUTOR

Enrique J. Baran

**PUBLICADO POR**

Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [ANCEFN]

SERIE: PUBLICACIONES CIENTIFICAS N° 17 (2021)

Baran, Enrique José

Metaenzimas de plantas / Enrique José Baran ; editado por Enrique José Baran. - 1a ed volumen combinado. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : ANCEFN - Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2021.

Libro digital, PDF - (Publicaciones científicas ; 17)

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-4111-16-6

1. Química. I. Título.

CDD 549.11

Fecha de catalogación: mayo de 2021

Esta publicación es propiedad de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

ISBN 978-987-4111-15-9

Primera edición, Buenos Aires,

Copyright © by Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Toda la correspondencia referida a esta publicación debe dirigirse a:

All enquires regarding this publication should be addressed to:

Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Av. Alvear 1711, 4° piso, (1014) Buenos Aires.

E-mail: biblio@ancefn.org.ar

Sitio web: www.ancefn.org.ar

Queda hecho el depósito previsto por la Ley 11.723

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta obra puede ser reproducida o transmitida en cualquier forma o por cualquier medio electrónico o mecánico, incluyendo fotocopiado, grabación o cualquier otro sistema de archivo y recuperación de información, sin el previo permiso por escrito de la Academia.

ÍNDICE

PREFACIO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 1	
Metaloenzimas Dependientes de Cobre.....	8
Introducción	8
1. Cobre en Sistemas Biológicos	8
2. Enzimas de Cobre en Plantas	12
2.1. Sistemas de transferencia electrónica	12
2.2. Oxidasas de cobre	15
2.3. Cobre en reacciones de dismutación	20
2.4. Otros sistemas relacionados a cobre	22
CAPÍTULO 2	
Metaloenzimas Dependientes de Hierro	28
Introducción	28
1. Captación y Transporte de Hierro en las Plantas	28
2. Enzimas de Hierro en Plantas	31
2.1. Proteínas de hierro conteniendo enlaces Fe-S	31
2.2. Proteínas de hierro conteniendo el grupo hemo	37
2.3. Otras proteínas de hierro	45
CAPITULO 3	
Metaloenzimas Dependientes de Manganeso	56
Introducción	56
1. Características Esenciales de los Diferentes Estados de Oxidación del Manganeso.....	56
2. Aspectos Biológicos Relevantes del Manganeso,.....	57
3. Captación y Transporte de Manganeso en las Plantas.....	58
4. Enzimas de Manganeso en Plantas.....	59
4.1. Oxidoreductasas.....	59
4.2. Transferasas.....	66
4.3. Hidrolasas.....	66
4.4. Liasas.....	68
4.5. Isomerasas	69
4.6. Ligasas	70

5. Proteínas Conteniendo Manganeso Ligado	71
---	----

CAPÍTULO 4

Metaloenzimas Dependientes de Zinc..... 75

Introducción	75
1. Zinc en Sistemas Biológicos	75
2. Captación y Transporte de Zinc en las Plantas	77
3. Enzimas de Zinc en Plantas	78
3.1. Anhidrasa carbónica	78
3.2. Hidrolasas de zinc.....	80
3.3. Oxido-reductasas de zinc	84
3.4. Polimerasas de zinc.....	86
3.5. “Dedos de zinc”	88

CAPÍTULO 5

Metaloenzimas Dependientes de Níquel 92

Introducción	92
1. Esencialidad del Níquel para las Plantas	92
2. Captación y Distribución del Níquel en Plantas	92
3. Enzimas de Níquel en Plantas	93
3.1. Aspectos generales de las enzimas de níquel	93
3.2. Ureasa. Una enzima clave para las plantas	94
3.3. Glioxalasa I	99

CAPÍTULO 6

Metaloenzimas Dependientes de Molibdeno 104

Introducción	104
1. Captación y Transporte de Molibdeno en las Plantas	105
2. Biosíntesis del Cofactor de Molibdeno	106
3. Enzimas de Molibdeno en Plantas	108
3.1. Nitrato reductasa	108
3.2. Sulfito oxidasa	109
3.3. Aldehido oxidasa(s)	110
3.4. Xantina oxidasa	111

CAPÍTULO 7

Metaloenzimas Dependientes de Vanadio	114
Introducción	114
1. Vanadio en Plantas	115
2. Vanadio en Hongos	116
3. Haloperoxidasas Dependientes de Vanadio	120

CAPÍTULO 8

Funciones del Magnesio y el Calcio en Plantas	127
Introducción	127
1. Magnesio en Plantas	128
1.1. Captación y transporte de magnesio en las plantas	128
1.2. Funciones del magnesio en las plantas	128
2. Calcio en Plantas	133
2.1. Captación y transporte de calcio en plantas	133
2.2. Funciones del calcio en las plantas	133
3. Biominales de Calcio y Magnesio en Plantas	137

CAPÍTULO 9

Comentarios Sobre la Hiperacumulación de Metales por las Plantas	145
Introducción	145
1. Distribución Geográfica y Elementos Hiperacumulados	146
2. Algunos Ejemplos de Hiperacumulación	147
3. Cómo y por qué las Plantas Hiperacumulan Metales?	153
4. Potenciales Aplicaciones Prácticas de Plantas Hiperacumuladoras	154
4.1. Fitoremediación	154
4.2. Fitominería	155

PREFACIO

Durante más de cuarenta años me he dedicado al estudio de procesos y sistemas de biomineralización. Durante los últimos veinte años, esta actividad estuvo centrada en forma bastante continuada al estudio y análisis de biominerales de origen vegetal. Esta actividad me llevó, indirectamente, a explorar y a tratar de comprender diversos otros aspectos de la fisiología y de la bioquímica de las plantas. Estos estudios abrieron para mí un panorama bastante inesperado y novedoso, algo como ver de pronto frente a mí lo que podríamos llamar la Química Bioinorgánica de las Plantas, mostrándome que muchas de las funciones y sistemas bioinorgánicos presentes en los mamíferos (y que son los que habitualmente se analizan y discuten en nuestros cursos de Química Bioinorgánica) se encontraban también replicados en el reino vegetal, ciertamente con variadas peculiaridades y características propias, y a veces muy distintivas.

Los estudios de estos sistemas bioinorgánicos de plantas, me llevaron a la preparación de varios artículos de revisión para textos y publicaciones especializadas en fisiología vegetal y botánica.

Habiendo pensado en unificar toda esa interesante información, se me ocurrió ordenarla en forma de una publicación para la serie Publicaciones Científicas de la ANCEFN y de esta manera hacerla accesible en forma sencilla a todos los interesados en estas temáticas. Para ello, realicé una revisión y actualización de los artículos de revisión antes mencionados, y agregué algunos temas que no habían sido tratados hasta ahora en mis publicaciones previas.

Este material es el que pongo aquí a disposición de la comunidad científica y educativa y de todos los interesados en el mismo esperando sinceramente, que pueda ser de utilidad e interés para muy variadas actividades y estudios y que todos los lectores lleguen a disfrutarlo plenamente.

Finalmente, deseo agradecer a los colegas de la Sección de Ciencias Químicas, de la Tierra y Biológicas y a las autoridades de la Academia por haberse interesado en este proyecto y por haber apoyado con entusiasmo y sin reticencias su concreción.

Buenos Aires, abril de 2021.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos únicos, capaces de absorber agua y nutrientes a través de sus raíces, así como dióxido de carbono de la atmósfera. Esto hace que las características y calidad del suelo y el clima se constituyan en factores determinantes de la distribución de las plantas y de su desarrollo y crecimiento. La combinación de nutrientes, agua, dióxido de carbono y luz solar permiten el crecimiento de las plantas.

Dado que las plantas requieren nutrientes en la forma de elementos como carbono, hierro o calcio, es importante conocer la composición química de las mismas. La mayor parte del volumen celular de una planta, entre un 80 y 90% del peso de la planta, está constituida por agua. Y el suelo es la fuente de agua de todas las plantas terrestres. Las raíces absorben el agua y la transportan hacia las hojas a través del xilema. Cuando las hojas liberan el agua en forma de vapor, las raíces incorporan más agua para suplir la deficiencia, ya que el agua es requerida no sólo para mantener la estructura celular, sino también para el transporte de nutrientes, para realizar funciones metabólicas y para la fotosíntesis.

Aparte del agua, las células vegetales requieren de sustancias esenciales, que son las que comúnmente llamamos nutrientes. Estos nutrientes pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos. En definitiva, aparte de agua y luz las plantas requieren de unos 20 elementos para cumplir con todas sus funciones biológicas y bioquímicas fundamentales y estos elementos se conocen como nutrientes esenciales.

Tabla 1. Macro y micronutrientes esenciales para las plantas

MACRONUTRIENTES	MICRONUTRIENTES
H (Hidrógeno)	B (Boro)
C (Carbono)	Na (Sodio)
N (Nitrógeno)	Cl (Cloro)
O (Oxígeno)	Mn (Manganeso)
Mg (Magnesio)	Fe (Hierro)
P (Fósforo)	Co (Cobalto)
S (Azufre)	Ni (Níquel)
K (Potasio)	Cu (Cobre)
Ca (Calcio)	Zn (Zinc)
	Mo (Molibdeno)

La definición más simple de elemento esencial es, obviamente, de que es un elemento requerido para el mantenimiento de la vida y su ausencia resulta en la muerte o mal funcionamiento del organismo. Experimentalmente, este criterio muy riguroso no siempre es satisfecho y ha llevado a definiciones más amplias de la esencialidad. Por ejemplo, como los siguientes: Un elemento se considera esencial cuando su incorporación deficitaria produce un deterioro funcional y cuando el

mismo vuelve a sus niveles fisiológicos ese deterioro es revertido. El organismo no puede ni crecer ni completar su ciclo vital sin ese elemento. El elemento debe tener una influencia directa en el organismo y estar involucrado en sus procesos metabólicos. El efecto de un elemento esencial no puede ser reemplazado totalmente por ningún otro elemento [1].

Los elementos esenciales para las plantas pueden a su vez subdividirse en **macronutrientes** (elementos más abundantes) y **micronutrientes**. En la Tabla 1 se presentan estos elementos, ordenados por sus pesos atómicos crecientes.

Los macronutrientes esenciales H, C, N y O, acompañados a veces por P y S, son los constituyentes fundamentales de las moléculas orgánicas presentes en los tejidos de todos los seres vivos. También los elementos, K, Mg y Ca, así como el Na, suelen aparecer en concentraciones importantes en casi todos los organismos vivos [2]. Además de estos constituyentes mayoritarios las plantas, al igual que otros organismos, requieren acceder a cantidades apropiadas de los elementos micronutrientes, muchos de los cuales son metales con actividad redox y están presentes en los sitios activos de muchas metaloenzimas, mientras que otros (como es el caso del Zn) además de su papel en la catálisis pueden cumplir una importante función estructural en la estabilización de proteínas [2,3].

Una vez que un metal es absorbido por la raíz, su movimiento hacia las partes superiores de la planta está fuertemente relacionado a su posibilidad de formar complejos con diferentes moléculas orgánicas. Si bien este aspecto del tráfico metálico en muchos casos todavía no está claramente comprendido, se admite que, en general, los potenciales ligandos para metales en plantas pueden clasificarse en tres grupos: 1) ligandos donores de oxígeno (usualmente carboxilatos: citrato, malato, succinato, tartrato, oxalato, etc.); 2) ligandos donores de azufre (metalotioneínas y fitoquelatinas) y 3) donores nitrogenados (especialmente amino ácidos) [4]. Además, las plantas poseen mecanismos homeostáticos que le permiten mantener una correcta concentración de los elementos esenciales en diferentes compartimentos celulares y para minimizar el daño que puede producir la exposición a elementos no-esenciales o tóxicos. Una intrincada y perfectamente regulada red de transporte, complejación y distribución funciona de manera concertada para lograr estos objetivos de manera eficiente y muy precisa [3,5].

En los siguientes capítulos de este libro se analizarán en detalle aquellos micronutrientes metálicos que forman parte de sistemas enzimáticos y generalmente ocupan el sitio catalítico activo de los mismos (Mn, Fe, Ni, Cu, Zn y Mo). Además, se ha agregado un capítulo referido al vanadio, que si bien no aparece como un micronutriente esencial para las plantas superiores, forma parte de interesantes centros catalíticos encontrados en hongos, algas y líquenes. Asimismo, se ha agregado un capítulo referido a la importancia del calcio y el magnesio para las plantas. Si bien estos dos metales no participan como sitios activos en sistemas enzimáticos, actúan muchas veces en la estabilización, conformación y activación de numerosas enzimas importantes y además son constituyentes fundamentales de algunos biominerales típicos de las plantas. En el capítulo final se presenta un breve resumen del llamado fenómeno de hiperacumulación de metales, que ocurre en

ciertas especies de plantas y para determinados metales, siendo un fenómeno sumamente curioso y atractivo el cual inclusive ha desembocado en potenciales aplicaciones de estas especies hiperacumuladoras en los campos de la fitoremediación y la fitominería.

Y para terminar esta Introducción haremos algunos breves comentarios sobre la importancia y funciones de los elementos nutrientes esenciales no tratados en los capítulos siguientes.

Para comenzar digamos que los cationes alcalinos, **sodio** y **potasio**, que son relativamente abundantes en la corteza terrestre, muestran una distribución bastante diferente en la biosfera y también en el reino vegetal. En todos los organismos vivientes el K^+ siempre está presente en concentraciones relativamente importantes en el citoplasma, y varias veces mayores que las de Na^+ . Además, se sabe que altas concentraciones de Na^+ en el citoplasma pueden afectar seriamente a algunos procesos metabólicos, p.ej., la actividad fotosintética de las plantas [6]. Usualmente se admite que el sodio no es esencial para la mayoría de las plantas, excepto en algunas halófitas [6,7], pero en algunos casos puede comportarse como elemento benéfico en reemplazo del K^+ , como osmótico vacuolar [6]. También se ha sugerido que podría ser esencial para ciertas plantas tolerantes a la sal y que utilizan el metabolismo C_4 y, eventualmente, el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM). La inducción del metabolismo CAM por parte del $NaCl$ es considerada como una respuesta general a situaciones de estrés acuático [7]. En cambio, el potasio es claramente un elemento esencial para todas las plantas y es necesario para algunas funciones fisiológico-bioquímicas fundamentales: activación de enzimas, procesos de transporte a través de membranas, neutralización de aniones, neutralización eléctrica y regulación de la presión osmótica celular [6,7]. Por otra parte, el potasio también aparece involucrado en procesos de síntesis de proteínas y en la fotosíntesis [8].

El caso del **boro** es particularmente interesante ya que su naturaleza química muy particular sugiere una variedad de posibles funciones biológicas, sin embargo sus funciones metabólicas exactas aún no están claramente definidas [3]. Dado que el boro es requerido por las plantas superiores y por algunas algas y diatomeas pero no por animales, hongos o microorganismos, se piensa que debe cumplir algunas funciones únicas y especiales en las plantas [7]. De hecho, el boro parece estar involucrado en numerosos procesos importantes, incluyendo la síntesis de proteínas, el transporte de azúcares y el metabolismo de los carbohidratos en general. Sin embargo su función más importante parece estar relacionada a la síntesis de paredes celulares, y a la lignificación así como a la integridad estructural de biomembranas [2,3,7]. A los valores de pH, cercanos a la neutralidad, encontrados en la mayoría de los sistemas biológicos, el boro existe primariamente como ácido bórico, $B(OH)_3$, más una pequeña proporción de anión borato, $B(OH)_4^-$ [9]. Esto ha llevado a la especulación de que un posible mecanismo de acción del boro en las estructuras de membranas y paredes celulares, podría ser su interacción con *cis*-diones [7,9], una bien conocida reacción en la química del ácido bórico [10]. Por otra parte, varios autores han marcado también diversas interacciones importantes entre B y Ca en los sistemas vegetales [9,11].

En lo referido al **cloruro** y debido a que es un anión relativamente móvil en las plantas, muchas de sus funciones probablemente están relacionadas al balance de cargas eléctricas y también se ha establecido, recientemente, que es un cofactor importante del llamado complejo de evolución de oxígeno presente en el llamado fotosistema II [3]. Por otra parte, se sabe que existe un número importante de compuestos orgánicos conteniendo cloro, presente en todas las plantas [3,7]. Dado que la concentración de cloruro en las plantas es muy baja, se supone que no es un eficiente regulador de presión osmótica. Sin embargo, se acumula en ciertos tejidos y células específicas (p. ej., células de guardia). La apertura y cierre de las células de guardia es mediada por un flujo de potasio, malato y cloruro. De esta manera el cloruro aparecería involucrado, indirectamente, en el crecimiento de la planta y en la regulación estomatal [3].

En cuanto al **cobalto** si bien se sabe que desempeña algún papel en el metabolismo y el crecimiento de las plantas, su rol aún no está claramente definido, si bien una gran cantidad de investigaciones han establecido claramente que muy pequeñas cantidades del elemento tienen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas mientras que cantidades algo más grandes lo tornan tóxico [12,13]. También se ha establecido que la presencia de cobalto es beneficiosa en el retardo de la senescencia de las hojas y en el aumento a la resistencia de las semillas frente a situaciones de sequía. Asimismo, parece tener también algún efecto en la biosíntesis del etileno mientras que su papel en la fotosíntesis permanece controversial [13].

Para finalizar esta Introducción parece oportuno realizar algunos comentarios sobre otros dos elementos que usualmente están presentes en las plantas, pero cuya esencialidad todavía es motivo de disputa, el **silicio** y el **litio**. Durante mucho tiempo no hubo pruebas claras acerca de la esencialidad del silicio y el tema sigue abierto a discusión [7]. Evidentemente, por su amplia presencia y distribución en los suelos, las plantas tienen de siempre acceso a este elemento y, en muchas plantas se lo ha encontrado, impregnando las paredes de tejidos epidérmicos y vasculares sugiriéndose que su presencia refuerza esos tejidos, reduce las pérdidas de agua y retarda las infecciones fúngicas [7]. Varios estudios recientes apuntan fuertemente a la idea de que la presencia de este elemento en las plantas es mucho más importante de lo que se venía pensando, remarcándose muy especialmente su activa participación en la minimización de situaciones de estrés, tanto biótico como abiótico [14,15]. Un enfoque diferente empezó también a despertar un cierto interés en el silicio y es la probabilidad de que todos los organismos lo utilicen de alguna manera para detoxificar o minimizar los efectos tóxicos del Al(III) [2,16]. Desde el punto de vista de la química básica esta posibilidad no parece descabellada teniendo en cuenta la afinidad entre Al y Si, demostrada por ejemplo a través de la facilidad con que los grupos AlO_4^{5-} pueden reemplazar a los SiO_4^{4-} en los minerales formando las típicas estructuras de alúmino-silicatos. Y a partir de esas observaciones se ha postulado la formación de ciertos hidroxoaluminosilicatos, que serían de factible formación en condiciones fisiológicas y a través de cuya generación, el silicio podría mantener acotados los niveles de aluminio [2,16,17]. Para finalizar, también debemos recordar que diversas formas hidratadas del dióxido de silicio, usualmente llamadas ópalo o sílice biogénica constituyen uno de los biominerales característicos que pueden ser generados en el reino vegetal [2,18]. El mecanismo a través del cual

las plantas son capaces de mineralizar ácido silícico, proceso para el cual la literatura en lengua inglesa ha acuñado el término “*silicification*”, es sumamente complejo y parece involucrar a una vesícula específica llamada SDV (*silica deposition vesicle*) ligada a una membrana especializada denominada silicalema y que parece ser la matriz orgánica orientadora del proceso de biomineralización [2,18].

En lo que hace al litio se sabe que prácticamente todas las plantas son capaces de captarlo desde los suelos, aunque hasta ahora no se ha demostrado que este elemento sea requerido para su crecimiento y desarrollo. Lo que sí está claramente establecido es que altos niveles de Li en suelos son tóxicos para las plantas, generando condiciones de clorosis [19,20]. Sin embargo diversos estudios de laboratorio han demostrado que el agregado de bajas concentraciones litio a las soluciones de cultivo potencia el crecimiento de ciertas plantas [20,21]. Y, por otra parte, investigadores rusos reportaron efectos beneficiosos del litio en el desarrollo de las plantas, remarcando una influencia positiva en los contenidos de clorofila, aumentos de biomasa y en el metabolismo del nitrógeno y los carbohidratos. En base a estos estudios formularon algunos nuevos fertilizantes conteniendo litio para su uso en agricultura, encontrando también algunos efectos positivos muy interesantes [20,21]. De todas maneras, en el estado actual de nuestros conocimientos todavía no puede definirse con certeza si el litio cumple una función esencial en las plantas.

REFERENCIAS

- [1] E. Frieden, A Survey of the Essential Biochemical Elements. En: *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*, E. Frieden (Ed.), Plenum Press, New York, 1984, pp. 1-15.
- [2] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [3] R. Hänsch & R.R. Mendel, *Curr. Op. Plant Biol.* **12**, 259 (2009).
- [4] D.L. Callahan, A.J.M. Baker, S.D. Kolev & A.G. Wedd, *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 2 (2006).
- [5] S. Clemens, *Planta* **212**, 475 (2001).
- [6] M. Nieves-Cordones, F.R. Al Shiblawi & H. Sentenac, Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. En: *Metal Ions in Life Sciences*, A. Sigel, H. Sigel & R.K.O. Sigel (Eds.), vol. 16, Springer, Berlin, 2016, pp. 291-234.
- [7] D.T. Clarkson & J.B. Hanson, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 239 (1980).
- [8] M. Hawkesford, W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J.Schjoerring, I. Skrumsager Møller & P. White, Functions of Macronutrients. En: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd. Edit., P. Marschner (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 2012, pp. 135-189.
- [9] L. Bolaños, K. Lukaszewski, I. Bonilla & D. Blevins, *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 907 (2004).
- [10] R.B. Heslop & H. Jones, *Inorganic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- [11] I. Bonilla, A. El-Hamdaoui & L. Bolaños, *Plant Soil* **267**, 97 (2004).
- [12] R.S. Young, Cobalt. En: *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*, E. Frieden (Ed.), Plenum Press, New York, 1984, pp. 113-147.
- [13] S. Palit, A. Sharma & G. Talukder, *Bot. Rev.* **60**, 149 (1984).

- [14] H.A. Currie & C.C. Perry, *Ann. Bot.* **100**, 1383 (2007).
- [15] A. Frew, L.A. Weston, O.L. Reynolds & G.M. Gurr, *Ann. Bot.* **121**, 1265 (2018).
- [16] J.D. Birchall, *Chem. Brit.* **26**, 141 (1990).
- [17] C. Exley, C. Schneider & F.J. Doucet, *Coord. Chem. Rev.* **228**, 127 (2002).
- [18] P.V. Monje & E.J. Baran, Plant Biomineralization. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 7, Scientific Publishers, Jodhpur, 2004, pp. 395-410.
- [19] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, 4th. Edit., CRC-Press, Boca Raton, 2011.
- [20] E.J. Baran, Lithium in Plants. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 18, Scientific Publishers, Jodhpur, 2019, pp. 154-161.
- [21] C.E. Anderson, Lithium in Plants. En: *Lithium and Cell Physiology*, R.O. Bach & V.S. Gallicchio (Eds.), Springer, New York, 1990, pp. 24-46.

CAPITULO 1

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE COBRE

INTRODUCCIÓN

Junto al hierro y al zinc el cobre es el más abundante de los metales de transición presente en los sistemas vivientes y está involucrado en un importante número de funciones y procesos biológicos y bioquímicos. Las metaloenzimas de cobre están presentes en oxidasas, participan del transporte de electrones y en reacciones de oxigenación y dismutación y, en el caso de artrópodos y moluscos, también en el transporte de oxígeno [1-4]. Todo esto significa también que desempeña un rol central en la fisiología y el metabolismo vegetal [5-8].

Por otra parte, numerosos compuestos de cobre y, en particular complejos de Cu(II), poseen un interés farmacológico relevante y creciente dado que varios de ellos muestran un importante número de efectos, incluyendo actividad anti-inflamatoria, anti-ulcerosa, anti-convulsivante y antitumoral [2,9-14].

En este capítulo presentaremos una visión general de las propiedades estructurales y funcionales de enzimas dependientes de cobre, precedida de una breve introducción sobre las características generales y el comportamiento del cobre en sistemas biológicos, así como a diversos aspectos relacionados a la captación y transporte de cobre por parte de las plantas.

1. COBRE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

1.1. Aspectos generales

Después del hierro y el zinc el cobre es el tercer metal de transición más abundante en todas las formas elevadas de vida [2] y, al igual que el hierro y a diferencia del zinc, es un metal que posee actividad redox. En los organismos vivientes presenta dos estados de oxidación estables (Cu(I) y Cu(II)) con una cupla redox adaptable al rango de los potenciales de óxido-reducción biológicos.

En términos de la teoría de ácidos y bases duros y blandos de Pearson [15-17], el Cu(I) es un catión blando que se liga preferencialmente a ligandos blandos como los grupos sulfuro, mientras que el Cu(II) es un catión de acidez intermedia que prefiere donores nitrogenados u oxigenados para su coordinación.

Como consecuencia de los cambios atmosféricos que ocurrieron durante la evolución de nuestro planeta [18,19] la Naturaleza ha generado una serie de sistemas dependientes de hierro que también tienen sus análogos en las proteínas conteniendo cobre. El hierro fue utilizado para transferencias electrónicas en las etapas iniciales de la evolución, cuando las concentraciones de O₂ eran más bajas, mientras que la utilización de cobre a esos fines comenzó más tarde y, consecuentemente, el cobre es importante para organismos relativamente “nuevos” y las cuplas redox Cu(II)/Cu(I) presentan potenciales mayores que las cuplas Fe(III)/Fe(II). El hecho de que la mayoría de las enzimas de cobre se encuentran en

eucariotas es consistente con esta hipótesis, dado que se considera que las eucariotas han tenido un desarrollo relativamente reciente en la escala bio-geoquímica [20].

En soluciones acuosas neutras o en el agua de mar las sales de Cu(II) son más solubles que las de Cu(I). Contrariamente, en el caso de la cupla Fe(III)/Fe(II) la forma oxidada es menos soluble. Esto significa que altas concentraciones de O₂ favorecen la precipitación del hierro y la movilización del cobre. Además, y debido a su aparición y biodisponibilidad evolutiva posterior, el cobre se encuentra muchas veces en espacios extracelulares mientras que el hierro se encuentra habitualmente en el interior celular [21].

El cobre tiene una afinidad particularmente elevada por el dioxígeno, lo que explica que sea el centro catalítico en muchas oxidasas de plantas. Más de la mitad del cobre presente en plantas se encuentra en los cloroplastos y participa de reacciones fotosintéticas. También resulta interesante de destacar que el metabolismo del cobre está íntimamente ligado al del hierro y, dependiendo de la biodisponibilidad de ambos elementos, las plantas poseen enzimas para el uso alternativo de hierro o cobre, catalizando la misma reacción con apoproteínas totalmente diferentes [7].

1.2. Características de los sitios de cobre presentes en proteínas

Usualmente, los complejos simples de Cu(II) poseen simetría tetragonal con cuatro ligandos ecuatoriales coordinados fuertemente en el plano *xy* y dos ligandos más débilmente coordinados a lo largo del eje *z*, como consecuencia directa del efecto Jahn-Teller para la configuración electrónica d^9 [15,22]. En el estado fundamental, el electrón desapareado está ubicado en la orbital $3d_{x^2-y^2}$ y este estado genera un espectro EPR característico con $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.00$ y un importante desdoblamiento hiperfino paralelo, $A_{\parallel} > 140$ [23].

Históricamente, los sitios de Cu(II) en proteínas han sido divididos en base a sus características espectroscópicas, las que reflejan la estructura geométrica y electrónica de los sitios activos [2,24,25].

Proteínas de cobre de **tipo-1** (muchas veces llamadas “proteínas azules”) muestran características espectrales excepcionalmente diferentes en comparación con la de los complejos normales de Cu(II) descritos más arriba. Muestran una fuerte banda de absorción ($\epsilon \sim 3000-6000 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en su espectro electrónico, a ca. 600 nm, que es la responsable del intenso color azul de esas proteínas. El desdoblamiento hiperfino paralelo en sus espectros de EPR está fuertemente reducido y todos estos sistemas muestran también potenciales de reducción sumamente elevados.

Las proteínas de cobre de **tipo-2** presentan espectros electrónicos y de EPR totalmente comparables a los de complejos de coordinación de Werner sencillos (una banda de absorción en su espectro electrónico a ca. 600 nm con valores de ϵ alrededor de $10-20 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y un fuerte desdoblamiento hiperfino paralelo en el espectro EPR).

Las proteínas de cobre de **tipo-3** contienen sitios binucleares de Cu(II), que son EPR inactivos, debido a fuertes acoplamientos antiferromagnéticos. Presentan una intensa banda de absorción en el espectro electrónico alrededor de los 350 nm ($\epsilon \sim 20.000 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Debido a sus muy peculiares características fisicoquímicas los sitios de tipo-1 despertaron especial interés y atención durante muchos años. Afortunadamente, en la actualidad existen estudios cristalográficos de alta resolución para este sitio en diversas proteínas [21,24], que permitieron aclarar definitivamente sus características generales. La estructura esquemática de este tipo de centro de cobre se muestra en la Fig. 1.

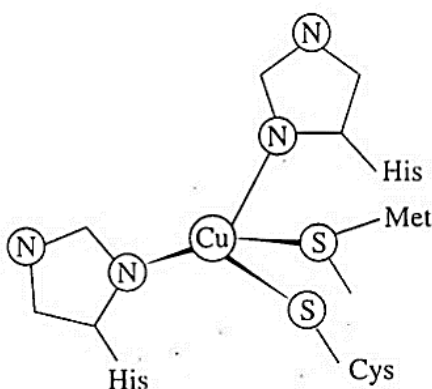


Fig.1. Estructura esquemática del sitio de cobre tipo-1.

El catión Cu(II) presenta una estructura tetraédrica distorsionada con un enlace tiolato S-Cu muy corto (2.13 \AA), involucrando un residuo de cisteína; los otros tres ligandos son dos átomos de N de residuos de histidina y un S de tioéter, proveniente de un residuo de metionina con un enlace Cu-S relativamente largo (2.90 \AA). El característico color azul intenso de este sitio se origina en una transferencia de carga $S \rightarrow \text{Cu}$, que involucra el corto enlace de tiolato y las típicas características del espectro EPR aparecen generadas por la elevada covalencia en el sitio metálico (el electrón desapareado está fuertemente delocalizado hacia el ligando cisteína, reduciendo su interacción con el espín nuclear del cobre) [25].

El muy peculiar ordenamiento geométrico y la presencia de dos donores “duros” (N) y dos donores “blandos” (S) alrededor del centro metálico, evidentemente facilitan la función de la cupla Cu(II)/Cu(I) durante la actividad de estos centros [2].

Es interesante de mencionar que ciertos sistemas biológicos contienen combinaciones de las tres clases de sitios de cobre. Por otro lado, algunos estudios recientes demostraron la existencia de característicos sitios trinucleares conformados por un sitio de tipo-2 y uno de tipo-3 (binuclear) [2,24].

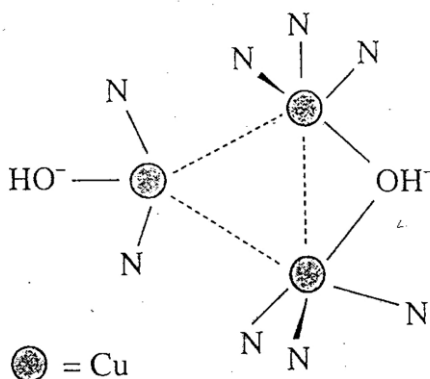


Fig.2. Estructura esquemática del cúmulo trinuclear de cobre.

Como puede verse en la Fig. 2 los dos cobres del sitio binuclear están coordinados por tres átomos de N de residuos de histidina y están puenteados por un grupo oxhidrilo. El sitio de tipo-2 puede ser descrito como centro tri-coordinado con dos átomos de N (histidina) y un grupo OH⁻, enfrentando al cúmulo traingular. Todas las distancias Cu-Cu son menores que 4.0 Å.

1.3. Captación de cobre por las plantas

El cobre es un micronutriente esencial para las plantas debido al papel que desempeña en diferentes sistemas enzimáticos, involucrando la fotosíntesis y otras funciones fisiológicas relevantes. Sin embargo, y similarmente a lo que ocurre en el caso de otros metales con actividad redox, el cobre se vuelve tóxico a concentraciones elevadas. Por esta razón, las plantas regulan sus niveles intracelulares de cobre, regulando su captación así como minimizando la concentración de cobre libre en las células, a través de las llamadas metalo-chaperonas [8,26].

Aunque no existe todavía demasiada información acerca de los mecanismos de captación de cobre, en años recientes ha habido avances notables en relación a su transporte en el reino vegetal [26,27].

Para la captación de hierro del suelo, las gramíneas utilizan la llamada Estrategia-II [28,29] a través de la cual un ligando Fe-específico (fitosideroforo), el ácido muginéico, es segregado desde las raíces para complejar al Fe(III) en la rizosfera. El complejo Fe(III)/fitosideroforo entra a las raíces *vía* un transportador específico. Un mecanismo similar podría actuar en la homeostasis de otros metales, tales como Cu, Zn, Mn o Ni [29-31].

1.4. Transporte de cobre en plantas

Sistemas adecuados para la incorporación de metales desde las raíces, transporte y distribución en el tejido vegetal y regulación de sus concentraciones

citosólicas son claramente parte integral del crecimiento y desarrollo de las plantas y en ellas las proteínas de transporte juegan un papel central [32].

La complejidad de las metaloenzimas abarca desde un único ion metálico unido a residuos de proteínas, hasta cúmulos polinucleares, que incluyen cadenas laterales de proteínas o ligandos exógenos como agua o iones sulfuro. La constitución de estos centros metálicos es un proceso sumamente complejo que involucra la participación de varias proteínas accesorias o de ayuda. Una de estas clases de proteínas accesorias son las arriba mencionadas metalo-chaperonas, que ligan cationes metálicos y los liberan directamente en el sitio enzimático *via* interacción proteína-proteína [33]. Estas chaperonas tienen que generar complejos termodinámicamente estables hasta acercarse a la apoproteína con la que van a interactuar, pero el metal dentro del complejo debe ser cinéticamente lábil para permitir un rápido intercambio para su apropiado transporte y distribución [3]. La forma en la que las metalo-chaperonas ligan cationes metálicos, reconocen proteínas específicas para interactuar y facilitan la transferencia metálica son todavía cuestiones importantes totalmente sin respuestas en el campo de la Química Bioinorgánica [8].

2. ENZIMAS DE COBRE EN PLANTAS

2.1. Sistemas de transferencia electrónica

Uno de los procesos elementales más sencillos en la química de soluciones homogéneas es la transferencia electrónica, dado que no es necesario romper ni formar enlaces químicos. Se requieren dos participantes, **D** (agente donador o reductor) y **A** (agente aceptor u oxidante), cada uno de los cuales debe poseer al menos dos estados de oxidación accesibles. Cuando ambos agentes **D** y **A** son iones metálicos, se han establecido dos vías de transferencia electrónica [1, 15, 34]:

a) Transferencia electrónica de esfera externa, cuando la esfera de coordinación de ambos, **D** y **A**, sólo se ve levemente alterada y no se producen rupturas de enlaces metal-ligando durante la reacción.

b) Transferencia electrónica de esfera interna cuando **D** y **A** forman un enlace químico a través de un ligando puente común a ambas esferas de coordinación conectando ambos centros metálicos y proveyendo una serie de orbitales solapadas que facilitan la eficiente transferencia electrónica.

En sistemas biológicos, el primer proceso generalmente es el más utilizado, mientras que la transferencia electrónica directa a través de un complejo de esfera interna es habitualmente utilizada sólo en transformaciones químicas relativamente complejas [1] y diversos aspectos generales relacionados a los sitios químicos involucrados son bien conocidos [35]:

1. En proteínas de transferencia electrónica, los ligandos alrededor del centro metálico son seleccionados para facilitar las velocidades de transferencia; ellos reducen la carga y favorecen configuraciones de bajo espín en el centro metálico. La presencia de sulfuro, imidazol o porfirina para Fe y Cu en todas las proteínas importantes de transferencia electrónica, son claros ejemplos de ello.

2. La geometría alrededor del centro metálico es generada por el plegamiento proteico y es tan fuerte que se minimiza al mínimo el reordenamiento de ligandos, al variar la carga.

3. Los sitios metálicos están inmersos unos 10 Å dentro de la proteína para prevenir reacciones adventicias con moléculas pequeñas. La esfera de coordinación está efectivamente completa y es inviolable debido a que el plegamiento proteico no se relaja fácilmente y el sitio metálico está protegido del solvente, agua.

4. Las tres condiciones previamente enunciadas generan sitios ideales de transferencia electrónica y las constantes de velocidad obtenidas, del orden de 10^5 seg^{-1} , son adecuadas para los sistemas biológicos.

5. La ubicación del ión metálico justo debajo de la superficie de la proteína genera una distancia de unos 10 Å entre su esfera de coordinación y la de una o hasta dos esferas de transferencia de carga de otros centros proteicos.

6. El control termodinámico (potencial redox) está generado por un conjunto complejo de factores que incluyen la esfera de coordinación y su geometría, las características de la proteína envolvente, así como la exposición al solvente. Estos potenciales han evolucionado para controlar las velocidades y permitir la conexión de los electrones con el movimiento protónico.

Existe un número de proteínas de cobre, conformadas por una cadena polipeptídica simple de unos 90-150 residuos de amino ácidos, unida a un centro de cobre de tipo-1 (“proteínas azules”), involucradas en la transferencia de electrones. Se las ha denominado muchas veces cupredoxinas, por analogía con las proteínas análogas de hierro, llamadas ferredoxinas [1,3]. Los ligandos del cobre en estos sitios son exclusivamente residuos de amino ácidos, hecho que argumenta a favor de la adaptabilidad de la cupla redox Cu(II)/Cu(I), que evidentemente no necesita de un grupo prostético como requiere el hierro [21].

2.1.1. Plastocianinas

Las plastocianinas han sido aisladas en una variedad de plantas superiores, así como de algas y funcionan como transportadoras de electrones entre los dos complejos de membrana citocromo b₆f y fotosistema I en la cadena de transferencia electrónica de la fotosíntesis. La cadena polipeptídica tiene un peso molecular de unos 10.500 Da y muestra un importante número de residuos conservados, particularmente en las plastocianinas de plantas superiores, en las cuales cerca de la mitad de esos residuos son los mismos [5,36].

Las plastocianinas muestran potenciales redox entre 340 y 370 mV, que sufren alteraciones a bajos valores de pH. Consecuentemente, la proteína muestra inactividad redox a pH 4,5, debido a un importante cambio conformacional, inducido por la protonación y desprendimiento de uno de los residuos de histidina [21].

2.1.2. Stellacianinas

Las stellacianinas constituyeron el primer ejemplo de un grupo de “proteínas azules” conteniendo glutamina como ligando axial, en lugar del usual residuo de metionina. Son glicoproteínas con un contenido variable de carbohidratos y presentan potenciales de reducción más bajos que otras “proteínas azules”. Esta familia incluye a la primera proteína de este tipo, aislada del llamado árbol de la laca, *Rhus vernicifera*, y luego de algunas otras especies como las raíces de rábano, el pepino y el calabacín verde. Diversas evidencias experimentales sugieren que las stellacianinas son proteínas ubicadas en las paredes celulares e involucradas en sistemas de defensa [21].

2.1.3. Plantacianinas

Las plantacianinas son, básicamente, “proteínas azules” no glicosiladas y fueron aisladas de espinaca, remolacha, espárragos y pepinos, siendo las últimas las más investigadas y generalmente conocidas como proteínas básicas de pepino [21]. La estructura de esta proteína ha sido investigada por diferentes autores y finalmente pudo ser resuelta y refinada a una resolución de 1.8 Å. El sitio de Cu(II) presenta una geometría trigonal-piramidal distorsionada (simetría aproximada C_{3v}) [37].

Algunos años después la estructura de una plantacianina de espinaca también pudo ser resuelta a una resolución de 2.05 Å. El cristal contiene tres monómeros de la así llamada proteína básica de espinaca, cuyo potencial redox es, llamativamente, marcadamente diferente a la de la proteína aislada de pepino [38].

Una peculiaridad estructural muy interesante de estos sistemas es que muestran enlaces Cu(II)-S(Met) relativamente cortos, en comparación con los determinados en otros centros de “proteínas azules”. Esta distancia es de 2.61 Å en la proteína de pepino [37] y presenta valores de 2.78, 2.68 and 2.56 Å en las tres unidades que conforman la estructura de la proteína de espinaca [38].

La posible función biológica de estas proteínas de cobre todavía no está definitivamente clarificada [38].

2.1.4. Umecianinas

Esta es otra proteína conteniendo un centro de cobre de tipo-1, encontrada en las raíces del rábano rústico (*Armoracia laphatifolia*). Fue aislada primeramente como un sub-producto, durante el aislamiento de peroxidasa de esa planta [39] y posee un peso molecular de unos 14 kDa. Su rol funcional aún se desconoce [5, 40], pero debe notarse que diversas proteínas pequeñas conteniendo cobre de tipo-1 han sido aisladas como sub-productos durante la purificación de enzimas más grandes con las cuales aparecen funcionalmente relacionadas [40].

Como en el caso de las stellacianinas, el centro de cobre está coordinado por dos átomos de N de residuos de histidina, un átomo de S de cisteína y un átomo de O de un residuo de glutamina [40,41].

2.2. Oxidasas de cobre

2.2.1. Oxidasas de cobre azul

Las oxidasas azules de cobre son enzimas ampliamente distribuidas en la Naturaleza y se encuentran en bacterias, hongos, plantas y animales. Catalizan la reducción, por cuatro electrones, de O_2 a H_2O . Esta reacción es muy importante para los seres vivos debido a que es una fuente de energía libre y evita el desprendimiento de formas parcialmente oxidadas de la molécula de O_2 , tales como el H_2O_2 o los radicales hidroxilo, que son sumamente tóxicas para las células.

Estos sistemas pueden definirse como oxidasas multi-cobre, dado que estudios estructurales y espectroscópicos muy detallados han demostrado que todos ellos contienen al menos un sitio de cobre “azul” de tipo-1 y un cúmulo trinuclear conformado por un Cu tipo-2 y un Cu tipo-3 (ver nuevamente Fig. 2) como unidad funcional mínima [25]. Los dos miembros conocidos de este grupo, hallados en plantas son las lacasas y la ascorbato oxidasa.

2.2.1.1. Lacasas

La lacasa (p-difenol-dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2.) es la más simple de las oxidasas “azules” conocidas y aparece involucrada en la degradación de la lignina. Se supone que también puede desempeñar un papel importante en la patogénesis, la esporulación y en el desarrollo de los frutos. El primer reporte conocido sobre esta enzima, aislada de exudados de la llamada planta de laca japonesa, *Rhus vernicifera*, data ya de 1883. Adicionalmente, diversas lacasas de origen fúngico fueron caracterizadas hacia fines del siglo XIX [21,42].

Las lacasas consisten en una cadena polipeptídica simple conteniendo unos 500 residuos de amino ácidos, sus pesos moleculares a veces están fuertemente aumentados debido a un extensivo recubrimiento de carbohidratos. El sitio de tipo-1 acepta electrones del sustrato (usualmente difenoles o aminofenoles) y luego los transfiere al sitio trinuclear, donde tiene lugar la reducción del O_2 a agua [21,42].

2.2.1.2. Ascorbato oxidasa

La ascorbato oxidasa (L-ascorbato-dioxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.3.) está ampliamente difundida en el reino vegetal, catalizando la oxidación de ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico (Fig.3) y este ácido aparece como el sustrato fisiológico más adecuado y rápido de reaccionar, y que en los vegetales está involucrado con procesos celulares relacionados al crecimiento, protección y desarrollo de las plantas [43]. Además, la enzima puede oxidar otros sustratos, aunque su rol fisiológico en las plantas todavía no está claramente definido [25].

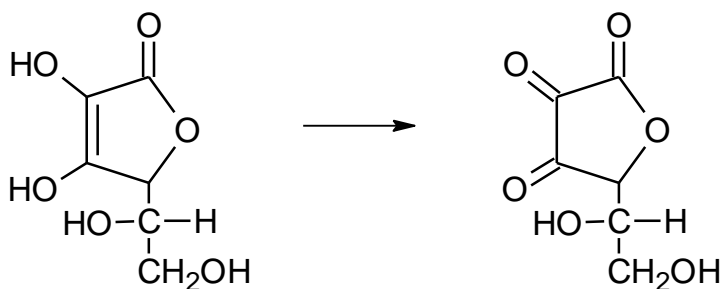


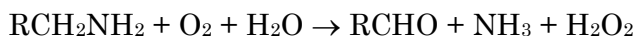
Fig. 3. Oxidación de ácido L-ascórbico, a ácido dehidroascórbico, catalizada por la enzima ascorbato oxidasa.

Su mecanismo de acción es probablemente similar al de las lacasas, teniendo en cuenta las fuertes analogías estructurales entre ambos sistemas. La ascorbato oxidasa fue la primera de las oxidasas “azules” en ser caracterizada estructuralmente [44,45]. El sitio activo contiene al cobre mononuclear de tipo-1, coordinado como es habitual por dos residuos de histidina, uno de cisteína y otro de metionina, y está separado por alrededor de 12,5 Å del cúmulo trinuclear acompañante.

2.2.2. Oxidasas de cobre no-azul

2.2.2.1. Amino oxidasas

Las amino oxidasas conteniendo cobre (EC 1.4.3.6) catalizan la desaminación oxidativa de aminas primarias por O_2 en una reacción de aminotransferasa, en dos etapas, para producir H_2O_2 , NH_3 y aldehídos [34,46]:



Estas enzimas están ampliamente difundidas, encontrándose tanto en procariotas como en eucariotas, en las primeras permiten a los microorganismos la utilización de variadas aminas como sustrato, como fuentes de carbono y nitrógeno. Por otra parte, en las eucariotas se ha sugerido que participan en procesos de detoxificación, mecanismos de defensa, señalización celular y, en el caso de plantas, en la lignificación. El sitio activo se conoce con cierto detalle y contiene un catión $Cu(II)$ que presenta una geometría cuadrado-piramidal distorsionada conformando su esfera de coordinación con tres N-histidina y dos moléculas de H_2O , una en posición axial y la otra en posición ecuatorial [34].

Más remarcable resulta ser la presencia del cofactor 2,4,5-trihidroxifenilalanina (TPQ, Fig. 4), ubicado a unos 6 Å del centro metálico. El sitio activo también contiene un residuo conservado de aspartato (Asp383), crucial para el mecanismo de reacción [34,46].

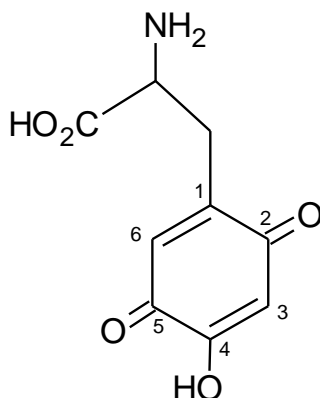
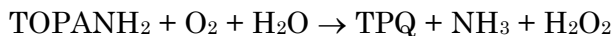
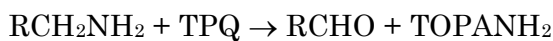


Fig. 4. Estructura esquemática de 2,4,5- trihidroxifenilalanina (TPQ cofactor).

Hay evidencias de que la formación de TPQ es una reacción de auto procesamiento que no requiere de ningún sistema enzimático específico. El cobre unido a la proteína parece jugar un papel crucial en la conversión de un residuo específico de tirosina en el cofactor [34].

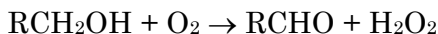
Este cofactor parece esencial para el proceso de oxidación, proveyendo el poder oxidativo de dos electrones de la enzima. Y se admite que el mecanismo general consiste en dos reacciones sucesivas:



La primera reacción involucra la interacción del sustrato con el TPQ y generación de un complejo de base de Schiff, cuya deprotonación, por el sitio activo de aspartato e hidrólisis de la imina intermedia genera un aminofenol reducido de TPQ y libera el aldehído producto. En la segunda etapa, el cofactor reducido es reoxidado a TPQ por O_2 molecular, generando peróxido de hidrógeno y amoníaco [34].

2.2.2.2. Galactosa oxidasa

La galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9) es una enzima extracelular que cataliza la oxidación de alcoholes primarios (incluyendo D-galactosa y polisacáridos conteniendo D-galactosa) a aldehídos por oxígeno molecular [46,47], produciendo peróxido de hidrógeno como producto secundario:



Aunque inicialmente fue solo identificada en hongos filamentosos, los genes de galactosa oxidasa han sido reconocidos posteriormente en procariontas y plantas [48]. Desde el punto de vista de la forma de la proteína, el sitio activo se ubica en una conformación terciaria de β -hélice. Esta forma fue inicialmente descubierta en *Drosophila* [49] y está muy ampliamente difundida en diversos

organismos extendiéndose a virus, hongos, plantas y mamíferos, aunque en todos los casos la secuencia primaria parece estar escasamente conservada [50].

El sitio de Cu tipo-2 presente en esta enzima muestra una geometría aproximadamente piramidal cuadrada, teniendo en el plano ecuatorial dos átomos de N (histidina), un átomo de O (tirosina) y un átomo de O (acetato, aunque este ligando se origina de la solución buffer en la que la enzima fue cristalizada, en el sistema nativo esta posición está ocupada por un átomo de O de agua). En posición apical se ubica otro átomo de O (tirosina), débilmente coordinado [46].

La galactosa oxidasa es, en cierto sentido, inusual entre las metaloenzimas que catalizan reacciones por dos electrones en un sitio metálico mononuclear. Una serie de estudios bioquímicos y espectroscópicos mostraron que como componente esencial de la enzima activa se produce la estabilización de un radical libre, generando una cupla radical libre/sitio de cobre [51]. Este radical libre aparentemente se localiza en el residuo de tirosina apical unido al cobre [46] y su presencia no es inmediatamente aparente ya que ni el Cu(II) ni el radical libre producen una señal de EPR, como consecuencia de un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre esos dos centros. Ambos, el centro metálico y el radical libre presentan actividad redox y participan directamente en la catálisis, generando la unidad redox de dos electrones necesaria para producir la reacción [51].

2.2.2.3. Catecol oxidasa

La catecol oxidasa (EC 1.10.3.1) junto con las tirosinasa (ver Secc. siguiente) constituyen un grupo importante de oxidasas de plantas, pertenecientes a la clase de proteínas conteniendo cobres de tipo-3 [46,52]. Estas enzimas usan O₂ para oxigenar orto-difenoles (catecoles) a quinonas (actividad de catecolasa), como se muestra en la Fig.5.

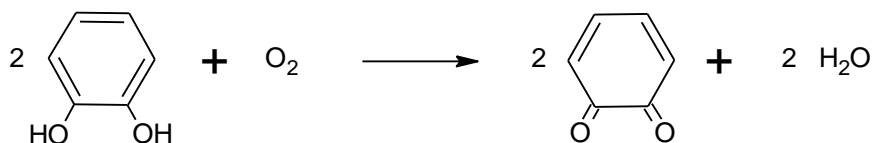


Fig. 5. Oxidación de un *o*-difenol a la correspondiente *o*-quinona.

Las catecol oxidasas se han aislado y purificado de diferentes fuentes (espinaca, batatas, manzana, porotos, bananas, plantas de café, etc.). La determinación estructural de cristales de catecol oxidasa, aislada de batata dulce (*Ipomoea batatus*) fue publicada en 1998 [53]. El centro catalítico, un cobre de tipo-3, está ubicado cerca de la superficie del arrollamiento proteico. Ambos centros metálicos poseen tres ligandos histidina y adicionalmente están unidos por un puente de OH⁻ que actúa como cuarto ligando de cada uno de ellos. En la forma oxidada [Cu(II)-Cu(II)] los dos iones cúpricos están separados unos 2.9 Å y no dan señales en el espectro de EPR, debido a un fuerte acoplamiento antiferromagnético, seguramente inducido por un mecanismo de super-intercambio en el que participa el

OH⁻ puente [52]. Después de la reducción la separación entre los centros metálicos crece marcadamente a unos 4.4 Å, mientras que las histidinas se desplazan solo débilmente y no se observan cambios conformacionales importantes para los otros residuos de proteína.

2.2.2.4. Tirosinasa

La tirosinasa (EC 1.14.18.1) es también una proteína de conteniendo un cobre de tipo-3, capaz de catalizar dos tipos de reacciones: la hidroxilación de monofenoles a *orto*-difenoles (actividad de monooxigenasa, Fig. 6) y también la oxidación de *o*-difenoles a las correspondientes *o*-quinonas. En otras palabras, la tirosinasa posee adicionalmente a la actividad de catecolasa la de monooxigenasa, que le permite a esta enzima aceptar monofenoles como sustrato (p. ej. tirosina).

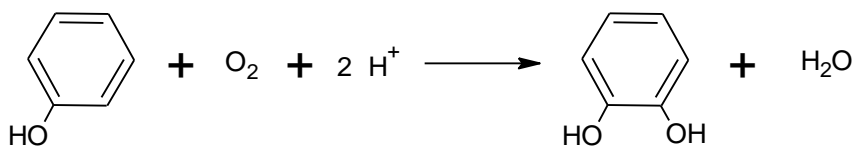
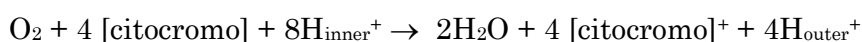


Fig. 6. Hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles.

La tirosinasa está ampliamente difundida en la Naturaleza y se encuentra tanto en bacterias, como en insectos, plantas y animales y es usada, por ejemplo, en la formación de los pigmentos de la melanina, siendo también responsable del color marrón que toman muchos frutos expuestos al aire. Su estructura aún no es conocida, pero diversos estudios espectroscópicos muestran fuertes similitudes entre tirosinasa, catecol oxidasa y hemocianina [34,52]. Dado que los centros de 2Cu en los tres sistemas son muy similares, se ha sugerido que la fijación inicial de O₂ en todos ellos ocurre de manera similar, implicando un mecanismo inicial similar para la fijación y activación de la molécula de dioxígeno [2,46].

2.2.2.5. Citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) es una de las oxidasas terminales en las cadenas de transporte electrónico en bacterias aeróbicas o en la mitocondria de las eucariotas. Es una de las metaloproteínas más importantes, pero también de las más complejas, encontradas en organismos vivientes. Usualmente está conformada por 13 subunidades con un peso molecular total del orden de los 20 kDa. Es una proteína unida a membrana, que genera la reducción de O₂ a H₂O con la concomitante oxidación de cuatro equivalentes del citocromo. La reacción global puede expresarse como [46]:



y parte de la energía libre de reacción es utilizada para impulsar la translocación de protones desde la matriz acuosa al espacio inter-membrana de la mitocondria. Esto significa que la enzima es una bomba de protones impulsada por un proceso redox, que acopla la energía del proceso redox con el transporte endoérgico vectorial de protones.

Las citocromo c oxidasas de plantas hasta ahora estudiadas (de batata, maíz y guisantes) muestran una composición diferente de sus subunidades a las encontradas en otras oxidasas de eucariotas [54]. Estudios estructurales de esta enzima hasta ahora sólo han sido reportados para muestras aisladas de corazón de bovino y de bacterias [46].

Cada molécula de citocromo c oxidasa contiene los siguientes centros metálicos [46]:

- Un sitio dinuclear (Cu_A) de transferencia electrónica
- Un cofactor hemo aislado, que habitualmente es un grupo hemo- α , y que también cumple funciones de transferencia electrónica
- Un segundo cofactor hemo, generalmente un grupo hemo- α_3 , y un centro de cobre tipo-2 (Cu_B) en posición muy cercana. Este par Fe/Cu sería el sitio de reducción del O_2 .

La estructura del centro bimetálico Cu_A ha sido motivo de largos e intensos debates. Los dos cationes cobres están puenteados por dos átomos de S de dos residuos de cisteína, formando una unidad Cu_2S_2 casi planar, con una distancia Cu-Cu muy corta. Sin embargo la estructura no es simétrica, ya que uno de los cobres está unido a un residuo de histidina y a uno de metionina, generando un entorno casi tetraédrico mientras que el otro metal adopta una geometría trigonal, coordinando a un residuo de histidina y a uno de glutamato. Por otra parte, este centro bimetálico posee dos estados redox, $[\text{Cu(II)Cu(I)}]$ y $[\text{Cu(I)Cu(I)}]$ y experimenta sólo cambios estructurales menores durante la reducción, resultando de esta manera una baja energía de reorganización que lo hace más eficiente para la transferencia de electrones que los habituales sitios “azules” de cobre [21].

2.3. Cobre en Reacciones de Dismutación

2.3.1. Superóxido dismutasa

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido en O_2 y H_2O_2 . Desde el punto de vista de la Química Bioinorgánica estos sistemas son sumamente atractivos e interesantes, dado que pueden involucrar a diferentes metales traza como cofactores en ellas (Cu/Zn, Fe, Mn, Ni) [1-3,55].

En el caso de plantas, se han encontrado SODs en numerosas especies y, lo que es más interesante, en plantas se han encontrado tres de las formas conocidas

de SOD (esto es, los sistemas conteniendo Cu/Zn, Mn y Fe) y es únicamente en plantas donde estas tres formas coexisten [56].

La SOD más investigada hasta el presente es, indudablemente, la aislada de eritrocitos de bovinos. Posee un peso molecular de unos 32 kDa y está conformada por dos subunidades conteniendo unos 150 amino ácidos así como un átomo de zinc y uno de cobre [2,57], generalmente denominada SOD1 (EC 1.15.1.1.). Los sitios metálicos se muestran en la Fig. 7. El Cu(II) está coordinado por cuatro histidinas en una coordinación cuadrado-planar distorsionada mientras que el Zn(II) se coordina a tres histidinas, una de las cuales lo puentea con el cobre, y por un átomo de oxígeno de carboxilato, procedente de un residuo de aspartato, generando un entorno prácticamente tetraédrico.

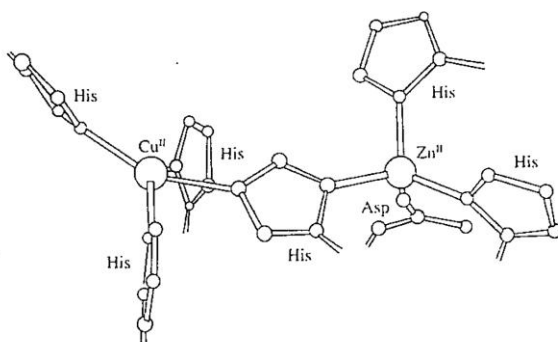
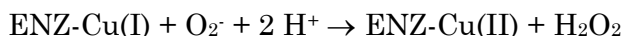
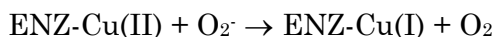


Fig. 7. Representación esquemática del sitio bimetalítico de la superóxido dismutasa de Cu/Zn (adaptado de refer. [2]).

Diferentes evidencias experimentales han demostrado claramente que el Cu(II) es el sitio catalíticamente activo, mientras que el Zn(II) sólo desempeña un papel estructural, confiriendo estabilidad a la proteína, que posee una remarcable estabilidad térmica y se mantiene activa en el rango de pH entre 4,5 y 10.

El sustrato (anión superóxido, O_2^-) es guiado electrostáticamente al sitio activo a través de canales de residuos de amino ácidos, cargados positivamente. La reacción catalítica ocurre a través de dos procesos redox controlados difusionalmente, involucrando un electrón, como se muestra en las siguientes ecuaciones:



Un importante número de estudios biológicos y biofísicos permitió proponer un mecanismo para esta reacción de dismutación que inicialmente involucra una etapa de oxidación en la cual un electrón, por un proceso de esfera interna es transferido del superóxido coordinado al centro de Cu(II). En esta etapa se libera O_2 rompiéndose simultáneamente el puente de histidina, con la concomitante protonación del átomo de N descoordinado. La proteína reducida de

Cu(I) reacciona luego con un segundo anión superóxido, para producir H_2O_2 y la reoxidación de la enzima [57].

2.4. Otros Sistemas Relacionados a Cobre

2.4.1. Sitio receptor de etileno

Moléculas gaseosas pequeñas actúan como señales para una variedad de organismos involucrando, en muchos casos, cationes de metales de transición como cofactores que median la interacción entre la señal y el receptor proteico. Por ejemplo, sensores para NO en animales usan una unidad *hemo* para estos fines [1]. El sencillo hidrocarburo etileno, $H_2C=CH_2$, regula diversos aspectos del ciclo vital de las plantas, incluyendo la germinación de semillas, la formación de raíces, el desarrollo floral, la maduración de los frutos y así como respuestas a situaciones de stress biótico o abiótico. También desempeña un papel central en situaciones ambientales que pueden tener impacto directo en la adaptación y reproducción de las plantas [58,59].

Como el etileno es efectivo en concentraciones nanomoleculares puede ser considerado como una hormona, reflejando la presencia de receptores de alta afinidad y diversos estudios han demostrado que el Cu(I) es el posible cofactor receptor [59,60,61] y en años recientes se han producido importantes avances para la mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan su síntesis y acción [59].

Está bien establecido que la L-metionina es el precursor para la síntesis de etileno en plantas superiores. Como se muestra en la Fig. 8, el amino ácido es activado por ATP para formar S-adenosilmetionina, a través de la actividad catalítica de la S-adenosilmetionina sintetasa. Partiendo de ese intermediario dos etapas específicas llevan a la formación de etileno. En la primera de ellas, se forma 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) por acción de la ACC-sintasa con piridoxal como cofactor. En la etapa final, la ACC-oxidasa cataliza la producción de etileno, una reacción que es dependiente de oxígeno y en la cual el Fe(II) está involucrado como cofactor y el ascorbato como cosustrato [58,61].

La utilización del etileno como señalador depende de la capacidad de las células para monitorear los cambios de concentración del gas y de transducir esa información en respuestas fisiológicas. Diversos estudios fisiológicos sugieren que el etileno es efectivo para generar respuestas biológicas a concentraciones nanomoleculares, indicando claramente el requerimiento de receptores de alta afinidad. Los tiempos de respuesta al etileno abarcan un variado rango y van desde los 10-15 minutos (inhibición del crecimiento de semillas) a horas (aumento de actividad enzimática) y aún de días (promoción de la senescencia de hojas).

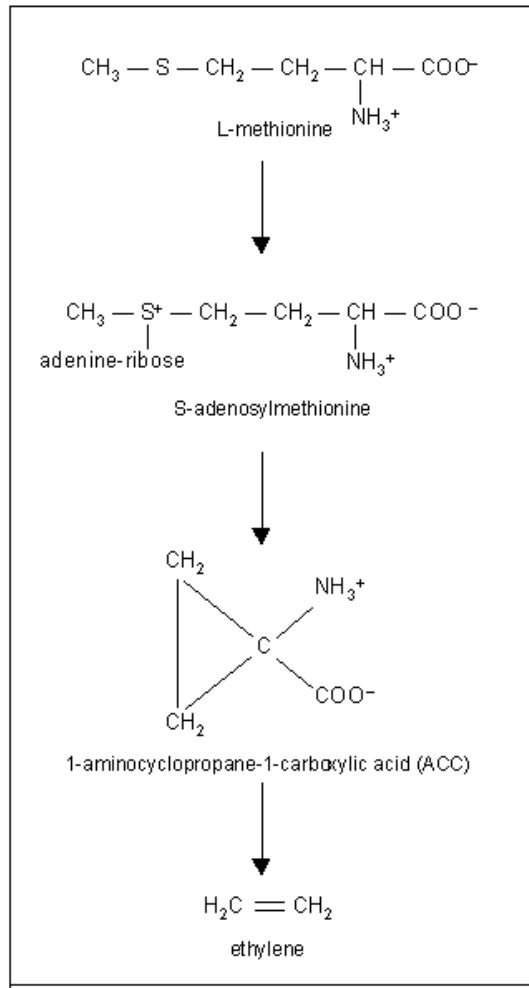


Fig. 8. Biosíntesis del etileno en plantas superiores.

En 1967 se sugirió por primera vez que tal vez algún metal de transición podría ser el cofactor que proveyera la química necesaria para una interacción de alta afinidad, teniendo en cuenta la facilidad con la que algunas olefinas forman complejos estables con los metales de transición [62], pero recién dos años después se pudo demostrar concluyentemente la presencia de Cu(I) en el receptor ETR1 de *Arabidopsis* [60]. Se presume que la coordinación del etileno al centro metálico, inicia diversos cambios conformacionales en ese sitio que son propagados al dominio de transmisión [61]. También se ha sugerido que residuos de cisteína e histidina estarían involucrados como ligandos en la coordinación del Cu(I) [59,60].

Todavía no existen datos estructurales que permitan determinar el mecanismo exacto y la forma en que el etileno se liga al cobre, pero la combinación de diversos estudios han permitido también avanzar en este sentido [8,59,63,64].

Por otro lado, resulta interesante de comentar que de todos los metales involucrados en sistemas biológicos, solo el cobre reacciona con etileno, formando aductos con este ligando gaseoso [22], un hecho que refuerza claramente la particular

capacidad del cobre en el contexto que venimos analizando. Adicionalmente, hace ya más de treinta años se pudo preparar y caracterizar detalladamente una interesante serie de complejos Cu(I)/etileno con ligandos tipo-imidazol que resultaron ser sumamente estables. Es más, las geometrías observadas para estos complejos de bajo peso molecular resultan totalmente compatibles para aductos Cu/olefina en sitios activos de proteínas, en los cuales la geometría tetraédrica o geometrías de coordinación más bajas están habitualmente presentes. Los resultados estructurales sugieren que la interacción dominante es un enlace de tipo σ entre el Cu(I) y el C_2H_4 coordinado [65].

2.4.2. Biosíntesis del cofactor de molibdeno (Moco)

El cofactor de molibdeno (generalmente denominado Moco) constituye el sitio activo de todas las enzimas dependientes de molibdeno, excepto de la nitrogenasa [1,2]. Este cofactor consiste en molibdopterina, una piranopterina fosforilada con el molibdeno coordinado a sus dos grupos tiolato. En las plantas, existe una proteína multidominio denominada Cnx1G que cataliza la inserción del Mo a la molibdopterina [66].

Un aspecto interesante y relativamente inesperado es la presencia de cobre ligado a los dos azufres de ditiolato, antes de la inserción del Mo, lo que sugiere que el cobre protege a este sitio de coordinación altamente reactivo antes de la inserción del metal activo (Mo) y provee la primera evidencia de una relación metabólica entre cobre y molibdeno en este tipo de sistemas [66-68]. Estas y otras cuestiones relacionadas serán analizadas con mayor detalle en el Cap. 6 de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] J.J.R. Fraústo da Silva & R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
- [2] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [3] R.M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry. A Short Course*, J. Wiley, Hoboken NJ, 2002.
- [4] B. Krebs, *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat.* **58**, 39 (2006).
- [5] R.W. Hay, Plant Metalloenzymes. En: *Plants and the Chemical Elements*, M.E. Farago (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1994, pp.107-148.
- [6] I. Yruela, *Braz. J. Plant Physiol.* **17**, 145 (2005).
- [7] R. Hänsch & R.R. Mendel, *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259 (2009).
- [8] E.J. Baran, Copper in Plants: An Essential and Multifunctional Element. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranja (Ed.), Vol. 15, Scientific Publishers, Jodhpur, 2014, pp. 373-397.
- [9] E.J. Baran, *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat.* **63**, 77 (2011).
- [10] J.R.J. Sorenson, The Anti-inflammatory Activities of Copper Complexes. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Vol. 14, Marcel Dekker,

- New York, 1982, pp. 77-124.
- [11] J.R.J. Sorenson (Ed.) *Inflammatory Diseases and Copper*, Humana Press, Clifton, NJ, 1982.
- [12] N. Farrell, *Transition Metals as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer, Dordrecht, 1989.
- [13] L. Ruiz-Azuara & M.E. Bravo-Gómez, *Curr. Med. Chem.* **17**, 3606 (2010).
- [14] C. Duncan & A.R. White, *Metallomics* **4**, 127 (2012).
- [15] W.W. Porterfield, *Inorganic Chemistry. A Unified Approach*, 2nd. Edit., Academic Press, San Diego, 1993.
- [16] E.J. Baran, Phytochelatins: Natural Chelating Agents Involved in Plant Protection. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranja (Ed.), Vol. 13, Scientific Publishers, Jodhpur, 2012, pp. 389-414.
- [17] E.J. Baran, Quelatoterapias: Avances Recientes y Perspectivas. En: *Aplicaciones de los Compuestos Metálicos en Medicina*, D. Gambino, V. Moreno & M. Navarro (Eds.), EAE-LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co KG, Saarbrücken, 2012, pp. 383-445.
- [18] R.J.P. Williams & J.J.R. Fraústo da Silva, *The Natural Selection of the Chemical Elements*, Clarendon Press, Oxford, 1996.
- [19] R.J.P. Williams & J.J.R. Fraústo da Silva, *Coord. Chem. Rev.* **200-202**, 247 (2000).
- [20] E.I. Ochiai, *J. Chem. Ed.* **63**, 942 (1986).
- [21] A.J. Vila & C. O. Fernández, Copper in Electron Transfer Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & A. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 813-856.
- [22] F.A. Cotton, G. Wilkinson, C.A. Murillo & M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th. Edit., Wiley, New York, 1999.
- [23] I. Bertini & A. Scozzafava, Copper(II) as Probe in Substituted Metalloproteins. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Vol. 12, Marcel Dekker, New York, 1981, pp.31-74.
- [24] E.I. Solomon & M.D. Lowery, *Science* **259**, 1575 (1993).
- [25] E.I. Solomon, U.M. Sundaran & T.E. Machonkin, *Chem. Rev.* **96**, 2563 (1996).
- [26] N. Grotz & M.L. Guerinot, *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 595 (2006).
- [27] E. Himelblau & R.M. Amasino, *Curr. Op. Plant Biol.* **3**, 2054 (2000).
- [28] V. Römheld & H. Marschner, *Plant Physiol.* **80**, 175 (1986).
- [29] E.J. Baran, Phytosiderophores and Related Systems: Metal Uptake by Plants. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 14, Scientific Publishers, Jodhpur, 2013, pp. 1-27.
- [30] M.H. Treeby, H. Marschner & V. Römheld, *Plant Soil* **114**, 217 (1989).
- [31] M.J. Haydon & Ch.S Cobett, *New Phytol.* **174**, 499 (2007).
- [32] L.E. Williams, J.K. Pittman & J.L. Hall, *Biochim. Biophys. Acta* **1445**, 104 (2000).
- [33] A. Rosenzweig, *Chem. Biol.* **9**, 673 (2002).
- [34] M. Fontecave & J.L. Pierre, *Coord. Chem. Rev.* **170**, 125 (1998).
- [35] R.J.P. Williams, Overview of Biological Electron Transfer. En: *Electron Transfer in Biology and the Solid State*, M.K. Johnson, R.B. King, D.M. Kurtz, Ch. Kutal, M.L. Norton & R.A. Scott (Eds.), American Chemical

- Society, Washington DC, 1990, pp. 1-23.
- [36] A.G. Lappin, Properties of Copper “Blue” Proteins. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Vol. 13, Marcel Dekker, New York, 1981, pp. 15-71.
- [37] J.M. Guss, E.A. Merritt, R.P. Phizackerley & H.C. Freeman, *J. Mol. Biol.* **262**, 686 (1996).
- [38] O. Einsle, Z. Mehrabian, R. Nalbandyan & A. Messerschmidt, *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 666 (2000).
- [39] K.G. Paul & T. Stigbrand, *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 255 (1970).
- [40] G.C. van Driessche, C. Dennison, G. Sykes & G. van Beeumen, *Protein Sci.* **4**, 209 (1995).
- [41] C. Dennison & M.D. Harrison, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2481 (2004).
- [42] P.F. Lindley, Multi-copper Oxidases. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 763-811.
- [43] O. Arrigoni, *J. Bioenergetics Biomembranes* **26**, 407 (1994).
- [44] A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, R. Petruzzelli & A. Finazi-Agro, *J. Mol. Biol.* **206**, 513 (1989).
- [45] A. Messerschmidt, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, & A. Finazi-Agro, *J. Mol. Biol.* **224**, 179 (1992).
- [46] M.A. Halcrow, P.F. Knowles & S.E.V. Philips, Copper Proteins in the Transport and Activation of Dioxygen, and of the Reduction of Inorganic Molecules. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 709-762.
- [47] K. Parikka, A.S. Leppänen, L. Pitkänen, M. Reunanen, S. Willfur & M. Tenkanen, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 262 (2010).
- [48] T. Liman, P.D. Facey, G. van Keulen, R.J. Dyson & R. Del Sol, *PLOS ONE* **8**, e54112 (2013).
- [49] P. Bork & R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **236**, 1277 (1994).
- [50] S. Prag & J.C. Adams, *BMC Bioinformatics* **4**, 42 (2003).
- [51] M.M. Whittaker & J.W. Whittaker, *J. Biol. Chem.* **263**, 6074 (1988).
- [52] B. Krebs, M. Merkel & A. Rompel, *J. Argent. Chem. Soc.* **92**, 1 (2004).
- [53] T. Klabunde, C. Eicken, J.C. Sacchettini & B. Krebs, *Nature Struct. Biol.* **5**, 1084 (1998).
- [54] W.E. Pfeiffer, R.T. Ingle & S. Ferguson-Miller, *Biochemistry* **29**, 8696 (1990).
- [55] S. Ciurli & S. Mangani, Nickel-Containing Enzymes. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 669-707.
- [56] C. Bowler, W. van Camp, M. van Montagu, D. Inze, & K. Asada, *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 199 (1994).
- [57] P.F. Lindley, Proteins of Various Functions Containing Copper. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 857-880.
- [58] Z. Lin, S. Zhong & D. Grierson, *J. Exp. Bot.* **60**, 3311 (2009).
- [59] K.M. Light, J.A. Wisniewski, W.A. Vinyard & M.T. Kieber-Emmons, *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 715 (2016).
- [60] F.I. Rodríguez, J.J. Esch, A.E. Hall, B.M. Binder, G.E. Schaller &

- A.B. Bleeker, *Science* **282**, 996 (1999).
- [61] A.B. Bleeker & H. Kende, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 1 (2000).
- [62] S.P. Burg & E.A. Burg, *Plant Physiol.* **42**, 144 (1967).
- [63] W. Wang, J.E. Esch, S.H. Shiu, H. Agula, S.M. Binder, C. Chang, S.E. Patterson & A.B. Bleeker, *Plant Cell* **18**, 3429 (2006).
- [64] R.F. Lacey & B.M. Binder, *J. Inorg. Biochem.* **133**, 58 (2014).
- [65] J.S. Thompson, R.L. Harlow & J.F. Whitney, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5322 (1983).
- [66] R.R. Mendel, *Dalton Transact.* **2005**, 3404.
- [67] J.A. Kuper, A. Llamas, H.J. Hecht, R.R. Mendel & G. Schwarz, *Nature* **430**, 803 (2004).
- [68] R.R. Mendel & T. Kruse, *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1568 (2012).

CAPITULO 2

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE HIERRO

INTRODUCCIÓN

El hierro es uno de los elementos traza más importantes y más ampliamente difundidos en todas las formas de vida, desde las bacterias hasta el Hombre [1,2]. En los sistemas biológicos el hierro se encuentra habitualmente como Fe(II) o Fe(III), aunque en algunos de los procesos y reacciones en los que está involucrado su número de oxidación puede llegar a ser, transitoriamente, Fe(IV) [1,2]. Si bien las cantidades de hierro presentes en plantas suelen ser bastante variables, dependiendo del tipo de planta y del órgano vegetal analizado, se estima habitualmente un rango de concentraciones entre 50 y 150 µg/g (de masa seca del vegetal), lo que lo convierten en el metal de transición más abundante en las plantas, siendo un elemento de importancia central para las mismas [3,4].

Como metal con actividad redox el hierro está involucrado en la fotosíntesis, en la respiración mitocondrial, en la asimilación del N₂, en la biosíntesis de hormonas, en la generación y remoción de especies activas del oxígeno, osmoprotección y mecanismos de defensa [3,5]. Más del 80% del Fe presente en plantas está localizado en los cloroplastos, consistente con su fuerte participación en los procesos fotosintéticos [3].

1. CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE HIERRO EN LAS PLANTAS

Los mecanismos de captación y transporte de hierro por parte de las plantas han recibido mucha y constante atención porque constituyen el proceso clave para la suplementación de este elemento a las plantas. Y, en realidad, todas las deficiencias de hierro ocurren debido a los factores que gobiernan la movilidad del Fe en suelos [4].

La limitación principal para una fácil captación del hierro reside en el hecho de que el hierro en los suelos se encuentra principalmente en forma de oxihidróxidos insolubles del tipo FeO(OH). Dado que los mismos son sumamente estables y muy poco solubles, en un entorno acuoso y aeróbico, y a pH neutro la concentración de Fe(III) libre está limitada a una concentración de aproximadamente 10⁻¹⁷ M, un valor bastante alejado al requerido para el óptimo crecimiento de las plantas. Esto significa, que la poca disponibilidad del hierro no es un problema de abundancia, sino de disponibilidad en un entorno aeróbico a pH biológico. La deficiencia de hierro puede ser particularmente pronunciada en plantas que crecen en suelos calcáreos, que cubren aproximadamente un tercio de la corteza terrestre [6].

1.1. Captación de hierro por las plantas

En relación a la captación de hierro en suelos, se han identificado dos estrategias básicas [6,7]. En la llamada **estrategia I**, que es utilizada por las plantas no gramíneas, se utilizan tres procesos concurrentes (disminución del pH en la rizoesfera, reducción del Fe(III) y transporte del Fe(II) generado). Para lograr bajar el pH, las plantas envían protones hacia la rizoesfera, admitiéndose que estas llamadas “bombas de protones” están impulsadas por ATP-asas de membranas plasmáticas. Por cada unidad de disminución del pH el hierro aumenta su solubilidad unas mil veces. Por otra parte, el requerimiento de una etapa de reducción implica la existencia de una reductasa férrica plasmática, la que ha sido descrita tanto en células procariontas como eucariotas [8]. Finalmente, una vez que el Fe(III) ha sido reducido, el ion ferroso debe ser transportado al interior de la planta. El tipo y las características generales de los transportadores involucrados todavía no son bien conocidos [8].

En la denominada **estrategia II**, utilizada por las gramíneas, las plantas emplean una estrategia de quelación, sintetizando amino ácidos no-protéicos, denominados fitosideroforos, los que son excretados a la rizoesfera y ligan fuertemente al Fe(III), transportándolo al interior de la planta en esa forma complejada [7]. El fitosideroforo más común y más estudiado es, sin duda, el ácido mugineico [7], cuya estructura se esquematiza en la Fig. 1.

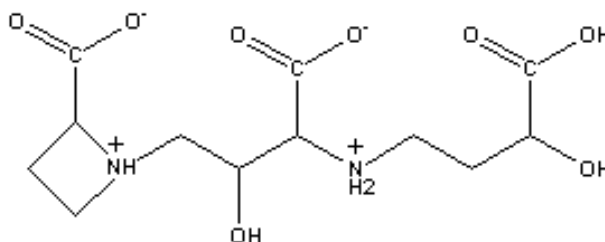


Fig.1. Estructura esquemática del ácido mugineico.

Como puede verse, este ácido posee siete grupos potencialmente coordinantes, esto es, tres grupos carboxilato, dos grupos hidroxilo, el átomo N de azetidina y el átomo N de la amina secundaria. Si bien aún no se ha podido aislar un complejo de hierro/ácido mugineico, ha sido posible obtener y caracterizar muy detalladamente el correspondiente complejo de Cu(II), que presenta una coordinación octaédrica distorsionada y en el que el centro metálico está coordinado a seis de los grupos donores del ácido, quedando fuera de la esfera de coordinación sólo el OH intermedio. Se supone que el complejo de Fe(III) debe presentar una estructura similar, con la única diferencia de que el OH coordinado debería estar deprotonado [7].

Otros fitosideroforos química y estructuralmente relacionados al ácido mugineico son los ácidos avénico, disticónico, 3-hidroximugineico, 2'-hidroxiavénico y 3-epihidroxi-2'-deoximugineico, entre otros [7].

1.2. Transporte de hierro en plantas

Este es un problema relativamente complejo y cuyos aspectos detallados aún no están totalmente clarificados y comprendidos. Lo que está claro es que durante el transporte desde las raíces hacia la parte superior de la planta, tanto el Fe(II) como el Fe(III) deben estar complejados y para esta complejación existe una variedad de posibilidades, principalmente ácidos orgánicos y amino ácidos presentes en las plantas. Se ha dicho que todos los constituyentes celulares son, potencialmente, agentes quelantes de hierro, tal es así que tanto los amino ácidos, como las proteínas, o los ácidos nucleicos y hasta los carbohidratos han demostrado ser excelentes quelantes [9]. Las evidencias hasta ahora acumuladas sugieren que los dos ligandos principalmente involucrados en esta complejación serían el ácido cítrico y la nicotianamina [10-12].

El ácido cítrico (Fig. 2) es un ácido que está siempre presente en las plantas [13], y es un buen complejante para metales de transición. En particular, se conocen una variedad de complejos de Fe(III) y Fe(II) con el ácido cítrico, tanto especies simples como poliméricos, los que muestran una gran versatilidad de este ácido como ligando [13], situación que seguramente es sumamente favorable para su involucramiento en el transporte de hierro.

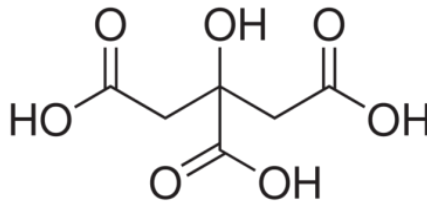


Fig.2. Estructura esquemática del ácido cítrico.

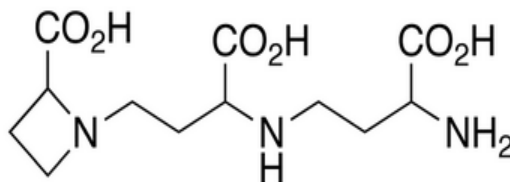


Fig.3. Estructura esquemática de la nicotianamina (NA).

En cuanto a la nicotianamina (NA, Fig. 3), es el precursor de los fitosideroforos y está fuertemente relacionada al metabolismo del hierro [7]. Las constantes de estabilidad de los complejos M(II)/nicotianamina siguen el ordenamiento de la bien conocida serie de Irving-Williams, esto es: Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn (II), mientras que el complejo de Fe(III) muestra un

valor mucho más elevado [7]. La nicotianamina parece tener una situación privilegiada, por varias razones, que se enumeran brevemente a continuación [12]:

1. Forma complejos estables con ambos estados de oxidación del hierro, a pH neutro o ligeramente alcalino.

2. Aunque el complejo Fe(III)/NA tiene, como se dijo, una constante de estabilidad mucho mayor, el complejo Fe(II)/NA es más estable cinéticamente, bajo condiciones aeróbicas.

3. La NA se halla siempre presente en todos los tejidos de plantas superiores.

4. Los complejos hierro/NA son reactivos de Fenton relativamente pobres.

5. Algunas especies vegetales mutantes deficientes en NA, muestran niveles elevados de enzimas antioxidantes.

6. La concentración de NA se correlaciona muy bien con la localización y niveles de hierro en ciertas plantas.

De esta forma, el hierro se va distribuyendo en todas las partes superiores de la planta, acumulándose o incorporándose a diversos sistemas funcionales, que serán discutidos en detalle en las Secciones siguientes.

2. ENZIMAS DE HIERRO EN PLANTAS

Para facilitar y ordenar el análisis de los sistemas conteniendo hierro presentes en plantas, conviene dividirlos en tres grandes grupos: a) proteínas conteniendo cúmulos (“clusters”) de Fe-S, b) proteínas conteniendo grupos hemo; c) otras proteínas de hierro.

2.1. Proteínas de hierro conteniendo enlaces Fe-S

Los cúmulos de Fe-S desempeñan un papel central en la transferencia de electrones, constituyen parte del sistema de unión del sustrato en algunas enzimas, forman unidades de almacenamiento de hierro, están involucradas en la regulación transcripcional y translacional, pueden controlar la estructura proteica en las cercanías del cúmulo y, finalmente, han demostrado poder participar en la reducción de disulfuro y en la donación de azufre (p.ej. tioredoxinas). Es decir, estas proteínas de Fe-S funcionan como enzimas, transportadores de electrones (p.ej. ferredoxinas) y como reguladores de proteínas (p.ej. aconitasa) [3].

2.1.1. Ferredoxinas

Estas proteínas de Fe/S están ampliamente difundidas en la Naturaleza y se las ha encontrado en bacterias, algas, hongos, plantas superiores y mamíferos [1]. El azufre presente en estos sistemas es de dos tipos, por un lado el llamado “azufre inorgánico” o “azufre lábil” que genera SH₂ por tratamiento de la proteína con ácidos inorgánicos diluidos y por otro, el denominado “azufre orgánico” que proviene del amino ácido cisteína.

2.1.1.1. Ferredoxina 2-2

La proteína más simple de este tipo encontrada en plantas, es la llamada ferredoxina vegetal, inicialmente aislada de cloroplastos de espinaca (*Spinacia oleracea*) [14-16]. En Química Bioinorgánica esta ferredoxina se llama ferredoxina 2-2, la que como se muestra en la Fig. 4, contiene dos átomos de hierro y dos “azufres inorgánicos” y la coordinación sobre cada uno de los átomos de hierro está completada por sendos átomos de “azufre orgánico”, generando un entorno casi tetraédrico sobre cada uno de los centros metálicos.

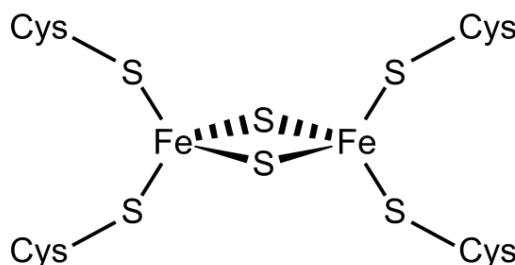


Fig.4. Estructura esquemática de la ferredoxina 2-2.

Todas las ferredoxinas 2-2 de origen vegetal tienen un peso molecular aproximado a los 12.000 Da y contienen, en promedio, unos 97 residuos de amino ácidos. Tienen un potencial redox de unos $-0,43$ V y transfieren un electrón por vez, durante las reacciones en las que intervienen [14].

El rol principal de estas ferredoxinas en los cloroplastos, durante el proceso de fotosíntesis, es mediar la transferencia de electrones, catalizando la reducción de NADP a NADPH₂ [14-16].

Existe ya abundante información sobre el comportamiento espectroscópico de las ferredoxinas 2-2. Estas ferredoxinas de plantas son de color rojo y su espectro electrónico de absorción muestra máximos a 465, 420, 330 y 278 nm y la absorción en el visible está originada por el cromóforo Fe/S, ya que desaparece si se trata a la ferredoxina con reactivos capaces de eliminar el hierro o el sulfuro. Por reducción con ditionito de sodio se pierde aproximadamente un 50% de la absorción en el visible, pero el espectro se restaura, por simple reoxidación, agitando la muestra al aire. La absorción en 278 nm se debe, en parte, al contenido de amino ácidos aromáticos y en parte al grupo cromofórico [14]. Por su parte, los espectros de resonancia paramagnética electrónica de la ferredoxina en su estado reducido, siempre muestran, a bajas temperaturas, una señal centrada alrededor de $g = 1,94$ y exhiben simetría ortorrómbica. La forma oxidada no presenta señal de EPR. Se supone que la forma oxidada contiene dos centros de Fe(III) (d^5 de alto espín) y acoplados antiferromagnéticamente, a través del doble puente de sulfuros, dando un espín neto igual a cero y no generando señal de EPR. En la forma reducida uno de los iones férricos es reducido a Fe(II) (d^6 de alto espín), dando un espín neto $S = \frac{1}{2}$ y generando la característica señal de EPR [14]. También los espectros Mössbauer

de ^{57}Fe confirman plenamente la estructura electrónica de los dos centros metálicos (en las formas oxidada y reducida). La forma oxidada de la ferredoxina 2-2 muestra dos líneas prácticamente iguales con un desplazamiento isomérico $\delta = + 0,20$ mm/seg relativo a Fe metálico y un desdoblamiento cuadrupolar $\Delta Q = 0,60$ mm/seg, espectro consistente con Fe(III) de alto espín. El espectro de la forma reducida muestra cuatro líneas casi iguales, que son superposición de dos dobletes, uno de ellos similar al observado en la forma oxidada y el segundo con valores mayores de δ y ΔQ , característicos de Fe(II) de alto espín ($\delta = 0,56$ mm/seg y $\Delta Q = 2,75$ mm/seg) [14,17,18]. También los espectros vibracionales (IR, Raman y resonancia Raman) de la ferredoxina de lechuga han sido investigados y analizados reiteradamente (ver p. ej. [19, 20]).

2.1.1.2. Proteína Fe/S de Rieske

Esta proteína es un componente del complejo citocromo *bf* de la membrana tilacoide del cloroplasto y aparece involucrado en la transferencia electrónica entre plastoquinol y el citocromo *b₆f* en la cadena de transferencia electrónica de la fotosíntesis [16,21]. La proteína madura, que tiene un peso molecular de unos 20 kDa, parece estar asociada con la membrana tilacoide a través de una extendida región hidrofóbica de residuos de aminoácidos [21].

El centro metálico del sistema transportador de electrones, es similar al de las ferredoxinas 2-2, con la diferencia de que sobre uno de los hierros se coordinan dos residuos de histidina en lugar de las cisteínas [16,21-23] (Fig. 5).

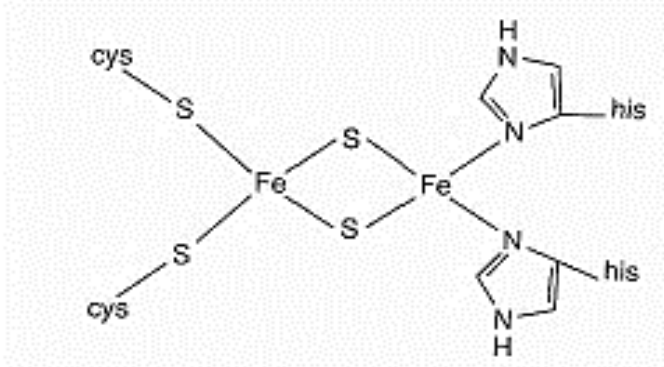


Fig. 5. Estructura esquemática del cúmulo Fe₂-S₂ presente en la proteína de Rieske.

También estas proteínas han sido investigadas intensivamente por métodos espectroscópicos. Sus espectros electrónicos de absorción son marcadamente diferentes a los de las proteínas con 4 residuos de cisteína sobre los átomos de hierro. En el estado oxidado presentan máximos a 458 y 325 nm, así como un hombro entre 560 y 580 nm. En el estado reducido, los máximos se observan a 380-383 nm, 425-432 nm y 505-550 nm. También los espectros de Mössbauer muestran diferencias con respecto a los de las ferredoxinas 2-2 con 4 residuos de cisteína. El

desplazamiento isomérico del Fe(II) de la forma reducida muestra un desplazamiento más positivo que el de aquellas ($\delta = 0.68$ mm/seg), indicando coordinación a un ligando menos donador de electrones que el cisteinato al sitio de Fe(II). Por otro lado, el espectro de resonancia de espín electrónico muestra una señal característica a $g = 1,90 - 1,91$ claramente fuera del rango usualmente observado para las ferredoxinas 2-2 (1,945 – 1,975) [22].

Un aspecto interesante y muy llamativo de estas proteínas es que sus potenciales de reducción varían enormemente, entre -150 y + 400 mV, dependiendo del origen de la proteína. Estas notables diferencias, aparentemente, se relacionan con las características del entorno del cúmulo metálico, y más precisamente de la cantidad y distribución de residuos disociables, en el entorno del sitio [24].

2.1.1.3. Ferredoxina 4-4

Este tipo de ferredoxinas también están ampliamente difundidas en la Naturaleza. En este caso hay cuatro átomos de hierro rodeados de cuatro azufres lábiles, generando un cubo ligeramente deformado (estructura llamada comúnmente cubano). Y, como muestra la Fig. 6, cada átomo de hierro está unido a un azufre orgánico de un residuo de cisteína y a través de él a la cadena proteica. De esta manera, alrededor de cada centro metálico se genera, también aquí, una coordinación aproximadamente tetraédrica [1].

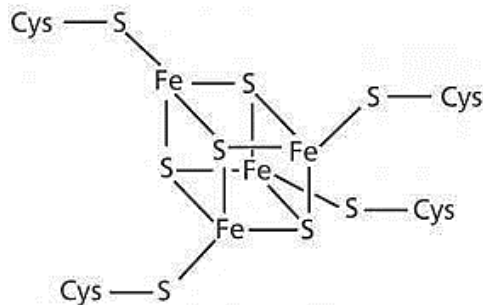


Fig. 6. Estructura esquemática de la ferredoxina 4-4.

Este tipo de ferredoxinas es muy común en bacterias [16,25], y de los pocos ejemplos encontrados en plantas analizaremos a continuación algunos de los más conocidos y estudiados.

2.1.1.4. Ferredoxina:Tiorredoxina reductasa

El sistema ferredoxina/tiorredoxina presente en los cloroplastos de plantas, constituye un mecanismo mediante el cual la luz regula la actividad de una serie de enzimas relacionadas al metabolismo del carbono en plantas fotosintéticas [16,26]. La señal lumínica se transmite en la forma de electrones desde la clorofila contenida en la membrana tilacoide, via una ferredoxina 2:2, la

ferredoxina/tiorredoxina reductasa (FTR) y las tiorredoxinas que activan o desactivan las enzimas objetivo por reducción de sus puentes regulatorios de disulfuro. La FTR cataliza la etapa clave en este importante sistema regulatorio, esto es, la reducción por dos electrones del disulfuro de la tiorredoxina, por dos oxidaciones secuenciales de un electrón de la ferredoxina 2-2 [16,26].

La FTR es un heterodímero que consiste de subunidades variables (7-13 kDa) y una subunidad catalítica altamente conservada (13 kDa), que contiene una ferredoxina 4:4. Sin embargo, este cúmulo no está involucrado en la transferencia de electrones desde la ferredoxina 2-2 al disulfuro activo y parece, en cambio, estar involucrado en la estabilización del intermediario que se genera por reducción con el primer electrón del disulfuro activo, generando incluso una ferredoxina coordinada por cinco cisteínas, a través de una novedosa unión tipo μ_3 -S-S(Cys), situación que sugiere una nueva función biológica para este cúmulo [16,27].

2.1.1.5. Aconitasa

La aconitasa (aconitato hidratasa o citrato hidroxio-liasa, EC 4.2.1.3) es un ejemplo interesante de una ferredoxina 4-4 que forma parte de una enzima que participa del ciclo de Krebs. Esta enzima cataliza la isomerización estereoespecífica de citrato a iso-citrato via cis-aconitato, por un mecanismo de eliminación (deshidratación) y adición (hidratación) (ver Fig. 7), en el cual este cúmulo está directamente involucrado [16].

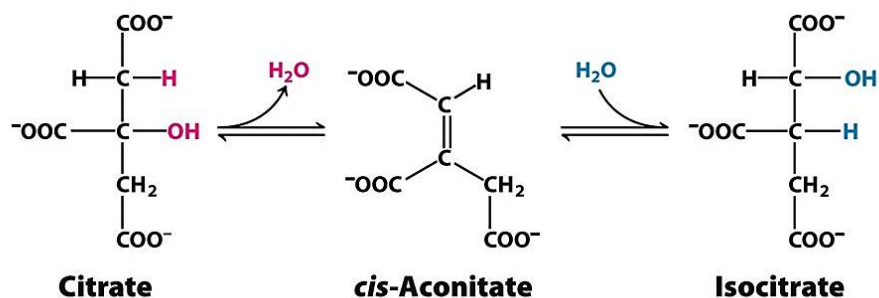


Fig. 7. Mecanismo de transformación de citrato en isocitrato.

Se conocen dos formas de aconitasa, con diferentes distribuciones relativas en los tejidos y órganos, la forma mitocondrial (m-aconitasa) y la forma citoplasmática (c-aconitasa), esta última tiene 135 residuos de amino ácidos más que la forma m. Todas las aconitasas de plantas descritas hasta el presente muestran una mayor homología con la forma c que con la forma m [28]. Y esta forma de c-aconitasa no es sólo una enzima sino que también desempeña un papel clave en la homeostasis del hierro [16].

El cúmulo Fe_4S_4 constituye el sitio activo de la enzima. Sólo tres de los hierros están ligados a átomos de S de cisteínas, el cuarto hierro (Fe_4) apunta hacia el interior de la cavidad proteica y, en ausencia de sustrato, está coordinado a un grupo OH^- como cuarto ligando. En presencia de sustrato este hierro presenta coordinación seis, en forma de octaedro débilmente distorsionado, unido a los tres azufres lábiles y a tres átomos de oxígeno (uno de una molécula de agua relativamente lábil, y los otros dos de un carboxilato y de un hidroxilo del ácido cítrico o isocítrico) [16]. El Fe_4 es realmente el sitio activo de este sistema enzimático, y muestra varias propiedades relevantes: a) facilidad para cambiar de número de coordinación (de 4 a 6) de geometría y de tipo de ligando; b) está orientado de manera tal que permite la fácil interacción del H saliente con el oxígeno de un residuo lateral de Ser-642 y c) puede actuar como base de Lewis activando el grupo OH del sustrato facilitando su eliminación [16].

2.1.1.6. Biotina sintasa

La biotina (vitamina H o vitamina B_8) es una vitamina esencial sintetizada por microorganismos y plantas que actúa como cofactor para un pequeño número de enzimas involucradas en reacciones de carboxilación, decarboxilación y transcarboxilación, relacionadas al metabolismo de los carbohidratos y ácidos grasos [29]. La etapa final de su biosíntesis consiste en la inserción de un átomo de azufre en la ditiobiotina para formar un anillo de tiofeno via un mecanismo de radicales (Fig. 8). Esta reacción (formación de dos enlaces C-S) requiere de la presencia de la proteína biotina sintasa (BioB), S-adenosilmetionina, como fuente inicial del radical 5'-deoxiadenosilo y un sistema reductor [16].

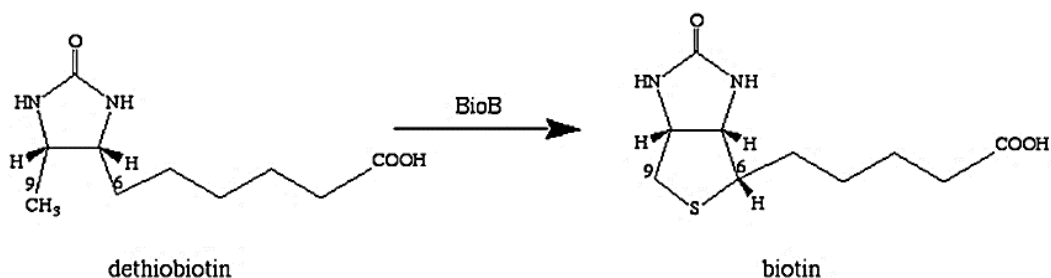
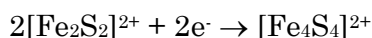


Fig. 8. Etapa final de la biosíntesis de la biotina.

Estudios iniciales de la biotina sintasa, purificada aeróbicamente, revelaron en ella la presencia de una ferredoxina 2-2, pero el sistema resultaba inactivo. Por otra parte, bajo otras condiciones experimentales, se detectaba también la presencia de un cúmulo 4-4, el que se generaría por reducción del cúmulo más sencillo, esto es [16]:



Finalmente, y en base a medidas de potenciales redox, la enzima incubada y repurificada bajo condiciones de ensayo estrictamente anaeróbicas mostró contener un cúmulo $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ y un cúmulo $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ por monómero, sugiriendo que la estructura estable dominante de estos cúmulos en la biotina sintasa es un dímero conteniendo dos cúmulos $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$ y dos cúmulos $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ [30].

Estos dos cúmulos metálicos Fe/S tienen, seguramente, dos funciones mecánicas en el proceso de acción de la enzima. Inicialmente, pueden participar como aceptor de electrones del sistema reductor y luego, la interacción del cúmulo con la S-adenosilmetionina puede ayudar a la labilización del relativamente estable centro sulfonio, generando el radical 5'-deoxiadenosilo, esencial para iniciar el ataque sobre los átomos de C(6) y C(9) de la detiobiotina. Por otro lado, los cúmulos de Fe/S pueden cumplir la función adicional de actuar como donadores de sulfuro para la formación del anillo de tioéter del producto [30].

2.2. Proteínas de hierro conteniendo el grupo hemo

Las hemoproteínas son compuestos que contienen complejos porfirínicos de hierro como grupos prostéticos [1,2] siendo el grupo hemo uno de los grupos prostéticos más versátiles en metaloproteínas [31]. Las porfirinas constituyen un grupo muy amplio e importante de complejos metálicos presentes en los sistemas biológicos. El ligando básico es el macrociclo porfina (Fig. 9 (I)). Los derivados de las porfinas, por sustitución en las posiciones de 1 a 8 reciben genéricamente el nombre de porfirinas, y cuando ambos hidrógenos de los grupos NH son desplazados, por incorporación de un ion metálico, se las llama metaloporfirinas (Fig. 9 (II)) [1]. Las porfirinas pueden generar complejos cuadrado-planares, piramidales (coordinación 5) u octaédricos (coordinación 6), lo que amplía la variedad y gama de sus posibilidades como ligando [1].

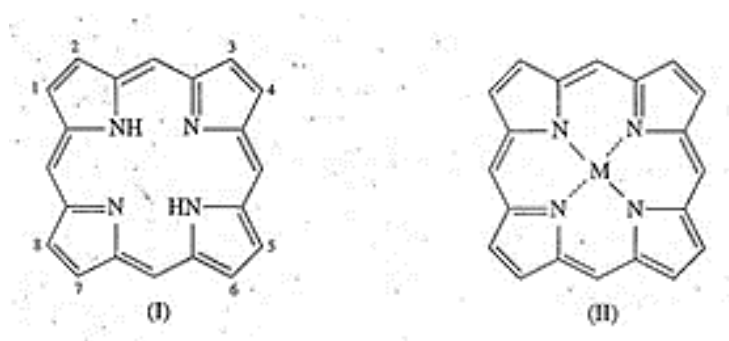


Fig. 9. Estructura de la porfina (I) y de una metaloporfirina (II).

Uno de los ejemplos más importantes y frecuentes en la Naturaleza es la llamada protoporfirina IX (heme tipo *b*), que se muestra en la Fig. 10 en forma de su complejo de hierro.

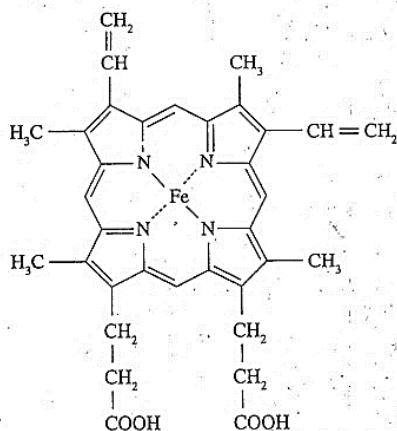


Fig. 10. Estructura de la Fe-protoporfirina IX.

Las porfirinas tienen una serie de propiedades y características sumamente interesantes y particulares: a) el anillo planar es sumamente estable y no está prácticamente sometido a tensiones; b) en sus formas deprotonadas, cargado negativamente, el ligando es apto para complejar especies metálicas relativamente lábiles; c) el “hueco” en el centro del anillo es altamente selectivo, en la captación y retención de cationes metálicos (suponiendo iones esféricos, las especies más aptas para ser complejadas son aquellas cuyo radio iónico oscila entre 0,60 y 0,70 Å); d) poseen un sistema de uniones π conjugadas, fuertemente delocalizadas, propiedad que es esencial para la reactividad y propiedades generales de sus complejos [1].

Todas las porfirinas presentan un espectro electrónico muy característico constituido generalmente por tres bandas, identificadas con las letras α , β y γ y cuya posición exacta depende de la naturaleza de los sustituyentes y del metal incorporado al macrociclo. La más intensa de las tres bandas, generalmente ubicada alrededor de los 400 nm se denomina *banda de Soret*. Todas las bandas observadas corresponden a transiciones electrónicas de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ entre orbitales moleculares del macrociclo [1].

En las plantas las hemoproteínas aparecen involucradas, esencialmente, en el transporte de electrones (función cumplida por los citocromos) y en algunas funciones catalíticas importantes. Su participación en los sistemas de captación y transporte de O_2 , que es una de sus funciones más importantes en los mamíferos, [1,2] es relativamente limitada en plantas.

2.2.1. Hemoproteínas involucradas en el transporte de electrones

Las hemoproteínas involucradas en el transporte de electrones son los citocromos. Antes de avanzar en el análisis pormenorizado de algunos citocromos representativos e importantes para las plantas, en esta Sección haremos algunos comentarios generales sobre su nomenclatura, estructura y otros aspectos básicos.

Se conocen unos cincuenta citocromos diferentes, su clasificación es bastante complicada, y a veces confusa, sobre todo ante la falta de información estructural detallada para muchos de ellos. Algunos citocromos se nombran en base al tipo de grupo hemo que ellos contienen, tales como, **a**, **b** o **c**. Para distinguir adicionalmente a ciertos citocromos que contienen el mismo grupo hemo, se utiliza un subíndice cerca del tipo de grupo hemo, p. ej. **c₂**, **c₅** o **c₆**, donde el subíndice indica el orden histórico de su descubrimiento. En otros citocromos, como **c₅₅₁** o **c₅₅₄** el subíndice denota el máximo del pico electrónico de la banda α en su forma reducida [31].

Independientemente del grupo hemo involucrado, diferentes ligandos axiales son posibles y, en todos los casos, el Fe del hemo está siempre hexacoordinado. Por otro lado, los potenciales de reducción de estos sistemas cubren un rango relativamente amplio, entre + 390 y - 380 mV [31].

2.2.1.1. Citocromos en plantas

La mayoría de estos citocromos están involucrados en el transporte de electrones en el proceso de fotosíntesis, utilizando la cupla redox Fe(II)/Fe(III). Un ejemplo típico, y muy estudiado, es el **citocromo c**. En este caso, los dos grupos propionato de la protoporfirina IX (Fig. 10), están reemplazados por dos grupos tioéter, y la esfera de coordinación del hierro está completada por un N de histidina y un S de metionina, como se muestra en la Fig. 11.

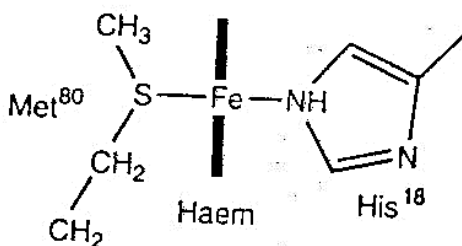


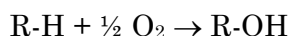
Fig. 11. Coordinación del Fe en el citocromo c.

Es interesante de mencionar que el hierro se encuentra siempre en el plano del anillo porfirínico tanto como Fe(II) que como Fe(III) y, en ambos casos mantiene también la configuración electrónica de bajo espín (Fe(II), t_{2g}^6 ; Fe(III), t_{2g}^5) y la distancia Fe-S prácticamente no se modifica con el cambio de estado de oxidación [1].

El **citocromo f** también tiene un grupo hemo de tipo c y su átomo de hierro está coordinado por el N de un histidina y el N del grupo amino de un residuo de tirosina. El **citocromo c₆** funciona como un transportador de electrones soluble entre la especie compleja de citocromos **b₆f**, unidos a una membrana, y el fotosistema I en la fotosíntesis oxigénica. También los **citocromos c₆**, **c₂** y **c₅₅₀** desempeñan un papel en la fotosíntesis [31]. Por su parte, el **citocromo** mitocondrial **b₅** está

involucrado en una serie importante de procesos, aceptando electrones de la b_5 reductasa y transfiriéndolos a otras enzimas [31]. Otros citocromos caracterizados en plantas son los **citocromos b_{565} y b_{566}** [31].

Otro sistema muy conocido e importante, y reiteradamente estudiado en años recientes, es el **citocromo P450**, cuyo nombre proviene del hecho de que la especie reducida con CO presenta una *banda de Soret* “anómala” en 450 nm [1,31]. En realidad, se trata de sistemas bastante complejos constituídos por el citocromo, una proteína de Fe/S y una reductasa [1,31]. La enzima está ampliamente distribuida en la Naturaleza, encontrándose en mamíferos, peces, aves, insectos, plantas y bacterias y cataliza la adición de oxígeno a diversos sustratos [31]. La reacción representativa más importante de este tipo es la siguiente:



Se conocen más de 20 diferentes citocromos P450 de plantas y los mismos guardan bastante similitud con la enzima análoga de mamíferos, mostrando pesos moleculares que oscilan entre 48 y 60 kDa [32,33]. La enzima se puede encontrar en casi todas las partes de las plantas, esto es: semillas, raíces, brotes, hojas, flores, etc. [32]. Una diferencia importante entre la enzima animal y la vegetal es el gran número de sustratos fisiológicos y la variedad de reacciones que la enzima de plantas cataliza. Los sustratos incluyen ácidos grasos, fenilpropanoides, terpenos, alcaloides y otros. Por otro lado, las plantas poseen sistemas de detoxificación que también dependen fuertemente de esta enzima [32,33].

En el estado inicial, el hierro que está insertado en una protoporfirina IX, está como Fe(III) de bajo espín. Una de sus posiciones axiales está ocupada por un S de cisteína y la otra, probablemente, por una molécula de agua. Al acercarse el sustrato la molécula de agua es desplazada y la configuración electrónica del Fe(III) pasa a ser de alto espín [23]. La reacción completa se muestra, esquemáticamente, en la Fig. 12.

La enzima en su estado inicial se muestra en el borde superior de la Fig.12. El sustrato se une en una posición próxima al centro metálico pero sin unirse al mismo, y el hierro capta un electrón reduciéndose a Fe(II), quedando en configuración de alto espín. En este nuevo estado el sistema puede fijar una molécula de O_2 formando un oxo-complejo (no mostrado en la figura). El oxo-complejo es luego reducido por otro electrón y es protonado, generando el hidroxoperoxo-complejo férrico (mostrado en la parte inferior de la figura). El ligando aquí unido al Fe(III) es HO_2 , esto es, peróxido de hidrógeno deprotonado. Seguidamente, el hidroxoperoxo-férrico del complejo enzima/sustrato sufre una ruptura de enlace O-O heterolítica, generando un centro oxo conteniendo Fe^{IV} , con el ligando porfirínico oxidado. Esta especie transfiere luego un átomo de oxígeno neutro al sustrato ligado, el que es liberado en forma de producto oxigenado, regenerando el estado inicial de la enzima [23].

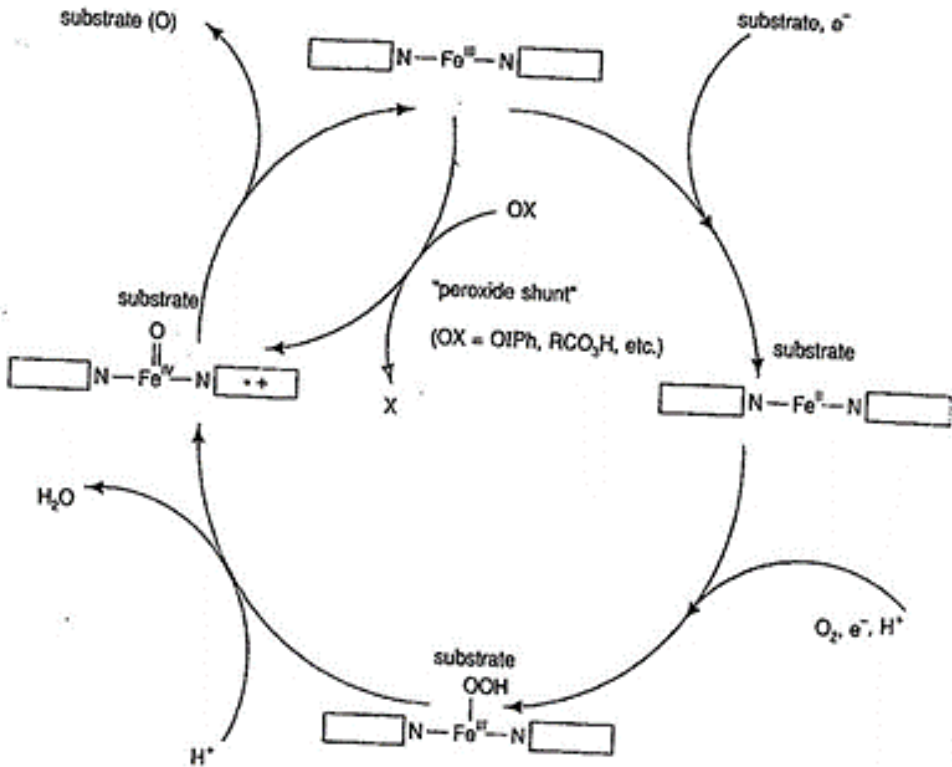


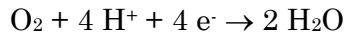
Fig. 12. Mecanismo de reacción propuesto para el citocromo P450 (tomado de [23]).

También se ha encontrado que el citocromo férrico P450 puede catalizar reacciones de oxigenación utilizando peróxidos orgánicos o átomos donores de oxígeno, en lugar del O_2 y agentes reductores, y usualmente sustratos iguales generan idéntico producto oxigenado, por ambas rutas, la descrita en la Fig. 12, y la que en esa figura se menciona como "*peroxide shunt*", lo que hace suponer que en ambos casos el intermediario final de la reacción debe ser el mismo complejo porfirínico de Fe(IV) [23].

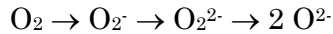
Otro sistema muy importante es la *citocromo-c oxidasa*, la enzima terminal en la cadena de transporte electrónico de la respiración, que cataliza la reducción de O_2 a H_2O pero la que, por contener también centros de cobre, ha sido ya discutida en detalle en el capítulo anterior (ver Cap. 1, Secc. 2.2.2.5.).

2.2.2. Hemoproteínas que cumplen funciones catalíticas

Durante la utilización del O_2 por parte de los sistemas biológicos, el oxígeno tiende a reducirse a agua, mediante un proceso redox que involucra la utilización de cuatro electrones:



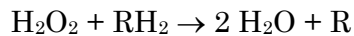
Pero, muchas veces esta reducción resulta incompleta, generándose iones superóxido o agua oxigenada [1]:



Dado que estas especies intermedias son sumamente tóxicas, los organismos han diseñado sistemas enzimáticos capaces de destruir a las mismas. Para la destrucción del anión superóxido, se utilizan habitualmente las superóxido dismutasas (ver Secc. 3.3.1., así como los Cap. 1 y 3 de este trabajo) y para la destrucción del agua oxigenada se utilizan, entre otras, dos hemoproteínas: catalasas y peroxidasas.

2.2.2.1. Peroxidasas y catalasas

Las peroxidasas son enzimas capaces de catalizar la oxidación de sustratos orgánicos por medio del agua oxigenada:



Entre los sustratos biológicos típicos podemos mencionar ácidos grasos, aminas y fenoles.

Por su parte, las catalasas desproporcionan el agua oxigenada:



pudiendo ser consideradas como un caso especial de peroxidasas, en las cuales el sustrato a ser oxidado es otra molécula de agua oxigenada [1].

Las peroxidasas mejor estudiadas provienen casi todas de fuentes vegetales y contienen Fe(III) unido a la protoporfirina IX como grupo prostético. Una de ellas, la peroxidasa de rábano rústico tiene un peso molecular del orden de 40 kDa y en ella el Fe(III) se encuentra en la configuración de alto espín y ubicado ligeramente por fuera del plano del anillo. Su esfera de coordinación se completa con un átomo de N de un residuo de imidazol histidínico y con el O de una molécula de H₂O [1].

A diferencia de las peroxidasas formadas por una sola subunidad, las catalasas tienen un peso molecular del orden de 240 kDa, y están constituidas por cuatro subunidades, cada una conteniendo un grupo hemo. También en este caso el Fe(III) de alto espín está ubicado por encima del plano del anillo. Las dos posiciones de coordinación restantes del centro metálico están ocupadas por un átomo de oxígeno de fenolato, proveniente de un residuo de tirosina, y uno de oxígeno de una molécula de agua [1,23].

Durante las reacciones catalizadas por estas enzimas aparecen otra vez involucradas especies intermediarias conteniendo Fe(IV), el que aparece en forma de dos compuestos corrientemente denominadas compuesto **I**, de color verde y compuesto **II**, de color rojo [1,23].

2.2.3. Hemoproteínas que participan del transporte de oxígeno

Entre todas las estructuras biológicas dependientes de hemoproteínas los sistemas de transporte y acumulación de O₂ ocupan un lugar central. Entre ellos, las hemoglobinas y mioglobinas de diversos orígenes, se cuentan entre los sistemas bioinorgánicos más estudiados y seguramente mejor caracterizados, tanto desde el punto de vista estructural, como espectroscópico y funcional [1,2,23,31]. También en las plantas se han encontrado y estudiado sistemas de este tipo, genéricamente llamados leghemoglobinas, cuyas características generales se analizarán brevemente en la Sección siguiente.

2.2.3.1. Leghemoglobinas

Durante mucho tiempo se pensó que las hemoglobinas de plantas sólo se encontraban en los nódulos de las raíces de las legumbres [34]. Estas leghemoglobinas muestran estructuras muy similares a la mioglobina de mamíferos y desempeñan un papel importante en la fijación simbiótica de N₂. Previene la inhibición del complejo de nitrogenasa ligando fuertemente al O₂ y facilitando su difusión a las bacterias fijadoras de nitrógeno a una concentración interna suficientemente baja como para inhibir la destrucción de la nitrogenasa, que es altamente sensitiva al O₂ [34]. Posteriormente, se descubrió que otras especies de plantas también mostraron la presencia de leghemoglobin, identificándose tres tipos diferentes, simbióticas (sLhg), no simbióticas (nsLhg) y truncadas (tLhg) [34,35]. Las leghemoglobinas no simbióticas se han identificado en especies que van desde las briofitas hasta las angiospermas, pensándose actualmente que están presentes en todas las plantas, si bien en muy bajas concentraciones [36]. Y, en algunos casos, se han encontrado los tres tipos de leghemoglobinas en una única planta [35].

Una manera sencilla de comprender la función de la leghemoglobina en plantas es por analogía con la mioglobina. La mioglobina facilita la difusión del O₂ desde la sangre al tejido muscular y de manera similar, la leghemoglobina facilita la difusión del O₂ desde fuera de las raíces hacia las bacterias fijadoras de N₂ en el interior de los nódulos. Sin embargo, a diferencia de la mioglobina, la leghemoglobina debe facilitar la difusión, pero manteniendo una concentración muy baja del oxígeno libre (~ 10 nM) para evitar la inhibición de la nitrogenasa. Vale decir, que esta mioglobina de plantas satisface simultáneamente dos necesidades, la captación y el transporte de O₂ [36].

Existen una serie de semejanzas biofísicas entre la mioglobina de mamíferos y las leghemoglobinas, las que pueden ser atribuidas claramente a las

similitudes en sus funciones biológicas, recién comentadas, pero existen una serie de diferencias importantes entre ellas, las que podrían estar relacionadas a diferencias fundamentales de sus entornos fisiológicos. La diferencia más importante es que la leghemoglobina muestra una afinidad por el O_2 unas veinte veces más grande que la mioglobina [36].

Tanto en la mioglobina como en la leghemoglobina el hierro está presente como Fe(II) de alto espín y está desplazado ligeramente por encima del plano del anillo porfirínico. En ambos casos, la quinta posición de coordinación está ocupada por un átomo de N de un residuo de histidina. Durante el proceso de oxigenación, la molécula de O_2 unida al hierro en la mioglobina resulta estabilizada por su interacción con una histidina “distal”, pero el entorno proteico de la histidina “proximal” disminuye la afinidad por el oxígeno ligado. En cambio, en la leghemoglobina prácticamente no hay interacción del O_2 ligado con la histidina “distal” pero el entorno de la histidina “proximal” claramente produce una mayor afinidad del sistema por el O_2 [36].

El comportamiento de la leghemoglobina simbiótica frente al O_2 fue también claramente demostrado por estudios cinéticos, que mostraron una muy elevada velocidad de combinación, cuya constante de reacción es mucho mayor que la obtenida para cualquier otra hemoglobina. Por otro lado, el O_2 unido a la leghemoglobina se disocia a una velocidad moderada, de hecho del orden de la mitad a la cual el O_2 se disocia de la mioglobina [37].

Aunque los detalles sobre la estructura y funciones de la leghemoglobina simbiótica se han ido analizando a lo largo de más de sesenta años de investigación, las más recientemente descubiertas leghemoglobinas no simbióticas siguen siendo un profundo misterio. El aspecto más llamativo desde el punto de vista estructural es que el hierro presente en ellas, en ausencia de O_2 , está hexacoordinado, con el N de la histidina distal, ocupando la sexta posición de coordinación. De todas formas también estas proteínas muestran una elevada afinidad por el oxígeno y bajas constantes de disociación del mismo [36]. No obstante, su rol fisiológico sigue siendo poco claro, aunque se han propuesto diferentes funciones, incluyendo algún papel en el transporte y acumulación de O_2 , la detoxificación de NO o de otras especies reactivas de oxígeno (ROS) o el sensado de la concentración de O_2 [36].

Hacia fines de los años '90 se realizaron los primeros estudios cristalográficos con leghemoglobinas simbióticas (soja y lupino) [35]. La primera estructura cristalina de una leghemoglobina no simbiótica fue la de arroz-Hb1, a una resolución de 2,4 Å, mostrando la presencia de una estructura dimérica, que muestra contactos muy cercanos entre ambas subunidades. Cada una de ellas contiene una protoporfirina IX como grupo prostético, con enlaces entre el hierro del grupo hemo y las histidinas “distal” y “proximal”. De todas formas la histidina distal es rápidamente desplazada en presencia de O_2 y la unidad FeO es estabilizada, en parte, por un reordenamiento de la cadena proteica y por la participación de ligandos vecinales [38].

Finalmente, hay que mencionar, que al igual que en el caso de las leghemoglobinas no simbióticas, también es muy poco lo que se sabe todavía sobre las leghemoglobinas truncadas. Aunque se ha sugerido que podrían estar involucradas en la detoxificación de NO [34]. De todas formas parece ser que la estructura de estas tLgh es más abierta, presentando túneles que facilitarían la unión con ligandos y estos ligandos unidos al centro metálico podrían estar estabilizados por más de un residuo “distal” [35].

Para terminar, en base a toda la información hasta ahora disponible, podemos afirmar que las leghemoglobinas son proteínas polifuncionales, esenciales para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular de las plantas. Estas funciones podrían diferir según el tipo de leghemoglobina implicada y aún del tipo de planta. Si esto es realmente así, estas proteínas han desempeñado seguramente un papel muy importante durante la evolución y adaptación de las plantas al medio ambiente [34,35].

2.3. Otras proteínas de hierro

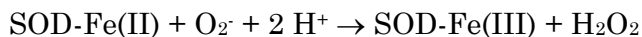
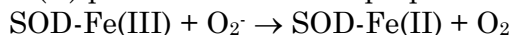
2.3.1. Superóxido dismutasa

Como se mencionara en el Capítulo anterior, las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido en O_2 y H_2O_2 y pueden involucrar a diferentes metales en sus sitios activos (Cu/Zn, Fe, Mn, Ni). En el caso de plantas, se ha demostrado la presencia de SODs en numerosas especies, encontrándose en ellas tres de las formas conocidas de SOD (esto es, los sistemas conteniendo Cu/Zn, Mn y Fe) y es únicamente en plantas donde estas tres formas pueden coexistir [39].

La Fe-SOD de plantas se haya esencialmente localizada en los cloroplastos [39]. Diversos estudios estructurales demostraron que las SOD dependientes de Fe y Mn presentan estructuras primarias, secundarias y terciarias muy similares y que no se asemejan a la enzima dependiente de Cu/Zn [40,41]. Adicionalmente, todas las SODs conocidas de ambos metales tienen el mismo modo de coordinación del sitio activo. Evidentemente, ambas SODs son miembros de la misma familia de proteínas y entonces no resulta sorprendente que puedan usar cualquiera de los dos iones metálicos. Hay estudios que muestran que numerosos organismos producen la versión de MnSOD cuando están expuestas a O_2 o cuando tienen deficiencia de hierro pero, en caso contrario, generan la FeSOD [41].

La enzima es dimérica y contiene un átomo de hierro en cada uno de los monómeros, con un peso molecular total de aproximadamente 44 kDa [42]. El hierro, que se encuentra como Fe(III) de alto espín [43], presenta una geometría de bipirámide trigonal con dos átomos de N de sendos residuos de histidina y un átomo de O de un residuo de aspartato como ligandos ecuatoriales y un átomo de N de otro residuo de histidina y un átomo de O de una molécula de agua (o un grupo OH⁻) como ligandos axiales [41].

El mecanismo de reacción de la FeSOD es similar al propuesto en el capítulo anterior para el caso de la SOD de Cu/Zn, y en este caso emplea la cupla redox Fe(III)/Fe(II) para catalizar la desproporción del anión superóxido:



Y la reacción ha sido estudiada con mucho detalle, y sus aspectos salientes pueden consultarse p.ej. en la refer. [41].

2.3.2. Lipoxigenasas

Los ácidos grasos son los constituyentes mayoritarios de los lípidos y son también componentes importantes de membranas y de reservorios de lípidos. Aparte de la reorganización de ácidos grasos en el interior de los lípidos y su uso como fuentes de carbono y energía, la oxidación de ácidos grasos insaturados es una de las reacciones más importantes en el metabolismo de los lípidos [44,45]. La formación de hidroperóxidos de ácidos grasos puede ocurrir o bien por oxidación química o por la acción de enzimas tales como las lipoxigenasas (LOs) [45].

Las lipoxigenasas (LOs) son proteínas mononucleares de hierro que se encuentran en plantas y animales, así como en algunos hongos, algas y cianobacterias. Catalizan la hidroperoxidación de ácidos grasos poli insaturados por adición de oxígeno molecular a unidades 1,4-*cis-cis*-dieno del sustrato. En plantas, ácidos insaturados, tales como el linoléico o el linolenico son sustratos para esta enzima [44]. Los metabolitos derivados de la oxidación de ácidos grasos insaturados via una etapa catalizada por las LOs, así como aquellos metabolitos que derivan de reacciones de oxidación alternativas reciben colectivamente el nombre de oxilipinas [42,45].

Las LOs aparecen involucradas en procesos que generan compuestos que afectan el crecimiento, el desarrollo y la protección frente a patógenos, tales como el ácido jasmónico y otras hormonas de plantas [44,46]. La lipoxigenasa de plantas mejor caracterizada es la isoenzima L1 de soja (SLO-1) [46].

Las lipoxigenasas presentan una sola cadena polipeptídica con una masa molecular de ~75-80 kDa en animales y de ~94-104 kDa en plantas [47] y, en el caso de la SLO-1 el centro catalítico está conformado por un átomo de hierro que muestra una geometría prácticamente octaédrica, coordinado a tres átomos de N de residuos de histidina a un átomo de O del carboxilato de un residuo de isoleucina, a un átomo de O de amida de un residuo de asparagina y a otro átomo de O proveniente de una molécula de agua (o de OH⁻), como se muestra en la Fig. 13 [45-47]. El hierro se encuentra en forma de Fe(II) de alto espín (inactiva) [48], la que se transforma en la forma activa (Fe(III) de alto espín) durante el proceso de reacción [46-48]. Por otra parte, todavía no hay consenso acerca de la forma en la que el sustrato llega al sitio activo y su forma de interacción [47].

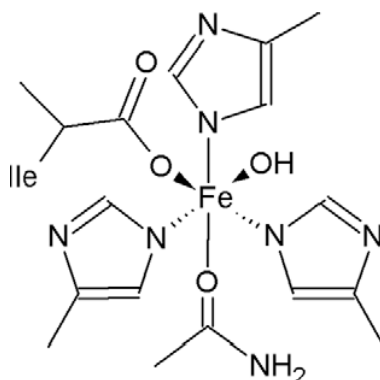


Fig. 13. Esfera de coordinación del hierro en la lipoxigenasa SLO-1.

Los efectos de las lipoxigenasas sobre las plantas parecen ser múltiples. Entre otras las LOs parecen estar involucradas de alguna manera en el envejecimiento celular, en la germinación de semillas y a diversas respuestas a situaciones de estrés causadas por el entorno, así como a mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos [49]. Y, por último no hay que dejar de remarcar su participación en la síntesis del ácido jasmónico, cuyo éster metílico (Fig. 14) ha sido identificado como un importante regulador celular, involucrado en diversos procesos de desarrollo así como en mecanismos de defensa frente a situaciones de estrés biótico y abiótico [50].

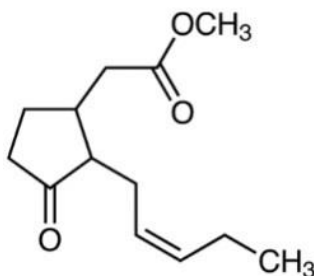


Fig. 14. Estructura esquemática del metil jasmonato.

La biosíntesis de los jasmonatos en las plantas se inicia, luego de que a través de un cierto estímulo se activen fosfolipasas que remueven ácido α -linolénico del lípido de membranas. Este ácido es oxigenado por la lipoxigenasa para formar ácido 13(S)-hidroxilínolénico a partir del cual, por cuatro etapas sintéticas posteriores, se genera el ácido jasmónico. A partir del ácido y por acción de la JA carboxil metiltransferasa, finalmente se genera el éster metílico volátil [50].

2.3.3. Oxidasa alternativa

La oxidasa alternativa (OxA), constituye uno de los descubrimientos más recientes en relación a la Química Bioinorgánica del hierro. Es una proteína de la

cadena respiratoria presente en todas las plantas superiores, así como en hongos, levaduras no-fermentativas y tripanosomas. Su estructura primaria sugiere que se trata de un nuevo miembro de la familia de proteínas de 2Fe/carboxilato [51]. Esta oxidasa parece proveer una ruta alternativa en el transporte de electrones que, finalmente, lleva a la reducción del oxígeno. Es decir, sigue un camino diferente al que lleva la citocromo c oxidasa y además es resistente a la inhibición por cianuro. La energía libre resultante se libera como calor (y por lo tanto no se puede aprovechar para la síntesis de ATP) y el proceso de reducción del O₂ no está acoplado con el bombeo de protones [51]. La expresión de los genes de la OxA está influenciada por situaciones estrés tales como frío, presencia de especies reactivas de oxígeno e infección por patógenos, así como otros factores que reducen el flujo de electrones a través del camino respiratorio de los citocromos.

De todas formas, la función biológica de la OxA aún no está claramente comprendida y se han ido barajando diferentes posibilidades que incluyen la posibilidad de que se trate de una proteína muy antigua desde el punto de vista evolutivo, cuya función primordial habría sido la de eliminar dioxígeno, desempeñando un rol importante en los mecanismos de defensa de las especies anaeróbicas primitivas [52].

La oxidasa alternativa de plantas es un homodímero de masa molecular del orden de los 32 kDa [51] y se han hecho diversas propuestas en cuanto a las características de su sitio activo di-metálico. Una de las más consistentes y actualmente aceptadas se muestra en la Fig. 15. Como puede verse, los dos centros metálicos están puenteados por dos carboxilatos de ácido glutámico y la coordinación de cada uno de los centros se completa con un átomo de O de un carboxilato de otro residuo de ácido glutámico y un átomo de N de un residuo de histidina [53].

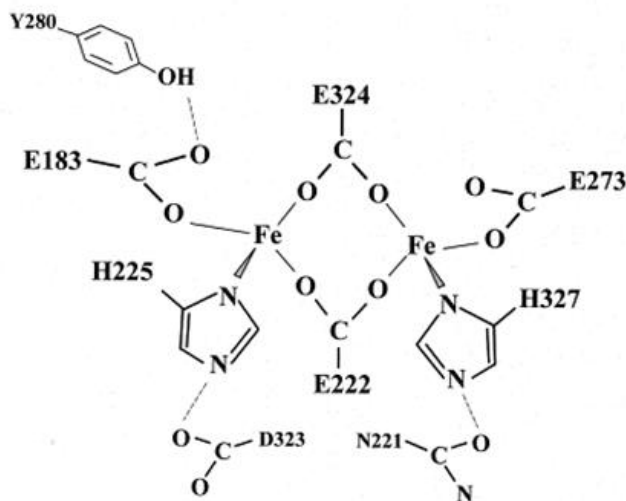


Fig. 15. Propuesta del sitio activo di-metálico de la oxidasa alternativa de plantas (E: ácido glutámico; H: histidina; N: asparagina; Y: tirosina; D: ácido aspártico) (de refer. [53]).

Estudios espectroscópicos por resonancia de espín electrónico, mostraron claramente la señal característica de un centro di-metálico de valencia mixta (Fe(II)/Fe(III)) en el sitio activo [54].

Asimismo, y en base a toda la información hasta ahora reunida se han hecho ya algunas propuestas de tipo mecanístico, que han permitido obtener una imagen más clara sobre el funcionamiento y peculiaridades químico-biológicas de este sistema [55].

2.3.4. Fosfatasas ácidas púrpuras

Las fosfatasas son enzimas que remueven un grupo fosfato de un compuesto orgánico, generando un anión fosfato, PO_4^{3-} , y una molécula conteniendo un grupo oxhidrilo [1,2]. Una de las fosfatasas mejor conocidas y más estudiadas es la llamada fosfatasa alcalina, que se encuentra en muchos organismos desde las bacterias al Hombre, y que es una fosfomonoesterasa no específica que cataliza la reacción de hidrólisis para producir un fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol, mostrando máxima actividad a valores de pH de 8 o superiores. Esta enzima será discutida en detalle en el Cap. 4.

Por otro lado, las así llamadas fosfatasas ácidas púrpuras (PAPs) representan a un grupo de enzimas que también hidrolizan ésteres del ácido fosfórico pero muestran su máxima actividad a valores bajos de pH. Debido a su intenso color estas fosfatasas, terminaron de ser conocidas como PAPs [56,57].

En años recientes las PAPs han sido aisladas de una variedad de fuentes animales, vegetales y bacterianas [57,58]. Aparte de las propiedades y características que avalan su designación como fosfatasas ácidas púrpuras, estas enzimas de fuentes animales, vegetales y bacterianas difieren considerablemente en sus masas moleculares, ordenamiento de subunidades y secuencia de amino ácidos. Mientras que las de mamíferos son glicoproteínas monoméricas con pesos moleculares del orden de 35 kDa, las masas moleculares de las enzimas diméricas de plantas van de 100 a 120 kDa y, por su parte, las PAPs bacterianas son proteínas monoméricas fuertemente glicosiladas con pesos moleculares del orden de los 80 kDa [56,58].

Otra característica de todas estas enzimas es la presencia de dos iones metálicos relativamente cercanos que conforman un centro de reacción dinuclear. En las enzimas de mamíferos este centro está conformado por dos iones de hierro (un par Fe(III)/Fe(II)), mientras que la mayoría de las PAPs de plantas tienen centros Fe(III)/Zn(II) o Fe(III)/Mn(II) [57,58].

El característico color púrpura de estas enzimas, relacionado a una banda de absorción a 510-560 nm, es debido a una transferencia de carga de un átomo de O de un residuo conservado de tirosina al Fe(III) presente en el sitio activo [58].

Aunque se sabe que las PAPs están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, estudios detallados de las mismas sólo han sido realizados en un número limitado de casos, por ejemplo frijoles rojos o habichuelas rojas (*Phaseolus vulgaris*), batatas (*Ipomea batatas*), lupino (*Lupinus albus* y *Lupinus luteus* L.), soja (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), frijol mungo (*Vigna radiata*), lenteja de agua (*Spirodela oilgorrhiza*) y *Arabidopsis thaliana*, entre otras pocas más. Sin embargo, la naturaleza y estructura del sitio activo solo ha sido determinada en el caso de los frijoles rojos, la batata y el lupino amarillo [58].

En el caso de los frijoles rojos se encontró, inicialmente, que la enzima es dimérica con un peso molecular de aproximadamente 130 kDa, y contiene un átomo de hierro y uno de zinc por subunidad. El espectro de absorción visible muestra una intensa banda de absorción en 560 nm ($\epsilon = 3360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La presencia del par Fe/Zn fue confirmada adicionalmente por estudios espectroscópicos, comparando el comportamiento de los espectros EPR de la enzima nativa con el del correspondiente derivado Fe(III)/Fe(II) [58,59].

Los detalles estructurales de la enzima finalmente fueron develados por un estudio cristalográfico tridimensional, refinado a 2,9 Å en el grupo espacial C222₁ [56,60]. La estructura del sitio di-metálico activo se muestra en la Fig. 16.

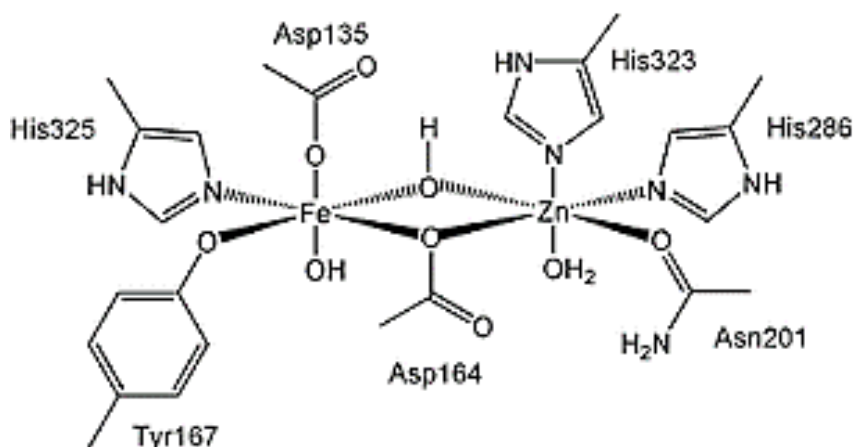


Fig. 16. Estructura esquemática del sitio di-metálico de la PAP de frijoles rojos.

Los dos centros metálicos del sitio dinuclear están separados 3,1 Å y la esfera de coordinación de cada uno de los centros es aproximadamente octaédrica, algo más distorsionada en el caso del Zn(II).

En el caso de la PAP de batata, se encontró la existencia de tres isoformas, conteniendo respectivamente Fe(III)/Zn(II), Fe(III)/Mn(II) y Fe(III)/Fe(II) como sitios di-metálicos activos [58]. La isoforma conteniendo el sitio Fe(III)/Zn(II) presenta un peso molecular de 112 kDa y la coordinación de ambos iones metálicos es similar a la descrita para la PAP de los frijoles rojos en la Fig. 16 [58,61]. Por otra parte, también en las isoformas conteniendo Fe(III)/Mn(II) y Fe(III)/Fe(II), que tienen un peso molecular de unos 110 kDa, las características generales de coordinación

resultan similares a las de los casos anteriores [58,62-64]. También la PAP recientemente aislada de semillas de soja parece guardar una fuerte relación con el sistema estudiado en los frijoles rojos [58, 62].

Por su parte, la PAP del lupino amarillo (*Lupinus luteus*), que posee un sitio di-metálico conformado por Fe/(III)/Mn(II), tiene ciertas semejanzas con la PAP de batata pero una diferencia notable con respecto a todas las otras PAPs hasta ahora investigadas, y es que presenta una estructura cuaternaria hexamérica, mientras que todas las otras enzimas de este tipo son diméricas [58,65].

A pesar de nuestros actuales conocimientos sobre especificidad de sustratos, acción de inhibidores, localización subcelular, geometría y estructura de sus sitios activos, relación con otras enzimas, y mecanismos químicos, la función fisiológica de las PAPs de plantas continúa siendo relativamente poco clara [56,58]. Sin embargo, existe ya un amplio consenso de que un papel general de estas PAPs debe estar relacionado con la movilización y captura de fosfatos inorgánicos de organofosfatos presentes en los suelos.

La concentración de P_i soluble en muchos suelos es apreciablemente menor que la concentración intracelular de P_i requerida para el desarrollo óptimo de las plantas y su desarrollo. El fósforo es asimilado por las plantas en su estado más oxidado, $H_2PO_4^-$ o HPO_4^{2-} , mientras que el PO_4^{3-} es el macronutriente menos accesible en muchos suelos debido a que forma fácilmente compuestos insolubles.

Extensivas reservas de P_i en los suelos existen en forma de fosfato-ésteres, derivados de la descomposición de material orgánico y las plantas pueden acceder a este fósforo segregando ácidos orgánicos o enzimas hidrolíticas a la rizoesfera y el involucramiento de las PAPs en estos procesos está ya claramente establecido [58,66]. Asimismo, se han sugerido algunas otras posibles funciones para estas enzimas, entre otras, la hidrólisis de otros ésteres de fosfato, participación en la utilización de fitato, remoción de especies reactivas de oxígeno y transporte de hierro y zinc en algunas plantas [58]. Todas estas cuestiones ponen en evidencia que todavía son necesarios más estudios para lograr la comprensión completa y definitiva de las funciones de esta enzima y su posible interdependencia con otras.

2.3.5. Ferritinas vegetales

Las ferritinas son una clase de proteínas multiméricas encontradas en animales, plantas y bacterias, involucradas esencialmente en la homeostásis del hierro debido a su capacidad de retener hasta 4500 átomos de este elemento en una forma segura y estable en el interior de una cavidad proteica [1,67]. Existe una estrecha relación estructural y funcional entre las ferritinas de animales y las de plantas [67].

La apoferritina está constituida por una proteína hidrosoluble, formada por 24 subunidades equivalentes las que se ubican en los vértices de un cubo truncado (es decir, 3 subunidades por cada vértice). Este ordenamiento genera un

empaquetamiento casi esférico con un diámetro de unos 125 Å, quedando en el centro de la esfera un espacio hueco con un diámetro de unos 70 Å, en el cual se ubicará el material inorgánico. Este esqueleto proteico tiene un peso molecular del orden de 444.000 Da. Por otro lado, el ordenamiento de las subunidades permite la generación de un cierto número de canales que juegan un papel importante en la acumulación y liberación del hierro [1,68].

En la recién mencionada cavidad, localizada en el centro de la esfera de apoferritina, se ubica el hierro en forma de micelas esféricas constituidas por un complejo oxo-hidroxoférrico de estequiometría $(\text{FeO.OH})_8(\text{FeO.OPO}_3\text{H}_2)$. Estas micelas pueden contener un máximo de hasta 4.500 átomos de hierro, con lo cual el peso molecular de la ferritina puede llegar ser del orden de 900.000 Da. Vale decir que cuando se satura de hierro, el sistema puede duplicar su peso. A partir de datos obtenidos por estudios EXAFS se ha determinado que el hierro está en coordinación octaédrica de oxígenos, formando unidades FeO_6 y la estructura del complejo muestra ciertas analogías con la del mineral ferrihidrita, $\text{Fe}_{10}\text{O}_6(\text{OH})_{18}$ [1]. El comportamiento magnético del sistema sugiere la presencia de Fe(III) de alto espín con fuertes acoplamientos ferrimagnéticos y estudios Mössbauer sugieren la presencia del fenómeno conocido como “superparamagnetismo”, que habitualmente es observable en el caso de material magnético muy fuertemente dividido [1,69].

La ferritina de plantas es, como se dijo, estructural y funcionalmente similar a la de animales, pero a diferencia de la ferritina de mamíferos, que se encuentra fundamentalmente en el citoplasma celular, la de plantas se encuentra exclusivamente intracelularmente en los plástidos. Muchas veces a esta ferritina en particular se la ha denominado como “fitoferritina” [70]. La ferritina de plantas ha sido observada como componente en prácticamente todo tipo de plástidos vegetales: proplástidos, etiolplastos, cloroplastos, amiloplastos y cromoplastos. Adicionalmente, depósitos cristalinos o masas de partículas cristalinas pueden ocupar importantes partes de volúmenes de ciertos plástidos, formando partículas que suelen denominarse “plástidos ferritínicos” ya que contienen mayoritariamente a este compuesto proteico de hierro [70].

Estos depósitos cumplen múltiples funciones en todas las plantas: a) acumulación y reservorio de hierro en forma no-tóxica, retirando el exceso de metal de la circulación por el tejido vegetal, b) reabsorción de hierro originado en la desintegración de plástidos durante la senescencia; c) depósito de hierro para su futura utilización por parte de algún órgano que lo requiera [70].

La fitoferritina también suele ser muy abundante en las semillas de ciertas plantas, p. ej. en las legumbres, siendo probable que estos depósitos de ferritina en las semillas también actúen como reservorio de hierro en las plantas. De todas formas, durante la germinación la fitoferritina es rápidamente degradada, probablemente catalizada por la liberación de Fe(II) y generación de radicales hidroxilo que destruyen la cáscara proteica [71].

La ferritina de plantas también parece cumplir una función importante en los mecanismos de defensa frente a situaciones de estrés abiótico o biótico,

pudiéndose concebir que algunas situaciones de estrés puedan alterar ciertas estructuras biológicas y por lo tanto conducir a cambios en los depósitos intracelulares de hierro, aumentando la concentración de hierro libre y, consecuentemente, se sintetizará ferritina para acumular esos excesos de hierro en forma segura. Es decir, la función de la ferritina de plantas durante el desarrollo y bajo condiciones de estrés, sería la misma, que es la de acumular el metal rápidamente, en forma temporaria y segura [67].

REFERENCIAS

- [1] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [2] J.J.R. Fraústo da Silva & R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
- [3] R. Hänsch & R.R. Mendel, *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259 (2009).
- [4] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, 4th. Edit. CRC-Press, Boca Ratón, 2011.
- [5] A.C. Dlouhy & C.E. Outten, The Iron Metallome in Eukariotic Organisms. En: L. Banci (Ed.) *Metal Ions in Life Science: Metallomics and the Cell*, Vol. 12, Springer, Dordrecht, 2013, pp. 241-278.
- [6] M.L. Guerinot & Y. Yi, *Plant Physiol.* **104**, 815 (1994).
- [7] E.J. Baran, Phytosiderophores and Related Systems: Metal Uptake by Plants. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 14, Scientific Publishers, Jodhpur, 2013, pp. 1-27.
- [8] A. Dancis, R.D. Klausner, A.G. Hinnebusch & J.G. Barriocanal, *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2294 (1990).
- [9] T. Emery, The Storage and Transport of Iron. En: *Metal Ions in Biological Systems* (H. Sigel, Ed.), Vol. 7, Marcel Dekker, New York, 1978, pp. 77-126.
- [10] S.A. Kim & M.L. Guerinot, *FEBS-Lett.* **581**, 2273 (2007).
- [11] D.L. Callahan, A.J.M. Baker, S.D. Kolev & A.G. Wedd, *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 2 (2006).
- [12] R. Hell & U.W. Stephan, *Planta* **216**, 541 (2003).
- [13] J.L. Pierre & I. Gautier-Luneau, *Biometals* **91**, 96 (2000).
- [14] D.O. Hall, R. Cammack & K.K. Rao, *Pure Appl. Chem.* **34**, 553 (1973).
- [15] G. Hanke & P. Mulo, *Plant, Cell Environm.* **36**, 1071 (2013).
- [16] D. Bentrop, F. Capozzi & C. Luchinat, Iron-Sulfur Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins* (I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel, Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 357-460.
- [17] P. Gütlich, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **638**, 15 (2012).
- [18] K.K. Rao, R. Cammack, D.O. Hall & C.E. Johnson, *Biochem. J.* **122**, 257 (1971).
- [19] V.K. Yachandra, J. Hare, A. Gewirth, R.S. Czernuszewicz, T. Kimura, R.H. Holm & T.G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6462 (1983).
- [20] S. Han, R.S. Czernuszewicz, T. Kimura, M.W.W. Adam & T.G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3505 (1989).
- [21] F. Madueño, J.A. Napier & J.C. Gray, *Plant Cell* **5**, 1865 (1993).

- [22] T.A. Link, The Structures of Rieske and Rieske-Type Proteins. En: *Advances in Inorganic Chemistry*, A.G. Sykes & R. Cammack (Eds.), Vol. 47, Academic Press, San Diego, 1999, pp. 83-157.
- [23] E.I. Stiefel & G.N. George, Ferredoxins, Hydrogenasas and Nitrogenases: Metal-Sulfide Proteins. En: *Bioinorganic Chemistry*, I. Bertini, H.B.Gray, S.J. Lippard & J. Silverstone Valentine (Eds.), University Science Books, Mill Valley, CA, 1994, pp. 365-453.
- [24] E.N. Brown, R. Friemann, A. Karlsson, J.V. Parales, M.M.J. Couture, L.D. Eltis & S. Ramaswamy, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 1301 (2008).
- [25] W.H. Orme-Johnson, *Ann. Rev. Biochem.* **42**, 159 (1973).
- [26] C.R. Staples, E. Ameybor, W. Fu, L. Gadet-Salvi, A.L. Strit-Etter, P. Schürmann, D.B. Knaff & M.K. Johnson, *Biochemistry* **35**, 11425 (1996).
- [27] S. Dai, R. Friemann, D.A. Glauser, F. Bourquin, W. Manieri, P. Schürmann & H. Eklund, *Nature* **448**, 92 (2007).
- [28] W. Moeder, O. del Pozo, D.A. Navarre, G.B. Martin & D.F. Klessig, *Plant Mol. Biol.* **63**, 273 (2007).
- [29] C. Alban, D. Job & R. Douce, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 17 (2000).
- [30] N.B. Ugulava, B.R. Gibney & J.T. Jarrett, *Biochemistry* **40**, 8343 (2001).
- [31] P. Turano & Y. Lu, Iron in Heme and Related Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 269-356.
- [32] F. Durst & D.P.O. O'Keefe, *Drug Metabolism. Drug Interact.* **12**, 171 (1995).
- [33] J. Xu, X. Wang & W. Guo, *J. Integrat. Agricult.* **14**, 1673 (2015).
- [34] V. Garrocho-Villegas, S.K. Gopalasubramaniam & R. Arredondo-Peter, *Gene* **398**, 78 (2007).
- [35] J.A. Hoy & M.S. Hargrove, *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 371 (2008).
- [36] S. Kundu, J.T. Trent III & M.S. Hargrove, *Trends Plant Sci.* **8**, 387 (2003).
- [37] J.B. Wittenberg, C.A. Appleby & B.A. Wittenberg, *J. Biol. Chem.* **247**, 527 (1972).
- [38] M.S. Hargrove, E.A. Brucker, B. Stec, G. Sarath, R. Arredondo-Peter, R.V. Klucas. J.S. Olson & G.N. Phillips, jr., *Structure* **8**, 1004 (2000).
- [39] C. Bowler, W. Van Camp, M. Van Montagu & D. Inzé, *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 199 (1994).
- [40] M.W. Parker & C.C.F. Blake, *FEBS Lett.* **229**, 377 (1988).
- [41] Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, M.J. Maroney, A.F. Miller, M. Teixeira & J. Selverstone Valentine, *Chem. Rev.* **114**, 3854 (2014).
- [42] D. Ringe, G.A. Petsko, F. Yamakura, K. Suzuki & D. Ohmori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3879 (1983).
- [43] J.P. Renault, C. Verchere-Beaur, I. Morgenstern-Badarau, F. Yamakura & M. Gerloch, *Inorg. Chem.* **39**, 2666 (2000).
- [44] I. Feussner & C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 275 (2002).
- [45] A. Andreou & I. Feussner, *Phytochemistry* **70**, 1504 (2009).
- [46] P. Nordlund, Structure-Function of Nonheme Iron Proteins with Oxygen and Nitrogen-Dominated Coordination. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 461-570.
- [47] A.R. Brash, *J. Biol. Chem.* **274**, 23679 (1999).

- [48] S.T. Prigge, J.C. Boyington, M. Faig, K.S. Doctor, B.J. Gaffney & L.M. Amzel, *Biochimie* **79**, 629 (1997).
- [49] S. Rosahl, *Z. Naturforsch.* **51c**, 123 (1996).
- [50] J.J. Chong & Y.D. Choi, *Trends Gen.* **19**, 409 (2003).
- [51] A.L. Moore, M.S. Albury, P.G. Crichton & C. Affourtit, *Trends Plant Sci.* **7**, 478 (2002).
- [52] C.M. Gomes, J. Le Gall, A.V. Xavier & M. Teixeira, *ChemBioChem.* **2**, 583 (2001).
- [53] D.A. Berthold, M.E. Andersson & P. Nordlund, *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 1241 (2000).
- [54] D.A. Berthold, N. Voevodskaya, P. Stenmark, A. Gräslund & P. Nordlund, *J. Biol. Chem.* **277**, 43608 (2002).
- [55] C. Affourtit, M.S. Albury, P.G. Crichton & A.L. Moore, *FEBS Lett.* **510**, 121 (2002).
- [56] T. Klabunde & B. Krebs, *Struct. Bond.* **89**, 177 (1997).
- [57] G. Schenk, N. Mitic, G.R. Hanson & P. Comba, *Coord. Chem. Rev.* **257**, 473 (2013).
- [58] E.J. Baran, Plant Purple Acid Phosphatases: Structure and Functions. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 17, Scientific Publishers, Jodhpur, 2013, pp. 331-359.
- [59] J.L. Beck, J. de Jersey, B. Zerner, M.P. Hendrich & P.G. Debrunner, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 3317 (1988).
- [60] N. Sträter, N. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel & B. Krebs, *Science* **268**, 1489 (1995).
- [61] A. Durmus, C. Eicken, B.H. Sift, A. Kratel, R. Kappi, J. Hüttermann & B. Krebs, *Eur. J. Biochem.* **260**, 709 (199).
- [62] G. Schenk, Y. Ge, L.E. Carrington, C.J. Wynne, I.R. Searle, B.J. Carroll, S. Hamilton & J. de Jersey, *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 183 (1999).
- [63] G. Schenk, L.R. Gahan, L.E. Carrington, N. Mitic, M. Valizadeh, S.E. Hamilton, J. de Jersey & L.W. Guddat, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **22**, 273 (2005).
- [64] T. Waratrujiwong, B. Krebs, F. Spener & P. Visoottiviseth, *FEBS J.* **273**, 1649 (2006).
- [65] S.V. Antonyuk, M. Olczak, T. Olczak, J. Ciuraszkiewicz & R.W. Strange, *Internat. Union Crystallogr. J.* **1**, 101 (2014).
- [66] H.T. Tran, B.A. Hurley & W.C. Plaxton, *Plant Sci.* **179**, 14 (2010).
- [67] J.F. Briat, *J. Plant Nutrit.* **19**, 1331 (1996).
- [68] E. C. Theil, *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 289 (1987).
- [69] D.P.E. Dickinson, *Hyperf. Interact.* **27**, 35 (1986).
- [70] J. Seckback, *J. Plant Nutrit.* **5**, 369 (1982).
- [71] H. Marschner, *Mineral Nutrition in Higher Plants*, Academic Press, Amsterdam, 1995.

CAPITULO 3

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE MANGANESO

INTRODUCCIÓN

El manganeso es un elemento traza esencial para todas las formas de vida pero, muchos de los aspectos relacionados a su actividad biológica-bioquímica están todavía poco explorados y escasamente comprendidos [1-5].

Los primeros y más evidentes valores funcionales de este elemento parecen estar relacionados a su acidez de Lewis (como Mn(II)) y a sus propiedades oxidantes (como Mn(III) y Mn(IV)). Otras características químicas típicas del manganeso son la estabilidad del catión Mn^{2+} en soluciones ácidas y la gran estabilidad del MnO_2 en soluciones alcalinas y en presencia de oxígeno. Por otro lado, los estados de oxidación mayores que Mn(IV) son agentes oxidantes extremadamente poderosos (ver p. ej. el diagrama de Latimer para el manganeso [6]) y son, por lo tanto, de escaso interés para los sistemas biológicos. Esto implica que los tres estados de oxidación del manganeso que son indudablemente importantes para la vida son Mn(II), Mn(III) y Mn(IV) [1-3,5] y sus características esenciales se discuten brevemente a continuación.

1. CARACTERÍSTICAS ESENCIALES DE LOS DIFERENTES ESTADOS DE OXIDACIÓN DEL MANGANESO

Manganeso(II): El acuo-complejo rosado-pálido $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ es seguramente la especie más relevante bajo condiciones fisiológicas y ciertamente es la forma de manganeso libre predominante en sistemas celulares. Este catión es extremadamente lábil debido a su configuración electrónica d^5 de alto espín, baja carga y ausencia de energía de estabilización por campo cristalino. Las longitudes de enlace Mn(II)-Ligando son apreciablemente largas y variables y el Mn(II) prefiere complejarse con átomos donores que generan un elevado carácter iónico en los enlaces $Mn^{II}-L$, favoreciendo la coordinación con átomos de O antes que con átomos de N. En relación a los números de coordinación, el Mn(II) aparece usualmente hexacoordinado en geometría octaédrica [7]. Una comparación con otros cationes metálicos biológicamente relevantes muestra que el radio cristalino del Mn(II) con 0,97 Å es solamente ligeramente superior a los del Fe(II) (0.92 Å), Mg(II) (0.86 Å), Zn(II) (0.88 Å) y Cu(II) (0.87 Å), pero algo menor que el del Ca(II) (1.14 Å) [6].

Manganeso(III): El Mn(III) es un agente oxidante relativamente fuerte ($E^\circ = 1.51$ V) siendo aún capaz de oxidar lentamente al agua con liberación de O_2 . La especie verde $[Mn(H_2O)_6]^{3+}$ solamente es estable en soluciones fuertemente ácidas y un incremento del pH produce su desproporción, según [7]:



Debido a su estructura electrónica ($3d^4$) el Mn(III) forma complejos distorsionados tetragonalmente por efecto Jahn-Teller, teniendo generalmente cuatro enlaces cortos y dos enlaces más largos, constituyéndose en el único catión trivalente de interés biológico que muestra esas características. Consecuentemente, posee el potencial de incorporarse a determinados sitios bien seleccionados de proteínas. En este aspecto difiere claramente del Fe(III) el cual, siendo un catión $3d^5$, entra fácilmente en sitios octaédricos o tetraédricos [2].

Manganeso (IV): Por su configuración electrónica $3d^3$, este catión se asemeja al Cr^{3+} y, consecuentemente, muestra una fuerte preferencia por la coordinación octaédrica. Su química en solución acuosa es muy limitada y está dominada por la formación del MnO_2 altamente insoluble. Por otro lado, su elevado poder polarizante le permite asociarse fuertemente a un átomo de O del agua, dando el oxocación MnO^{2+} y generando una importante tendencia a la formación de especies polinucleares de valencia mixta (Mn(IV)/Mn(III)) con ligandos μ_2 -oxo [2,5,7].

2. ASPECTOS BIOLÓGICOS RELEVANTES DEL MANGANESO

Las consideraciones precedentes muestran claramente que la bioquímica del manganeso debería estar esencialmente dominada por la química del Mn(II), así como por la fuerte acción oxidante de su estado de oxidación estable más elevado, Mn(IV). No obstante, un análisis de todos los sistemas bioinorgánicos dependientes de manganeso hasta ahora conocidos, muestra que estas expectativas sólo están cumplidas parcialmente, ya que también el Mn(III) desempeña un papel central en varios sistemas biológicos importantes.

Por otro lado, una de las características más importantes de las enzimas dependientes de manganeso es su amplio espectro de funcionalidad. Aunque mucha atención se ha prestado siempre a las enzimas involucradas en procesos redox (p. ej., el denominado fotosistema-II, asociado a la liberación de O_2 , diferentes hidrogenasas, así como peroxidasa y superóxido-dismutasa dependientes de Mn), también son bien conocidas diversas hidrolasas, ligasas, isomerasas y transferasas dependientes del manganeso [3,5].

En proteínas, el Mn(II) usualmente se encuentra hexacoordinado, aunque también han sido reportados números de coordinación menores (cuatro o cinco). El entorno de coordinación de Mn(II) y Mn(III) en todas las proteínas hasta ahora caracterizadas estructuralmente siempre contiene donores oxigenados y, frecuentemente, el oxígeno es el único donador a Mn(II). Asimismo, el Mn(II) muestra una muy baja afinidad por donores sulfurados y tampoco se conocen ejemplos de Mn ligado a anillos porfirínicos o a corrina. Es interesante de mencionar también que el Mn(III) se encuentra coordinado al menos a un átomo de N de histidina, en todos los ejemplos caracterizados estructuralmente hasta el presente [5].

3. CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE MANGANESO EN LAS PLANTAS

El comportamiento del Mn en suelos es relativamente complejo y depende no solo de la concentración del elemento y de la composición del suelo, sino también del pH y de la presencia de otros elementos [8,9]. El manganeso puede existir en forma de especies catiónicas, especialmente como $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, usualmente asociado con otros cationes divalentes de tamaño y características similares. Pero también es muy usual su presencia en forma de óxidos u oxohidróxidos. Entre estos, los más comunes y estables son la pirolusita, $\beta\text{-MnO}_2$, la manganita $\text{MnO}(\text{OH})$ y la hausmanita, Mn_3O_4 . Además, en el suelo el manganeso participa de diversos procesos redox, a saber [9]:

Además, en el suelo el manganeso participa de diversos procesos redox, a saber [9]:

- La reducción $\text{Mn}(\text{III}) \rightarrow \text{Mn}(\text{II})$ puede ser biótica o abiótica y en ella pueden intervenir especies tales como $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Cr}(\text{III})$, sulfuro, fenoles, sustancias húmicas o bacterias reductoras.
- La oxidación $\text{Mn}(\text{II}) \rightarrow \text{Mn}(\text{III})$, $\text{Mn}(\text{IV})$, puede ocurrir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y puede ser mediada biológicamente o ser autocatalítica.
- La especie $\text{Mn}(\text{III})$ es extremadamente reactiva desde el punto de vista redox y desaparece rápidamente, tanto aceptando como donando un electrón.
- La especie $\text{Mn}(\text{II})$ puede ser adsorbida por el MnO_2 o ser oxidada a $\text{Mn}(\text{III})$ o $\text{Mn}(\text{IV})$.
- Diversos ligandos orgánicos o fosfatos pueden estar involucrados en estos ciclos redox.

Ha quedado bastante claramente demostrado que todo el comportamiento químico del manganeso en suelos está controlado por los procesos de óxido-reducción recién citados, unidos a una serie de complejas reacciones hidrolíticas [9]. También se sabe que en la rizoesfera las reacciones de oxidación que ocurren son predominantemente biológicas mientras que las de reducción pueden ser tanto de naturaleza biológica como química [8].

También existen numerosas evidencias que muestran que la captación de manganeso está controlada metabólicamente y parece ser que es transportado a través de la interfaz suelo-raíz en como $\text{Mn}(\text{II})$, aparentemente en forma similar a otras especies catiónicas divalentes como $\text{Mg}(\text{II})$ o $\text{Ca}(\text{II})$. La captación y translocación en la planta parece ser, generalmente bastante rápida, lo que sugiere que el manganeso no se une a ligandos orgánicos insolubles ni en la raíz ni en el fluido del xilema. También se sabe que la presencia de microorganismos en la rizoesfera puede afectar la captación del elemento [9]. Como los requerimientos fisiológicos de Mn son bajos y la capacidad de captación del elemento excede estos requerimientos en varios órdenes de magnitud, se puede concluir que la regulación de captación está pobremente controlada [8,10].

En los fluidos y extractos vegetales el manganeso parece estar esencialmente en forma catiónica libre y, por lo tanto, se puede presumir que básicamente es transportado como $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, aunque en algunos exudados se lo ha encontrado complejoado con moléculas orgánicas [9]; se ha estimado que alrededor de un 40% del Mn(II) transportado puede estar ligado a los ácidos cítrico o málico y también a la nicotianamina [8]. A nivel celular, el Mn(II) se acumula predominantemente en las vacuolas y, en cierta medida, en los cloroplastos y también puede quedar asociado a las paredes celulares [10]. Esta distribución depende claramente del estado de desarrollo de la planta, así como de los niveles de manganeso a los que la planta está expuesta [10].

4. ENZIMAS DE MANGANESO EN PLANTAS

Como se mencionara más arriba, el manganeso aparece involucrado en una gran variedad de funciones biológicas, no sólo en plantas sino también en bacterias y animales y otros organismos superiores. Para organizar la discusión de los sistemas enzimáticos conteniendo manganeso presentes en plantas, los presentaremos ordenadamente en las siguientes subsecciones: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Finalmente presentaremos ejemplos de algunas proteínas no catalíticas que ligan el elemento.

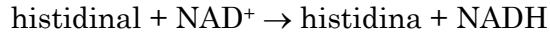
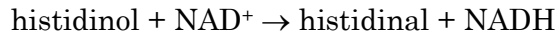
4.1. Oxidoreductasas

4.1.1. Hidrogenasas

En realidad existen varias dehidrogenasas en las que el Mn(II) simplemente es utilizado para ligar, orientar o activar el sustrato; sobre la participación directa del Mn(II) en enzimas de este tipo, en el caso de plantas todavía no hay demasiada información. Un caso interesante es el de la ***3-isopropilmalato dehidrogenasa*** (EC 1.1.1.85), que ha sido encontrada tanto en microorganismos como en plantas [11]. Esta enzima cataliza la conversión de 3-isopropilmalato a 2-isocaproato, una etapa clave en la biosíntesis del amino ácido leucina y requiere Mn(II) y K(I) para mantener actividad óptima [5,11]. La enzima también funciona con Mg(II), pero es mucho más activa con Mn(II) [11].

Recientemente, se ha identificado esta enzima en batata, colza y *Arabidopsis thaliana*, como parte del camino de biosíntesis de la leucina. También se ha reportado la estructura en torno del sitio metálico (en este caso, Mg(II)) para la *Arabidopsis*, encontrándose que el centro metálico interaccionando con el sustrato muestra una coordinación cinco relativamente distorsionada, unido a cinco átomos de oxígeno, tres de sendos carboxilatos de residuos de ácido aspártico y dos provenientes de un carboxilato y un OH⁻ del isopropilmalato [12].

Otra hidrogenasa dependiente de Mn muy interesante es la ***histidinol dehidrogenasa*** (EC 1.1.1.23) [5], enzima que cataliza las dos últimas etapas en la síntesis de la histidina [13]:



esto es, reduce dos moles de NAD^+ para formar un mol de histidina.

Esta enzima fue identificada en varias plantas, por ejemplo repollo (*Brassica oleracea*), pepino (*Cucumis sativus*), espárrago (*Asparagus officinalis*), berenjena (*Solanum melongena*), lechuga (*Lactuca sativa*) y pimiento (*Capsicum annuum*) entre otras [13]. La enzima extraída de repollo pudo ser purificada hasta homogeneidad. Muestra un peso molecular de 103 kDa y aparentemente está conformada por dos subunidades de masa molecular ~ 52 kDa cada una. El pH óptimo para su funcionamiento es de 9,5 y el agregado de Mn(II) aumenta notablemente su actividad, mientras que otros cationes divalentes, p. ej., Ni(II), Zn(II), Mg(II), Cu(II) inhiben la reacción [13].

4.1.2. Oxidasas

Este grupo contiene un número importante de enzimas de manganeso, con diferentes funciones catalíticas. La **amino oxidasa** (EC 1.4.3.6) oxida a monodi y poliaminas a aldehído y amoníaco [5]. El rol del manganeso en estas enzimas aún no está totalmente claro, ya que su remoción usualmente no afecta la actividad [5]. En las plantas, estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de la pared celular, en respuestas a daños de los tejidos y en la síntesis de ciertos factores de crecimiento y también podrían estar involucradas en una variedad de procesos fisiológicos como la regulación de la concentración de aminos biogénicas y el control del crecimiento celular y la diferenciación [14].

El estudio de la enzima aislada de semillas de guisantes reveló la presencia tanto de Cu(II), que es el centro activo de la enzima, como de Mn(II) que aparece como un segundo centro metálico, no sólo en esta sino en otras enzimas relacionadas [14]. El Mn está coordinado a los grupos carboxilato de tres residuos de ácido aspártico, y los oxígenos carbonílicos peptídicos de una fenil alanina y una isoleuceína, completando su coordinación con el átomo de O de una molécula de H_2O [14].

La **catalasa**, que cataliza la reacción $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$, está también presente en todas las plantas y, como se discutió en el capítulo anterior, es una enzima que contiene hierro unido a la protoporfirina IX.

Es interesante de mencionar que varias catalasas microbianas contienen como centro activo un sitio dinuclear de manganeso (EC 1.11.1.6) que cicla entre dos estados diamagnéticos, (Mn(II)/Mn(II) y Mn(III)/Mn(III) durante su ciclo catalítico [5,15,16], mientras que la llamada forma “superoxidada”, Mn(III)/Mn(IV), es catalíticamente inactiva [5]. El sitio activo resulta especialmente atractivo porque es un buen ejemplo de una especie sencilla de cúmulo metálico conteniendo los dos iones manganeso, como se muestra en la Fig. 1.

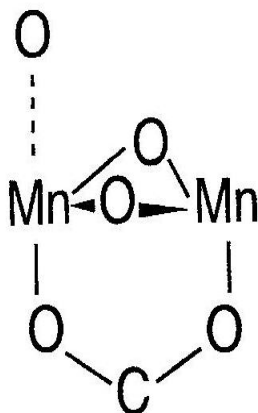


Fig. 1. Esquema del cúmulo dimetálico presente en la catalasa de manganeso (de refer. [16]).

Los oxígenos puente (que pueden ser oxo, hidroxilo o aqua, en los diferentes estados de oxidación de los centros metálicos), explican el acoplamiento electrónico entre los dos centros, los que además están puenteados por un ligando $\mu_{1,3}$ -carboxilato de un residuo de ácido glutámico. Además cada uno de los iones Mn está coordinado a un N de histidina y a un O carboxílico de un residuo de ácido glutámico y el Mn de la izquierda coordina además a una molécula de H₂O [16].

También la **peroxidasa** dependiente de manganeso (EC 1.11.1.13) resulta ser un sistema sumamente interesante y complejo y está involucrada en la degradación de la madera [5] y es secretada por hongos blancos y rojos de la familia basidomicetos. La enzima tiene un peso molecular de ~ 46 kD y sus detalles estructurales fueron revelados por un estudio cristalográfico del hongo *Phanerochaete cryosporium*, conocido por su gran capacidad para la degradación de la lignina [17,18].

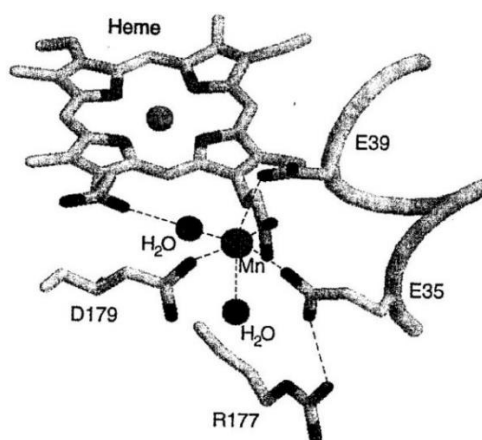


Fig. 2. Representación esquemática de la esfera de coordinación del Mn(II) y del sitio activo de la peroxidasa de Mn (de refer. [18]).

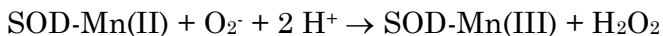
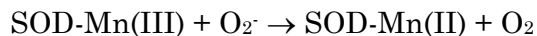
Como en todas las peroxidases el sistema básico de reacción es también aquí una protoporfirina IX, conteniendo un Fe(III) de alto espín, ligado en la quinta

posición de coordinación a un átomo de N de un residuo de histidina. También en este caso existe una histidina “distal” que acepta un protón del H₂O₂ facilitando su deprotonación e interacción con el sitio activo. Como se muestra en la Fig. 2, el Mn(II) está muy próximo a este sitio central de reacción [18] y está en coordinación aproximadamente octaédrica unido a oxígenos de dos residuos de ácido glutámico (E35 y E39), a uno de un residuo de ácido aspártico (D179) así como de un cuarto átomo de O de un carboxilato de uno de los grupos propionato unidos al anillo porfirínico, completando su esfera de coordinación con dos moléculas de H₂O [17,18].

El manganeso desempeña un papel clave en el funcionamiento de esta enzima, porque como Mn(III) es capaz de oxidar al sustrato orgánico y además participa, mediante la cupla redox Mn(II)/Mn(III), en dos etapas fundamentales de su mecanismo de reacción, por un lado en la reducción del llamado compuesto I (conteniendo oxoferril-Fe^{IV} y un radical porfirínico catiónico) y luego en la etapa final del proceso que lleva nuevamente a la enzima nativa original [18].

Otra enzima muy importante en las plantas es la **superóxido dismutasa, dependiente de Mn** (EC 1.15.1.1) la que, como ya se mencionara en el capítulo anterior, guarda estrechas relaciones con el sistema análogo de hierro [19]. También la estructura en torno al sitio activo (en este caso, Mn(III)) es similar a la encontrada en la Fe-SOD, esto es: una bipirámide triangular ligeramente deformada con dos átomos de N de sendos residuos de histidina y un átomo de O de un residuo de aspartato como ligandos ecuatoriales y un átomo de N de otro residuo de histidina y un átomo de O de una molécula de agua (o un grupo OH⁻) como ligandos axiales [19].

Desde el punto de vista mecanístico el comportamiento de esta SOD es mucho más complejo que el de las enzimas similares dependientes de otros metales, ya que depende fuertemente de la concentración de anión superóxido presente en el medio [19]. Por lo demás, en primera aproximación, y hasta una relación [O₂⁻]/[MnSOD] < 5 el mecanismo es similar al discutido en los dos capítulos anteriores para las SOD de Cu/Zn y Fe y, en este caso, basado en la utilización de la cupla redox Mn(III)/Mn(II):



Otro sistema enzimático muy importante para las plantas es la **oxalato oxidasa** (EC 1.2.3.4). Dado que el ácido oxálico es generado como producto final del metabolismo de una variedad de plantas, hongos y animales, no resulta sorprendente que los microorganismos que ataquen al oxalato (bacterias oxalotróficas [20,21]) estén ampliamente difundidos en la naturaleza [21]. Estos procesos de degradación del oxalato implican, además, la utilización de dos sistemas enzimáticos, ambos dependientes de manganeso, la ya mencionada oxalato oxidasa y la oxalato decarboxilasa, que será discutida en la Secc. 4.4. de este mismo capítulo. Ambas enzimas tienen varias características en común, entre ellas en pertenecer a la

superfamilia de proteínas conocidas como “cupinas”, ser dependientes de manganeso y poseer sitios activos muy similares.

La oxalato oxidasa (OxOx) está presente en casi todas las plantas superiores y cataliza la oxidación, dependiente de O₂, del oxalato a CO₂, en una reacción que está acoplada con la formación de agua oxigenada, según:



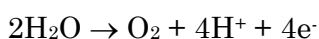
Se trata de una enzima ampliamente difundida en la naturaleza y ha sido descrita en una gran variedad de plantas [22-24], reconociéndose también que la oxalato oxidasa es idéntica a la germina, una importante proteína de semillas, aunque no todas las germinas muestran actividad de OxOx [22,23].

Por otra parte, es importante de enfatizar que el oxalato, al igual que el ascorbato, puede participar en la bioquímica oxidativa de la matriz extra-celular (ECM) de plantas superiores. De hecho, la disolución de oxalato de calcio acumulado en las plantas y la degradación del oxalato soluble por la OxOx puede liberar Ca²⁺ y H₂O₂, ambos conocidos por tener un papel central en la bioquímica de la ECM [22,23]. Asimismo, se presume que la generación enzimática de H₂O₂ puede ser utilizada como un mecanismo de defensa en respuesta a infecciones por patógenos [22-24].

La OxOx nativa es una glicoproteína y un primer estudio cristalográfico de la enzima extraída de cebada demostró que cristaliza como un hexámero (un trímero de dímeros) con una masa molecular monomérica de unos 26 kDa [22,23,25], demostrándose también la presencia de Mn(II) en cada subunidad [22,23]. Posteriormente, un estudio cristalográfico de mayor resolución (1,6 Å) reveló otros detalles más sutiles del plegamiento y ordenamiento proteico y mostrando claramente la localización y características del sitio activo [26]. Como puede verse en la Fig. 3, el catión Mn(II) presenta una coordinación octaédrica distorsionada y está unido a los átomos de N de tres residuos de histidina, al átomo de O de un residuo de glutamato y a dos moléculas de agua, que ocupan posiciones adyacentes [22,23,26].

Existe ya bastante información acerca del probable mecanismo de acción de esta enzima y de la relacionada (oxalato decarboxilasa) y la misma ha sido discutida en detalle en trabajos previos, pudiendo ser consultados en esas fuentes [22,23].

Un sistema particularmente atractivo dentro del campo de la Química Bioinorgánica del manganeso, es el **complejo de evolución de oxígeno presente en el llamado fotosistema II**, habitualmente denominado OEC (“oxygen evolving complex”) [5,27,28]. Este fotosistema, está localizado en la membrana tilcaloide de los cloroplastos de plantas y algas y contiene un cúmulo metálico, de composición Mn₄CaO₅, que cataliza la reacción de oxidación del agua:



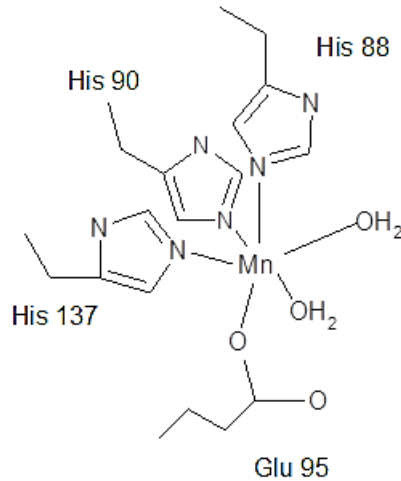


Fig.3. Esquema del sitio activo de la oxalato oxidasa (adaptado de refer. [26]).

Esta reacción de oxidación del agua probablemente apareció en la naturaleza hace unos 3 billones de años y el componente clave de este sistema es el cúmulo metálico que puede almacenar los equivalentes de oxidación capaces de facilitar la oxidación, por 4 electrones, de dos moléculas de agua a dióxígeno, como se muestra en la reacción de arriba y al mismo tiempo generar los electrones necesarios para la fijación reductiva de carbono, requerida para el mantenimiento de la vida [29]. Es decir, los protones y electrones producidos en la reacción de oxidación del H₂O son finalmente utilizados para almacenar energía en la forma de ATP y reducir CO₂ a hidratos de carbono a través del ciclo de Calvin-Benson, y son los precursores de la síntesis de las moléculas biológicas necesarias a los organismos. La Naturaleza ha generado esta elegante vía para almacenar la luz solar en la forma de energía química, y es esta forma de energía creada por la fotosíntesis de la que depende toda la vida [29].

Desde el punto de vista estructural el fotosistema-II es uno de los sistemas biológicos más complejos e intrincados hasta ahora conocidos [5,29], habiéndose logrado avances importantes para su mejor conocimiento recién a partir de 2011 en que se pudo resolver su estructura cristalina por difracción de rayos X a una resolución de 1,9 Å [29,30]. La unidad cristalográfica asimétrica contiene un dímero (700 kDa), y los dos monómeros se relacionan por un eje binario no cristalográfico perpendicular al plano de la membrana. Cada monómero contiene 35 clorofilas *a*, 11-12 moléculas de β-caroteno 1 cúmulo OEC, un grupo hemo *b*, un grupo hemo *c*, 2 o 3 plastoquinonas, 2 feofitinas, un Fe-no hemo y unos 20-25 lípidos [29,30].

En la Fig. 4 se muestra la estructura del cúmulo Mn₃CaO₅ que constituye el sitio activo de reacción del sistema (OEC):

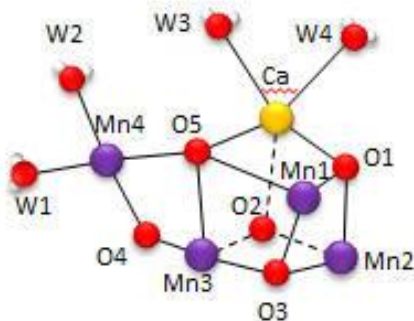


Fig.4. Esquema del cúmulo OEC, sitio de reacción del fotosistema-II.

Como puede verse se trata de cúmulo con estructura de cubano, donde tres de los vértices del cubo están ocupados por átomos de Mn y el restante por un átomo de Ca y existe un cuarto átomo de Mn fuera del cubo. El sistema muestra además 4 moléculas de agua, dos ligadas al Ca y las otras dos al Mn4. Además todos los átomos metálicos presentes en el sistema tienen coordinaciones adicionales con átomos de oxígeno de carboxilatos de diversos residuos de amino ácidos, predominantemente glutámico y aspártico. Con estas interacciones cada manganeso queda en coordinación 6 y el calcio en coordinación 7. Asimismo, existe todo un complejo ordenamiento de amino ácidos en torno al cúmulo, que sin duda juegan también un papel importante durante la reacción. Por otra parte, existen en las cercanías del cubano dos iones Cl⁻, uno de ellos interactuando directamente con dos de los aminoácidos ligados a Mn2 y Mn3, esos dos aniones haluro seguramente desempeñan también una función relevante en el proceso de óxido-reducción [30].

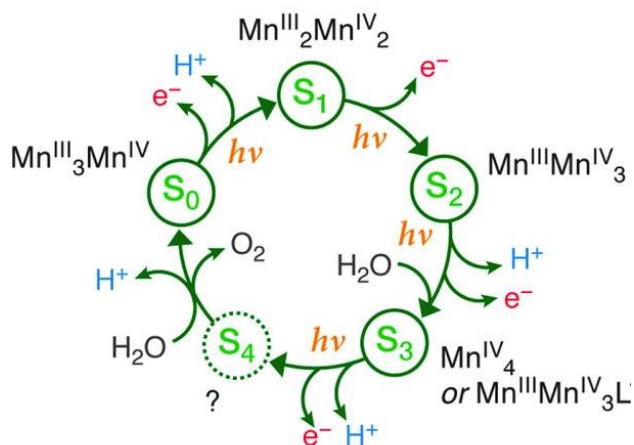


Fig. 5. El ciclo de Kok mostrando las diferentes etapas de evolución de O₂ en el OEC del fotosistema-II, con detalles de los estados S_i, las etapas de oxidación inducidas por luz y el desprendimiento de e⁻ y H⁺, junto a la captación de las dos moléculas de H₂O.

El proceso de oxidación del agua requiere cuatro eventos oxidativos secuenciales, que son catalizados por el cúmulo Mn₄CaO₅ el que cicla a través de

diferentes estados de oxidación, conocidos como estados S_i ($i = 0 - 4$). En base a un modelo inicialmente desarrollado por Kok *et al.*, a través de interesantes experiencias fotoquímicas [31], se pueden comprender y explicar razonablemente todas esas etapas, como se muestra en la Fig. 5.

El proceso inducido por luz sobre el fotosistema-II es extremadamente eficiente, con un rendimiento cuántico superior al 90%, con un tiempo de reciclado del OEC del sólo 2 ms y de unos 10 ms para todo el fotosistema-II [28].

Si bien se ha podido avanzar notablemente en el conocimiento del fotosistema-II sobre todo, utilizando en forma combinada, resultados provistos por métodos difractométricos y EXAFS y las espectroscopías EPR y de IR, todavía hay diversos aspectos que no están definitivamente clarificados. Por ejemplo, se sabe que el Ca(II) del cúmulo puede ser desplazado por otros metales y el sistema pierde totalmente o disminuye fuertemente su actividad, lo mismo ocurre si de alguna forma se afecta al ion cloruro próximo al cúmulo. O sea, es evidente que tanto el calcio como el cloruro juegan un papel central en todo este proceso, aunque todavía no entendemos claramente cuál es el mismo. De igual manera, todavía no está claro de qué manera y exactamente en qué momento del proceso se genera la formación del enlace O-O. Por otra parte, el proceso $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ todavía no está comprendido en detalle, incluso no está aún bien clarificada la estructura electrónica del cúmulo en el estado S_4 [29].

4.2. Transferasas

Existe un importante número de transferasas que involucran al Mn(II) como cofactor metálico. Un grupo importante está constituido por las **kinasas**. Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos fosfato desde fosfatos de alta energía (ATP o GTP) a sustratos específicos, p. ej. a residuos de tirosina, histidina, serina o treonina, presentes en proteínas o al grupo OH de un azúcar [5]. Este proceso se conoce como fosforilación, en el cual el sustrato gana un grupo fosfato y la molécula de alta energía lo dona (es decir si la molécula donora es ATP, se genera ADP). Estas enzimas son extraordinariamente importantes y abundantes en plantas, conociéndose varios miles de ejemplos [32]. La mayoría de ellas parecen depender de Mg(II) como cofactor metálico y si bien en algunos casos, el reemplazo de Mg(II) por Mn(II) ha mostrado el mantenimiento de una cierta, pero muy baja actividad [33], el involucramiento de manganeso en estas enzimas de plantas no ha quedado hasta ahora establecido [5]. Algo similar ocurre con otros grupos de transferasas conocidas, presentes p.ej. en diverso tipo de microorganismos, las que dependen claramente de Mn(II), pero nunca han sido reportadas en plantas [4,5].

4.3. Hidrolasas

También en este grupo de enzimas, del que se conocen numerosos ejemplos, existe todavía muy poca información sobre sistemas dependientes de manganeso que aparezcan en plantas e involucrados en funciones de este tipo [4,5].

Sin embargo, en este grupo se ubican las **fosfatasas ácidas purpuras**, discutidas en el capítulo anterior. Y como hemos visto en la Secc. 3.3.4. de ese capítulo, hay varios ejemplos de enzimas de este tipo que tienen en su sitio di-metálico activo el par Fe(III)/Mn(II).

Por su parte, la **fructosa-1,6-bisfosfatasa** (EC 3.1.3.11) convierte a la forma α de la D-fructosa-1,6-bisfosfato en D-fructosa-6-fosfato y PO_4^{3-} [5,34]. La estructura de esta enzima, aislada de cloroplastos de hojas de espinaca fue resuelta cristalográficamente a una resolución de 2,8 Å, mostrando que se trata de un tetrámero conformado por 358 amino ácidos en cada subunidad (masa molar ~ 39 kDa) [34] y el sitio activo di-metálico, conformado por dos iones Mn(II), es similar al determinado durante su reacción con sustrato extraído de hígado de cerdo y con algunos análogos del sustrato [35]. Los dos iones Mn(II) están separados unos 3,7 Å y están puenteados por dos grupos carboxilato (uno de ácido aspártico y otro de ácido glutámico), la geometría de coordinación de cada uno de los centros metálicos parece ser un tetraedro distorsionado [35].

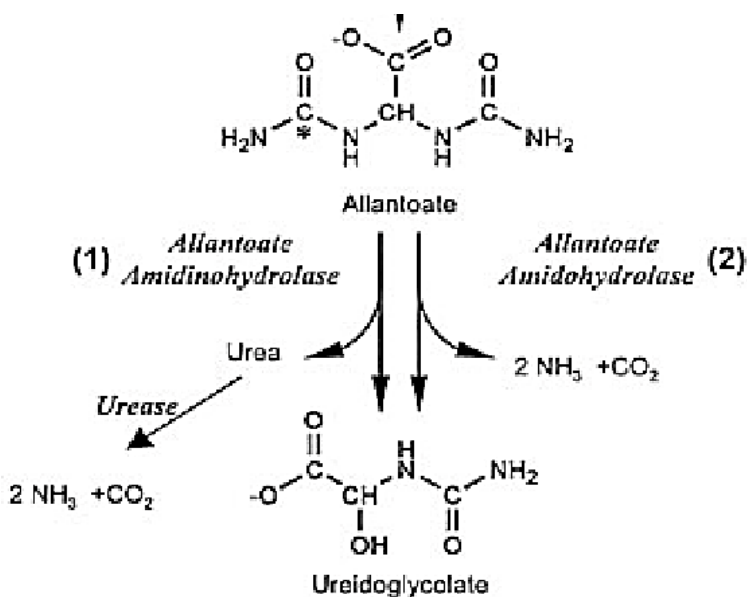


Fig. 6. Reacción catalizada por la allantoato amidohidrolasa (2).

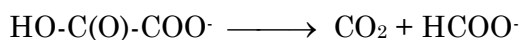
Otra hidrolasa de plantas que parece ser dependiente de Mn es la **allantoato amidohidrolasa** (EC 3.5.1.5.) que hidroliza al ureido allantoato a ureidoglicolato, CO_2 y dos moléculas de NH_3 , como se muestra en la Fig. 6. Este es un proceso degradativo que aparece como necesario para reciclar el nitrógeno purínico en las plantas. El catabolismo de las purinas puede ser dividido en tres fases. Primero, se genera xantina a partir de nucleótidos de purinas, luego la xantina se convierte en allantoato, a través de cinco pasos enzimáticos. Finalmente, cuatro moléculas de NH_3 se desprenden del allantoato y sus productos de degradación, haciendo al nitrógeno de las bases purínicas accesible para reacciones anabólicas. En

esta última fase el allantoato se hidroliza primero a ureidoglicolato. Si la reacción es catalizada por la allantoato amidinohidrolasa (EC 3.5.3.4) se genera una molécula de urea por allantoato (Fig. 6 (1)), la que luego es hidrolizada por la ureasa produciendo dos moléculas de NH_3 y CO_2 . Alternativamente, si el catalizador es la allantoato amidohidrolasa, se desprenden directamente dos moléculas de NH_3 y CO_2 sin formación intermediaria de urea [36].

Si bien todavía existe poca información al respecto, parecería ser que también la **allantoato amidinohidrolasa** sería una enzima dependiente de Mn [37].

4.4. Liasas

La primera enzima para mencionar en esta Sección es la **oxalato decarboxilasa** (EC 4.1.1.2), generalmente presente en hongos y bacterias, y que cataliza la remarcable reacción en la que el oxalato es degradado a formiato y dióxido de carbono:

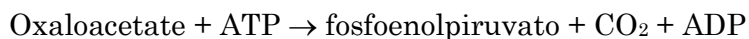


El estudio cristalográfico de esta enzima mostró que posee de una estructura homohexamérica de 264 kDa, constituida por dos capas triméricas [22] y que cada una de las subunidades tiene dos sitios de Mn(II). Un estudio detallado de los mismos demostró que esos dos centros metálicos son idénticos y tienen la misma configuración y coordinación que la encontrada en la oxalato oxidasa (ver Fig. 3) y ambos sitios están separados unos 26 Å. Asimismo, se ha demostrado que uno de ellos es realmente el sitio activo de la reacción, mientras que el otro sólo cumple un rol estructural [22,38].

El mecanismo de reacción de la oxalato decarboxilasa está fuertemente relacionado al de la oxalato oxidasa. Como ambas enzimas presentan sitios activos totalmente similares y usan el mismo sustrato (oxalato), es evidente que las diferencias en los caminos de reacción y los productos finales de reacción deben estar relacionados sólo a pequeñas y muy sutiles diferencias en las conformaciones proteicas en torno a esos centros activos, un hecho bien conocido para muchos otros sistemas bioinorgánicos [22].

Otra liasa muy interesante es la **enolasa** (2-fosfo-glicerato hidrolasa, EC 4.2.1.11) una enzima que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, que constituye la única etapa de deshidratación en la ruta glicolítica [5]. Esta enzima, aislada de diversos organismos parece ser dependiente de Mn(II) y Mg(II) [5]. En el caso de plantas todavía hay muy poca información disponible sobre la misma y la eventual participación de Mn(II) en su actividad, si bien se la ha aislado de papa, lechuga, tomate y *Arabidopsis thaliana* [39,40].

Por su parte, la **fosfoenolpiruvato carboxikinasa** (EC 4.1.1.32) cataliza la reacción siguiente:



En esta reacción, además del ATP, también el GTP puede actuar como donador de fosforilo, generándose en este caso GDP [5], como puede verse en la Fig. 7. Hace ya bastante tiempo atrás, se encontró una importante actividad de esta enzima en el proceso fotosintético de las llamadas plantas C4 [41] así como en las plantas que muestran metabolismo de ácido crasuláceo (plantas CAM: crassulacean acid metabolism) [42], demostrándose también que la enzima requiere la presencia de Mg(II) y Mn(II) para alcanzar su máxima actividad [41,42].

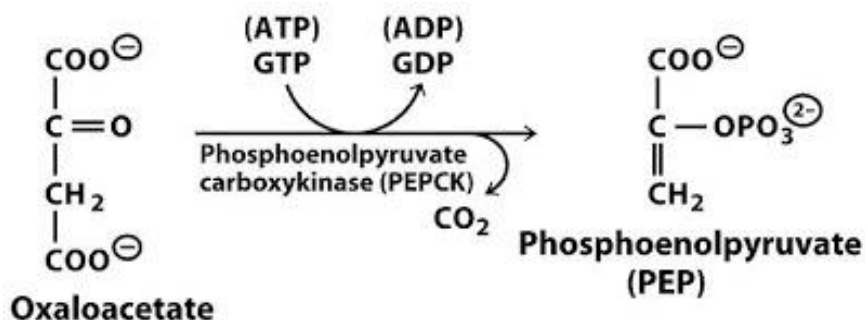


Fig. 7. Reacción catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

En plantas y algas parece predominar la enzima dependiente de ATP, mientras que la dependiente de GTP es más común en mamíferos, peces, pájaros, insectos y bacterias [43]. La enzima está presente en varios tejidos de plantas, localizándose exclusivamente en el citosol [43].

4.5. Isomerasas

Aunque es conocido el hecho de que existen diferentes isomerasas en plantas, hasta ahora no está todavía claro si alguna de ellas es dependiente de manganeso. Un caso muy probable es el de la *fosfoglicerato mutasa* (EC 5.4.2.1) que cataliza la interconversión de 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicerato (Fig. 8). Se conocen dos tipos de enzimas de este tipo, las que dependen y las que no dependen de 2,3-difosfoglicerato (DPG) como cofactor [5].

La enzima de plantas y la de las especies *Bacillus* son independientes de DPG y estas últimas mostraron un requerimiento específico de Mn(II) [5], por lo que resulta probable suponer que también la enzima de plantas sea dependiente de manganeso.

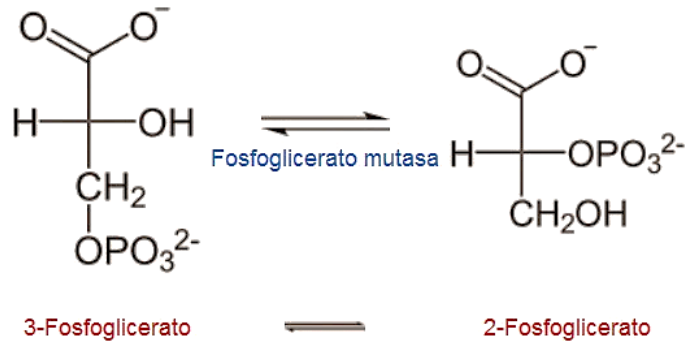


Fig.8. Reacción de interconversión catalizada por la fosfoglicerato mutasa.

4.6. Ligasas

En plantas superiores varias etapas del metabolismo del nitrógeno ocurren en múltiples compartimentos subcelulares y muchas veces ha resultado difícil establecer adecuadamente las funciones de las enzimas involucradas, o saber si cumplen funciones redundantes o diferentes en estos procesos [44]. Uno de los ejemplos mejor estudiados de una enzima biosintética de amino ácidos en plantas, es la **glutamino sintetasa** (EC 6.3.1.2.). Esta enzima cataliza la conversión de L-glutamato, ATP y amoníaco en L-glutamina, ADP y PO_4^{3-} [5].

Todas las glutamino sintetetas hasta ahora estudiadas estructuralmente, tanto de origen bacteriano, como de mamíferos muestran que el centro metálico activo es el Mn(II) o, eventualmente una combinación de Mn(II) y Mg(II) [5,45]. Todavía no existen datos estructurales de una enzima de origen vegetal, pero es de presuponer que también estas dependen del mismo metal o par metálico.

La **carbamoil fosfato sintetasa** (EC 6.3.4.16), desempeña una función crítica en la biosíntesis de arginina y pirimidina [5,46], proveyendo el precursor esencial, esto es el carbamoil fosfato, a partir de un anión bicarbonato, dos moléculas de ATP/Mg(II) y una molécula de glutamina [46], como puede verse en la Fig. 9.

En las enzimas estudiadas estructuralmente hasta el presente, generalmente de origen bacteriano, el centro activo es siempre Mn(II), y el K(I) parece ser un activador enzimático esencial [5,46] y en muchas plantas se ha detectado la presencia de esta enzima en los cloroplastos [47].

Metaloenzimas de Plantas

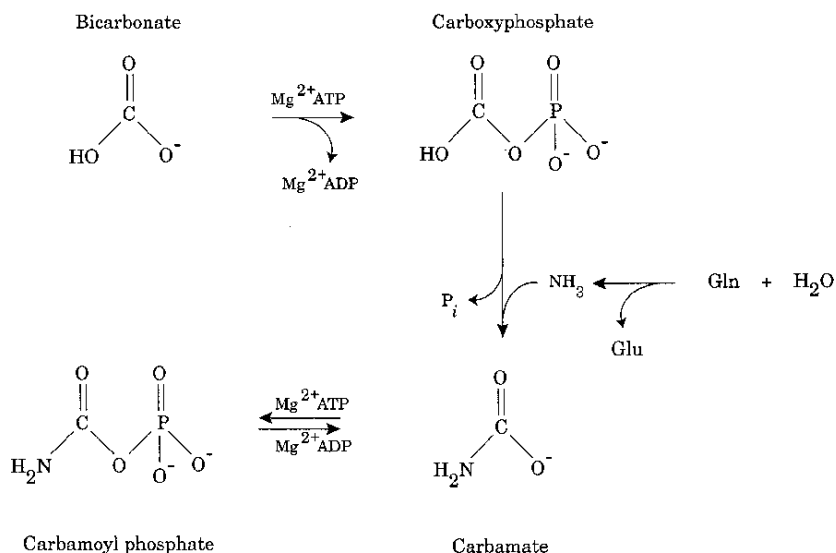


Fig. 9. Esquema de la síntesis del carbamoil fosfato.

5. PROTEÍNAS CONTENIENDO MANGANESO LIGADO

Los virus, las plantas y los animales contienen habitualmente proteínas capaces de ligar carbohidratos, llamadas **lectinas** o aglutinas. Las lectinas animales contienen Ca(II) como cofactor metálico, pero las lectinas de plantas poseen un sitio dinuclear conteniendo Ca(II) y Mn(II) [5]. La primera lectina caracterizada cristalográficamente fue la **concanavalina A** aislada de un tipo de frijol (*Canavalia ensiformis*) y la misma ha sido objeto de diversos estudios espectroscópicos y cristalográficos [5,48]. El sitio de unión para los carbohidratos es el calcio, el que es estabilizado por la presencia del Mn(II). En ausencia de Ca(II) ambos sitios metálicos pueden ser ocupados por Mn(II) [5].

Un estudio cristalográfico de alta resolución [49] mostró que la concanavalina A es un tetrámero (un dímero de dímeros) con un peso molecular total de unos 100 kDa. Cada monómero, de 25 kDa contiene 237 amino ácidos, constituyendo la celda unitaria asimétrica. Cada subunidad contiene también dos centros metálicos, Ca(II) y Mn(II) coordinados en la forma que se muestra en la Fig. 10, puenteados por dos residuos de ácido aspártico (Asp-10 y Asp-19 (no numerado explícitamente en la figura)) y, como se ve, el Mn(II) está en un entorno octaédrico distorsionado.

La proteína puede ser totalmente desmetalizada y la posición de los sitios metálicos puede ocuparse por Ni, Co, Zn, Mn o Cd, generándose especies que contienen el mismo metal en los dos sitios metálicos. Asimismo, también pueden prepararse concanavalinas que contienen calcio y Mn o cualquiera de los otros cuatro metales mencionados en el sitio del Mn [48]. De varios de estos sistemas ya se determinaron también las estructuras cristalinas [48]. El manganeso o cualquiera de los otros metales que pueden ocupar el sitio del metal de transición desempeñan

un papel indirecto pero clave en la generación del sitio activo de interacción concanavalina/sacárido. Aunque el Mn(II) está localizado aproximadamente a 13 Å del sitio de interacción, su presencia es absolutamente necesaria para que la interacción tenga lugar. Si bien el sitio de interacción está próximo al Ca(II) parece no haber coordinación directa entre el metal y el azúcar [5].

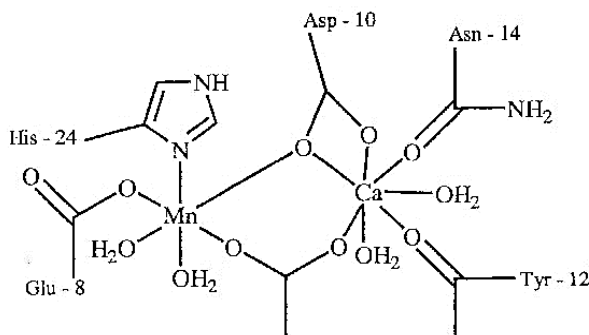


Fig. 10. Vista esquemática del sitio di-metálico de la concanavalina A.

Después del aislamiento de la concanavalina A, ha sido posible aislar y caracterizar muchas otras lectinas de legumbres, conociéndose más de 70 estructuras cristalinas de estos sistemas. Los miembros de estas familias muestran similitudes en sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, sin embargo contienen sitios activos que si bien parecen ser fuertemente conservados y similares a los de la concanavalina A, muestran una gran diversidad de especificidad respecto a los azúcares [48].

Las **integrinas** son proteínas receptoras de la superficie celular que median la adherencia a los receptores superficiales de otras células o a componentes de la matriz extracelular. Consisten en dos subunidades α de 120-180 kDa y una subunidad β de 90-110 kDa [5]. Las primeras integrinas en células animales fueron descubiertas hace más de 30 años y poco tiempo después fueron identificadas también en plantas. Asimismo, se sabe que su interacción con otros ligandos depende de la presencia de un catión metálico divalente [5,50]. Tanto el Mn(II) como el Mg(II) parecerían cumplir satisfactoriamente con esa función y estos cationes podrían o bien ayudar a generar una interacción directa con el ligando o simplemente promover un ordenamiento cuaternario favorable en la integrina [50].

REFERENCIAS

- [1] K. Wieghardt, *Angew. Chem. Internat. Edit.* **28**, 1153 (1989).
- [2] J.J.R. Fraústo da Silva & R.J.P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
- [3] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [4] D.C. Weatherburn, *Structure and Functions of Manganese-Containing*

- Biomolecules. En: *Perspectives in Bioinorganic Chemistry*, R.W. Hay, J.R. Dilworth & K.B. Nolan (Eds.), Vol. 3, JAI Press, London, 1996, pp. 1-113.
- [5] D.C. Weatherburn, Manganese-Containing Enzymes and Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins I*. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 193-268.
- [6] W.W. Porterfield, *Inorganic Chemistry. A Unified Approach*, 2nd Edit., Academic Press, San Diego, 1993.
- [7] F.A. Cotton, G. Wilkinson, C.A. Murillo & M. Bochman. 1999. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th Edit., J. Wiley, New York, 1999.
- [8] Z. Rengel, Manganese Uptake and Transport in Plants. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 37, Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 57-87.
- [9] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soil and Plants*, 4th Edit., CRC-Boca Raton, 2011.
- [10] J.K. Pittman, *New Phytol.* **167**, 733 (2005).
- [11] G. Wallon, K. Yamamoto, H. Kirino, A. Yamagishi, S.T. Lovett, G.A. Petsko & T. Oshima, *Biochim. Biophys. Acta* **1337**, 105 (1997).
- [12] S.G. Lee, R. Mwumeh & J.M. Jez, *J. Biol. Chem.* **291**, 13421 (2016).
- [13] A. Nagai & A. Scheidegger, *Arch. Biochem. Biophys.* **284**, 127 (1991).
- [14] V. Kumar, D.M. Dooley, H.C. Freeman, J.M. Guss, I. Harvey, M.A. McGuirl, M.C.J. Wilce & V.M. Zubak, *Structure* **4**, 943 (1996).
- [15] G.S. Waldo, S. Yu & J.E. Penner-Hahn, *Biochemistry* **34**, 1507 (1995).
- [16] M.M. Whittaker, V.V. Barynin, S.V. Antonyuk & J. Whittaker, *Biochemistry* **38**, 9126 (1999).
- [17] P. Turano & Y. Lu, Iron in Heme and Related Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 269-356.
- [18] M.H. Gold, H.L. Youngs & M.D. Sollewijn Gelpke, Manganese Peroxidase. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol.37, Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 559-586.
- [19] Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, M.J. Maroney, A.F. Miller, M. Teixeira & J. Selverstone Valentine, *Chem. Rev.* **114**, 3854 (2014).
- [20] N. Sahin, *Res. Microbiol.* **154**, 399 (2003).
- [21] E.J. Baran & P.V. Monje: Oxalate Biominerals. En: *Metal Ions in Life Science*, A.Sigel, H.Sigel & R.K.O.Sigel (Eds.), Vol. 4, J.Wiley & Sons, Chichester, 2008, pp. 219-254.
- [22] E.J. Baran, Oxalate Degradation in Plant and Fungi: The Role of Manganese Enzymes. En: *Advances in Plant Physiology*, H.Hemantaranjan (Ed.), Vol. 12, Scientific Publishers, Jodhpur, 2011, pp. 369-389.
- [23] E.J. Baran, Oxalate Biosynthesis and Degradation in Plants and Fungi. En: *Oxalate; Structure, Functions and Occurrence*, E. Kytönen (Ed.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, 2020, pp. 95-131.
- [24] D. Svedružić, S. Jónsson, C.G. Toyota, L.A. Reinhardt, S. Ricagno, Y. Lindquist & N.G.J. Richards, *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 176 (2005).
- [25] E.J. Woo, J.M. Dunwell, P.W. Goodenough & R.W. Pickersgill, *FEBS Lett.* **437**, 87 (1998).

- [26] E.J. Woo, J.M. Dunwell, P.W. Goodenough, A.C. Marvier & R.W. Pickersgill, *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1036 (2000).
- [27] N. Cox, D.A. Pantazis, F. Neese & W. Lubitz, *Acc. Chem. Res.* **46**, 1588 (2013).
- [28] S. Birkelund Schmidt & S. Husted, *Plants* **8**, 381 (2019).
- [29] J. Yano & V. Yachandra, *Chem. Rev.* **114**, 4175 (2014).
- [30] Y. Umena, K. Kawakami, J.R. Shen & N. Kamiya, *Nature* **473**, 55 (2011).
- [31] B. Kok, B. Forbush & M. McGloin, *Photochem. Photobiol.* **11**, 457 (1970).
- [32] M.D. Lehti-Shiu & S.H. Shiu, *Phil. Transact. Royal Soc. B* **367**, 2619 (2012).
- [33] M.J. Knape, M. Ballez, N.C. Burghardt, B. Zimmermann, D. Bertinetti, A.P. Kornev & F.W. Herberg, *Metallomics* **9**, 1576 (2017).
- [34] V. Villeret, S. Huang, Y. Zhang, Y. Xu & W.N. Lipscomb, *Biochemistry* **34**, 4299 (1995).
- [35] Y. Zhang, J.Y. Liang, S. Huang, H. Ke & W.N. Lipscomb, *Biochemistry* **32**, 1844 (1993).
- [36] A.K. Werner, I.A. Sparkes, T. Romeis & C.P. Witte, *Plant Physiol.* **146**, 418 (2008).
- [37] P. Piedras, A. Muñoz, M. Aguilar & M. Pineda, *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 340 (2000).
- [38] V.J. Just, C.E.M. Stevenson, L. Bowater, A. Tanner, D.M. Lawson & S. Bornemann, *J. Biol. Chem.* **279**, 19867 (2004).
- [39] D. van der Straeten, R.A. Rodríguez-Pousada, H.M. Goodman & M. van Montagua, *Plant Cell* **3**, 719 (1991).
- [40] M. Eremina, W. Rozhan, S. Yang & B. Poppenberger, *Plant J.* **81**, 895 (2015).
- [41] G.E. Edwards, R. Kanai & C.C. Black, *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **45**, 278 (1971).
- [42] P. Dittrich, W.H. Campbell & C.C. Black, jr., *Plant Physiol.* **52**, 357 (1973).
- [43] R.C. Leegood & R.P. Walker, *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 204 (2003).
- [44] J.W. Edwards, E.L. Walker & G.M. Coruzzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3459 (1990).
- [45] D. Eisenberg, H.S. Gill, G.M.U. Pfluegl & S.H. Rotstein, *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 122 (2000).
- [46] H.M. Holden, J.B. Thodent & F.M. Raushel, *Curr. Op. Struct. Biol.* **8**, 679 (1998).
- [47] H. Shibata, H. Ochiai. Y. Sawa & S. Miyoshi, *Plant Physiol.* **80**, 126 (1986).
- [48] A.J. Kalb (Gilboa), J. Habash, N.S. Hunter. H.J. Price, J. Raftery & J.R. Helliwell, Manganese(II) in Concanavalin A and Other Lectin Proteins. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 37, Marcel Dekker, New York, 2000, pp. 279-304.
- [49] A. Deacon. T. Gleichmann, A.J. Kalb (Gilboa), H. Price, J. Raftery, G. Bradbrook, J. Yariv & J.R. Helliwell, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **93**, 4305 (1997).
- [50] A. Qu & D.J. Leahy, *Structure* **4**, 931 (1996).

CAPITULO 4

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE ZINC

INTRODUCCIÓN

El zinc es luego del hierro el segundo metal de transición más abundante en todos los organismos y juega un papel esencial en todos ellos. Además, se ha convertido en el metal del cual se conocen más metaloenzimas, con más de 300 sistemas hasta ahora identificados. Estos incluyen enzimas fundamentales que participan en la constitución (polimerasas, ligasas, transferasas) o degradación (hidrolasas) de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, precursores de porfirinas y otras biomoléculas importantes, en la estabilización de estructuras protéicas, en procesos de regulación y control y, aún, en la transferencia de información genética [1-3].

También en las plantas el zinc participa de un importante número de procesos y reacciones, las más importantes de las cuales serán analizadas a lo largo de este capítulo, luego de una breve introducción sobre los aspectos generales de la química del elemento y su comportamiento general en sistemas biológicos y en los suelos, así como a diversos aspectos vinculados a su captación y transporte por parte de las plantas.

1. ZINC EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

1.1. Aspectos generales

La amplia difusión y utilización del zinc por parte de los seres vivientes, hace pensar que este elemento debe reunir una serie de características únicas y bastante especiales que lo hacen adecuado para cumplir eficientemente con todas las funciones de las que participa. Entre estas características se destacan especialmente las siguientes [1]:

- a) Su fuerza ácida se ve exaltada cuando está ubicado en sitios con bajo índice de coordinación (por ejemplo, unido a tres ligandos y a una molécula de H_2O lábil, en un entorno tetraédrico distorsionado).
- b) Presenta un único estado de oxidación estable, como $Zn(II)$ (configuración electrónica $3d^{10}$), de manera que no puede participar en reacciones o procesos de óxido-reducción.
- c) Su configuración electrónica hace que su efecto polarizante sea isotrópico, generando una gran flexibilidad de coordinación, pudiendo adoptar números de coordinación seis, cinco y cuatro y esta peculiaridad facilita mucho su reactividad e influye positivamente sobre la cinética de los procesos que cataliza.
- d) Tanto el H_2O como el OH^- pueden entrar y salir muy rápidamente de su esfera de coordinación, situación que también tiene un efecto positivo sobre las velocidades de reacción.

Uno de los problemas fundamentales en los estudios iniciales de metaloproteínas conteniendo Zn(II), es que debido a su configuración electrónica ($3d^{10}$), el catión permanece “silencioso” frente a la mayoría de las técnicas espectroscópicas habitualmente empleadas en el estudio de biomoléculas. Esta situación no sólo dificultó su descubrimiento sino también los primeros intentos de caracterización físico-química. En este sentido, se demostró que los sistemas conteniendo Zn(II) pueden ser convenientemente investigados mediante la llamada “técnica de las pruebas metálicas” [1]. Es decir, se reemplaza el metal nativo de la proteína por otro con el cual se pueden realizar estudios espectroscópicos y magnéticos. En el caso del zinc una de las “pruebas” más utilizadas ha sido la sustitución de Zn(II) por Co(II), a partir de la cual se ha podido reunir una enorme cantidad de información espectroscópica y estructural en torno a las metaloproteínas de zinc [1,4]. Por otra parte, muchas proteínas de Zn(II) sustituidas por Co(II) muestran una actividad enzimática marcadamente mayor que la enzima nativa conteniendo zinc [1,4].

1.2. Características de los sitios de zinc presentes en proteínas

Hasta el presente, se han determinado ya un importante número de estructuras cristalinas de sistemas enzimáticos conteniendo Zn(II) y en base a esta información se ha podido establecer que al menos existen tres tipos primarios de sitios de coordinación de zinc, esto es: catalíticos, estructurales y co-catalíticos [3,5,6], los que se esquematizan en la Fig. 1.

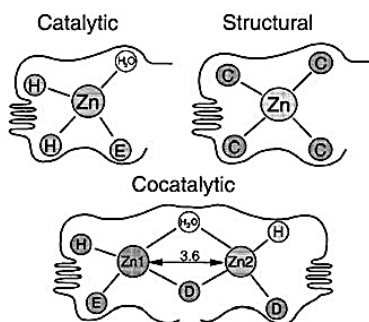


Fig.1. Sitios de coordinación de Zn(II) en enzimas (Las letras **D**, **E**, **H** y **C** se refieren a los ácidos aspártico y glutámico y a la histidina y cisteína, respectivamente).

Los aminoácidos que más comúnmente aportan ligandos a estos sitios son la histidina, los ácidos aspártico y glutámico y la cisteína. En los sitios catalíticos el Zn(II) generalmente forma complejos con agua y donores de O, N o S, con la histidina como ligando generalmente predominante. El agua está siempre presente en esos sitios. Los sitios de zinc estructural tienen cuatro ligandos de proteínas y nunca presentan una molécula de agua ligada. La cisteína es el ligando preferencial de esos sitios. Los sitios co-catalíticos contienen dos o tres centros metálicos (uno o más iones Zn(II)) muy próximos con dos de los centros puenteados por un grupo lateral de un residuo de aminoácido, tales como aspártico, glutámico o histidina y, a veces una molécula de H_2O . El ácido aspártico y la histidina son los ligandos preferidos para

estos sitios y nunca se encuentra cisteína en los mismos. Es evidente que el ordenamiento de ligandos en torno al Zn(II) es de importancia central para el funcionamiento y la reactividad del metal [3,5,6].

La coordinación del Zn(II) en los sitios catalíticos es usualmente 4 o 5 y la geometría en torno al metal es un tetraedro distorsionado o una bipirámide trigonal, respectivamente. El H₂O ligado al metal resulta activado por ionización, polarización o desplazamiento y estos procesos muchas veces conducen a la generación de grupos OH⁻ a pH neutro. En los sitios estructurales predomina, como se dijo la cisteína como ligando coordinante, y a veces aparecen involucradas una o dos histidinas, en reemplazo de las cisteínas. Por su parte, los sitios co-catalíticos aparecen en enzimas de zinc multi-metálicas y los ligandos predominantes son el ácido aspártico y la histidina y en muchos casos aparecen sitios puenteados heterometálicos, por ejemplo Zn(II)/Mg(II), Zn(II)/Cu(II) o Zn(II)/Fe(III) [6].

2. CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE ZINC EN LAS PLANTAS

El zinc en suelos ocurre en tres formas primarias: i) formas solubles en agua (como [Zn(H₂O)₆]²⁺) y compuestos orgánicos solubles); ii) Zn(II) adsorbido e intercambiable en fracciones coloidales, asociado a partículas de arcilla, compuestos húmicos y también hidróxidos de hierro y aluminio; iii) compuestos insolubles y minerales diversos [5,7,8]. Su distribución está fuertemente dominada por el valor del pH del suelo. De todas maneras, más del 90% del zinc en suelos está en forma insoluble y, por lo tanto, indisponible para las plantas [5,8] y el 50% de toda la fase soluble parece ser [Zn(H₂O)₆]²⁺, sin embargo en suelos calcáreos la concentración de esta especie también puede hacerse muy baja (del orden de 10⁻¹¹ – 10⁻⁹ M) [5].

El zinc es captado desde el suelo básicamente como [Zn(H₂O)₆]²⁺ y luego transportado desde las raíces hacia las partes superiores de la planta. En los mecanismos de captación también pueden participar ácidos orgánicos (p.ej. ácidos cítrico, málico, oxálico) secretados a nivel de las raíces que ayudan a la solubilización del Zn(II) y aún, en el caso de los cereales, podría involucrarse algún tipo de fitosideroforo [8].

Hay diversas evidencias que apuntan al hecho de que en la planta parte del Zn(II) puede estar ligado a proteínas solubles de bajo peso molecular y más de la mitad del Zn(II) estaría en forma de algún tipo de complejo aniónico [7]. Incluso, podría estar involucrado directamente algún amino ácido como por ejemplo la histidina y, eventualmente, también la nicotianamina [8]. Finalmente, se lo encuentra acumulado en una gran variedad de tejidos vegetales lo que sugiere que posee una elevada movilidad [7].

En general, la acumulación de zinc es mayor en las raíces que en la parte aérea de la planta. En las hojas, muchas veces la concentración de zinc depende de su posición en la planta y las hojas más jóvenes acumulan más zinc que las más viejas. A lo largo del tallo los niveles suelen ser bastante variables, entre la parte

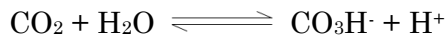
más alta y la más baja de la planta. Asimismo, se han detectado variaciones estacionales interesantes en la concentración del elemento [8].

El zinc queda acumulado en las plantas en forma de complejo de coordinación con ácidos orgánicos quelantes tales como los ácidos cítrico, málico, fumárico, tartárico y siquímico y, eventualmente, la nicotianamina, fitoquelatinas o metalotioneínas. Varios de los ácidos citados son producidos por el ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que significaría que su producción durante la acumulación metálica, podría interrelacionarse con el metabolismo respiratorio de las plantas [8]. Los complejos de zinc así formados quedan retenidos en las membranas celulares o son luego transportados a vacuolas para su acumulación. Esta secuestro vacuolar también sería importante para proteger el metabolismo celular de los efectos tóxicos del zinc [8,9].

3. ENZIMAS DE ZINC EN PLANTAS

3.1. Anhidrasa carbónica

La anhidrasa carbónica (AC, EC 4.2.1.1) fue la primera enzima dependiente de zinc en ser descubierta (1940) y cataliza la hidratación reversible del CO₂:



La reacción no catalizada es relativamente lenta a pH fisiológico ($k \sim 10^{-1} \text{ seg}^{-1}$) mientras que en presencia de la forma más eficiente de isoenzima la velocidad aumenta dramáticamente ($k \sim 10^6 \text{ seg}^{-1}$) [4].

Dado que el CO₂ es o bien el punto de partida en la fotosíntesis o el punto final de los procesos de oxidación, la anhidrasa carbónica está ampliamente difundida, encontrándose tanto en animales como en plantas así como en diverso tipo de bacterias [4]. Diferentes enzimas, de variados orígenes y que catalizan la misma reacción y que usualmente poseen estructuras homólogas reciben el nombre de isoenzimas [4,10]. En las plantas se han identificado las tres familias de isoenzimas de AC conocidas, la α -AC, la β -AC y la γ -AC [10-12]. Las α -AC parecen ser las más ampliamente difundidas. Estas α -AC catalizan, además, algunas otras reacciones tales como por ejemplo la hidratación de cianato a ácido carbámico o la de cianamida a urea así como la hidratación de aldehídos a *gem*-dioles [10].

Las α -AC se presentan en forma de monómeros con pesos moleculares del orden de 30 kDa [11] y el sitio de coordinación del Zn(II) en la enzima es un tetraedro fuertemente distorsionado, estando el metal unido a tres nitrógenos imidazólicos provenientes de otros tantos residuos de histidina, mientras que la cuarta posición está ocupada por una molécula de H₂O [1,4,11]. En cambio en las β -AC, que se presentan como oligómeros formados por 2-8 monómeros cada uno con un peso molecular del orden de 25-30 kDa, la esfera de coordinación del Zn(II) está conformada por un nitrógeno imidazólico de un residuo de histidina, dos azufres de cisteínas y una molécula de agua [10,11]. Las γ -AC se presentan en forma de

trímeros y la esfera de coordinación del Zn(II) está nuevamente conformada por tres nitrógenos imidazólicos de histidina y una molécula de agua [12].

El mecanismo de reacción de la anhidrasa carbónica ha sido intensivamente estudiado durante muchos años. Los espectros electrónicos de la enzima sustituida por Co(II) muestran las características típicas de los complejos tetraédricos de Co(II) y las transiciones “d-d” presentan una marcada dependencia del pH, sugiriendo que la enzima debe presentarse en dos formas, relacionadas por un equilibrio de protonación [1,4].

Efectivamente, a pH fisiológico la molécula de H₂O unida al Zn(II) adquiere un valor de pK_a tan bajo, que puede pasar rápidamente a la forma activa de la enzima en la que en lugar del agua queda un grupo OH⁻ en la esfera de coordinación. En este proceso de deprotonación seguramente también se involucra algún residuo de amino ácido próximo al sitio activo (probablemente un residuo de histidina), capaz de capturar y retener eficientemente al protón liberado [1,4]. Y una vez generada la forma activa la enzima reacciona con el sustrato (CO₂) a través del mecanismo que se presenta en la Fig. 2 y que es el que actualmente se considera como el más razonable [4,6]. La unidad Zn-OH es un relativamente buen nucleófilo que permite iniciar la reacción, mediante el ataque nucleofílico del sustrato [4,6]. En la etapa 3 el bicarbonato generado actúa como ligando bidentado frente al Zn(II) que adquiere, intermediariamente, coordinación cinco.

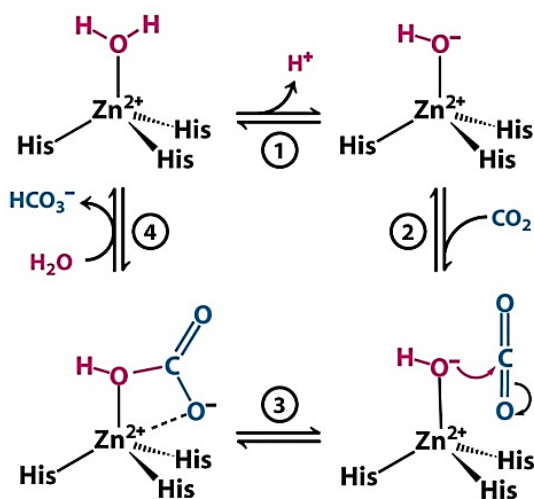


Fig. 2. Mecanismo catalítico propuesto para la anhidrasa carbónica.

Otras propuestas mecanísticas alternativas, implicaban la participación adicional de una molécula de agua en la reacción, sin interacción directa del O=C=O con el centro metálico [1].

La localización de la AC en plantas ha sido también motivo de reiterados estudios. Aunque este aspecto es claramente dependiente del tipo de planta, actualmente está bastante claro que la AC se encuentra distribuida en diferentes

órganos y tejidos (las α -AC se encuentran habitualmente en cloroplastos, citosol y mitocondrias) y, en algunos casos, aún en las raíces. Esta diversidad de localizaciones muestra las múltiples funciones fisiológicas y bioquímicas que las AC desempeñan en las plantas. Más aún, en varios casos se ha encontrado la presencia simultánea de isoenzimas pertenecientes a dos o tres de las familias de AC en una misma planta [11,12].

3.2. Hidrolasas de Zn(II)

Un conjunto de enzimas dependientes de Zn(II), ampliamente difundidas en la Naturaleza y pertenecientes a este grupo son las carboxipeptidasas, como por ejemplo la ampliamente conocida y estudiada carboxipeptidasa A. Esta enzima cataliza la hidrólisis de uniones peptídicas próximas al carboxilo terminal. Sin embargo, estas enzimas dependientes de Zn(II), hasta ahora no han sido identificadas en plantas. Su función aparentemente es cumplida en ellas por las llamadas serina-carboxipeptidasas, enzimas que no contienen ningún sitio metálico en su estructura [13].

3.2.1. Fosfatasa alcalina

Las fosfatasas son enzimas que remueven un grupo fosfato de un compuesto orgánico, generando un anión fosfato, PO_4^{3-} , y una molécula conteniendo un grupo oxhidrilo [1,4]. Una de las fosfatasas mejor conocidas y más estudiadas es la llamada fosfatasa alcalina (FA; EC 3.1.3.1), que se encuentra ampliamente difundida en la Naturaleza [14,15], y que es una fosfomonoesterasa no específica que cataliza la reacción de hidrólisis para producir un fosfato inorgánico y el correspondiente alcohol, mostrando máxima actividad a valores de pH de 8 o superiores. La enzima también muestra una cierta actividad de fosfotransferasa (transferencia de un grupo fosfato al grupo oxhidrilo de un aceptor) [1].

La FA dimérica de *Escherichia coli* es una de las enzimas de este tipo más intensivamente investigadas (para una revisión ver [14]). La enzima muestra un pH máximo alcalino y la velocidad sigue un perfil de pH aproximadamente sigmoideo con un valor aparente de pK_a de $\sim 7,5$ [14]. La estructura cristalina de FA nativa de *E. coli*, complejada con fosfato inorgánico fue resuelta y refinada a resolución de 2,0 Å; asimismo se han reportado datos estructurales de la enzima sustituida por Cd(II), complejada también con fosfato inorgánico (resolución 2,5 Å) y de la enzima nativa libre de fosfato (resolución 2,8 Å) [16]. El peso molecular del dímero es del orden de los 94 kDa y cada uno de los monómeros contiene dos iones Zn(II) y un ion Mg(II) [4,16] y estos dos sitios activos de las dos subunidades están separados alrededor de 30 Å [16].

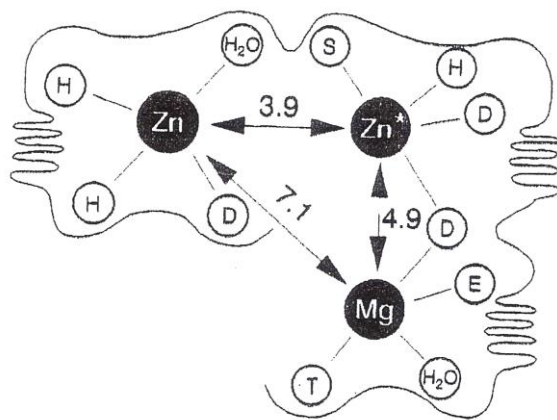


Fig.3. Estructura esquemática del sitio catalítico de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (H = histidina, D = ácido aspártico, S = serina, E = ácido glutámico, T = treonina).

Como puede verse de la Fig. 3 los tres cationes metálicos forman los vértices de un triángulo no-equilátero; los dos iones Zn(II) están separados por 3.94 Å y el Mg(II) está a 7,09 Å del Zn1 y a 4,88 Å del Zn2. El Zn1 está coordinado a dos átomos de N imidazolínico de los residuos de His-331 y His-412 y a los dos átomos carboxílicos del Asp-327. La esfera de coordinación de este centro se completa con, al menos, una molécula de H₂O. El catión Zn2 (marcado como Zn* en la Fig. 3) está tetracoordinado a un oxígeno de carboxilato de Asp-51 y Asp-369, al N imidazolínico de la His-370 y al grupo OH⁻ de la Ser-102. Finalmente el Mg(II) se une al Zn2 a través de un puente de ácido aspártico (Asp-51) y coordinado a un átomo de oxígeno de Glu-332, al oxhidrilo de Thr-155 y a tres moléculas de agua [16,17].

La importancia de los tres centros metálicos está bien documentada. El Mg(II) no participa directamente en la reacción pero cumple un rol relevante en la estabilización de la enzima. Por otro lado, los dos cationes Zn(II) están directamente involucrados en el proceso catalítico, dado que están adecuadamente posicionados para activar a la serina y al agua para el ataque nucleofílico y también se involucran en soportar la porción de fosfato del sustrato. El Zn1 es requerido en forma directa para el proceso catalítico ya que se une a ambos, al sustrato y al fosfato, mientras que el Zn2 interactúa con el grupo OH de la serina activa, para estabilizar su forma deprotonada, necesaria para el ataque nucleofílico sobre el fosfato [18].

En el esquema cinético usualmente aceptado para la reacción enzimática de hidrólisis/transfosforilación de fosfato-monoésteres por la fosfatasa alcalina (Fig.4), el nucleófilo, Ser-102, es fosforilado transientemente produciendo un intermediario fosfoseril covalente (**E-P**). Este intermediario es subsecuentemente hidrolizado, generando un complejo no covalente enzima/fosfato (**E•P_i**). En presencia de aceptor de fosfato (por ejemplo, un alcohol), la enzima exhibe actividad de transfosforilación, produciendo otro fosfato-monoéster [14].

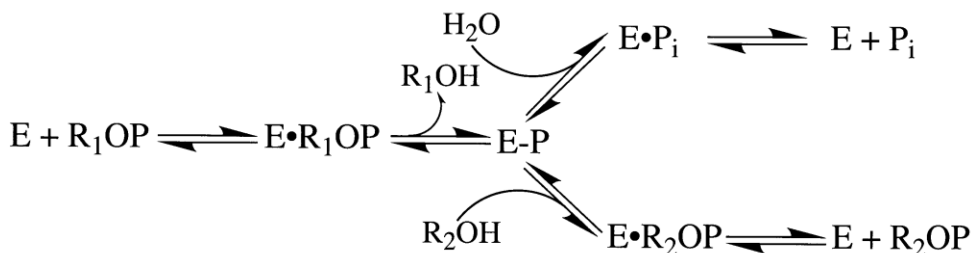


Fig. 4. Esquema mecánico para la fosfatasa alcalina.

El equilibrio $\text{E}-\text{P} / \text{E}\cdot\text{P}_i$ en la Fig. 4 ha sido objeto de diversos estudios por resonancia magnética nuclear. Estudios por NMR de ^{31}P demostraron que la hidrólisis del intermediario $\text{E}-\text{P}$ es limitante de la velocidad en condiciones ácidas, mientras que la hidrólisis de $\text{E}\cdot\text{P}_i$ es limitante de la velocidad en condiciones alcalinas. La disociación es esencialmente independiente del pH a valores entre 6 y 9 [14,16].

La FA desempeña un papel muy importante en la fisiología vegetal ya que es una de las fuentes que provee fosfato inorgánico para el mantenimiento del metabolismo celular. Además, la FA también está involucrada en la ruptura y movilización del almidón y la generación de azúcares así como en la biosíntesis de algunos aceites esenciales. Independientemente, el metabolismo del fosfato inorgánico en sí mismo, resulta de importancia crítica en todos los procesos de desarrollo de las plantas [19].

3.2.2. Metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz son parte de una familia de endopeptidasas localizadas en la matriz extracelular y que desempeña un papel importante en la degradación de sustratos de esa matriz, tales como colágeno, gelatina, fibronectina y otros, durante la embriogénesis, la curación de heridas y la resorción ósea. Más de 20 miembros de esa familia de metaloproteinasas han sido descritos en el organismo humano [20]. Sólo muy recientemente, este tipo de enzima ha sido detectada en plantas y algas pero muy pocas de ellas han sido definitivamente caracterizadas. Asimismo, no se conocen todavía con exactitud ni sus funciones ni sus posibles sustratos en plantas superiores, aunque se ha sugerido su participación en diversas etapas del crecimiento y desarrollo de la planta, tales como germinación, muerte celular programada, senescencia y respuesta a situaciones de estrés biótico y abiótico [21,22].

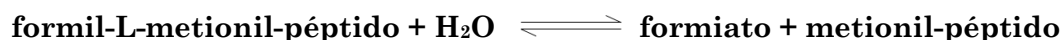
Las metaloproteinasas de plantas muestran similitudes estructurales con las de mamíferos, incluyendo la presencia de un sitio catalítico conteniendo Zn(II) [22,23].

La enzima contiene dos sitios de Zn(II) , uno de ellos constituye el verdadero centro catalítico mientras que el otro cumple un rol estructural. Ambos sitios metálicos están separados por unos 12,5 Å. En el sitio estructural el Zn(II) está

coordinado tetraédricamente por tres átomos de N de residuos de histidina y un átomo de oxígeno de un residuo de aspartato. El centro activo está coordinado por tres nitrógenos de histidina y una molécula de agua, cuyas características ácido/base parecen estar moduladas por un residuo cercano de ácido glutámico [6]. En algunas de estas enzimas existen, además, dos o tres cationes Ca(II), cuya función todavía no ha sido establecida [20,23], aunque probablemente éstos cumplan también un rol estructural [24].

3.2.3. Deformilasa peptídica

Inicialmente se pensaba que esta enzima sólo estaba presente en procariotas aunque luego se descubrió que están muy ampliamente difundidas y desempeñan también un papel muy importante en la biosíntesis de péptidos en el reino vegetal. Esta enzima (EC 3.5.1.88) cataliza la remoción de un grupo formilo de una N-formil-Met en el amino terminal de un polipéptido naciente (“nascent polypeptide”) y resulta esencial para todos los procesos subsiguientes que involucran proteínas N-terminales y para la supervivencia celular [25]:



En todas las plantas hasta ahora estudiadas existen dos genes de péptido deformilasa (DEF1 y DEF2) y ambos han sido extensivamente caracterizados en *Arabidopsis thaliana*, localizándose en cloroplastos y mitocondrias [25].

El estudio de la estructura cristalina de ambas formas mostró que se trata de una enzima dependiente de Zn(II) [26,27]. La esfera de coordinación del metal, que se presenta en forma de un tetraedro distorsionado, está conformada por los átomos de N de dos residuos de histidina, el átomo de S de un residuo de cisteína y el O de una molécula de agua, que actúa como nucleófilo atacante en el proceso de deformilación [27].

La exposición de diversas especies de plantas, incluida la *Arabidopsis*, a la actinonina, un inhibidor específico para la deformilasa peptídica produce clorosis y una severa reducción en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sugiriendo el papel esencial de esta enzima en el procesamiento de proteínas en todos los plástidos de plantas [28].

3.2.4. Peptidasa de procesamiento estromal (SPP)

Esta peptidasa (EC 3.4.21.102) cataliza la remoción de péptidos-señales (“transit peptides”) de una diversidad de proteínas precursoras almacenadas en los cloroplastos, habiéndose demostrado que no es sólo esencial para la biogénesis del cloroplasto, sino también para el desarrollo normal de las plantas. La SPP es un polipéptido monomérico, relativamente grande con un peso molecular de unos 124 kDa [29]. El sitio activo es un Zn(II) con características estructurales y de

coordinación muy similares a las de las metaloproteinasas de matriz y otras metalopeptidasas [29,30].

El proceso catalítico parece ocurrir en tres etapas: unión del SPP al péptido-senial, remoción del péptido y su inmediata conversión en un sub-fragmento degradable [29].

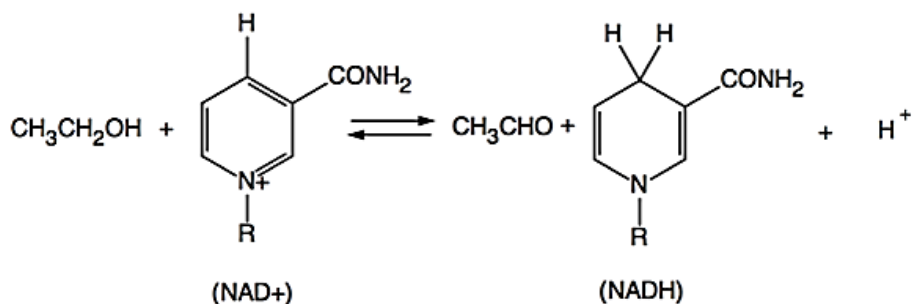
3.3. Oxido-reductasas de Zn(II)

3.3.1. Alcohol dehidrogenasa

La alcohol dehidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1) es un ejemplo de oxido-reductasa que involucra la participación de Zn(II) como elemento esencial para el proceso catalítico. Esta enzima cataliza la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos. La forma mejor conocida y estudiada es la ADH aislada de hígado de equinos y fue la base para todos los estudios posteriores de la misma [31]. Se trata de un sistema constituido por dos subunidades, cada una de las cuales posee un peso molecular de 40 kDa y contiene dos iones Zn(II). Uno de estos iones sólo posee funciones estructurales y se presenta coordinado tetraédricamente por cuatro átomos de azufre de otros tantos residuos de cisteína [1].

El otro ion Zn(II) que es el centro de la actividad catalítica, está unido a un nitrógeno imidazólico de un residuo de histidina y a dos azufres de sendos residuos de cisteína. La cuarta posición de coordinación está ocupada por una molécula de agua, relativamente lábil. La presencia de dos ligandos sulfurados aniónicos genera, por una parte, un complejo de zinc neutro y, por otro, limita el índice de coordinación del centro metálico a cuatro, debido al volumen de los dos átomos de azufre coordinados y la repulsión de cargas que existe entre ellos [1].

Dado que el Zn(II) no posee actividad redox, es evidente que se requiere de una enzima con actividad de dehidrogenasa, la que en el presente caso es el sistema NAD⁺/NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido) y la reacción global del proceso puede escribirse como sigue:



La función del sitio activo es la de fijar el sustrato, ligándose al oxígeno de la función alcohol, de manera de generar la geometría óptima para facilitar la deshidrogenación, como se muestra en la Fig.5. Inicialmente, el sustrato se une al Zn(II), reemplazando a la molécula de H₂O ligada. Luego, un protón se disocia del grupo hidroxilo del alcohol y es eliminado del sitio catalítico, por medio de una red de amino ácidos que lo dirige hacia la superficie de la enzima. La disociación de este protón del alcohol facilita la remoción del hidrógeno del carbono adyacente, en forma de hidruro (H⁻). Este hidruro se transfiere al NAD⁺, reduciéndolo a NADH. Como resultado de estos procesos, el alcohol se convierte en aldehído y el NADH reducido produce un cambio conformacional que ayuda a la eliminación del producto, y facilitando la entrada de una molécula de H₂O al sitio catalítico, reconstituyendo el cuarto enlace en torno al Zn(II) [31].

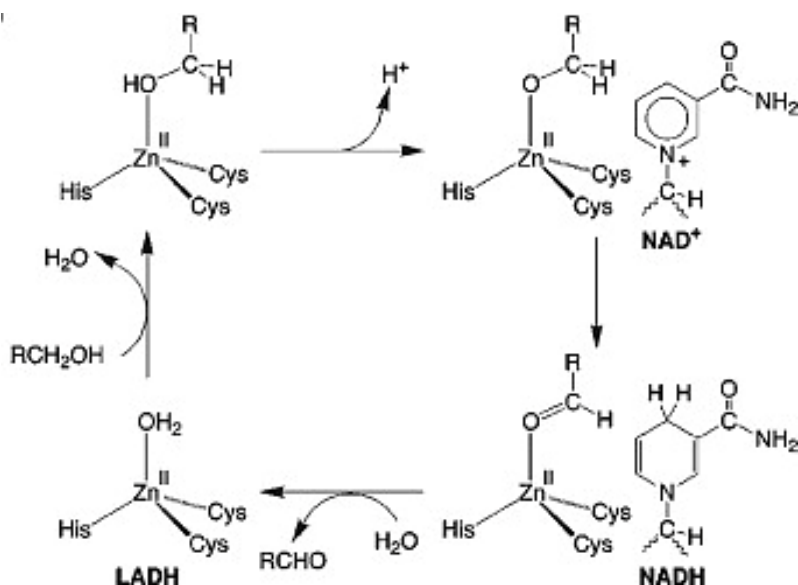


Fig. 5. Mecanismo de la oxidación de alcohol a aldehído catalizada por la enzima alcohol dehidrogenasa.

En las plantas herbáceas y leñosas la actividad de ADH ocurre mayormente en los ápices de las raíces y en las semillas en germinación, mientras que en la gran mayoría de las plantas ocurre en las hojas y tallos y es particularmente elevada en el meristema secundario, un sitio importante de síntesis de etanol [32].

La enzima también puede catalizar la reacción inversa, es decir la transformación de aldehído en alcohol. Ambas reacciones son posibles desde el punto de vista cinético con valores de K_m relativamente similares. Los potenciales sustratos de alguna manera parecen regulados por las secuencias de amino ácidos en torno al sitio activo [31]. Esta reacción inversa es de interés en el caso de las plantas durante episodios de privación de O₂ [31,32]. En estos casos, la ADH actúa en la etapa terminal de la glicolisis anaeróbica, transformando acetaldehído a etanol. Durante

el proceso se regenera NAD^+ y se produce una limitada cantidad de ATP durante el tiempo en el que la respiración normal está interrumpida [31].

3.3.2. Superóxido dismutasa de Cu/Zn

Esta enzima ya ha sido discutida en detalle en la Sección 2.3.1. del Capítulo 1, habiéndose establecido que el sitio activo de la misma es el Cu(II), mientras que el Zn(II) desempeña solamente un rol estructural. Agregaremos ahora algunos detalles adicionales sobre este importante sistema enzimático, básicamente derivados de estudios espectroscópicos.

Es interesante de comentar que se han realizado una gran variedad de trabajos, sobre esta SOD utilizando la espectroscopia electrónica, estudiando la enzima sustituida en uno o en los dos de sus sitios metálicos, por otros cationes. Algunos resultados típicos se comentan a continuación [1,33]:

- i) Sistemas del tipo $\text{Cu}_2\text{M}_2\text{-SOD}$ con $\text{M} = \text{Zn}^{\text{II}}, \text{Co}^{\text{II}}, \text{Cd}^{\text{II}}, \text{Hg}^{\text{II}}$
- ii) Sistema $\text{Cu}_2\text{E}_2\text{-SOD}$, E = sitio vacío
- iii) Sistema $\text{Ag}_2\text{Cu}_2\text{-SOD}$
- iv) Sistema $\text{Cu}_2\text{Cu}_2\text{-SOD}$

En la SOD nativa se observa una banda de absorción en 680 nm con un coeficiente de absorción molar relativamente elevado ($\epsilon = 155 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Por su parte todos los sistemas de tipo i) retienen esa misma banda aproximadamente en 680 nm, sugiriendo que los diferentes metales M que reemplazaron al Zn(II), no ocasionan cambios apreciables sobre el sitio de cobre. En cambio, en la proteína libre de Zn(II) (sistema ii), esa banda se desplaza hacia 700 nm, presumiblemente debido a una pequeña variación en la fuerza del campo de ligandos, originada en la protonación del puente imidazolato, al extraer el zinc. En el sistema iii), en el que el Cu(II) pasa a ocupar el sitio del Zn(II) y su lugar es ocupado por un ión Ag(I), la típica banda del Cu(II) se desplaza fuertemente al IR-cercano, indicando una geometría prácticamente tetraédrica. Finalmente, el sistema iv) muestra un espectro de dos bandas, como si fuera la superposición de los espectros de la SOD nativa y del sistema iii).

Todos estos resultados muestran que, por un lado que el Cu(II) en el sitio de cobre tiene una geometría bien definida, diferente a la que tiene el sitio de zinc y, por otro, que estas diferentes geometrías no se afectan apreciablemente por sustitución en el otro sitio metálico. Por otra parte, también diferentes estudios por resonancia de espín electrónico de la enzima nativa y del sistema ii), sustentan claramente la importancia del Zn(II) como factor estructural clave [33].

3.4. Polimerasas de zinc

Desde mediados del siglo pasado se sabe que el núcleo celular, el nucléolo y los cromosomas contienen zinc y diversos estudios histoquímicos mostraron que el zinc estaba asociado y estabilizaba la estructura nativa del ADN el ARN y los

ribosomas. Los efectos de la deficiencia de zinc sobre la síntesis del ADN y del ARN en varios tejidos y organismos sugieren un importante papel del mismo en el metabolismo de los ácidos nucleicos [34,35] y actualmente está universalmente establecida la presencia de zinc en las ADN y ARN polimerasas [34].

Hay una variedad de sistemas enzimáticos dependientes de zinc, asociados a la síntesis del ADN y el ARN, incluyendo la ADN-polimerasa, la ARN-polimerasa, las transcriptasas inversas y el factor de transcripción IIIA [35,36]. En estas enzimas el Zn(II) está fuertemente coordinado, formando una variedad de estructuras que son funcionalmente importantes [36]. Una estructura muy común es la de los llamados “dedos de zinc” que ha sido detectada en numerosas proteínas y este dominio ha sido mencionado como uno de los tres fundamentales para proteínas eucariotas reguladoras para ligar secuencias específicas del ADN [36].

La polimerización de trifosfato-ribonucleótidos, que es un proceso central para una variedad de procesos biológicos cruciales, incluyendo transcripción, síntesis primaria durante la replicación del ADN, adición de colas poliA al mRNA, adición de la enzima CCA al tARN y varias otras, es catalizada por una amplia variedad de diferentes enzimas. Estas polimerasas pertenecen a dos categorías mecánicas principales, las que copian una plantilla de ácido nucleico y las que actúan independientemente de una plantilla. Pero, en todos los casos, la actividad catalítica parece estar centrada en un polipéptido simple conteniendo un sitio activo constituido por un quelato metálico. El catión metálico dirige a un 5' trifosfato-nucleósido a generar un enlace fosfo-éster con el hidroxilo 3' del nucleótido precedente (el nucleótido 3'-terminal de una cadena de polinucleótido creciente), con la concomitante eliminación de pirofosfato [37].

La primera polimerasa, una ADN-polimerasa, aislada de *E. coli*, fue descubierta en 1956 y a partir de ese momento ha habido un continuado crecimiento en el conocimiento de este tipo de enzimas y ya se ha logrado caracterizar un importante número de ellas, tanto de eucariotas como de procariotas [34,35,38]. Estas incluyen cinco ADN-polimerasas de *Escherichia coli*, ocho de *Saccharomyces cerevisiae* y diez de *Arabidopsis thaliana* [38] a las que se agregan unas 16 aisladas en humanos [39].

La mayoría de nuestros conocimientos sobre estas enzimas proviene del estudio de células de levaduras y de animales y si bien algunas de ellas han sido identificadas en plantas, especialmente en *Arabidopsis* y en arroz [40], la información sobre estas polimerasas en plantas es todavía sumamente limitada y sólo en años recientes se han logrado algunos avances interesantes en este campo [40]. De todas formas, la conservación de ciertos pasos mecánicos fundamentales en todos los sistemas y procesos bioquímicos hasta ahora investigados hace presumir que los mismos no deben ser marcadamente diferentes en plantas con respecto a lo descrito en otras eucariotas [39,40].

3.5. “Dedos de zinc”

Como se mencionara más arriba, el descubrimiento de la presencia de los llamados “dedos de zinc” en algunos de los sistemas discutidos es particularmente interesante desde el punto de vista de la Química Bionorgánica del zinc y por ese motivo, habremos de referirnos a estas peculiares estructuras con algún detalle adicional, centrándonos especialmente a su amplia presencia y multiplicidad de actividades en las plantas.

Los “dedos de zinc” constituyen una de las mayores familias de factores transcripcionales de plantas y se categorizan en subfamilias basadas en el número y el orden de los residuos de cisteína e histidina, unidos al Zn(II) en la estructura secundaria del “dedo”, tales como tipo-Cys2/His2, esto es (C₂H₂) o (C₃H), (C₃HC₄), (C₂HC₅), (C₄HC₃), (C₂HC), C₄, C₆ y C₈ [42]. Entre ellas, los “dedos” de tipo C₂H₂ (Fig. 6) parecen ser los más abundantes y comunes [42,43]. Así, por ej., solamente en la *Arabidopsis thaliana* se han identificado 176 tipos diferentes de proteínas tipo C₂H₂ [42].

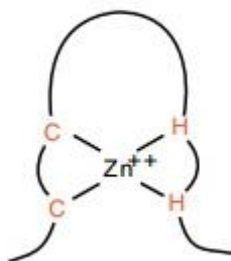


Fig.6. Plegamiento metálico alrededor del metal en un “dedo de zinc” C₂H₂.

En plantas, se ha reportado un número importante de proteínas conteniendo entre uno y cuatro “dedos” y los mismos están separados por espaciadores relativamente largos entre “dedos” adyacentes, y manteniendo una secuencia de aminoácidos fuertemente conservada, QALGGH, en las hélices del “dedo”, situación que no se da ni en animales ni en hongos [43,44]. Un ejemplo de este tipo de ordenamiento se muestra en la Fig. 7.

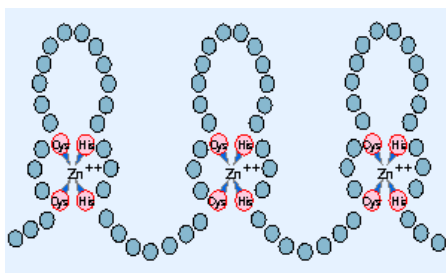


Fig.7. Ordenamiento de tres “dedos de zinc” C₂H₄.

Cuando existen en el reino vegetal problemas ambientales severos, generados por factores de estrés abiótico como elevada salinidad, bajas temperaturas

o sequías puede limitarse seriamente el crecimiento y/o desarrollo de las plantas. Por tal motivo, durante sus largos procesos evolutivos, las plantas han desarrollado mecanismos protectivos que involucran adaptaciones moleculares y cambios morfológicos y fisiológicos. Estos cambios adaptativos suelen incluir cambios sustanciales en la actividad de variados genes [43]. En este contexto, las proteínas reguladoras y los factores de transcripción juegan un papel sumamente importante.

Estudios recientes con arroz (*Oryza sativa*) permitieron la identificación de un número importante de proteínas del tipo C_2H_2 directamente involucradas en respuestas a diferentes tipos de estrés abiótico sugiriendo también la posibilidad de la interacción de diferentes proteínas de este tipo, durante estos procesos [43].

En términos más generales, los “dedos de zinc” de tipo C_2H_2 han mostrado claramente su capacidad de interactuar con el ADN y el ARN. Para el primer tipo de interacción parece muy importante la existencia de espaciadores de longitudes adecuadas entre los “dedos” y la existencia de la ya mencionada secuencia QALGGH, ya que la mutación en cualquiera de estos amino ácidos, excepto Q, conduce a la pérdida total de capacidad de interacción [42]. Por otra parte, también se ha encontrado que estos sistemas actúan muy rápidamente, y a través de muy diversos mecanismos, en ciertas condiciones de estrés, p.ej. estrés salino, osmótico u oxidativo así como también en la minimización de daños producidos por condiciones de sequía y frío. Más recientemente se ha encontrado también que pueden ayudar a evitar los daños causados por exceso de exposición a luz muy intensa, que suele ser dañina para muchas plantas [42].

Por otro lado, también es conocido el hecho de que ciertas hormonas de plantas participan en las adaptaciones fisiológicas a situaciones de estrés abiótico. Tanto los ácidos abscísico, jasmónico y salicílico así como el etileno, son hormonas importantes que participan en diversos cuadros de defensa fisiológica y hay ya numerosas pruebas de la participación de proteínas contenido “dedos de zinc” en varios de estos procesos [42].

REFERENCIAS

- [1] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [2] K.A. McCall, C.C. Huang & C.A. Fierke, *J. Nutrit.* **130**, 14375 (2000).
- [3] D.S. Auld, *Biometals* **14**, 271 (2001).
- [4] I. Bertini & C. Luchinat, The Reaction Pathways of Zinc Enzymes and Related Biological Catalysts. En: *Bioinorganic Chemistry*, H.B. Gray, S.J. Lippard & J. Selverstone Valentine (Eds.), University Science Books, Mill Valley, CA, 1994, pp. 37-106.
- [5] M.R. Broadley, P.J. White, J.P. Hammond, I. Zelko & A. Lux, *New Phytol.* **173**, 677 (2007).
- [6] D.S. Auld, Zinc Sites in Metalloenzymes and Related Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & A. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 881-959.

- [7] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soil and Plants*, 4th Edit., CRC-Boca Raton, 2011.
- [8] N. Gupta, H. Ram & B. Kumar, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **15**, 89 (2016).
- [9] N. Rascio & F. Navari-Izzo, *Plant Sci.* **180**, 169 (2011).
- [10] C.T. Supuran, *Curr. Pharm. Design* **14**, 603 (2008).
- [11] J.V. Moroney, S.G. Bartlett & G. Samuelson, *Plant, Cell, Environm.* **24**, 141 (2001).
- [12] R.J. DiMario, H. Clayton, A. Mukherjee, M. Ludwig & J.V. Moroney, *Mol. Plant.* **10**, 30 (2017).
- [13] K. Breddam, *Carlsberg Res. Commun.* **51**, 83 (1986).
- [14] J.E. Coleman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 441 (1992).
- [15] J.L. Millán, *Purinergic Signalling* **2**, 335 (2006).
- [16] E.E. Kim & H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **218**, 449 (1991).
- [17] B.L. Vallee & D.S. Auld, *Biochemistry* **32**, 6493 (1993).
- [18] M. Bortolato, F. Besson & B. Roux, *Struct., Funct, Genet.* **37**, 310 (1999).
- [19] B.O. Agoreyo, *Plant Omics J.* **3**, 66 (2010).
- [20] C. Tallant, A. Marrero & F.X. Gomis-Rüth, *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 20 (2010).
- [21] G. Marino & C. Funk, *Physiol. Plantarum* **145**, 196 (2011).
- [22] B.S. Flinn, *Funct. Plant Biol.* **35**, 1183 (2008).
- [23] L. Marino-Puertas, T. Goulas & F.X. Gomis-Rüth, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1864**, 2026 (2017).
- [24] T. Gossas & U.H. Danielson, *Biochem. J.* **398**, 393 (2006).
- [25] C-X. Hou, L.M.A. Dirk, S. Pattanaik, N.C. Das, I.B. Maiti, R.L. Houtz & M.A. Williams, *Plant Biotechnol. J.* **5**, 275 (2007).
- [26] S. Fieulaine, C.J. Binard, A. Serero, F. Dardel, C. Giglione, T. Meinel & J.L. Ferrer, *J. Biol. Chem.* **280**, 42315 (2005).
- [27] L.M.A. Dirk, J.J. Schmidt, Y. Cai, J.C. Barnes, K.M. Hanger, N.R. Nayak, M.A. Williams, R.B. Grossman, R.L. Houtz & D.W. Rodgers, *Biochem. J.* **413**, 417 (2008).
- [28] L.M.A. Dirk, M.A. Williams & R.L. Houtz, *Plant Physiol.* **127**, 97 (2001).
- [29] S. Richter & G.K. Lamppa, *J. Biol. Chem.* **278**, 39497 (2003).
- [30] P.F. Teixeira & E. Glaser, *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 360 (2013).
- [31] J. Strommer, *Plant J.* **66**, 128 (2011).
- [32] D.E. Harry & T.W. Kimmerer, *Forest Ecol. Manag.* **43**, 251 (1991).
- [33] J.Silverstone Valentine & D. Mota de Freitas, *J. Chem. Ed.* **62**, 990 (1985).
- [34] F.Y.H. Wu & Ch.W. Wu, The Roles of Zinc in DNA and RNA Polymerases. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Vol. 15, Marcel Dekker, New York, 1983, pp. 157-192.
- [35] F.Y.H. Wu & Ch.W. Wu, *Ann. Rev. Nutrit.* **7**, 251 (1987).
- [36] R.S. McDonald, *J. Nutrit.* **130**, 1500S (2000).
- [37] M.I. Lakshminarayan, E.V. Koonin & L. Aravind, *BMC Struct. Biol.* **3**, 1 (2003).
- [38] M.F. Goodman & B. Tippin, *Nature Rev. (Mol. Cell Biol.)*, **1**, 101 (2000).
- [39] R. Jain, A.K. Aggarwal & O. Rechkoblit, *Curr. Op. Struct. Biol.* **53**, 77 (2018).
- [40] J.A. Pedroza-García, L. De Veylder & C.Raynaud, *Internat. J. Mol. Sci.* **20**, 4814 (2019).
- [41] J.A. Bryant & S.J. Aves, *Ann. Bot.* **107**, 1119 (2011).

- [42] G. Han, Ch. Lu, J. Guo, Z. Qiao. N. Sui, N. Qiu & B. Wang, *Front. Plant Sci.* **11**, 115 (2020).
- [43] S. Ciftci-Yilmaz & R. Mittler, *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1150 (2008).
- [44] H. Takatsuji, *Plant Mol.Biol.* **39**, 1073 (1999).

CAPITULO 5

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE NÍQUEL

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo, el níquel fue el único elemento de la segunda mitad de la primera serie de elementos de transición, para el cual no se pudo establecer una clara función biológica [1]. Sin embargo, la importancia de enzimas dependientes de níquel en *Archea*, bacterias, plantas y eucariotas primitivas ha quedado claramente establecida en años recientes [2,3]. Aunque no se han encontrado enzimas dependientes de níquel en mamíferos, el impacto de la bioquímica del elemento sobre la salud humana es bastante significativo [4].

La abundancia del níquel en la corteza terrestre es del orden de 0,02%, alrededor de 500 veces menor que la del hierro [4]. En la Naturaleza existe en forma de sulfuros, óxidos o silicatos, y también en forma de partículas insolubles, que son componentes de polvos y humos. Compuestos solubles e insolubles de níquel se encuentran también en aguas y suelos. En solución acuosa usualmente se lo encuentra en forma del hexahidrato verde $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ [4,6].

1. ESENCIALIDAD DEL NIQUEL PARA LAS PLANTAS

En base a los criterios generales de esencialidad definidos en la Introducción de este trabajo, puede establecerse que el níquel es claramente un micronutriente esencial para las plantas. Las primeras evidencias sobre esa esencialidad se obtuvieron en la década de los '70 del siglo pasado, cuando se encontró que el crecimiento de diferentes especies de plantas mejoraba por agregado de níquel a los medios de cultivo. Posteriormente se sugirió un posible rol en el metabolismo del nitrógeno, debido a su presencia en la ureasa [7,8]. Algún tiempo después, este rol fue demostrado para las plantas leguminosas [9] y rápidamente extendió la idea de que el níquel es también esencial para las plantas superiores [9,10].

Estos y otros estudios relacionados, finalmente permitieron incluir al níquel en el grupo de los nutrientes minerales esenciales para plantas y, consecuentemente, se entiende que las plantas no pueden completar su ciclo vital sin el mismo [7,8, 11]. Estudios posteriores confirmaron claramente esa esencialidad, sugiriendo que el níquel forma parte del grupo de elementos considerados como micronutrientes esenciales para todas las plantas superiores [12].

2. CAPTACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL NIQUEL EN PLANTAS

La vía principal de captación del níquel desde los suelos es su absorción por las raíces de las plantas. El mecanismo y la cinética de absorción del metal por parte de las plantas todavía no están claramente comprendidos pero, de la misma

manera que para otros metales, podría proceder por difusión pasiva o transporte activo [11].

La captación del níquel aumenta a valores bajos de pH, observándose que la concentración de Ni(II) disponible aumenta a valores de pH menores que 6,5, probablemente por ruptura de los complejos de Ni/Fe/Mn, asociados a óxidos básicos. Por otra parte, en los suelos el Ni(II) es fuertemente absorbido por óxidos de magnesio y calcio y a pH más elevados, la superficie de las raíces y las partículas del suelo podrían recubrirse de películas insolubles de compuestos férricos, que también pueden ligar al Ni(II) y lo hacen inaccesible a las plantas [7, 11]. Estudios cinéticos competitivos demostraron que tanto el Cu(II) como el Zn(II) inhiben la absorción de Ni(II), sugiriendo que los tres elementos se absorben utilizando el mismo sitio de captación [13].

Asimismo, se ha sugerido que los fitosideroforos y moléculas relacionadas, que desempeñan un papel central en la captación de hierro por parte de las plantas [14], podrían también estar involucradas, en cierta medida en la captación de níquel [15]. Una vez que el níquel es absorbido por la raíz, sus movimientos hacia la parte superior de la planta están fuertemente relacionados a la posible formación de complejos con diferentes ligandos orgánicos (ácidos carboxílicos, amino ácidos, tio-donores) [8].

También en el caso del níquel, recientemente se han descubierto varias metalochaperonas [16,17], que ligan al Ni(II) y lo transportan específicamente a un sistema enzimático definido, por ejemplo, la ureasa [18].

3. ENZIMAS DE NÍQUEL EN PLANTAS

3.1. Aspectos generales de las enzimas de níquel

Enzimas conteniendo níquel son especialmente prominentes en el metabolismo de bacterias anaeróbicas. Muchos de los sustratos así como varios de los productos de reacciones catalizadas por enzimas de níquel son moléculas gaseosas (H_2 , CO, CH_4 , CO_2 , NH_3). Catalizadores conteniendo níquel parecen ser remanentes de sistemas bioinorgánicos primitivos (atmósfera reductora, mayor abundancia de azufre, presencia de H_2 , SH_2 y CH_4).

Otro aspecto remarcable de las enzimas conteniendo níquel es que diferentes sistemas, conteniendo este centro metálico no presentan peculiaridades estructurales comunes [19].

Las enzimas dependientes de níquel conocidas hasta ahora incluyen ureasa, hidrogenasa, CO-dehidrogenasa (y CO-dehidrogenasa/acetil-coenzima A sintasa), metil-S-coenzima M reductasa, glioxalasa I, una clase de superóxido dismutasa [5, 19-21] y acidoreductona dioxigenasa [22].

La primera enzima de níquel en ser descubierta fue la ureasa, la que está ampliamente difundida y desempeña un papel central en el metabolismo de plantas, hongos y bacterias.

Por otra parte, el hidrógeno gaseoso es generado o consumido por microorganismos como parte de su metabolismo, mediante el empleo de las hidrogenasas ($\text{H}_2 \leftrightarrow 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$), algunas de las cuales poseen níquel. En las bacterias metanogénicas, el níquel también está involucrado en un proceso, en el cual una compleja serie de reacciones lleva finalmente a la liberación de CH_4 . La enzima involucrada es la metil-S-coenzima M-reductasa, que contiene el cofactor F_{430} , que es un complejo de níquel tipo porfirínico. Por su parte, la CO-dehidrogenasa cataliza la conversión reversible de CO y H_2O a CO_2 y 2H^+ ($\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$).

La superóxido-dismutasa dependiente de níquel no muestra analogías con las otras tres superóxido-dismutasas conocidas (Cu/Zn, Fe, Mn) aunque su mecanismo de reacción es probablemente similar al de esas otras enzimas, involucrando la cupla redox Ni(III)/Ni(II).

De todas las enzimas mencionadas dependientes de Ni, solamente la ureasa y la glioxalasa I han sido encontradas y caracterizadas en plantas.

3.2. Ureasa. Una enzima clave para las plantas

3.2.1. Perspectiva histórica

En 1926, James B. Sumner (1887-1955), profesor de Bioquímica en la Cornell University logró aislar y cristalizar la enzima ureasa de una variedad de frijoles (*Canavalia ensiformis*). Esta fue la primera enzima que pudo ser cristalizada y Sumner además pudo demostrar que se trataba de una proteína, un hallazgo que estaba en contradicción con las ideas usualmente aceptadas en esa época.

Por este trabajo, Sumner recibió en 1946 el Premio Nobel de Química, compartido con John H. Northrop (1891-1987) y Wendell M. Stanley (1904-1971) por sus contribuciones al aislamiento, cristalización y estudios de enzimas, proteínas y virus.

Durante sus estudios con la ureasa, Sumner consideró la posibilidad de que la proteína pudiera contener iones metálicos, pero sus análisis para hierro y manganeso, dieron resultados negativos. Recién en 1975 análisis detallados de metales y la evaluación del peso equivalente de la enzima demostraron la presencia de una cantidad estequiométrica de níquel en *Canavalia ensiformis* (2.00 ± 0.12 átomos/gr de Ni por cada subunidad proteica de 96,6 kDa) [23]. De esta manera, la ureasa pasó a ser el primer ejemplo de una enzima conteniendo níquel, proveyendo además el primer ejemplo de un papel biológico específico para este elemento [23-27].

Finalmente, veinte años después, en 1995, la estructura cristalina de la enzima (en este caso aislada de *Klebsiella aerogenes*) pudo ser resuelta a una

resolución de 2.0 Å, revelando los detalles íntimos de la geometría molecular del sitio activo [27,28].

3.2.2. Características fisiológicas y bioquímicas de la ureasa

Se conocen tres mecanismos básicos para la síntesis de la urea en plantas superiores, estos incluyen el ciclo de la ornitina, el catabolismo de purinas o la biosíntesis a partir del amino ácido no-proteico canavanina [11,18]. La urea generada por algunas de estas reacciones es hidrolizada por la ureasa (urea amidohidrolasa, EC 3.5.1.5), la hidrolasa más eficiente hasta ahora conocida [22], cuyo función primaria es la de permitir a los organismos la utilización de urea, generada externa o internamente, como fuente de nitrógeno [29]. El amoníaco liberado en esta hidrólisis participa de varios procesos anabólicos, particularmente en la síntesis de glutamina a partir de glutamato, catalizada por la glutamato sintetasa, una reacción crucial para la asimilación de amoníaco [11].

La ureasa es una enzima importante para el ciclo global del nitrógeno y es sintetizada por varios organismos, incluyendo plantas, bacterias, hongos, algas e invertebrados. Las ureasas bacterianas desempeñan un papel importante en la patogénesis de ciertas especies, incluyendo *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Ureaplasma urealiticum* y otras. En otros casos (por ejemplo, *Klebsiella aerogenes*), la actividad de la ureasa transforma a la urea en la única fuente de nitrógeno. Uno de los ejemplos más frecuentes encontrados en la literatura reciente es la ureasa de *Helicobacter pylori* debido a su rol central en la patogénesis de este microorganismo y a la elevada prevalencia de este patógeno humano. En el invertebrado *Aplysia californica*, la ureasa junto a la anhidrasa carbónica, es empleada en la generación y homeostasis de statoconia, inclusiones de CaCO_3 en el lumen del órgano de sensado gravitacional, el statocisto [30].

Las ureasas de plantas y hongos son proteínas homo-oligoméricas (subunidades idénticas), mientras que las de origen bacteriano son multímeros formados por un complejo de dos o tres subunidades. Entre todas las ureasas conocidas se ha encontrado una fuerte similitud en los amino ácidos constituyentes. Los amino ácidos de los residuos terminales de los monómeros de enzimas de plantas y hongos son similares a las de las pequeñas subunidades de las enzimas bacterianas, mientras que las de sus subunidades mayores son similares a las porciones carboxi-terminales de las subunidades de hongos y plantas [30]. La alta similitud en sus secuencias indica que todas las ureasas son variantes de la misma enzima y probablemente muestren similares estructuras terciarias y mecanismos catalíticos [29].

3.2.3. Enzimología

La hidrólisis enzimática de la urea ocurre en dos etapas: en la primera se generan amoníaco y carbamato (Ec.(1)), el que espontáneamente reacciona con agua para producir bicarbonato y una segunda molécula de amoníaco (Ec.(2)) [5, 22]:



El primer proceso ocurre unas 10^{14} veces más rápido que la reacción no catalizada a pH 7-8, con un tiempo medio del orden de los microsegundos [5].

La ureasa exhibe un típico comportamiento Michaelis-Menten. Los valores observados de K_m se ubican entre 0,2 y 32 mM, con valores típicos de alrededor 1 – 4 mM, que son claramente independientes del pH. Se observa sólo una baja inhibición por parte del sustrato o de los productos. Además, la urea no es el único sustrato para esta enzima, observándose actividad hidrolítica para análogos de la urea como formamida, acetamida, N-metilurea, semicarbazida y tiourea, así como con diferentes tipos de ésteres del ácido fosfórico y amidas. No obstante, los valores de k_{cat} para estos sustratos son entre 2 y 3 órdenes de magnitud más bajos que los observados para la urea [22].

3.2.4. Estudios espectroscópicos y magnéticos

Estos aspectos han sido discutidos previamente en forma muy detallada [18], por lo que aquí se presentaran solamente los detalles más sobresalientes. La presencia de Ni(II) hexacoordinado en la ureasa de frijoles fue inicialmente revelada por estudios de espectroscopia electrónica de absorción [25,26,31]. Estudios de susceptibilidad magnética indicaron la existencia de un débil acoplamiento antiferromagnético ($J = -6,3 \text{ cm}^{-1}$) entre dos centros metálicos cercanos de alto espín ($S = 1$), demostrando la presencia de un sitio activo dinuclear de Ni(II) [32].

Los estudios de dicroísmo circular magnético a temperaturas variables mostraron que la enzima nativa presenta dos bandas negativas, cuya intensidad aumenta con la disminución de temperatura. Las mismas pueden ser asignadas a las dos transiciones $d-d$ de mayor energía del Ni(II) en un entorno octaédrico de ligandos, esto es: ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(P)$ (420 nm) y ${}^3A_{2g} \rightarrow {}^3T_{1g}(F)$ (745 nm) [33].

La estructura de los sitios dinucleares de la enzima fue también investigada por espectroscopia EXAFS, encontrándose que no había diferencias significativas entre la ureasa de plantas y la de bacterias [34].

3.2.5. Estructura del sitio activo

Como se mencionara en la Secc. 3.2.1., el primer reporte de la estructura cristalina de una ureasa, en este caso aislada de *Klebsiella aerogenes*, data de 1995 [28]. Actualmente, el número de estructuras depositadas en la Protein Data Bank, llega a 43. De estas 38 son de ureasas bacterianas, 4 son de frijoles (*C. ensiformis*) y una proviene de un tipo de arveja (*Cajanus cajan*) [22].

Muchas ureasas bacterianas presentan una estructura cuaternaria de trímeros de trímeros del tipo $(\alpha\beta\gamma)_3$, siendo α , β y γ tres subunidades diferentes. El sitio activo se encuentra en la subunidad α , generando tres sitios activos por subunidad biológica. En algunas otras ureasas bacterianas la estructura cuaternaria está constituida sólo por dos subunidades para formar trímeros $(\alpha\beta)_3$. En el caso del *H. pylori* el trímero $(\alpha\beta)_3$ se tetrameriza, produciendo un tetrámero de trímeros, $[(\alpha\beta)_3]_4$, de simetría esférica, conteniendo 12 sitios activos. Finalmente, las ureasas de plantas generalmente están constituidas por un dímero de homotrímeros $(\alpha_3)_2$, donde la subunidad α está derivada de la fusión de las correspondientes subunidades $\alpha\beta\gamma$, encontradas en bacterias. En todos los casos las estructuras secundarias y terciarias de todas las ureasas son muy similares [22].

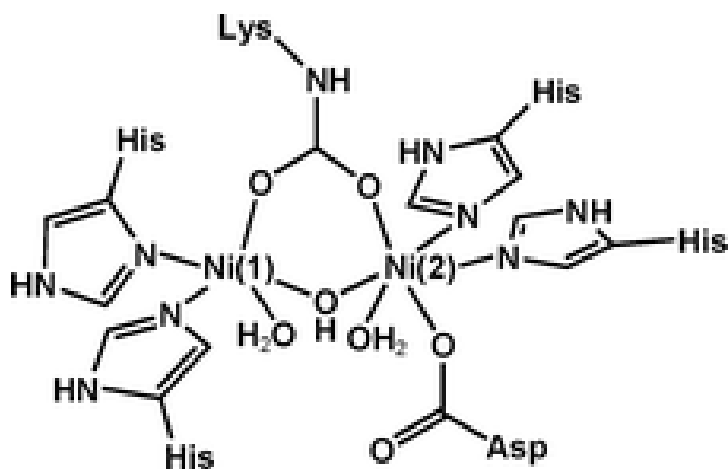


Fig.1. Esquema del sitio activo di-metálico de la ureasa.

Existe consenso en cuanto a la estructura de la esfera de coordinación de los iones Ni(II) en el sitio activo de las ureasas. Todas las estructuras hasta ahora determinadas indican la presencia del sitio di-metálico, con los dos iones Ni(II) separados a 3.5 - 3.7 Å y puenteados por los átomos de oxígeno de un residuo de lisina carbamilado y unidos a dos átomos de N de sendos residuos de histidina. Como se ve de la Fig. 1, uno de los iones Ni(II) está ligado adicionalmente al oxígeno carboxílico de un aspartato y la coordinación de cada Ni(II) se completa por la unión a una molécula de agua terminal y por un puente de anión hidroxilo [22].

La presencia de dos ligandos puente en el sitio metálico dinuclear, explica claramente el débil acoplamiento antiferromagnético arriba mencionado [32]. También es evidente de la Fig. 1 que el ordenamiento de ligandos descrito genera un ion Ni(II) pentacoordinado (Ni(1)) con una geometría cuadrado-piramidal distorsionada y el otro ion Ni(II) hexacoordinado (Ni(2)), con una geometría octaédrica distorsionada.

Es especialmente interesante de mencionar la existencia de una extendida red de enlaces de H que estabilizan a las moléculas de solvente unidas al níquel, incluyendo una tercera molécula de agua libre, como parte de ese entramado, completando un cúmulo tetraédrico de cuatro aguas/hidróxido en proximidad de los

iones Ni(II), apuntando a la existencia de una cavidad activa diseñada para estabilizar un estado de transición o un intermediario tetraédrico [22].

3.2.6. Mecanismo de acción de la enzima

El mecanismo de reacción de la reacción catalítica de hidrólisis de la urea ha sido tema de discusión a lo largo de los últimos cien años y sigue siendo un tema de interés actual. Tres caminos de reacción principales han sido propuestos:

- 1) El mecanismo (hidrolítico) de ácido carbámico, que involucra al ácido carbámico (o carbamato) como intermediario.
- 2) El mecanismo del dióxido de carbono, en el cual la urea se hidroliza directamente a CO_2 y NH_3 .
- 3) El mecanismo del ácido ciánico (mecanismo de eliminación), asociado a la formación intermediaria de cianatos.

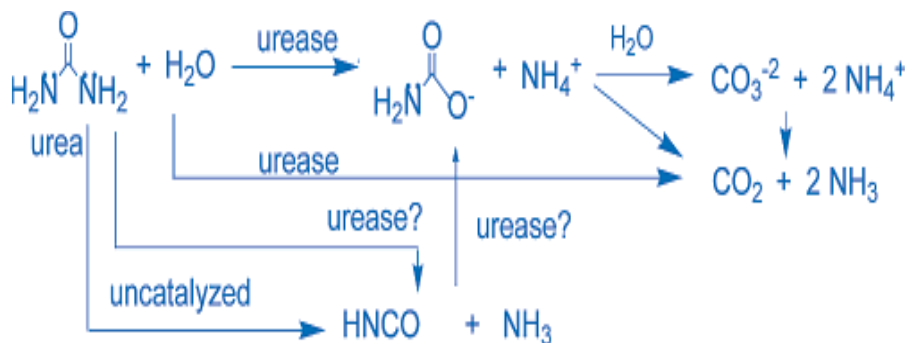


Fig.2. Visualización simplificada de los diversos caminos de reacción propuestos para la descomposición catalítica y no-catalítica de la urea.

Estos tres posibles mecanismos se esquematizan en la Fig. 2 [35]. Los estudios bioquímicos hasta ahora realizados no permiten definir con total certeza si la reacción involucra carbamatos o cianatos como intermediarios o si procede via una descomposición directa.

Usualmente se asume que, en el sitio activo, la ureasa se uno al ión Ni(1), más electrofílico, con el átomo de O de su grupo carbonilo. Después de desplazar a las dos moléculas de agua coordinadas, la urea se liga adicionalmente al Ni(2) a través del N de uno de sus grupos amino, actuando como ligando bidentado [36,37]. Este enlace parece facilitar el ataque nucleofílico del agua al grupo carbonilo, resultando en la formación de un intermediario tetraédrico del cual se desprenden el carbamato y el amoníaco. Este ataque nucleofílico podría ser realizado por el hidroxilo puente [36]. Otra posibilidad, sería que involucre directamente al residuo de His320, localizado en las cercanías del sitio activo [37, 38].

En relación a esta reacción enzimática hay algunos aspectos que todavía no están totalmente clarificados y están básicamente relacionados al modo de

coordinación de la urea a los centros metálicos y los potenciales estados de protonación de His320 y His219. Con la ayuda de simulaciones de dinámica molecular, el papel crítico desempeñado en la reacción por los residuos de His320, Cys319, Ala363, His219, Asp121 y Asp360, así como la relevancia del grupo hidroxilo puente, se han hecho bastante evidentes [39].

3.3. Glioxalasa I

La glioxalasa I (Glo I, EC 4.4.1.5.) es una enzima ampliamente difundida y encontrada en bacterias, protistas, hongos, plantas y animales [22] y cataliza la conversión de un hemiacetal a un 2-hidroxitioéster (ver Fig. 3).

El hemitioacetal se deriva de una reacción espontánea de un α -cetoaldehído y un tiol. El α -cetoaldehído más importante es el metilglioxal, que es un metabolito natural tóxico que se acumula cuando Glo I está suprimido o cuando el GSH (glutatión, γ -glutamyl-L-cisteinilglicina) se ha agotado. El metilglioxal es capaz de formar aductos con ácidos nucleicos, conduciendo a modificaciones en las proteínas, el DNA o el RNA y un número de efectos citotóxicos. De esta manera, el Glo I ha sido relacionado a procesos de envejecimiento o stress oxidativo.

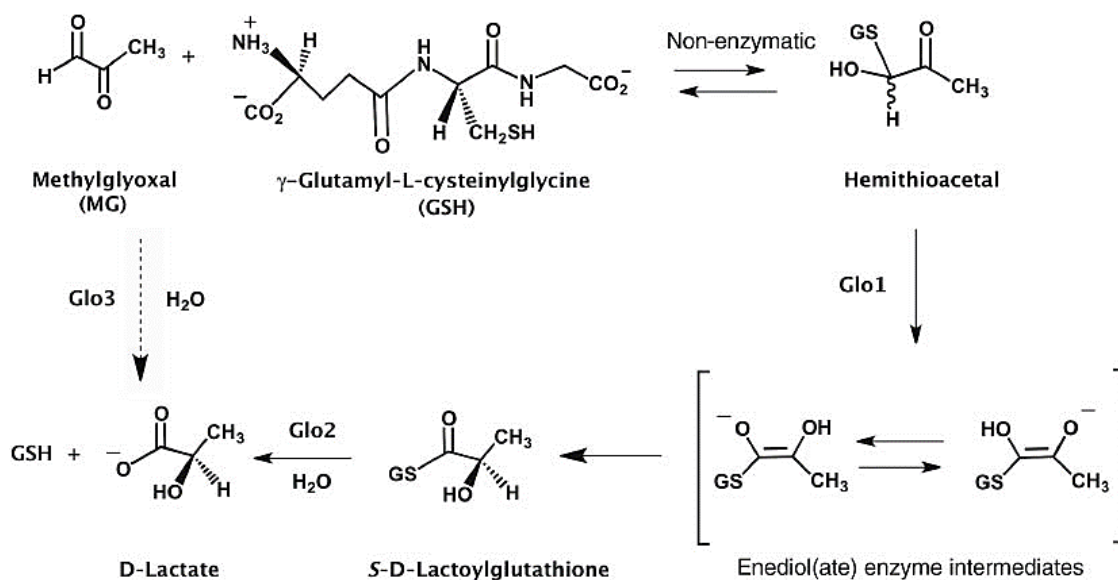


Fig.3. Transformación del metilglioxal en D-lactato catalizada por el sistema glioxalasa (Glo I y Glo 2).

La Glo I es la primera enzima del sistema glioxalasa. La segunda enzima en esta ruta biológica, Glo II (EC 3.1.2.6), hidroliza al tioéster producido por Glo I para generar el correspondiente α -hidroxiácido (ver otra vez Fig. 3). Esto es, el sistema glioxalato constituye una importante vía para detoxificar y controlar los niveles de metilglioxal en las células, convirtiéndolo en D-lactato.

Los primeros estudios bioinorgánicos de estas enzimas, utilizando ensayos de activación por metales, mostraron que las mismas, obtenidas de

mamíferos, levaduras y *Pseudomonas putida*, eran activadas por Zn(II), así como por otros cationes metálicos divalentes. Basados en estos antecedentes, inicialmente se asumió que todas las enzimas Glo I eran metaloenzimas dependientes de Zn(II), hasta que se descubrió que la Glo I de *E. coli* no se activaba por este metal, pero se activaba fuertemente por iones Ni(II), y en menor medida por Co(II), Mn(II) y Cd(II). Este hallazgo fue seguido del estudio con bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y de los protozoos de tripanosomas, *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*, que mostraron características de activación metálica similares a las encontradas en la enzima de *E. coli*. Consecuentemente, esto llevó a definir dos clases de Glo I: clase I, que puede ser activada por Zn(II) y clase II, que no es activada por Zn(II), pero alcanza su máxima activación con Ni(II) [22]. El origen de la diferente preferencia de metal en el sitio activo en las dos clases de enzima deriva seguramente de sutiles diferencias en las estructuras primarias y en diferencias entre los dímeros formados en ambas estructuras.

En la Glo I de *E. coli* el Ni(II) está hexacoordinado, en geometría octaédrica, unido a dos átomos de N de sendos residuos de histidina, dos átomos de O de carboxilatos provenientes de unidades de glutamato y dos átomos de O provenientes de moléculas de agua [22,40]. Por otro lado, en el complejo inactivo conteniendo Zn(II), el metal está pentacoordinado, con una geometría trigonal bipyramidal, conteniendo una molécula de agua menos que el complejo de Ni(II) [22,40].

3.3.1. Glioxalasa I en plantas

En general, las glioxalosas de plantas siguen escasamente caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y también en lo relativo a sus posibles funciones moleculares [41].

El primer reporte de aislamiento y purificación de una glioxalasa de una planta fue la de *Brassica juncea*. Aunque no se encontró la presencia de ningún metal de transición ella, se demostró que el Mg(II) estimulaba fuertemente su actividad [42].

En el caso del arroz (*Oryza sativa*) se encontró una glioxalasa I dependiente de níquel (denominada OsGLYI-11,2), la que fue caracterizada como una enzima monomérica conteniendo un solo sitio de coordinación de Ni(II), cuya expresión era fuertemente inducida por el sustrato, sugiriendo un importante modo de regulación en sus niveles celulares [43].

También es interesante de mencionar que en plantas de tabaco transgénicas (*Nicotiana tabacum*) la sobreexpresión de glioxalasa conduce a una resistencia al incremento de los niveles de metilglioxal, que aumenta bajo condiciones de estrés salino. Estas plantas sufren un mínimo estrés salino y daño oxidativo, manteniendo altos niveles de GSH [44]. Estos resultados claramente demuestran la importancia del sistema glioxalato bajo condiciones de estrés [45].

También en el caso del tomate (*Lycopersicon esculentum*), se observó un aumento en la concentración de glioxalasa I bajo condiciones de estrés salino y acuoso [46].

Más recientemente, se encontraron tres glioxalosas I activas en *Arabidopsis thaliana* (AtGLY12, AtGLY13 y AtGLY16) pertenecientes a diferente clases de activación metálica, coexistiendo en esa planta. Estas tres nuevas enzimas fueron caracterizadas en términos de su actividad, dependencia metálica y su papel en conferir tolerancia a múltiples cuadros de estrés abiótico en *E. coli* y levadura. Se demostró que la AtGLY12 es dependiente de Zn(II), mientras que las otras dos enzimas son dependiente de Ni(II). Este es el primer reporte de una especie eucariota superior poseyendo varias glioxalosas I, dependientes de diferentes metales para su activación [47].

REFERENCIAS

- [1] W. Kaim & B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, B.G. Teubner, Stuttgart, 1991.
- [2] J.R. Lancaster, Jr. (Ed.) *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, VCH Publishers, New York, 1988.
- [3] A. Sigel, H. Sigel & R.K.O. Sigel (Eds.) *Metal Ions in Life Sciences*, Vol. 2: Nickel and its Surprising Impact in Nature, J. Wiley, Chichester, 2007.
- [4] B. Zambelli & S. Ciurli, Nickel in Human Health. En: *Metal Ions in Life Sciences*, A. Sigel, H. Sigel & R.K.O. Sigel (Eds.), Vol. 13, Springer, Dordrecht, 2014, pp. 321-357.
- [5] S. Ciurli & S. Mangani, Nickel Containing Enzymes. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 669-707.
- [6] F.A. Cotton, G. Wilkinson, C.A. Murillo & M. Bochmann, *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th. Edit., Wiley, New York, 1999.
- [7] M.E. Farago & M.M. Cole, Nickel in Plants. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, Vol. 23, New York, 1988, pp. 47-90.
- [8] M.A. López & S. Magnitskiy, *Agron. Colomb.* **29**, 49 (2011).
- [9] D.L. Eskew, R.M. Welch & E.E. Cary, *Science* **222**, 621 (1983).
- [10] D.L. Eskew, R.M. Welch & W.A. Norwell, *Plant Physiol.* **76**, 691 (1984).
- [11] I.V. Seregin & A.D. Kozhevnikova, *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 257 (2006).
- [12] R. Hänsch & R.R. Mendel, *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 259 (2009).
- [13] D. Cataldo, T.R. Garland & R.E. Wildung, *Plant Physiol.* **62**, 563 (1978).
- [14] E.J. Baran, Phytosiderophores and Related Systems. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 14, Scientific Publishers, Jodhpur, 2013, pp. 1-27.
- [15] M.J. Haydon & Ch.S. Cobett, *New Phytol.* **174**, 499 (2007).
- [16] R.M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry. A Short Course*, J. Wiley, Hoboken, NJ, 2002.
- [17] A. Rosenzweig, *Chem. Biol.* **9**, 673 (2002).

- [18] E.J. Baran, Nickel and its Role in Plant Physiology. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 17, Scientific Publishers, Jodhpur, 2017, pp. 291-313.
- [19] R.P. Hausinger, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 279 (1997).
- [20] U. Ermler, W. Grabarse, M. Goubeaud & R.K. Thauer, *Curr. Op. Struct. Biol.* **8**, 749 (1998).
- [21] M.J. Maroney, *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**, 188 (1989).
- [22] M.J. Maroney & S. Ciurli, *Chem. Rev.* **114**, 4206 (2014).
- [23] R.K. Andrews, R.L. Blakeley & B. Zerner, Urease – A Ni(II) Metalloenzyme. En: *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*, J.R. Lancaster, jr. (Ed.), VCH Publishers, New York, 1988, pp. 141-165.
- [24] R.K. Andrews, R.L. Blakeley & B. Zerner, Nickel in Proteins and Enzymes. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel and A. Sigel (Eds.), Vol. 23, Marcel Dekker, New York, 1988, pp. 165-284.
- [25] N.E. Dixon, C. Gazzola, J.J. Waters, R.L. Blakeley & B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4130 (1975).
- [26] N.E. Dixon, C. Gazzola, J.J. Waters, R.L. Blakeley & B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4131 (1975).
- [27] S.J. Lippard, *Science* **268**, 996 (1995).
- [28] E. Jabri, M.B. Carr, R.P. Hausinger, & P.A. Karplus, *Science* **268**, 998 (1995).
- [29] H.L. Mobley, M.D. Island & R.P. Hausinger, *Microbiol. Rev.* **59**, 451 (1995).
- [30] A. Sirko & R. Brodzik, *Acta Biochim. Polon.* **47**, 1189 (2000).
- [31] N.E. Dixon, R.L. Blakeley & B. Zerner, *Canad. J. Biochem.* **58**, 481 (1980).
- [32] P.A. Clark & D.E. Wilcox, *Inorg. Chem.* **28**, 1326 (1989).
- [33] M.G. Finegan, A.T. Kowal, M.T. Werth, P.A. Clark, D.E. Wilcox & M.K. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4030 (1991).
- [34] S. Wang, M.H. Lee, R.P. Hausinger, P.A. Clark, D.E. Wilcox & R.A. Scott, *Inorg. Chem.* **33**, 1589 (1994).
- [35] G. Estiú & K.M. Merz, *J. Phys. Chem. B* **111**, 10263 (2007).
- [36] S. Benini, W.R. Rypniewsky, K.S. Wilson, S. Miletì, S. Ciurli & S.A. Mangani, *Structure* **7**, 205 (1999).
- [37] K. Muralidhar, J. Khurana & V. Sharma, *World J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **3**, 923 (2014).
- [38] P.A. Karplus, M.A. Pearson & R.P. Hausinger, *Acc. Chem. Res.* **30**, 330 (1997).
- [39] G. Estiú & K.M. Merz, *Biochemistry* **45**, 4429 (2006).
- [40] M. He, S.L. Clugston, J.F. Honek & B.W. Matthews, *Biochemistry* **39**, 8719 (2000).
- [41] R. Deswal, T.N. Chakaravarty & S.K. Sopory, *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 527 (1993).
- [42] R. Deswal & S.K. Sopory, *FEBS Lett.* **282**, 277 (1991).
- [43] A. Mustafiz, A. Ghosh, A.K. Tripathi, C. Kaur, A.K. Ganguli, N.S. Bhaversjh, J.K. Tripathi, A. Pareek, A.K. Sopory & S.L. Singla-Pareek, *Plant J.* **78**, 951 (2014).
- [44] S.K. Yadav, S.L. Singla-Pareek, M.K. Reddy, & S.K. Sopory, *FEBS Lett.*

- 579, 6265 (2005).**
- [45] S.K. Yadav, S.L. Singla-Pareek, M. Ry, M.K. Reddy & S.K. Sopory, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 61 (2005).
- [46] J. Espartero, I. Sánchez-Aguayo & J.M. Pardo, *Plant Mol. Biol.* **29**, 1223 (1995).
- [47] M. Jain, R. Batth, S. Kumary & A. Mustafiz, *PLOS ONE*, e 0159348 (2016).

CAPITULO 6

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE MOLIBDENO

INTRODUCCIÓN

El molibdeno es el único metal de la segunda serie de elementos de transición, que es un micronutriente esencial para microorganismos, animales y plantas [1-5]. De las más de 40 Mo-enzimas conocidas [3,6], solamente cuatro han sido encontradas en plantas: nitrato-reductasa, aldehído oxidasa(s), xantina dehidrogenasa y sulfito oxidasa [6,7].

Los organismos utilizan al molibdeno en el sitio activo de enzimas que catalizan (casi exclusivamente) reacciones de óxido-reducción, en las que el molibdeno cicla entre los estados de oxidación Mo(IV) y Mo(VI). Es además interesante de mencionar que muchas de las reacciones dependientes de molibdeno involucran también la transferencia de un átomo de oxígeno [2,5]. Por otra parte, las enzimas de molibdeno tienen un papel clave no solo en el metabolismo de todos los organismos vivientes, sino también en los ciclos biogeoquímicos del carbono, el nitrógeno y el azufre [4,8].

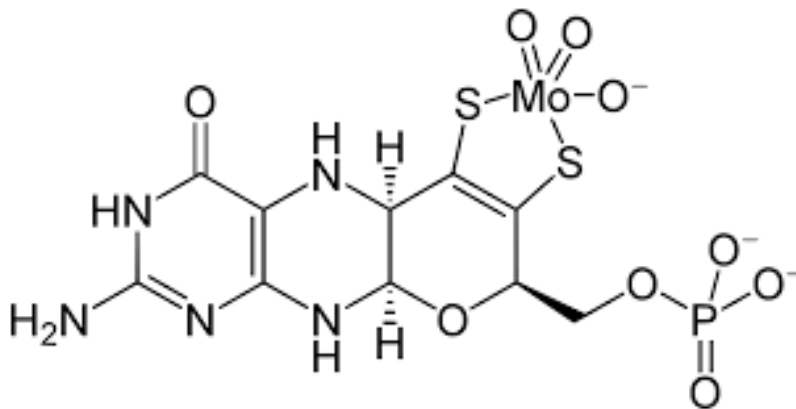


Fig.1. Estructura esquemática del cofactor de molibdeno (Moco).

Todas las enzimas de molibdeno caracterizadas hasta el presente caen en una de dos categorías. Estos dos tipos de enzimas se diferencian claramente por los dos diferentes cofactores de Mo que contienen. Las nitrogenasas son enzimas especiales que utilizan un sistema de dos proteínas para escindir el fuerte enlace N-N de la molécula de N₂ en condiciones normales de presión y temperatura, reduciendo el dinitrógeno a amoníaco [2,3]. Todas las otras molibdoenzimas son oxotransferasas que contienen un cofactor especial, mostrado en la Fig. 1, y que usualmente es denominado Moco [2-4]. Este cofactor muchas veces se representa con sólo dos grupos oxo unidos al Mo central (es decir, dos enlaces Mo=O), pero en los sistemas activos siempre hay un ligando adicional sobre el molibdeno (el O[•] en la Fig. 1). En las enzimas de plantas nitrato reductasa y sulfito oxidasa el átomo O[•] es reemplazado por un átomo de S de cisteína mientras que en la aldehído oxidasa y la

xantina dehidrogenasa los tres átomos libres unidos al Mo resultan ser un átomo de O unido por un doble enlace al Mo, un átomo de S, ligado también por un doble enlace al metal y un grupo hidroxilo [3,9].

1. CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE MOLIBDENO EN LAS PLANTAS

La abundancia terrestre del molibdeno, estimada del orden de 3 ppm, muestra su asociación con rocas graníticas y rocas magmáticas ácidas. Las concentraciones habituales de Mo en esas rocas están entre 1 y 2 ppm, mientras que en sedimentos arcillosos, ricos en materia orgánica, el contenido de Mo suele estar por encima de los 2 ppm. Su geoquímica está fuertemente dominada por especies aniónicas. Durante los procesos de erosión, los sulfuros de molibdeno y otras especies son oxidadas lentamente y generan fundamentalmente el anión MoO_4^{2-} , que es predominante a valores de pH neutro o moderadamente alcalino. A pH bajos comienza a predominar la especie MoO_4H^- . Sin embargo, estas especies, poco móviles, son fácilmente coprecipitadas por materia orgánica, CaCO_3 y por varios cationes como Pb(II), Cu(II), Zn(II), Mn(II) y Ca(II). Asimismo, las especies de molibdeno pueden ser adsorbidas por oxohidróxidos de Fe, Mn y Al, reacciones que contribuyen a la retención de Mo en depósitos superficiales. Todas estas reacciones son, obviamente, fuertemente dependientes del pH [10].

Por otro lado, es remarcable que el Mo es el metal de transición más abundante en los océanos. A valores de pH débilmente alcalino (~ 8,3) y en un entorno fuertemente oxigenado como lo son los océanos, el molibdeno está presente casi exclusivamente como ión MoO_4^{2-} . La concentración promedio de esta especie en los océanos es del orden de los 10 $\mu\text{g/L}$, muy superior a la de Zn(II) (0,5 $\mu\text{g/L}$), Cu(II) (0,1 $\mu\text{g/L}$) o Co(II) (0,003 $\mu\text{g/L}$) [8].

La solubilidad y, concomitantemente, la disponibilidad del Mo para las plantas, está fuertemente gobernada por el pH del suelo y las condiciones de drenado. Así, parece ser que el Mo de suelos húmedos y alcalinos resulta más fácilmente captado, aunque los procesos geoquímicos involucrados en este fenómeno son todavía escasamente comprendidos. Aparentemente, esta mayor facilidad de captación estaría relacionada con la elevada actividad del MoO_4^{2-} en un medio alcalino, así como a su facilidad en formar tiomolibdatos solubles bajo condiciones reductoras (p.ej. MoS_4^{2-} , $\text{MoO}_2\text{S}_2^{2-}$). También se presume que las plantas creciendo en un entorno reductor son capaces de transportar O_2 desde el tallo hacia las raíces y de esta manera los compuestos de Mo localizados en las proximidades de la raíz resultan más oxidados, y por lo tanto más solubles. En suelos ácidos (pH < 5,5) y con bajas concentraciones de Mo y especialmente en presencia de niveles altos de óxidos de hierro, el molibdeno es difícilmente accesible a las plantas. También especies reducidas de Mo y fijadas por ácidos húmicos son prácticamente inaccesibles. Por otro lado, suelos ricos en materia orgánica suelen ceder niveles adecuados del elemento a las plantas, debido a la lenta liberación del mismo de algunas formas unidas a residuos orgánicos [10].

Aunque los requerimientos de molibdeno por parte de las plantas son relativamente bajos, se han reportado deficiencias de Mo para varias especies de plantas y la misma está básicamente originada en la ausencia de nitrato reductasa, enzima que cataliza la etapa inicial de la asimilación de nitrato. Los síntomas visibles de esta deficiencia son variables, dependiendo del tipo de planta y muchas veces resultan en clorosis o en coloración amarillenta de las hojas [6,11].

Está claramente establecido que el molibdeno es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento saludable de las plantas. El MoO_4^{2-} que es la forma predominantemente disponible para las plantas es requerido a niveles muy bajos para formar parte del ya mencionado cofactor Moco y de esta forma participar de variados procesos redox esenciales. Pero el Moco no sólo participa en sistemas enzimáticos sino que está también involucrado en la síntesis del ácido abscísico, desempeñando un papel significativo en los niveles que esta fitohormona alcanza en las células vegetales y consecuentemente está ligado al papel del agua y a las velocidades de transpiración celular así como en las respuestas a situaciones de estrés [12].

De todas formas, los mecanismos que controlan el transporte de Mo en plantas y en todos los organismos superiores permanecen todavía relativamente desconocidos. Inicialmente, sistemas de transporte de este elemento sólo se habían identificado y caracterizado en procariotas (bacterias) y algunas eucariotas de orden inferior [6,12]. Consecuentemente, se había pensado que el molibdato era transportado en forma inespecífica por otro transportador de aniones. Los transportadores de fosfato y sulfato aparecían como los candidatos más probables y adecuados para la captación de Mo con baja afinidad [6,11-13]. Sólo muy recientemente se hizo clara la existencia de transportadores específicos de Mo en algunas especies. La primera evidencia fue encontrada en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que se identificó un transportador de alta afinidad al que se llamó MOT1. Miembros de esta familia han sido caracterizados en *C. reinhardtii* y *Arabidopsis* [14,15]. Subsecuentemente, un segundo tipo de transportador de molibdato, MOT2, no relacionado a MOT1, fue también caracterizado en *C. reinhardtii* e identificado asimismo en animales y humanos [15,16].

2. BIOSÍNTESIS DEL COFACTOR DE MOLIBDENO

La mayor parte de nuestros conocimientos sobre este proceso ha sido obtenido de estudios con bacterias y con plantas y se ha podido establecer que en los organismos superiores esta síntesis involucra tres etapas, mientras que en bacterias existe una etapa adicional [4,6,17].

Durante la primera etapa un derivado de la guanosina, probablemente GTP, es transformado en una pterina libre de azufre, habitualmente denominado precursor Z, que ya posee las características estructurales básicas del esqueleto del Moco (Fig.2), proceso en el que están involucrados sistemas enzimáticos contenidos en dos proteínas (Cnx2 y Cnx3).

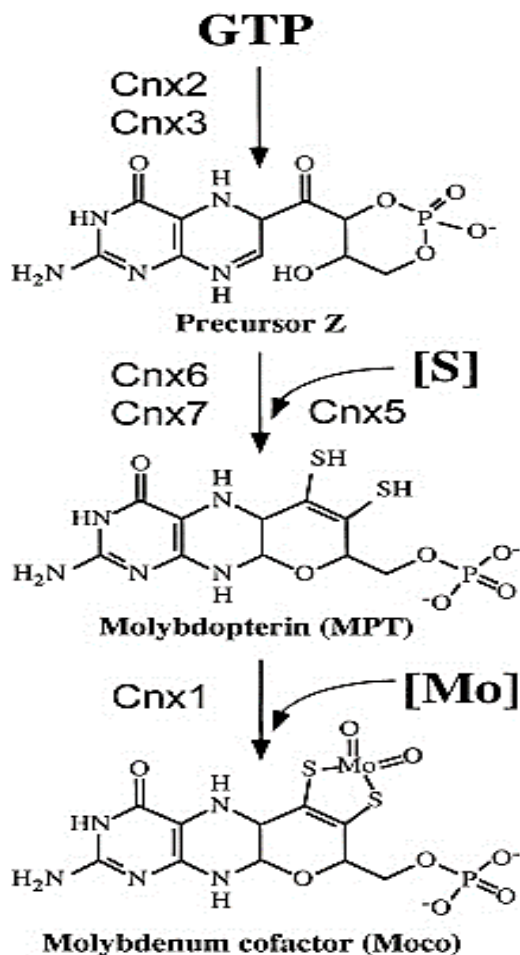


Fig.2. Esquema de las tres etapas que conforman la biosíntesis del Moco.

En la segunda etapa se transfiere azufre al precursor Z, transformándolo en molibdopterina (MPT). Esta reacción está catalizada por la enzima MPT sintasa, un complejo heterotetramérico constituido por dos subunidades pequeñas (Cnx7) y dos más grandes (Cnx6) capaces de convertir de manera estequiométrica al precursor Z en MPT. Una vez que la enzima transfiere los dos átomos de azufre al precursor, la misma es resulfurizada por la sulfurasa Cnx5 de manera de quedar reactivada para el siguiente ciclo de reacción.

En la tercera y última etapa de biosíntesis se incorpora el molibdeno, proceso catalizado por el sistema enzimático contenido en la proteína Cnx1. Un aspecto muy interesante de esta última etapa se da en el hecho de que aparece un ion Cu(II) unido a la función eneditiolato, antes de la inserción del molibdeno, obviamente protegiendo de alguna manera a este sitio altamente reactivo. El origen de este cobre permanece sin aclarar, pero se presume que ya queda incorporado desde el mismo momento de la formación de la función eneditiolato, esto es, al final de la segunda etapa de la biosíntesis [4,9].

3. ENZIMAS DE MOLIBDENO EN PLANTAS

Las cuatro enzimas de molibdeno encontradas en plantas son proteínas homodiméricas y funcionan únicamente como dímeros. Como monómeros resultan inactivas y su dimerización depende de la presencia del Moco. Involucran también cadenas de transporte de electrones, asociadas a diferentes grupos prostéticos (FAD, hemo, cúmulos Fe/S, Moco) usualmente ligadas a dominios separados de la enzima. Estas enzimas de molibdeno catalizan reacciones que involucran la transferencia de dos electrones desde o hacia el sustrato, reacción que es acompañada por la transferencia de un átomo de oxígeno, derivado o incorporado a una molécula de H₂O. En el curso de esta reacción el estado de oxidación del metal varía de Mo(IV) a Mo(VI) [2,7,18].

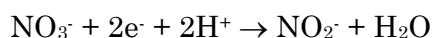
3.1. Nitrato reductasa

El nitrógeno es, junto al dióxido de carbono, el nutriente requerido en mayores cantidades por todo tipo de plantas. En zonas templadas el nitrógeno del suelo limita el crecimiento de las plantas porque su concentración permanece baja debido a pérdidas por lixiviación y consumición microbiana. Solo algunas pocas especies de plantas (especialmente las legumbres) pueden entrar en simbiosis con procariotas que pueden fijar N₂ gaseoso. Por esta razón, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten enfrentar la baja provisión de nitrógeno. Estos incluyen sistemas muy sensibles y selectivos de captación y la posibilidad de crecer con diferentes fuentes de nitrógeno, que involucran el desarrollo de una red de etapas regulatorias en el proceso de asimilación de nitrógeno y su coordinación con la asimilación de carbono, a efectos de mantener un balance nutricional óptimo que asegure su crecimiento.

Las fuentes principales de nitrógeno son el amonio, especialmente en suelos de bajo pH, los amino ácidos consumidos por plantas donde la nitrificación y mineralización están limitadas por razones climáticas (región ártica), y especialmente el nitrato, que es el compuesto de nitrógeno más habitualmente utilizado [19].

El nitrato es captado por las raíces y puede ser reducido y acumulado en las vacuolas o translocado al tallo para su reducción y posterior acumulación en vacuolas. La primera etapa de reducción, es realizada en el citosol por la enzima nitrato reductasa (NR), produciendo nitrito, el que posteriormente es reducido a amoniaco por la nitrito reductasa (NIR). El amonio es fijado y transformado a través del mecanismo GS/GOGAT (glutamino sintetasa/glutamato sintasa) en los amino ácidos glutamina y glutamato, que sirven de sustratos para las reacciones de transaminación que producen todos los otros amino ácidos protéicos [19].

La nitrato reductasa (EC 1.6.6.1) cataliza la siguiente reacción:



la que, como recién se mencionara, constituye la primera etapa en la asimilación de nitrato, un proceso que desempeña un papel clave en la nutrición vegetal. Como también se dijo ya, es una proteína homodimérica con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa por subunidad [6,7,18,20]. La regulación de la asimilación de nitrato forma parte de una compleja red regulatoria que responde a diversas señales medio-ambientales e internas tales como nitrato, luz, dióxido de carbono, fitohormonas y metabolitos del metabolismo de C y N, como forma de coordinar la asimilación de nitrato con otros procesos metabólicos esenciales de las plantas [6,19,20].

Cada monómero de la nitrato reductasa de plantas consiste de tres dominios funcionales: el dominio N-terminal asociado al Moco, un dominio hemo central, y el dominio FAD C-terminal, cada uno de estos grupos prostéticos redox activos presentes en la relación 1:1:1. Estos dominios están conectados entre sí por regiones de articulación sensibles a proteasas. Los tres dominios constituyen tres centros redox que catalizan la transferencia de electrones desde el reductor NAD(P)H via FAD, hemo y Moco al nitrato. El centro catalítico es la unidad que contiene al Moco. El dominio hemo está constituido por un citocromo b_5 [7,21].

El mecanismo de reacción todavía no está claramente comprendido, probablemente debido a la falta de resultados de un estudio estructural completo de una NR de plantas. Toda la información hasta aquí disponible sugiere la presencia de Mo(IV) en el sitio activo, al comienzo del proceso de reducción [3,22,23] y el nitrato probablemente interactúa con el centro metálico de manera unidentada [23].

3.2. Sulfito oxidasa

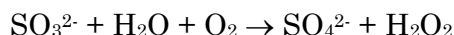
En animales, la sulfito oxidasa (SO) es una enzima muy bien conocida y estudiada pero su existencia en plantas fue motivo de controversias por un largo tiempo [6,18]. Durante el ciclo de asimilación primaria de sulfato en el cloroplasto, el sulfato es reducido, via sulfito, a sulfuro orgánico que es usado para la biosíntesis de cisteína [6].

En animales la sulfito oxidasa (EC 1.8.3.1) es una proteína homodimérica consistente en un dominio hemo N-terminal y un dominio Moco C-terminal que cataliza la reacción:



La existencia de SO en plantas fue demostrada por identificación de una cDNA de *Arabidopsis thaliana* que codifica una sulfito oxidasa funcional de plantas [7,24]. Esta SO aparece ampliamente distribuida y conservada en el reino vegetal. Por otra parte, esta SO de plantas presenta propiedades únicas que son diferentes a las encontradas en sistemas animales; entre otras cosas, no presenta el dominio hemo. De esta manera, entre las eucariotas esta aparece como la más simple de las enzimas de molibdeno y posee un único centro redox.

El oxígeno es el aceptor terminal de electrones para la SO de plantas, resultando reducido a peróxido de hidrógeno [7,24]:



Este hallazgo explica la localización peroxisomal de la enzima la que es diferente a su localización en animales, en los cuales se la encuentra en las mitocondrias. La SO animal se encuentra esencialmente en el hígado, donde cataliza la etapa final en la degradación oxidativa de la cisteína, la metionina y componentes de membrana tales como los sulfátidos [7]. Debido a que la SO de plantas no se encuentra en los cloroplastos, se puede asumir que su función no está relacionada a la asimilación de azufre en cloroplastos teniendo, probablemente, una función en la detoxificación de sulfito.

La estructura cristalina de la enzima, ha sido determinada a una resolución de 2.6 Å y muestra una remarcable conservación estructural entre la enzima de plantas y la de animales [24,26]. La SO de plantas es, como ya se dijo, dimérica con una masa molecular de unos 90 kDa y puede ser dividida en un dominio Moco N-terminal y un dominio C-terminal de dimerización [7]. La comparación de los residuos superficiales conservados y la distribución de cargas entre SO de plantas y animales revela algunas diferencias importantes cerca de las entradas a ambos sitios activos [26].

El análisis estructural también reveló que la unidad Moco está presente en su forma oxidada: en los límites planteados por la resolución estructural, parece correcta su formulación como $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{O}_2(\text{S-cys})$ [25,26].

3.3. Aldehído oxidasa(s)

La aldehído oxidasa (AO, EC 1.2.3.1) es una enzima citoplasmática con un peso molecular aparente de 300 kDa, conteniendo FAD, hierro y Moco como grupos prostéticos, en la relación estequiométrica 4:1:1 [27]. El hierro con actividad redox está presente en forma de un centro de ferredoxina 2Fe/2S, localizado en la parte N-terminal [7].

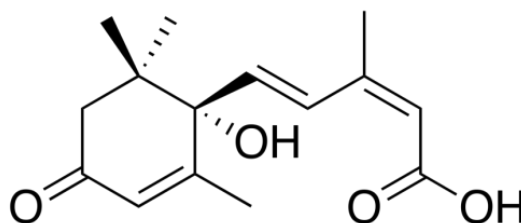


Fig.3. Estructura esquemática del ácido abscísico.

Las diferentes isoformas de la enzima muestran una especificidad de sustrato relativamente amplia para diversos aldehídos incluyendo aldehído

abscísico, indol-3-aldehído, indol-3-acetaldehído y benzaldehído. Diversos estudios han concluido que la AO3 de *Arabidopsis* cataliza la conversión de aldehído abscísico a ácido abscísico (Fig. 3), la etapa final en la biosíntesis de este ácido [28], una fitohormona con importantes funciones en la fisiología vegetal [29].

Otras experiencias recientes relacionan la actividad de la AO con la biosíntesis de la hormona vegetal ácido indol-3-acético (Fig.4), en la que cataliza la conversión de indol-3-acetaldehído a ese ácido [7], que es la más abundante de las auxinas presente en una gran variedad de tejidos vegetales.

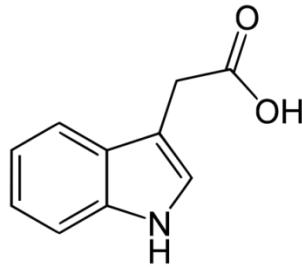


Fig.4. Estructura esquemática del ácido indol-3-acético.

Lo expresado más arriba permite asignar una importante función a las aldehído oxidasas de plantas, por su directa participación en la biosíntesis de fitohormonas, lo que las involucra directamente en el desarrollo de las plantas y su adaptación a situaciones de estrés. Pero su amplia especificidad a sustratos sugiere que podrían estar involucradas en otros procesos metabólicos aparte de la síntesis de fitohormonas. Reacciones de detoxificación y respuesta a patógenos aparecen como buenos candidatos para estas funciones adicionales. Así, recientemente se ha demostrado que las AOs de plantas generan H_2O_2 en respuesta a situaciones de estrés generadas por sequías [7].

3.4. Xantina dehidrogenasa

Las xantinas oxidoreductasas (XORs), xantina dehidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204) y xantina oxidasa (XO, EC 1.2.3.2), son bien conocidas enzimas de molibdeno, conteniendo flavoproteínas de Fe/S. Las enzimas de mamíferos existen originalmente en la forma de dehidrogenasa (XDH) pero pueden ser convertidas en la forma oxidasa (XO) ya sea por oxidación reversible de los residuos de cisteína de la molécula de proteína o en forma irreversible por proteólisis. La forma activa de la enzima es homodimérica con una masa molecular de 290 kDa. Cada subunidad contiene un grupo Moco, dos centros $2Fe/2S$ no idénticos y un cofactor FAD [30].

En plantas se ha identificado la XDH pero no la forma oxidasa, en una variedad de tejidos y organismos. La enzima pudo ser purificada de hojas de trigo y de legumbres y mostrando una elevada afinidad para xantina e hipoxantina como sustratos, pero también aceptando purinas y pterinas, con menor eficiencia. La xantina dehidrogenasa y la aldehído oxidasa muestran secuencias de amino ácidos y

ordenamiento de dominios muy similares, sugiriendo que ambas se han desarrollado a partir de un progenitor común [7]. La XDH de plantas es homodimérica con una masa molecular de unos 300 kDa.

Aparte de su participación en la degradación de purinas, se supone que la XDH desempeña otros papeles en procesos celulares importantes: i) interacciones planta-patógeno entre hongos fitopatogénicos con legumbres y cereales; ii) muerte celular asociada con respuestas hipersensitivas, y iii) senescencia natural [7]. Todos estos procesos requieren la formación de especies reactivas de oxígeno, suponiéndose que la XDH es capaz de generar aniones superóxido y/o peróxido de hidrógeno [7,31].

REFERENCIAS

- [1] R.W. Hay, *Bio-Inorganic Chemistry*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1984.
- [2] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [3] C.D. Garner, R. Banham, S.J. Cooper, E.S. Davies & L.J. Stewart, Enzymes and Proteins Containing Molybdenum and Tungsten. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 1023-1090.
- [4] R.R. Mendel, *Dalton Transact.* **2005**: 3404.
- [5] C.M. Cordas & J.J.G. Moura, *Coord. Chem. Rev.* **394**, 53 (2019).
- [6] R.R. Mendel & R. Hänsch, *J. Exper. Bot.* **53**, 1689 (2002).
- [7] G. Schwarz & R.R. Mendel, *Ann. Rev. Plant Biol.* **57**, 623 (2006).
- [8] E.I. Stiefel, The Biogeochemistry of Molybdenum and Tungsten. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 39, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 1-29.
- [9] R.R. Mendel & T. Kruse, *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1568 (2012).
- [10] A. Kabata-Pendias & H. Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd Edit., CRC-Press, Boca Raton, 2001.
- [11] W. Zimmer & R.R. Mendel, *Plant Biol.* **1**, 160 (1999).
- [12] B.N. Kaiser, K.L. Gridley, J. Ngairé Brady, T. Phillips & S.D. Tyerman, *Ann. Bot.* **96**, 745 (2005).
- [13] F. Bittner, *Front. Plant Sci.* **5**, art.28 (2014).
- [14] M. Tejada-Jiménez, A. Llamas, E. Sanz-Luque, A. Galván & E. Fernández, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20126 (2007).
- [15] M. Tejada-Jiménez, A. Chamizo-Ampudia, A. Galván, E. Fernández & A. Llamas, *Metallomics* **5**, 1191 (2013).
- [16] M. Tejada-Jiménez, A. Galván & E. Fernández, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6420 (2011).
- [17] R.R. Mendel & G. Schwarz, Biosynthesis and Molecular Biology of the Molybdenum Cofactor (Moco). En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 39, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 317-368.
- [18] R.R. Mendel & G. Schwarz, *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 33 (1999).
- [19] R. Tischner, *Plant, Cell, Environm.* **23**, 1005 (2000)."
- [20] W.H. Campbell, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 227 (1999).
- [21] P. Turano & Y. Li, Iron in Heme and Related Proteins. En: *Handbook of*

- Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 269-356.
- [22] L. Skipper, W.H. Campbell, J.A. Mertens & J.D. Lowe, *J. Biol. Chem.* **276**, 26995 (2001).
- [23] P.M.H. Kroneck & D.J. Abt, Molybdenum in Nitrate Reductase and Nitrite Oxidoreductase. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 39, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 369-403.
- [24] T. Eilers, G. Schwarz, H. Brinkmann, C. Witt, T. Richter, J. Nieder, B. Koch, R. Hille, R. Hänsch & R.R. Mendel, *J. Biol. Chem.* **276**, 46989 (2001).
- [25] R. Hille, *Structure* **11**, 1189 (2003).
- [26] N. Schrader, K. Fischer, K. Theis, R.R. Mendel, G. Schwarz & C. Kisker, *Structure* **11**, 1251 (2003).
- [27] T. Koshiba, E. Saito, N. Ono, N. Yamamoto & M. Sato, *Plant Physiol.* **110**, 781 (1996).
- [28] M. Seo & T. Koshiba, *Trends Plant Sci.* **7**, 41 (2002).
- [29] S.R. Cutler, P.L. Rodríguez, R.R. Finkelstein & S.M. Abrams, *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**, 651 (2010).
- [30] T. Nishino & K. Okamoto, *J. Inorg. Biochem.* **82**, 43 (2000).
- [31] G.M. Pastori & L.A. del Río, *Plant Physiol.* **112**, 411 (1997).

CAPITULO 7

METALOENZIMAS DEPENDIENTES DE VANADIO

INTRODUCCIÓN

La esencialidad, biodistribución y toxicología del vanadio, así como su actividad biológica y farmacológica, han sido temas de notable interés y desarrollo durante las últimas décadas [1-5]. Aunque se han sugerido numerosas funciones biológicas y fisiológicas para este elemento, y a pesar de la enorme cantidad de información y conocimientos que ya se han acumulado en torno a estos aspectos, el vanadio no tiene aún un papel claramente definido para las formas más desarrolladas de vida [1,2,6-9] aunque ya existen crecientes evidencias que avalan la idea de su posible esencialidad para todas las formas de vida [2,10].

Por otra parte, también es conocido el hecho de que importantes cantidades de vanadio están presentes en petróleos, carbones y asfaltenos [11-13] y la acumulación de vanadio por tunicados fue descripta a principios del siglo pasado e investigada reiteradamente desde entonces [4,14,15]. Posteriormente, la presencia de vanadio fue también confirmada en diversas especies de hongos [16] pero sólo más recientemente un importante número de descubrimientos aportó las primeras evidencias sólidas para ciertas funciones biológicas bien definidas para este elemento. Estos descubrimientos incluyen a las así llamadas nitrogenasas alternativas, en las cuales el vanadio reemplaza al molibdeno en el cofactor FeMoco de ciertas especies de *Azotobacter* y la caracterización de varias haloperoxidasas dependientes de vanadio, descriptas en ciertas algas, hongos y líquenes [4,17].

En la corteza terrestre la abundancia del vanadio se ha estimado en 136 ppm, o sea dos veces más que la de cobre, 10 veces más que la de plomo y unas 100 veces más que las de molibdeno y tungsteno [18]. En las aguas de mar, y con una concentración promedio de 30 nM, el vanadio es el segundo metal de transición más abundante, sólo superado por Mo (100 nM) y claramente más abundante que el Fe ($\leq 0,7$ nM) [9,19]. La especie mayoritariamente presente bajo condiciones fisiológicas y aeróbicas es el par ácido-base H_2VO_4/HVO_4^{2-} ($pK = 8,1$), mientras que en muchos sistemas biológicos el vanadato(V) y diversas especies de oxidovanadio(IV) suelen estar presentes simultáneamente [2,7,8].

Al igual que el molibdeno, el vanadio ocupa una posición excepcional entre los bioelementos debido a que tanto sus formas aniónicas y catiónicas pueden participar de procesos biológicos. En sus formas aniónicas (vanadatos (V)), muestra un fuerte paralelismo con los fosfatos, pero en sus formas catiónicas – en sistemas biológicos usualmente como VO^{2+} - se comporta como un metal de transición típico que compite con otros cationes metálicos por la coordinación a ligandos o compuestos biogénicos. Esta dualidad, juntamente a la facilidad con la que puede cambiar de estados de oxidación y de esferas de coordinación, podrían ser las responsables del comportamiento sumamente peculiar de este biometal [2,7,8,20].

1. VANADIO EN PLANTAS

1.1. Aspectos generales

Si bien hasta el presente no ha sido identificada ninguna metaloenzima dependiente de vanadio en plantas, se sabe que este elemento está presente en muy bajas concentraciones en la mayoría de ellas [21-23], incluso ya en 1950 se hizo la observación de que bajas concentraciones de vanadio podrían tener un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas [21].

De todas maneras, el vanadio ocurre siempre en muy bajas concentraciones, usualmente en niveles de unos pocos mg/Kg de masa seca de la planta y dentro de una determinada especie, las variaciones de estos niveles pueden estar influidas por los niveles de V en el suelo, la acidez del suelo y las condiciones de crecimiento. Las concentraciones medias determinadas en plantas superiores son del orden de 0,16 mg/Kg de masa fresca y 1 mg/Kg de masa seca [21]. En plantas acuáticas se han determinado concentraciones mayores, del orden 0,4-80 mg/Kg. También los musgos suelen acumular V en concentraciones del orden de 10 mg/Kg [22]. La acumulación excepcional del elemento por parte de una familia especial de hongos (*Amanitae*) será discutida en la Secc. 2 de este capítulo.

Si bien la esencialidad del vanadio para las plantas sigue siendo motivo de controversias [21,24,25], algunos autores lo han clasificado como micronutriente esencial [26] y en algunos casos se han aportado pruebas de una posible esencialidad [27]. También se ha demostrado que ciertas enzimas vegetales son estimuladas por la presencia de bajas concentraciones de vanadio (p.ej., en el caso de la remolacha azucarera, *Beta vulgaris*, L) [28] y en otros casos (p. ej. en el pimiento (*Capsicum annuum* L) bajas concentraciones del elemento han mostrado un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como sobre la concentración de amino ácidos y azúcares totales [23]. Empero, en otros casos, el crecimiento de las raíces y el desarrollo general de la planta pueden ser afectadas por el elemento [25].

1.2. Captación y transporte de vanadio en las plantas

La captación de vanadio por plantas superiores ha sido investigada por diferentes autores [29-31]. El vanadio es capturado por las plantas con relativa facilidad, a través de las raíces, especialmente en suelos ácidos y, aparentemente, es absorbido en forma pasiva, como lo sugiere la función lineal de su concentración en plantas en función de su concentración en suelos [30,32]. La captación de vanadio parece ser máxima a valores de pH alrededor de 4, bajando luego con el aumento de pH y manteniéndose constante a valores de pH entre 5 y 8, para luego ir disminuyendo nuevamente [29]. También se ha observado que durante la absorción de vanadio ocurre la bioreducción de vanadio(V) a VO^{2+} en las raíces y esto ha quedado claramente confirmado a través de estudios por espectroscopia ESR [30], habiéndose sugerido también que este proceso de reducción podría involucrar polisacáridos de las paredes celulares, explicando asimismo la posterior quelación y fuerte retención del catión oxidovanadio(IV) en las raíces [30]. Debido a esta retención, solo una muy pequeña fracción del vanadio captado por la raíz es

translocada luego hacia las partes superiores de la planta [33]. Efectivamente, y para muy diversas plantas, varios autores han demostrado que la acumulación de vanadio siempre es mayor en las raíces que en los tallos, hojas o frutos [30,33,34]. Asimismo, se ha demostrado que la presencia de Ca(II) parece tener un efecto importante en la acumulación y transporte de los aniones vanadato [29,31].

Todavía no se sabe nada acerca de los mecanismos de transporte durante la translocación así como sobre la forma en la que el vanadio quedaría retenido en los diferentes tejidos de la planta.

2. VANADIO EN HONGOS

2.1. Aspectos generales

Dentro de las diferentes familias de hongos los acumuladores más importantes de vanadio son las especies del género *Amanitae*. En particular, la *Amanita muscaria* (Fig.1) muestra una capacidad sorprendentemente elevada para la acumulación de este elemento, la que fue reportada inicialmente por Ter Meulen ya en 1931 [35].



Fig.1. Tres ejemplares de *Amanita muscaria*.

Para esta especie se han reportado concentraciones de vanadio de hasta 325 mg/Kg de masa seca [36], valores que están claramente muy por encima de las cifras promedio mencionadas más arriba para plantas. Otras especies de *Amanita*, tales como *A. velatipes*, *A. wellsii* y *A. regalis* también muestran valores muy altos de vanadio [16,37,38]. Valores algo más bajos se encontraron en *A. citrina*, *A. hyperborea* y *A. parvicolvata* [16].

Se ha determinado que la cantidad de vanadio acumulada es independiente de la edad del hongo, así como del contenido en vanadio del suelo en el cual la especie se desarrolla. El vanadio se encuentra esencialmente distribuido en forma igualitaria, en el tallo, la cutícula y el sombrero del hongo [21,36,37,39-41].

En la gran mayoría de las otras familias de hongos, cuyos contenidos en vanadio han sido estudiados, se pudo determinar que la concentración de este elemento es la habitualmente encontrada en plantas, es decir del orden de algunos pocos mg por Kg de masa seca [21].

2.2. Amavadina: el complejo de vanadio presente en las *Amanitae*

Una vez que quedó claramente establecido que el vanadio es acumulado por las *Amanitae*, resultaba interesante investigar la forma en que el metal estaba presente en los hongos y en qué estado de oxidación se encontraba. Esto fue logrado inicialmente en 1972, cuando Bayer y Kneifel lograron aislar un compuesto de vanadio de una variedad de *Amanita muscaria*, recogida en la Selva Negra (Alemania). Lo denominaron “amavadina” y demostraron que todo el vanadio presente en el hongo estaba en esa forma [16,42]. El compuesto fue obtenido por un proceso de extracción relativamente complejo, incluyendo la extracción con metanol seguida de su aislamiento a través de una serie de procesos cromatográficos utilizando celulosa, *Sephadex* y resinas de intercambio iónico.

La amavadina se obtiene como un polvo de color azul pálido y la determinación osmométrica de su peso molecular reveló que se trata de un compuesto de bajo peso molecular, del orden de los 420 Da [16]. Dado que los espectros de ESR antes y después del aislamiento resultan idénticos, es evidente que la amavadina no está ligada a ninguna proteína en estado nativo, en las células del hongo. Por otro lado, estos espectros, junto con los de IR y UV, muestran claramente la presencia de vanadio (IV) [16,43].

A través de una serie de elegantes estudios químicos Kneifel y Bayer demostraron que el pro-ligando para el vanadio en la hemovanadina es el ácido N-hidroxiimino- α,α' -dipropiónico (Fig.2) [16,44].

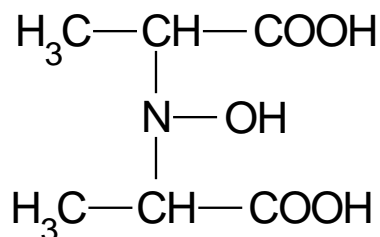


Fig.2. Estructura esquemática del ácido N- hidroxiimino- α,α' -dipropiónico.

Por otra parte, y en base a diversos estudios espectroscópicos la primera estructura propuesta involucraba al catión oxidovanadio(IV), VO^{2+} , coordinado a dos ligandos bidentados, como se muestra en la Fig. 3, con la eventual participación de una molécula de H_2O ocupando la sexta posición de coordinación [16,41,44].

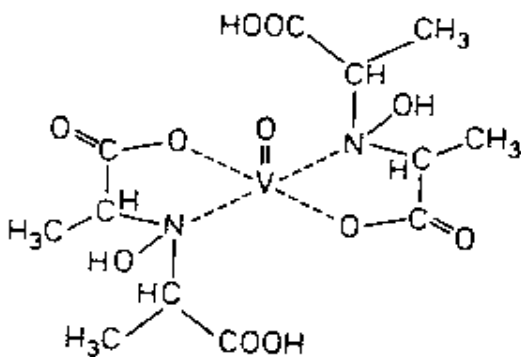


Fig.3. Estructura inicialmente propuesta para la amavadina.

El pro-ligando esquematizado en la Fig.2 no era conocido antes de su identificación en la amavadina. Contiene dos átomos de carbono asimétricos y puede existir en forma de los isómeros L, D y *meso*. Los tres isómeros pudieron ser sintetizados y por reacción del isómero L con VO_4 fue posible obtener una muestra de amavadina sintética. Este complejo sintético y el compuesto natural mostraron una excelente concordancia tanto en sus datos analíticos como espectroscópicos (IR, ESR, UV y dicroísmo circular) [16,45].

Sin embargo, a medida que las investigaciones sobre amavadina y sistemas relacionados fueron avanzando, la validez de la estructura propuesta en la Fig. 3 empezó a ser crecientemente cuestionada. Nuevos estudios por resonancia paramagnética electrónica, así como estudios de las constantes de estabilidad del pro-ligando y otros ligandos policarboxílicos relacionados, con VO^{2+} y diversos otros cationes mostraron claramente la excepcional estabilidad del complejo de vanadio con el ácido N-hidroxiimino- α,α' -dipropionico ($\log \beta_2 = 23$) [16,40]. La comparación de ligandos imino e hidroxiimino muestra que a través de una pequeña modificación en el ligando, esto es la inserción de un átomo de oxígeno en el compuesto imino, la naturaleza ha logrado implementar una elevada y muy eficiente selectividad para vanadio.

Lamentablemente, hasta el presente la amavadina no pudo ser investigada por métodos difractométricos de monocristal, debido a la imposibilidad de disponer de muestras cristalinas adecuadas. Sin embargo, experimentos de difracción de rayos X de ángulo elevado mostraron que la distancia metal-ligando más corta es del orden de 1,9 Å, excluyendo de esta manera la presencia de un doble enlace $\text{V}=\text{O}$, cuya distancia $\text{V}-\text{O}$ es usualmente del orden de 1.6 Å [46]. En base a estos nuevos resultados se propuso, finalmente, un nuevo modelo estructural, mostrado en la Fig. 4 [16,46].

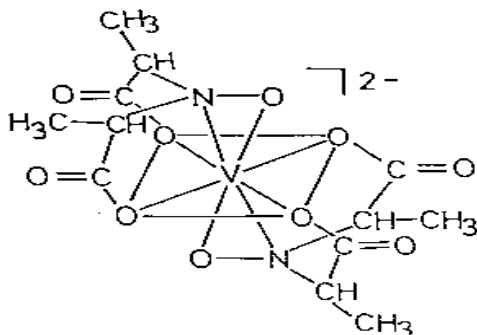


Fig. 4. Estructura de la amavadina.

Como puede verse, este modelo estructural involucra dos grupos $\eta^2\text{-N,O}$ y cuatro grupos carboxilato monodentados, generando una muy interesante e inusual coordinación ocho y geometría dodecaédrica para el complejo de vanadio(IV) que, también sorprendentemente, es un complejo en este estado de oxidación sin grupo oxo. Indudablemente, este grupo es removido para permitir la generación de un complejo con número de coordinación mayor, lo que aumenta su estabilidad y en el cual los grupos N-hidroxo de los ligandos están ionizados para unirse al metal. De hecho, el complejo generado aparece como el complejo más estable de vanadio(IV) hasta ahora conocido [40].

Un estudio EXAFS de la amavadina mostró claramente la presencia de 6 oxígenos a 2.01 Å, 2 nitrógenos a 2.04 Å, 8 carbonos a 2.94 Å y otros 4 oxígenos a 4.0 Å del centro metálico y ninguna indicación de señal consistente con la contribución de un grupo V=O [47].

Tanto la amavadina como sus análogos sintéticos muestran una cupla redox reversible de un electrón [$\text{V}^{\text{IV}}/\text{V}^{\text{V}}$], cuyo potencial es fuertemente dependiente del solvente. En H_2O y con un electrodo de Pt, el potencial es de + 0,53 V (vs. electrodo de calomel saturado) [48]. La reversibilidad perfecta es de fundamental importancia en relación a las posibles funciones de la amavadina, dado que se ha sugerido que durante sus procesos redox, ocurriría la transferencia de un único electrón, sin reordenamiento de ligandos [40,41,47].

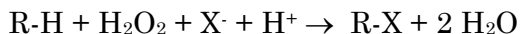
Una vez que ha quedado satisfactoriamente resuelto el tema estructural, resta saber cuál es la función de la amavadina, tema que aún no está totalmente clarificado. Sin embargo, todos los datos disponibles, sugieren que su papel es el de un sistema de transferencia de electrones. Su potencial redox está claramente en el rango de los agentes redox biológicos, particularmente en el de las metaloproteínas de cobre cuyo potencial redox está siempre en la región de oxidación y en el intervalo de 0,2 – 0,8 V y están usualmente involucradas en reacciones en las que el O_2 se ubica en la etapa terminal de oxidación [49]. Al igual que en el cobre ($\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^{\text{II}}$), el centro de vanadio en la amavadina presenta sólo dos estados de oxidación estables ($\text{V}^{\text{IV}}/\text{V}^{\text{V}}$) y su esfera de coordinación no resulta fácilmente alterada, haciendo imperativo el mecanismo de reacción por esfera externa. Estas comparaciones

sugieren que la amavadina podría ser el componente de una oxidasa primitiva, que ha sido reemplazada durante los procesos de evolución por oxidasas más efectivas, dependientes de cobre [40]. La abundancia del vanadio en las aguas de mar, su distribución natural y su carácter anfotérico (aniónico como vanadato, catiónico en la forma no-oxo, oxo y dioxovanadio), y la facilidad con la que puede cambiar de estados de oxidación en condiciones fisiológicas sugieren que este elemento puede haber sido utilizado más intensivamente como metal esencial en las primeras etapas de la evolución [19].

Más recientemente se ha sugerido también que la amavadina podría actuar como una peroxidasa que cataliza la oxidación de ciertos tioles a disulfuros o, eventualmente, en ausencia de tioles, como una catalasa que promueve la descomposición de H_2O_2 generado en numerosos procesos biológicos [50,51]. Asimismo, se ha enfatizado que el hecho de que los grupos carboxilato de la amavadina muestren una cierta capacidad para ligarse a cationes oxofílicos como el Ca^{2+} , podría ser relevante para la forma en que es acumulada en los tejidos del hongo o para generar alguna otra función biológica, como estabilizador de estructuras o captación y transferencia de cationes [41].

3. HALOPEROXIDASAS DEPENDIENTES DE VANADIO

Las haloperoxidasas son un grupo especial de peroxidadas que catalizan la halogenación de diferentes sustratos, involucrando al H_2O_2 [52,53]. Las haloperoxidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la Naturaleza y son capaces de catalizar una variedad de reacciones, de acuerdo a la siguiente ecuación general:



Históricamente, las haloperoxidasas han sido nombradas en base al anión haluro X^\cdot más electronegativo que son capaces de oxidar, esto es:

- cloroperoxidasas: Cl^\cdot , Br^\cdot , I^\cdot
- bromoperoxidasas: Br^\cdot , I^\cdot
- iodoperoxidasas: I^\cdot

Obviamente, no se conocen fluoroperoxidasas, ya que el agua oxigenada no tiene la capacidad oxidativa necesaria para oxidar al anión fluoruro.

Aunque las peroxidadas se conocen desde hace más de cien años, el descubrimiento de peroxidadas halogenantes ocurrió mucho más recientemente. Hacia 1950 solamente se conocían tres enzimas de este tipo: la peroxidasa de rábano rústico, aislada de la raíz de esa planta, la lactoperoxidasa de leche, saliva y lágrimas y la mieloperoxidasa presente en los glóbulos blancos de la sangre. Tres sistemas adicionales (peroxidasa tiroidea, de la glándula tiroidea, una cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* y una eosinil peroxidasa, presente también en los glóbulos blancos de la sangre) fueron identificados unos diez años más tarde. Sin embargo, sólo durante los pasados cuarenta años la amplia ocurrencia de haloperoxidasas se hizo claramente evidente. Un gran número de bromo- y de

iodoperoxidasas fueron encontradas en algas verdes, marrones y rojas y un número creciente de cloroperoxidasas pudo ser aislada de diferentes especies de hongos [53].

En muchos de los casos hasta ahora investigados el sitio activo de esas enzimas está constituido por hierro, presente generalmente como ferriprotoporfirina IX (ver Cap. 2) [53,54]. La presencia de vanadio en el sitio activo de algunas de estas enzimas halogenantes fue descubierta bastante después y será discutida en detalle en esta Sección.

Un número importante de haloperoxidasas dependientes de vanadio ha sido encontrada en algas marinas. Bromo- y iodoperoxidasas han sido identificadas en faeofíceas (algas marrones o pardas), incluyendo Fucaceae, Sargassaceae, Durvilleaceae, Hormoseiraceae, Laminariales, Laminariaceae, Lessoniaceae, Phyllariaceae, Chordariales y Dictyotales; rodófitas (algas rojas) y clorófitas (algas verdes). Otra bromoperoxidasa fue identificada en el líquen *Xanthoria parietina* mientras que cloroperoxidasas dependientes de vanadio fueron encontradas en los hongos *Curvularia inaequalis* y *Embellesis didymospora* [17,55].

Un avance significativo para el mejor conocimiento de las características de estos sistemas enzimáticos, se produjo en 1996 cuando se determinó por vez primera, a través de métodos difractométricos, la estructura del complejo de vanadio presente en la cloroperoxidasa del hongo *Curvularia inaequalis* [56]. Otro aspecto remarcable, es que las otras dos haloperoxidasas dependientes de vanadio cuyas estructuras fueron caracterizadas estructuralmente (una bromoperoxidasa del alga marrón *Ascophyllum nodosum* [57] y otra del alga roja *Corallina officinalis* [58]) (Fig. 5) muestran una alta homología en la secuencia de amino ácidos en las regiones cercanas a sus sitios activos y presentan sitios activos prácticamente idénticos entre ellos y con la cloroperoxidasa de *C. inaequalis*.

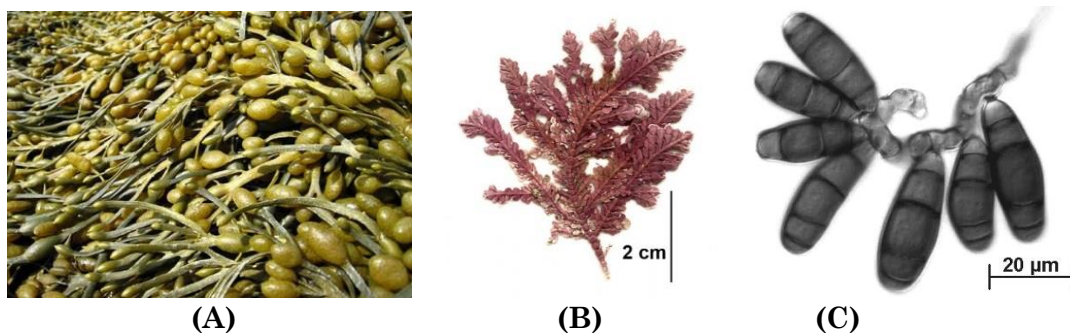


Fig.5. Organismos conteniendo haloperoxidasas dependientes de vanadio, cuyos sitios activos se determinaron estructuralmente: *Ascophyllum nodosum* (A); *Corallina officinalis* (B) y *Curvularia inaequalis* (C).

La estructura del sitio activo de esas haloperoxidasas se esquematiza en la Fig. 6. El vanadio(V) se encuentra en un entorno trigonal bipiramidal, unido al átomo de N de un residuo de histidina (a través del cual el sitio queda unido a la proteína) en una de las posiciones axiales y a un OH⁻ o H₂O (dependiendo del valor del pH) en la otra, mientras que las posiciones ecuatoriales están ocupadas por tres

átomos de oxígeno. El OH/H₂O apical está unido por un enlace de puente de hidrógeno a una histidina distal y hay puentes de H adicionales a los átomos de O ecuatoriales, uniendo el centro activo a cadenas de amino ácidos laterales de la matriz proteica.

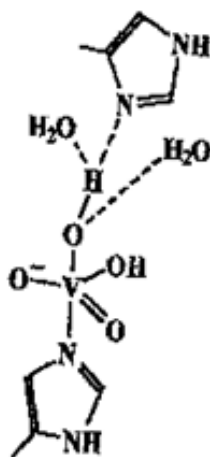


Fig.6. Sitio activo de las haloperoxidasas dependientes de vanadio

Las haloperoxidasas dependientes de vanadio catalizan la oxidación por dos electrones de un ion haluro con H₂O₂, via un mecanismo de ácido de Lewis, dado que un mecanismo redox involucrando la oxidación inicial del centro metálico puede ser excluido debido a que el vanadio ya está presente en su estado de oxidación más elevado y diversos estudios espectroscópicos sugieren que permanece en este estado durante todo el ciclo catalítico.

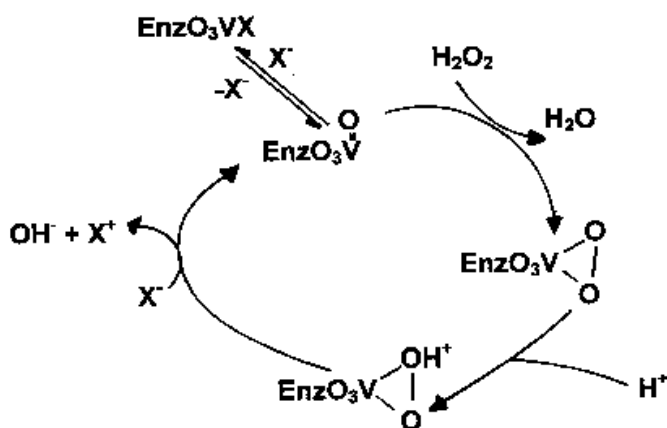


Fig.7. Mecanismo propuesto para la acción catalítica de las haloperoxidasas dependientes de vanadio (oxidación de haluros por H₂O₂).

Como se muestra en la Fig. 7. el mecanismo de reacción incluye una secuencia de pasos, con la incorporación inicial del agua oxigenada [59]. Después de

la coordinación del peroxo al vanadio de la enzima nativa, la geometría cambia de trigonal bipyramidal a un ordenamiento estructural intermedio entre trigonal bipyramidal y piramidal cuadrado [2].

La oxidación del haluro parece ocurrir a través de un ataque nucleofílico del mismo sobre el peróxido ligado. Las velocidades de oxidación del haluro son fuertemente dependientes del pH y la protonación del complejo peroxovanadato parece ser esencial para la actividad catalítica.

La forma oxidada del haluro, está indicada como "X⁺", aunque la naturaleza exacta de este intermediario halogenante no está todavía claramente determinada y probablemente tenga la forma de HOX, X₂ o X₃, dependiendo del haluro, su concentración en la solución y el pH del medio.

Estudios cinéticos apoyan la idea de que el ataque nucleofílico del haluro sobre el peroxovanadato es la etapa determinante de la velocidad de reacción, como se muestra en Fig. 8. Dependiendo de las condiciones de reacción, la especie "X⁺" puede halogenar un sustrato orgánico o reaccionar con un equivalente adicional de H₂O₂ para generar oxígeno singlete (actividad de catalasa). La formación de ¹O₂ se ve favorecida en ausencia de sustrato orgánico o a valores más altos de pH [59,60].

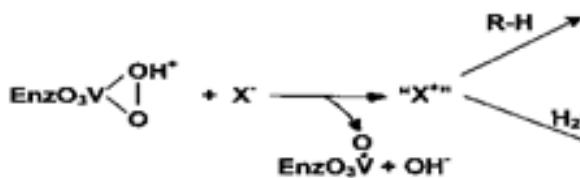


Fig.8. Mecanismo propuesto para la generación de sustratos halogenados y oxígeno singlete, involucrando ataque nucleofílico del haluro sobre el sitio de peroxovanadato activo.

El pH óptimo al cual todas estas enzimas operan, parece estar ubicado entre 5,5 y 7,2 [61] y además el pH debe ser más bajo cuanto más electronegativo es el haluro a oxidar [4].

Finalmente, un aspecto importante e interesante de comentar es el hecho de que una gran cantidad y variedad de productos halogenados que se encuentran en los océanos se originan a partir de la actividad de estas haloperoxidasas [2,19,62]. Entre los sustratos más comunes deben mencionarse los tres iones haluro cuya concentración promedio en las aguas de mar es de 0,47 μM (ioduro), 0,82 mM (bromuro) y 0,55 M (cloruro) [62]. Otros sustratos sobre los que actúan las haloperoxidasas que se deben mencionar son los pseudohaluros cianuro y tiocianato y varias moléculas orgánicas, entre ellas los sulfuros R₂S que se oxidan a sulfóxidos [2,62].

Los halometanos monosustituidos se generan preferencialmente por ataque nucleofílico del ión haluro por el grupo CH₃⁺ de la S-adenosilmetionina [62],

uno de los tres agentes biometilantes naturales más importantes [52], esto es sin la participación de haloperoxidasas, y tal como se muestra en la Fig. 9.

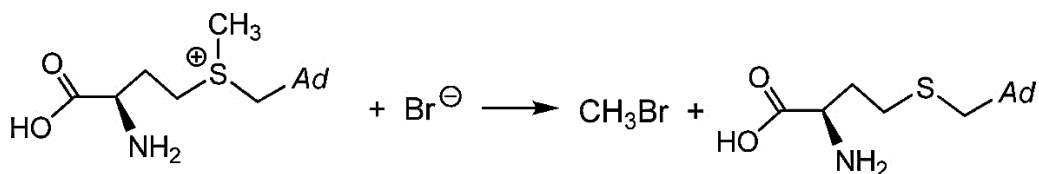
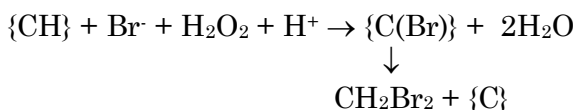


Fig.9. Generación de bromometano a partir de bromuro y S-adenosilmetionina (*Ad* = adenosina).

En cambio, la síntesis de halometanos di y tri substituidos (incluyendo heterosubstituidos tales como CHBr_2I y CHBr_2Cl) es efectivamente catalizada por haloperoxidasas con la utilización de materia orgánica reactiva disuelta en las aguas, $\{\text{CH}\}$, y H_2O_2 . La $\{\text{CH}\}$ puede ser de origen externo, pero también producida como sub-producto fotosintético [62]. Y la reacción para la formación de dibromo metano podría escribirse, entonces, de la siguiente manera:



Obviamente, algunas de estas reacciones naturales de síntesis pueden tener un fuerte impacto ambiental ya que los halometanos contribuyen a la degradación del ozono y, consecuentemente, al balance global de esta importante especie [2,62]. Piénsese por ejemplo, que el bromoformo producido por las algas marinas es del orden de las 10^4 toneladas anuales, casi comparable a la producción antropogénica de este haluro [2].

REFERENCIAS

- [1] H.Sigel & A. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 31: Vanadium and its Role in Life, Marcel Dekker, New York, 1995.
- [2] D. Rehder, *Bioinorganic Vanadium Chemistry*, J. Wiley, Chichester, 2008.
- [3] N.D. Chasteen (Ed.), *Vanadium in Biological Systems*, Kluwer Academic Publish., Dordrecht, 1990.
- [4] D.C. Crans, J.J. Smee, E. Gaidamauskas & L. Yang, *Chem. Rev.* **104**, 849 (2004).
- [5] E.J. Baran, *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat.* **69**, 84 (2017).
- [6] E.J. Baran, *Anales Soc. Científ. Argent.* **288**, 61 (1998).
- [7] E.J. Baran, *J. Inorg. Biochem.* **80**, 1 (2000).
- [8] E.J. Baran, *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 678 (2003).
- [9] D. Rehder, *Inorg. Chem. Comm.* **6**, 604 (2003).
- [10] F.H. Nielsen & E.O.Uthus, The Essentiality and Metabolism of Vanadium. En: *Vanadium in Biological Systems*, N.D. Chasteen (Ed.), Kluwer Academic Publish., Dordrecht, 1990, pp.51-62.
- [11] D.C. Crans, S.S. Amin & A.D. Keramidias, Chemistry of Relevance to Vanadium in the Environment. En: *Vanadium in the Environment*, J.O. Nriagu

- (Ed.), J. Wiley, New York, 1998, Part I, pp. 73-95.
- [12] V. Baran & E.J. Baran, *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fís. Nat.* **54**, 171 (2002).
- [13] W. Schlesinger, E.M. Klein & A. Vengosha, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E11092 (2017).
- [14] K. Kustin, G.C. McLeod, T.R. Gilbert & L.B.R. Briggs, *Struct. Bonding* **53**, 139 (1983).
- [15] H. Michibata & H. Sakurai, Vanadium in Ascidians. En: *Vanadium in Biological Systems*, N.D. Chasteen (Ed.), Kluwer Academic Publish., Dordrecht, 1990, pp.153-171.
- [16] E. Bayer, Amavadin, the Vanadium Compound of *Amanitae*. En: *Metal Ions in Biological Systems*, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Vol. 31, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 407-421.
- [17] A. Butler, J.N. Carter & M.T. Simpson. Vanadium in Proteins and Enzymes. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 153-179.
- [18] N.N. Greenwood & A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press, Oxford, 1984.
- [19] D. Rehder, *Org. Biomol. Chem.* **6**, 957 (2008).
- [20] D. Rehder, *Angew. Chem. Int. Edit.* **30**, 148 (1991).
- [21] D. Bertrand, *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* **94**, 403 (1950).
- [22] World Health Organization. *Environmental Health Criteria 81: Vanadium*, Geneva, 1988, pp. 27-29.
- [23] A. García-Jiménez, L.I. Trejo-Téllez, D. Guillén-Sánchez, F.C. Gómez-Merino, *Plos One* **13**, 0201908 (2018).
- [24] R.M. Welch & E.W.D. Huffman,jr., *Plant Physiol.* **52**, 183 (1973).
- [25] A. Olness, R. Gesch, F. Forcella, D. Archer & J. Rinke, *Ind. Crops Prod.* **21**, 165 (2005).
- [26] M.E. Farago & A. Mehra, Analytical Techniques for Plant Analysis. En: *Plants and the Chemical Elements*, M.E. Farago (Ed.),Verlag Chemie, Weinheim, 1994, pp. 241-264.
- [27] D.I. Arnon & G. Wessel, *Nature* **172**, 1039 (1953).
- [28] B. Sing & D.J. Wort, *Plant Physiol.* **44**, 1321 (1969).
- [29] R.M. Welch, *Plant Physiol.* **51**, 828 (1973).
- [30] B.G. Morrel, N.W. Lepp & D.A. Phipps, *Environm. Geochem. Health* **8**, 14 (1986).
- [31] A. Mehra & M.E. Farago, Metal Ions in Plant Nutrition. En: *Plants and the Chemical Elements*, M.E. Farago (Ed.),Verlag Chemie, Weinheim, 1994, pp. 32-66.
- [32] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soil and Plants*, 4th. Edit., CRC-Press, Boca Raton, 2011.
- [33] A. Roychoudhury, *SF J. Agric. Crop Manag.* **1**, 1010 (2020).
- [34] N. Vachirapatama, Y. Jirakiattikul, G. Dicinoski, A.T. Townsend & P.R. Haddad, *Songklanakarín J. Sci. Technol.* **33**, 255 (2011).
- [35] H. Ter Meulen, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **50**, 491 (1931).
- [36] H.U.Meisch, J.A. Schmitt & W. Reinle, *Z. Naturforsch.* **33c**, 1 (1978).
- [37] H.U. Meisch, W. Reinle & J.A. Schmitt, *Naturwissenschaften* **66**, 620 (1979).
- [38] E.H. Koch, H. Kneifel & E. Bayer, *Z. Naturforsch.* **42c**, 873 (1987).
- [39] D. Bertrand, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **25**, 194 (1943).

- [40] J.J.R. Fraústo da Silva, *Chem Spec. Bioavail.* **1**, 139 (1989).
- [41] C.D. Garner, E.M. Armstrong, R.E. Berry, R.L. Beddoes, D. Collison. J.J.A. Cooney, S.N. Ertok & M. Helliwell, *J. Inorg. Biochem.* **80**, 17 (2000).
- [42] E. Bayer & H. Kneifel, *Z. Naturforsch.* **27b**, 207 (1972).
- [43] P. Krauss, E. Bayer & H. Kneifel, *Z. Naturforsch.* **39b**, 829 (1984).
- [44] H. Kneifel & E. Bayer, *Angew. Chem.* **85**, 542 (1973).
- [45] H. Kneifel & E. Bayer, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3075 (1986).
- [46] E. Bayer, E. Koch & G. Anderegg, *Angew. Chem. Internat. Edit.* **26**, 545 (1987).
- [47] E.M. Armstrong, R.L. Beddoes, L.C. Calviou, J.M. Chamock, D. Collins, N. Ertok, J.H. Naismith & C.D. Garner, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 807 (1993).
- [48] M.A. Nawi & T.L. Riechel, *Inorg. Chim. Acta* **93**, 131 (1984).
- [49] W. Kaim & B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, Teubner, Stuttgart, 1991.
- [50] M.F.C. Guedes da Silva, J.A.L. da Silva, J.J.R. Fraústo da Silva, A.J.L. Pombeiro, C. Amatore & J-N. Verpeaux, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 7568 (1996).
- [51] C.M.M. Matoso, A.J.L. Pombeiro, J.J.R. Fraústo da Silva, M.F.C. Guedes da Silva, J.A.L. da Silva, J.L. Baptista-Ferreira & F. Pinho-Almeida, A Possible Role for Amavadine in Some *Amanita* Fungi: A Unique Case in Biology. En: *Vanadium Compounds: Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications*, A.S. Tacey & D.C. Crans (Eds.), ACS Symposium Series 711, American Chemical Society, Washington DC, 1998, pp. 241-247.
- [52] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [53] S.L. Neidleman & J. Geigert, *Biohalogenation*, Ellis Horwood, Chichester, 1986.
- [54] P. Turano & Y. Lu, Iron in Heme and Related Proteins. En: *Handbook of Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel & H. Sigel (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2001, pp. 269-356.
- [55] H. Vilter, Vanadium Dependent Haloperoxidases. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel & A. Sigel (Eds.), Vol. 31, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 325-362.
- [56] A. Messerschmidt & R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 392 (1996).
- [57] M. Weyand, M.-J. Hecht, M. Kiess, M.-F. Liaud, H. Vilter & D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **293**, 595 (1999).
- [58] M.N. Isupov, A.R. Dalby, A.A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G.N. Murshudov & J.A. Littlechild, *J. Mol. Biol.* **299**, 1035 (2000).
- [59] C. Slebodnick, B.J. Hamstra, & V.L. Pecoraro, *Struct. Bonding* **89**, 51 (1997).
- [60] A. Butler, *Coord. Chem. Rev.* **187**, 17 (1999).
- [61] R. Wever & B.E. Kren, Vanadium Haloperoxidases. En: *Vanadium in Biological Systems*, N.D. Chasteen (Ed.), Kluwer Academic Publish., Dordrecht, 1990, pp.81-97.
- [62] D. Rehder, *Metallomics* **7**, 730 (2015).

CAPITULO 8

FUNCIONES DEL MAGNESIO Y EL CALCIO EN PLANTAS

INTRODUCCIÓN

Si bien no existen metaloenzimas que contienen Mg(II) o Ca(II) como sitios activos, ambos cationes juegan un papel importante como cofactores o estabilizadores de un gran número de sistemas enzimáticos, que aparecen involucrados en una importante cantidad de funciones en las plantas. Y, por otra parte, el Mg(II) desempeña un papel esencial en la fotosíntesis, ya que es el metal presente en las clorofilas.

Antes que nada parece interesante comentar algunas diferencias de comportamiento entre Mg(II) y Ca(II) en sistemas biológicos [1,2]. El primer aspecto a considerar es la diferencia de tamaño, que condiciona varias de las propiedades y diferencias de comportamiento de ambos cationes. En coordinación octaédrica el radio del Mg(II) es de 0.72 Å, mientras que el del Ca(II) es de 1,00 Å [1,3].

El Mg(II) es un ácido de Lewis “duro”, formando fácilmente complejos estables con átomos donores electronegativos “duros” (p. ej. átomos de O de fosfatos). Estos enlaces son esencialmente de carácter iónico, aunque la unión Mg-N en la clorofila seguramente posee un cierto grado de covalencia, debido a la interacción con los ligandos N-porfirínicos, ligeramente “blandos”. Su número de coordinación es habitualmente seis, tendiendo a formar octaedros regulares y esta geometría es fuertemente demandada por el magnesio, situación que no ocurre con el calcio. En presencia de ligandos complejos el Mg(II) tiende a unirse a sólo uno o dos centros, manteniendo su estructura octaédrica regular con las aguas de hidratación remanentes. Esto significa que el Mg(II) aparece como muy adecuado para la formación de complejos ternarios con enzimas cuando se requiere un catión puente para generar una geometría precisa entre el ligando de una enzima y el sustrato.

En cambio, el Ca(II) puede sustituir más fácilmente su esfera de hidratación y reaccionar con una variedad de ligandos, produciendo complejos interconectados y mostrando una mayor flexibilidad geométrica. Y, asimismo, debido a su mayor tamaño, muestra una mayor variedad de posibles índices de coordinación, siendo los índices de coordinación siete u ocho bastante habituales, frente a ligandos pequeños.

En comparación con el Mg(II), el Ca(II) prefiere ligandos sin donores de átomos de N y, por otra parte, los fosfatos inorgánicos de Ca(II) son unas diez veces más insolubles que los de Mg(II).

1. MAGNESIO EN PLANTAS

1.1. Captación y transporte de magnesio en las plantas

En los suelos el magnesio está presente básicamente en tres fracciones. Intercambiable, no-intercambiable y soluble y su captación ocurre en forma de Mg(II) soluble. Su disponibilidad en los suelos está reducida por su competición con Al y Mn a valores ácidos de pH, mientras que en suelos alcalinos la formación de carbonato y un exceso de Ca, K y Na pueden reducir su disponibilidad. En este contexto, especialmente la presencia de potasio, parece condicionar fuertemente la disponibilidad de magnesio [4].

Respecto a la absorción y al transporte de Mg(II) dentro de la planta, todavía es muy escasa la información existente. Para entender estos procesos se hace necesario comprender también la absorción y translocación de K y Ca, debido a que estos cationes tienen un importante efecto sobre el Mg [4]. En este sentido, el catión más estudiado ha sido el potasio y en este caso parecen existir dos mecanismos concurrentes posibles, uno activo, utilizando una proteína de transporte y otro pasivo, a través de un canal de potasio [4,5], habiéndose sugerido que estas rutas también podrían ser posibles para la incorporación de magnesio [4,6,7].

Tampoco han sido identificadas todavía proteínas de transporte para Mg(II) y otros cationes divalentes, involucradas en su llegada al xilema. Lo que sí se sabe que parte del Mg(II) queda ligado a las paredes celulares y otra es secuestrado en vacuolas. El Mg(II) vacuolar aparece como sumamente importante para el balance catiónico celular y la regulación de la concentración de magnesio en la planta [8].

La distribución del Mg(II) en la planta es sumamente variable, dependiendo no sólo de la especie y el desarrollo y edad de la planta, sino también de la presencia y concentración de otros nutrientes y hasta de factores externos, tales como las condiciones meteorológicas [4].

1.2. Funciones del magnesio en las plantas

Las funciones del Mg(II) en las plantas están básicamente relacionadas a su capacidad para interactuar con ligandos fuertemente nucleofílicos. El catión Mg(II) tiende, como ya se dijo, a adoptar coordinación octaédrica con una marcada preferencia por ligandos donores de oxígeno o agua, uniéndose electrostáticamente en particular a grupos fosfatos cargados negativamente. La interacción del Mg(II) con proteínas puede ser agrupada en dos clases generales de reacción[6]:

1. El Mg(II) se une directamente a una proteína/enzima y determina su estructura y/o cumple un rol catalítico tales como átomo central en la clorofila o como un elemento puente para la agregación de ribosomas.
2. El Mg(II) se une al sustrato de una enzima, incrementando la eficiencia de la reacción catalítica, como en el caso de la fosforilación por Mg-ATP o la reacción Mg-isocitrato → isocitrato-liasa.

El rol específico del Mg(II) en la catálisis enzimática depende fundamentalmente de su capacidad para posicionar una molécula de H₂O para su participación en la reacción catalítica [6]. Como también fue mencionado más arriba, el magnesio forma complejos ternarios en los que el catión puente es requerido para establecer una geometría precisa entre la enzima y el sustrato [4,6].

Aparte de su papel en la regulación enzimática, una proporción sustancial del Mg(II) total presente en la célula está involucrada también en la regulación del pH celular y el balance catión/anión [6].

Resumiendo, el Mg(II) satisface plenamente la necesidad de un catión pequeño, fuertemente electronegativo y móvil, que tiende a coordinarse con ligandos fuertemente nucleófilicos a través de enlaces esencialmente iónicos, y con limitada distorsión geométrica. Estas propiedades encuentran amplia aplicación en la transferencia de grupos y en la estabilización de ciertas estructuras macromoleculares. Todas estas propiedades previenen también la interferencia del Mg(II) en la formación de complejos por otros metales, que son más covalente y variados en carácter y geometría [2].

1.2.1. Magnesio en la síntesis de proteínas

Una importante proporción del Mg(II) presente en las células de las hojas está asociado, directa o indirectamente con la síntesis de proteínas a través de su papel en la estructura y funciones del ribosoma [4,7]. El ensamblaje de subpartículas ribosomales está parcialmente controlado por Mg(II) y las subunidades ribosomales son inestables a concentraciones de Mg(II) menores de 10 nM. Componentes importantes de los sistemas de síntesis de proteínas en las células vegetales que requieren Mg(II) incluyen la activación de amino ácidos, la iniciación de cadenas polipeptídicas y las reacciones de elongación de esas cadenas. El Mg(II) es también requerido para la actividad de la RNA polimerasa y está fuertemente involucrado en la bioquímica de los ácidos nucleicos [4,7,9].

Otro sistema de polimerización muy importante, dependiente de Mg(II) es la formación de microtúbulos, que constituyen uno de los ordenamientos filamentosos que forman el citoesqueleto en las células eucariotas. El sistema se forma a partir de subunidades denominadas tubulinas, cuya polimerización requiere de la presencia de Mg(II) [4].

1.2.2. Magnesio en el metabolismo lipídico

Aparte de estar involucrado en la activación de varias enzimas que participan en el metabolismo y catabolismo de los lípidos participa también en varias enzimas sintetizadoras de fosfolípidos, lo que lo involucra directamente en la biosíntesis de fosfolípidos y, por lo tanto, en la formación de membranas celulares [4].

1.2.3. Magnesio en el metabolismo de carbohidratos

La acumulación de carbohidratos no-estructurales (almidón, azúcares) en las hojas de una planta es una característica típica de plantas deficientes en magnesio y puede ser detectada generalmente antes de la aparición de otros síntomas de deficiencia o de inhibición de la fotosíntesis [6]. Estos resultados muestran claramente un papel importante del Mg(II) en el metabolismo de los carbohidratos. Y, efectivamente, se sabe que prácticamente todas las enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos requieren Mg(II) para alcanzar su máxima actividad [4]. En muchas de estas reacciones de síntesis de carbohidratos el Mg(II) forma complejos de fosfato. Por otro lado, el Mg participa también en la actividad de varias enzimas relacionadas al ciclo glicolítico (siendo algunas de las enzimas dependientes de Mg(II) que participan en este ciclo la piruvato kinasa, la fosfoglicerato kinasa, la aldolasa y la hexokinasa) [4,10].

1.2.4. Magnesio como mediador energético

El Mg(II) desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético de la planta, ya que actúa como cofactor con la adenosina trifosfato (ATP), la principal fuente de energía celular [4,7]. Adicionalmente, la síntesis del ATP también es fuertemente dependiente de Mg(II), habiéndose encontrado que esa síntesis se ve notablemente incrementada con la suplementación de Mg(II). Esto también explica por qué la ATP sintasa opera esencialmente en las mitocondrias y en los cloroplastos, donde la concentración de magnesio es mucho más elevada que en el citosol [7].

1.2.5. Magnesio en la fotosíntesis

El magnesio también desempeña un papel central en la fotosíntesis por su presencia como elemento esencial en las clorofilas. Se trata, básicamente, de un sistema porfirínico con algunas modificaciones importantes en el anillo: el doble enlace de uno de los grupos pirrólicos está reducido y además se agrega un anillo de ciclopentanona. El esqueleto porfirínico está además unido a un largo resto alifático, denominado grupo fitilo, a través del cual el sistema puede anclarse en la membrana fosfolipídica. En la Fig. 1 se muestra la estructura de la llamada **clorofila a**. Una segunda forma, denominada **clorofila b**, difiere sólo de ésta por el reemplazo del grupo $-CH_3$ ubicado en el anillo pirrólico superior derecho por un grupo $-CHO$.

El metal incorporado es el Mg(II), el que se encuentra al igual que lo que ocurre en el caso del Fe(II) en las ferroporfirinas, coordinado a un nitrógeno imidazolínico en la quinta posición de coordinación y a través del cual se une a la cadena proteica. El metal se encuentra ligeramente desplazado fuera del plano porfirínico [11,12].

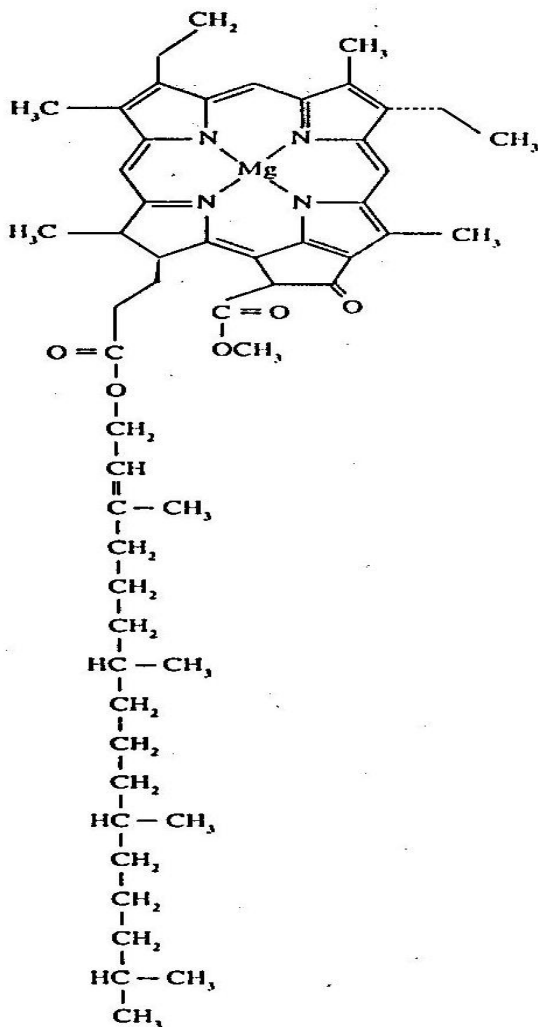


Fig.1. Estructura de la *clorofila a*.

La presencia de Mg(II) en estos sistemas resulta bastante llamativa, por un lado porque el catión aparece unido solo a ligandos nitrogenados y por el otro, porque no hay argumentos químicos obvios que la sustenten. Pero, la utilización de un elemento liviano como el magnesio, elimina las posibilidades de fluorescencia y, también, los posibles procesos redox que podrían originarse con la incorporación de iones pequeños similares, tales como Mn(II), Co(II), Fe(II) o Ni(II). Además el complejo de Mg(II) produce no sólo un desplazamiento de las típicas bandas α , β , y γ del espectro porfirínico hacia mayores longitudes de onda, sino que también, y debido a su simetría tetragonal genera un incremento en los coeficientes de absorptividad molar de las mismas (ver Fig. 2). Ambos hechos favorecen, claramente, la absorción de luz en esa región espectral [11,12].

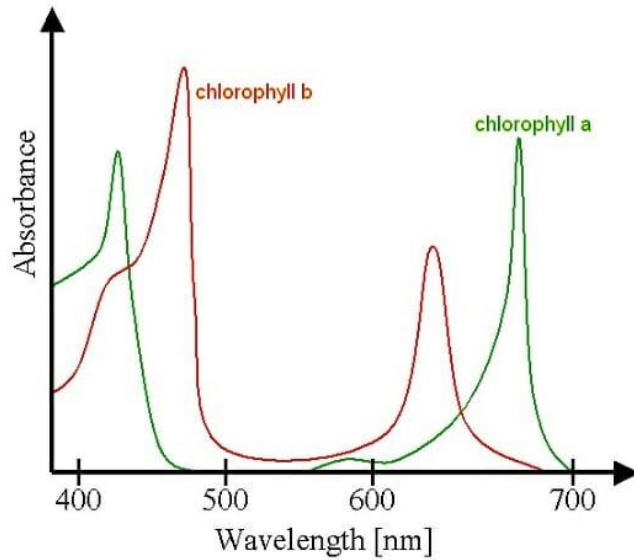


Fig.2. Espectros de absorción de las *clorofilas a y b*.

La fotosíntesis constituye el proceso bioenergético fundamental. Todas las reacciones biológicas son impulsadas por un flujo energético, con la luz solar actuando como fuente de energía. La fotosíntesis es el proceso a través del cual la energía radiante solar es convertida en energía química, en la forma de ATP y NADPH, la cual es posteriormente utilizada en una serie de reacciones enzimáticas para convertir CO₂ en compuestos orgánicos. La fotosíntesis se inicia con la captura de energía solar. Un cierto número de pigmentos orgánicos, incluyendo clorofilas, carotenoides, ficoeritrina y ficociaina son acumulados en complejos pigmento-proteína, llamados fotosistemas. Colectivamente, estos pigmentos absorben la mayor parte de la luz solar que llega a la Tierra y esta luz es transformada en energía química en complejos pigmento-proteína llamados centros de reacción [13]. Las clorofilas están presentes en dos centros de reacción fotoquímica, llamados respectivamente fotosistema I (FSI) y fotosistema II (FSII) y todos los procesos mencionados tienen lugar en los cloroplastos [11,12]. Normalmente, una quinta parte de todo el magnesio presente en una planta, se encuentra en los cloroplastos [7].

Adicionalmente a su participación en las clorofilas el magnesio también es esencial para la actividad de un gran número de enzimas, de tipo fotosintético, tales como la ribulosa-1,5-bisfosfonato (RuBP) carboxilasa y la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa [4,7]. La RuBP carboxilasa es una enzima clave que captura CO₂ en la primera reacción del ciclo de Calvin [7]. Su actividad es fuertemente dependiente de la concentración de Mg(II), ya que el mismo estabiliza la estructura de su sitio activo [7].

Por último, también es importante de mencionar que la primera etapa en la biosíntesis de las clorofilas está asociada a la inserción del Mg(II) en la estructura

del anillo porfirínico. Este proceso está catalizado por una magnésio quelatasa, cuya activación requiere de ATP, o sea de una cantidad adicional de Mg(II) [6,7,12].

2. CALCIO EN PLANTAS

2.1. Captación y transporte de calcio en las plantas

Al igual que para el Mg(II), también para el caso del Ca(II) sigue siendo escasa la información disponible acerca de la forma de su captación en suelos, y también en este caso se ha discutido si esa captación es un proceso activo o pasivo [12,14,15]. En años recientes se han logrado identificar y estudiar varias familias de canales aptos para el transporte de calcio desde las raíces [15,16]. Tampoco se conocen mayores detalles acerca del transporte y acumulación del Ca(II) en el xilema [15-17]. Se ha encontrado en algunas plantas que en ciertos momentos durante su transporte el Ca(II) se mueve en forma de quelatos de los ácidos cítrico o málico [15].

En contraste con otros macronutrientes, una elevada proporción del Ca(II) en los tejidos vegetales aparece muchas veces localizada en las paredes celulares. Esta distribución, bastante peculiar, es esencialmente el resultado del gran número de sitios de unión para calcio que existen en las paredes celulares [6]. Generalmente, se lo encuentra unido a grupos R-COO⁻ de ácidos poligalacturónicos (pectinas) y en una forma fácilmente intercambiable [6]. Por otra parte, el Ca(II) aparece como un macronutriente relativamente inmóvil en el interior de la planta, ya que una vez depositado en alguno de los tejidos vegetales sufre poca o ninguna redistribución [14].

Otro aspecto muy importante de la bioquímica del calcio, es que su concentración en los diversos espacios en los que se lo encuentra aparece muy estrictamente controlada. En los fluidos extracelulares, la concentración de Ca(II) libre se mantiene próxima a 10^{-3} M [12]. También en el citoplasma de las células se requiere un control extremadamente estricto de su concentración. Aquí el nivel de Ca(II) libre es del orden de 10^{-7} M [12,18]. Concentraciones mayores interfieren con una variedad de procesos celulares cruciales, incluyendo señalización dependiente de calcio, dinámica de procesos microestructurales y diversos problemas metabólicos, que finalmente pueden terminar en la destrucción celular [18].

2.2. Funciones del calcio en las plantas

Como ya se mencionara, la concentración de Ca(II) en el citoplasma y en los fluidos extracelulares es muy baja y el catión posee escasa movilidad fisiológica. Existe un requerimiento crítico para Ca(II) fuera del protoplasma, en la superficie exterior del plasmalema y en las paredes celulares y, además el Ca(II) parece tener un papel muy limitado como cofactor enzimático. Sin embargo, unido a ciertos sitios no-catalíticos puede desempeñar un papel estructural o estabilizador de ciertas enzimas [2]. Asimismo, desempeña un papel importante en la estabilización de membranas celulares y paredes vegetales [2].

A medida que se han profundizado los estudios en torno a este macronutriente se ha hecho cada vez más evidente que el Ca(II) participa en una gran cantidad y variedad de procesos bioquímicos y biológicos, apareciendo involucrado en procesos tales como la fosforilación oxidativa, la actividad de una multitud de reacciones catalizadas por kinasas, en la actividad hormonal, la fertilización y la transmisión de señales [12,16,17]. Asimismo, diversas sales de calcio, como los carbonatos, fosfatos y oxalatos son dominantes en los procesos de biomineralización [11,12].

De todas maneras hay que remarcar que todos los estudios más recientes apuntan a que la función más importante del calcio en las plantas es la de actuar como segundo mensajero en una gran variedad de procesos fisiológicos, y de desarrollo así como ante diversas situaciones de estrés externo o interno de las plantas [16,19].

2.2.1. El calcio en la estabilización de la membrana y la pared celular

El Ca(II) en forma de pectato de calcio es esencial para el refuerzo de la pared celular y otros tejidos vegetales. Esta función del calcio está claramente reflejada en la correlación positiva que existe entre la capacidad de intercambio iónico de la pared celular y la concentración de Ca(II). Por otra parte, la degradación de pectatos, que es mediada por la enzima poligalacturonasa, es fuertemente inhibida por una alta concentración de Ca(II) [6]. La proporción de pectato de calcio presente en la pared celular tiene también importancia por su poder protector frente a las infecciones fúngicas y bacterianas [6,16].

Las membranas celulares también son estabilizadas por Ca(II) que, en este caso, aparece unido a grupos fosfato o carboxilato de fosfolípidos y proteínas [6,16]. Este efecto estabilizador se hace más prominente bajo condiciones de estrés, por ejemplo muy bajas temperaturas o anaerobiosis [6]. Además, adicionalmente a su función estabilizadora de membranas, el Ca(II) citosólico también actúa como segundo mensajero para iniciar la reparación de la membrana [6].

2.2.2. El calcio en el balance iónico y la osmoregulación

En las vacuolas celulares, y en particular en las de hojas, siempre hay una importante concentración de Ca(II), la que contribuye al balance anión-catión, actuando como contra catión para aniones orgánicos e inorgánicos [6,17].

Adicionalmente, el calcio desempeña un papel clave en la osmoregulación, a través de su involucramiento como segundo mensajero en la célula. Movimientos estomatales y movimientos nictinásticos y seismonásticos son procesos regulados por la turgencia, e inducidos por cambios de turgencia de células individuales o tejidos. Estos cambios de turgencia son motorizados fundamentalmente por flujos de potasio, cloruro y malato, como solutos osmóticamente activos. Y ha quedado claramente

establecido que se requiere una variación transitoria de la concentración de Ca(II) citosólico libre para la transducción de señales a la respuesta fisiológica [6].

2.2.3. Enzimas reguladas por calcio

Existe una gran cantidad de enzimas directamente reguladas por Ca(II), mientras que otras son reguladas indirectamente actuando sobre un sistema regulatorio, usualmente una kinasa proteica, que a través de una fosforilación promueve o inhibe la actividad de otras enzimas. En estos procesos el calcio puede actuar directamente bien como Ca(II) o bien en forma de un complejo Ca-calmodulina [19].

Las calmodulinas son pequeñas proteínas ácidas, generalmente ricas en grupos carboxilato (especialmente de residuos aspartato y glutamato), capaces de ligar muy eficientemente al calcio, y están ampliamente difundidas en la Naturaleza. Son extremadamente resistentes al calor, a la acidez y a otros tratamientos que promueven denaturación [11,12,19]. El peso molecular de las calmodulinas de plantas se ha estimado entre 17 y 19 kDa [19]. Comparación de las propiedades físicas y bioquímicas de calmodulinas de variado origen, tanto de plantas como de animales, han revelado un alto grado de conservación en sus propiedades funcionales y estructurales. Su amplia difusión y estructura altamente conservada sugiere que deben desempeñar un papel fundamental en la mediación de procesos intracelulares dependientes de Ca(II). La examinación de la estructura terciaria de la calmodulina revela la presencia de cuatro dominios, groseramente similares, cada uno de los cuales contiene un sitio de unión para el Ca(II) [19].

El mecanismo de activación enzimática por calmodulina ocurre en dos etapas: 1) el Ca(II) se une a la calmodulina produciendo un cambio conformacional en la misma y 2) el conformero activo de la calmodulina interactúa con una enzima inactiva o parcialmente activada produciendo un cambio conformacional y la concomitante activación de la enzima. Se ha sugerido que existen cuatro diferentes conformaciones del complejo Ca(II)/calmodulina que pueden ser reconocidas por diferentes proteínas, esto es, en una conformación dada el complejo interactúa con una enzima particular o un grupo de enzimas. De esta manera la calmodulina puede transducir señales cuantitativas de Ca(II) de diferentes amplitudes en respuestas celulares cualitativamente diferentes [19].

Ha sido demostrado que en plantas, enzimas tales como la NAD kinasa, la Ca(II)-ATPasa, la H⁺-ATPasa y numerosas kinasas proteicas son reguladas por Ca(II) y calmodulina [19]. Las kinasas proteicas constituyen un grupo de enzimas sumamente importantes en la fisiología vegetal, ya que catalizan reacciones de fosforilación, un proceso que ha sido reconocido como uno de los mecanismos regulatorios más importantes a través del cual se regulan muchas actividades metabólicas. En estas reacciones de fosforilación las kinasas transfieren el grupo γ -fosfato del ATP a residuos de amino ácidos (generalmente a una serina o treonina) de una proteína. De esta manera, muchas proteínas regulatorias clave, al ser

fosforiladas, sufren pequeños cambios conformacionales que eventualmente modifican sus propiedades biológicas [19].

2.2.4. El calcio como segundo mensajero

La capacidad del calcio de actuar como segundo mensajero se basa en la muy baja concentración de Ca(II) libre en el citosol de las células vegetales y en la química del Ca(II) que permite alterar la conformación de proteínas a las cuales se une [6,17]. Señales medio-ambientales y de desarrollo interno pueden activar canales de Ca(II) en las membranas celulares que permiten el rápido influjo al citosol, aumentando la concentración de Ca(II) libre en el mismo. Señales medio-ambientales incluyen intensidad de la luz, extensión de los períodos de luminosidad, temperaturas extremas, sequías, estrés osmótico, salinidad, estrés por aluminio, estrés oxidativo, anoxia y ataque por patógenos [6,17].

Cambios en la concentración citosólica de Ca(II) también regulan procesos de desarrollo incluyendo división o elongación celular, elongación de tubos de polen y pelos de las raíces, germinación, senescencia y apoptosis [6,17].

Su función de segundo mensajero se extiende también a la señalización de la disponibilidad de nutrientes y a cambios en las concentraciones de los mismos. Inicialmente se admitió que esta función estaba relacionada al control de potasio, nitratos, hierro, amonio y boro pero más recientemente también se detectaron evidencias de que estos controles podrían extenderse a magnesio, zinc y manganeso [16].

Para finalizar conviene analizar brevemente la cuestión de por qué la Naturaleza ha seleccionado al Ca(II) para esta importante función. Efectivamente el Ca(II) tiene algunas propiedades únicas que lo hacen particularmente adecuado para cumplir la función de mensajero en sistemas biológicos. La combinación de tamaño atómico y densidad de carga permiten una alta selectividad para Ca(II), por encima de la de Mg(II), Na(I) o K(I), los otros tres cationes más abundantes en sistemas biológicos. La evolución ha favorecido la selección de macromoléculas que ligan selectivamente al Ca(II) antes que a otros cationes. Esto es así a pesar del hecho de que Ca(II) y Mg(II) sean ambos divalentes y que Ca(II) y Na(I) tengan casi el mismo radio cristalino. Otras propiedades fisicoquímicas tales como el mayor radio iónico y la baja energía de hidratación del Ca(II) también contribuyen a esta selectividad. Se ha argumentado que en los organismos vivientes la discriminación entre Ca(II) y Mg(II) proviene no solo de la insolubilidad de sus fosfatos (que favorece al Ca(II) en un factor 10) ni por la selectividad de sus velocidades de deshidratación (que favorece al Ca(II) en un factor 10^3), sino por la estabilidad frente a donores naturales multidentados de átomos de O (que favorece al Ca(II) en un factor mayor que 10^5) [19,20].

3. BIOMINERALES DE CALCIO Y MAGNESIO EN PLANTAS

La biomineralización es uno de los procesos más fascinantes que ocurren en la Naturaleza y el hecho de que organismos vivos, a través de una serie de complejos mecanismos fisiológicos, sean capaces de generar una variedad de compuestos inorgánicos cristalinos ha venido intrigando y fascinando al Hombre durante siglos [21-23].

Depósitos cristalinos en plantas se conocen desde el s. XVII, pero recién en las últimas décadas su amplia distribución en el reino vegetal ha quedado definitivamente confirmada. Sin embargo, todavía no están totalmente clarificados diversos aspectos relacionados a su formación y desarrollo y, muy especialmente, a su significado fisiológico [22].

Tres biominerales son especialmente comunes en plantas y están muy ampliamente distribuidos en ellas: oxalatos de calcio, carbonatos de calcio y dióxido de silicio (ópalo). De ellos, el biomineral más difundido en el reino vegetal es el oxalato de calcio, mientras que diversas formas del carbonato sólo han sido encontradas en algunas especies vegetales determinadas [22].

3.1. Oxalatos de calcio

El calcio es un elemento relativamente abundante en todos los entornos naturales y, como hemos analizado en las Secciones precedentes, su presencia es importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, cumpliendo además una importante serie de funciones fisiológicas y biológicas. Además, y como vimos también, los niveles de Ca(II) libre están muy estrictamente regulados. Debido a que las plantas superiores usualmente incorporan calcio en exceso a los requerimientos celulares y dado que la mayoría de ellas, a diferencia de lo que ocurre en animales, no poseen sistemas excretorios bien desarrollados para eliminar estos excedentes, deben modular la diferencia entre la abundancia natural de calcio y los muy bajos niveles intracelulares requeridos, controlando muy estrictamente su distribución [18,24].

Dado que su producto de solubilidad en agua es de $1,3 \times 10^{-9}$, el oxalato de calcio puede secuestrar muy efectivamente al Ca(II) y haciéndolo metabólicamente inactivo para las células de las plantas [18,22,24]. De esta manera, muchas plantas acumulan oxalato de calcio cristalino en respuesta a un exceso de calcio, generando un repositorio de gran capacidad para el mismo. Sin embargo, muchos estudios recientes han demostrado que estos cristales no forman un depósito inerte y no recuperable de Ca(II), dado que bajo ciertas condiciones estos cristales pueden ser redisueltos lo que convierte a estos depósitos en una suerte de reservorio de calcio [18,24].

Los cristales de oxalato de calcio pueden formarse en cualquier órgano o tejido de la planta y se los ha encontrado p. ej. en raíces, tallos, hojas, frutos y semillas [24]. Los cristales se desarrollan en células altamente especializadas,

corrientemente llamadas idioblastos [18,22,24-26]. Más específicamente, el desarrollo cristalino ocurre exclusivamente en el interior de una vacuola celular de la planta. El oxalato de calcio no resulta de una precipitación aleatoria que ocurre cuando se ponen en contacto niveles adecuados de Ca(II) y oxalato. Por el contrario, su formación es un excelente ejemplo de una biomineralización mediada por matriz orgánica [11,22,23,26]. El sistema para la biomineralización del oxalato de calcio no solo requiere una matriz intravacuolar que restrinja físicamente el proceso de cristalización, pero también la simultánea activación de rutas bioquímicas que lleven a la formación de oxalato y a la acumulación de Ca(II). La ultraestructura de estos idioblastos ha sido estudiada en diferentes plantas, encontrándose que se trata de células altamente especializadas que muestran algunas características únicas y peculiares que no se han encontrado en otras células [24].

Un aspecto muy interesante de los oxalatos de calcio en plantas es que los cristales usualmente adoptan una morfología muy específica. Los cristales pueden ocurrir como “ráfidos”, manojos de cristales aciculares, “estiloides”, monocristales elongados en forma de agujas, “drusas”, agregados de cristales con una geometría aproximadamente esférica, “prismas”, monocristales simples o maclados de simetría romboédrica y “arena microcristalina”, microcristales pequeños.

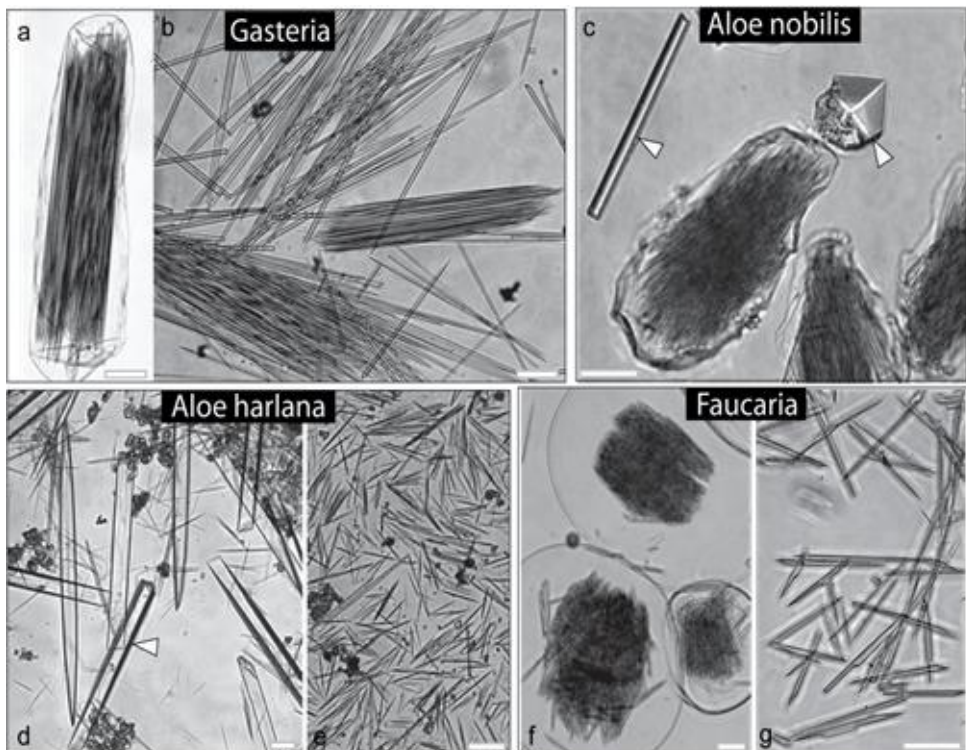


Fig. 3. Cristales de oxalato de calcio ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, whewellita) de especies suculentas no-cactáceas. Morfologías representativas encontradas en material de *Gasteria liliputana* (a-b), *Aloe nobilis* (c), *A. harliana* (d-e) y *Faucaria stomatium* (f-g). Ráfidos intactos encontrados en las paredes celulares (a, c y f). Imágenes detalladas de cristales individuales encontrados en los ráfidos se muestran en b, e y g. Otras morfologías, p.ej. estiloides (d), y cristales prismáticos (c y d, identificadas con puntas de flecha), son menos abundantes en las muestras investigadas. **Escala:** barras = 10 μm . (Tomado de refer. [27]).

Algunas de estas morfologías, extraídas de un estudio de biominerales de plantas suculentas no-cactáceas [27] se muestran en la Fig. 3. Además es interesante de mencionar que en muchos de los primeros estudios botánicos sistemáticos, las morfologías descritas se utilizaban frecuentemente con fines taxonómicos [22,24].

Se conocen tres formas hidratadas diferentes del oxalato de calcio: el monohidrato, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (whewellita), el dihidrato, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (weddelita) y el trihidrato, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (caoxita), de los cuales el monohidrato es la fase termodinámicamente más estable. Tanto la whewellita como la weddelita se han encontrado en una variedad de organismos mientras que la caoxita nunca se ha encontrado en un sistema biológico, aunque se ha sugerido que tal vez pueda ser el precursor de los otros dos hidratos [24,28]. La estructura de los tres hidratos es conocida [24,28-30]. El monohidrato es dimorfo, presentando una estructura básica, estable por encima de 38 °C (monoclínica, grupo espacial C2/m con $Z = 4$) y una forma derivada, de baja temperatura (monoclínica, grupo espacial $\text{P2}_1/\text{n}$ con $Z = 8$). El dihidrato es ortorrómbico (grupo espacial I4/m con $Z = 8$), pero desde el punto de vista químico se lo debe formular más correctamente como $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot (2 + x)\text{H}_2\text{O}$, donde $0 < x \leq 0,5$ y las aguas de hidratación fraccionales son de naturaleza zeolítica. Finalmente, la caoxita es triclínica (grupo espacial $\text{P}(-1)$ con $Z = 2$). Las relaciones estructurales entre los tres hidratos han sido descritas y analizadas muy detalladamente [28,31].

Otro aspecto muy importante e interesante para analizar, es el origen del ácido oxálico en las plantas. Se han postulado diferentes rutas para su formación, las que involucran glicolato, glioxalato, oxoaloacetato y/o citrato como posibles precursores. Pero, luego de haberse descubierto la amplia distribución y presencia del ácido L-ascórbico (Fig. 4) en plantas se ha admitido definitivamente que este debe ser el precursor principal del ácido oxálico en la mayoría de las plantas, a través del llamado mecanismo de Wheeler-Smirnoff [18,22,24,25,32-34].

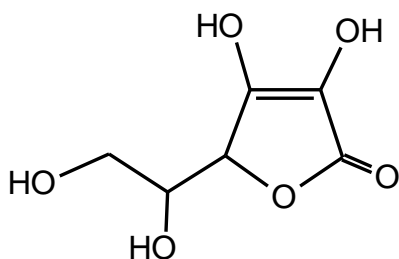


Fig.4. Estructura esquemática del ácido L-ascórbico

Este mecanismo quedó definitivamente clarificado luego del descubrimiento de la enzima L-galactosa dehidrogenasa (EC 1.1.1.316) que cataliza la oxidación de L-galactosa a L-galactono-1-lactona [32,34] y que es el intermediario clave en la síntesis del ácido L-ascórbico. El mecanismo se presenta en la Fig. 5 y, como puede verse, el precursor original es la D-glucosa, via D-glucosa-6 fosfato.

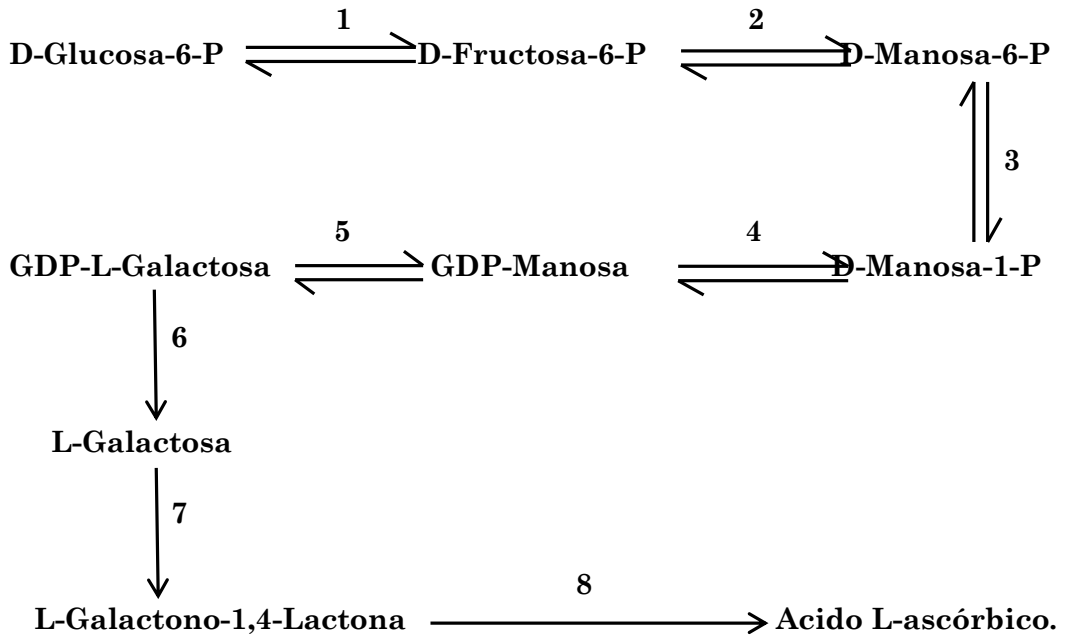


Fig.5. Mecanismo esquemático para la generación de ácido L-ascórbico en plantas (mecanismo de Wheeler-Smirnoff). **Clave para las enzimas involucradas:** 1: D-glucosa-isomerasa; 2: fosfomanosa isomerasa; 3: fosfomanosa mutasa; 4: GDP-manosa pirofosforilasa; 5: GDP-manosa-3,5-epimerasa; 6: actividad presente, pero enzima no identificada; 7: L-galactosa dehidrogenasa; 8: L-galactono-1,4-lactono dehidrogenasa mitocondrial.

Desde el punto de vista químico es bien conocido el hecho de que el ácido ascórbico es relativamente inestable a la oxidación. Y aún el ácido dehidroascórbico generado como producto primario de oxidación es muy inestable y sufre una rápida serie de transformaciones, como se muestra en la Fig. 6. Se degrada, primeramente a ácido 2,3 dicetogulónico que puede degradarse adicionalmente a una mezcla de ácido oxálico y ácido L-treónico. A valores más elevados de pH este último ácido finalmente puede oxidarse a ácido tartárico [34,35].

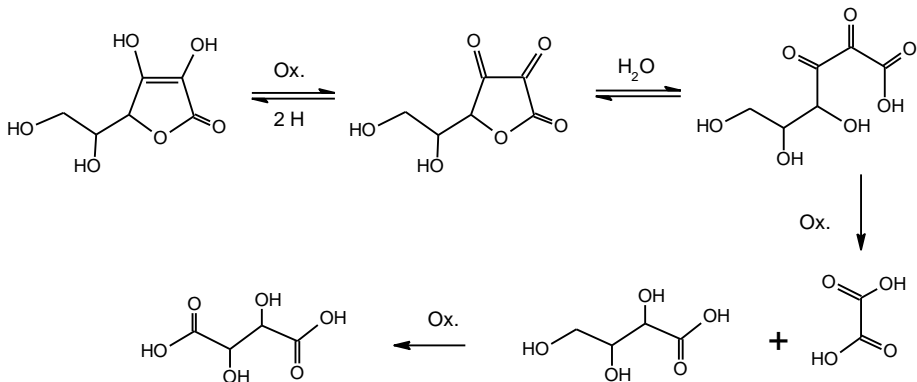


Fig.6. Esquema de la degradación del ácido L-ascórbico.

El otro aspecto interesante de esta síntesis de ácido oxálico es que parece ser que la misma ocurre directamente dentro de los idioblastos. Aparentemente, estas células son autosuficientes para realizar esta biosíntesis en su interior y no necesitan recurrir a una importación del ácido desde células vecinas [24,34,36].

Ante una redisolución de parte de los depósitos de oxalato de calcio, para recuperación de Ca(II) por parte de la planta, el ácido oxálico libre debe ser eliminado pues puede convertirse en tóxico para las plantas. Para ello, tanto las plantas como los hongos utilizan básicamente dos enzimas, la oxalato oxidasa y la oxalato decarboxilasa, ya discutidas en el Cap. 3 [24,36,37].

Aparte de su función primaria, como regulador de calcio, discutida más arriba, la diversidad de sus formas y tamaño así como la variedad de sus sitios de localización, sugieren que los oxalatos de calcio deben cumplir funciones adicionales en el reino vegetal. Estas incluyen su participación en la regulación intracelular del pH y el balance iónico, el soporte mecánico, la percepción gravitacional, así como la protección y detoxificación de plantas y la captación y reflexión de la luz [22,24-26].

Diferentes estudios han demostrado que algunas plantas usan diversos ácidos orgánicos (p.ej. ácidos cítrico, málico u oxálico) como parte de sus mecanismos de defensa frente a metales pesados. En algunos casos, trazas de metales peligrosos como plomo, aluminio, estroncio cobre o cadmio pueden quedar incorporados a los cristales de oxalato de calcio. Especialmente en el caso del aluminio, que es sumamente tóxico para las plantas, el ácido oxálico parece desempeñar un papel importante. Las plantas pueden excretar el ácido por las raíces hacia el exterior complejando al Al(III) directamente fuera de la planta o bien inmovilizarlo, como se dijo, en los depósitos de oxalato de calcio en sus hojas o tallos [24,27].

3.2. Carbonatos de calcio

Contrastando con la amplia distribución del oxalato de calcio en las plantas superiores, la distribución de carbonato de calcio es mucho más limitada y el número de familias de plantas que lo contienen es relativamente pequeño [22]. Adicionalmente, cuando existen, los depósitos de carbonato son bastante limitados y generalmente se los encuentra sólo en ciertos tejidos. Usualmente aparecen como incrustaciones en las paredes celulares, comúnmente llamadas cistolitos [22].

El CaCO_3 existe, el menos, en seis modificaciones, tres de ellas son anhidras, estos es calcita aragonita y vaterita y tres formas hidratadas (monohidrato, hexahidrato y una forma amorfa). Desde el punto de vista termodinámico, a temperatura y presión normal la forma más estable es la de calcita. La aragonita es menos estable que la calcita y la vaterita es la más inestable de las formas. De todas maneras, a pesar de ello la vaterita es muchas veces la primera forma en precipitar. Este comportamiento constituye un buen ejemplo de la ley empírica de Ostwald-Lussac que establece que bajo condiciones de precipitación secuencial la fase polimórfica inicialmente formada es la más soluble [22,38].

El biomineral habitualmente presente en los cistolitos es el carbonato de calcio amorfo. El mecanismo de biomineralización todavía no es conocido aunque se sabe que los cistolitos también poseen una matriz orgánica, sobre la que ocurre la biomineralización [22,39]. También hay algunas evidencias recientes de que el material amorfo puede irse transformando en otras formas del carbonato [22]. Asimismo, en algunas familias de cactáceas se ha encontrado la simultánea presencia de whewellita, calcita y ópalo, lo que muestra una composición biomineral sumamente compleja [40]. La simultánea presencia de oxalatos y carbonatos de calcio (sin identificación precisa de su forma química) fue también reportada en varias plantas de la familia Moraceae [22,41].

La presencia de carbonatos de calcio también ha sido claramente establecida en algas. En este sentido se ha realizado mucho trabajo en torno a los depósitos de CaCO_3 que se encuentran en los *Coccolithophoridae*, que son algas fotosintéticas monocelulares que cubren su pared celular externa con placas de carbonato, corrientemente denominadas coccolitos y forman parte importante del plankton marino [22,42,43]. En la Fig. 7 se muestra la forma de uno de esos depósitos calcáreos en el alga *Pleurocysis carterea*, ejemplo de un tipo de *Coccolithophoridae*.

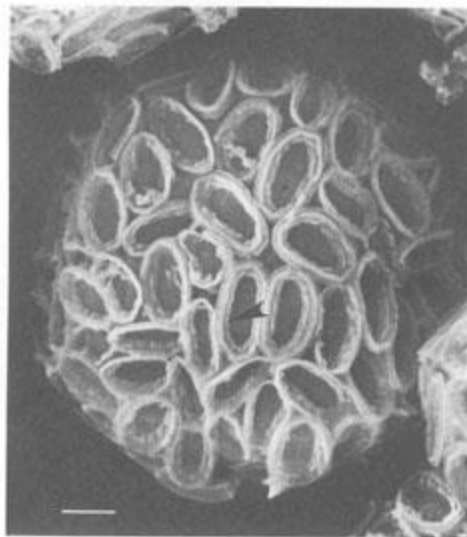


Fig.7. Imagen SEM de una célula de *Pleurocysis*, mostrando la forma del depósito de calcita (punta de flecha negra) sobre el material orgánico inferior. Escala: barra = 1,0 μm (de refer. [43]).

La biomineralización en algas puede ocurrir tanto a través de procesos biológicamente inducidos, como biológicamente controlados y los depósitos de CaCO_3 ocurren sobre, en o entre las células. El biomineral puede ser calcita o aragonita y mezclas de ambos biominerales han sido encontradas muy raramente [42].

3.3. Oxalato de magnesio

El único oxalato natural de magnesio conocido es la glushinskita, $\text{Mg}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [29,30]. Este oxalato se ha encontrado en algunos líquenes así como

biomineral en interfases líquen/suelo, por ejemplo en serpentinita (un silicato de magnesio pobre en calcio), colonizado por *Lecanora atria* [44]. También se ha encontrado en ese biomineral que el Mg(II) puede ser sustituido por pequeñas cantidades de Fe(II), Mn(II) y Ni(II), lo que está de acuerdo con las analogías estructurales existentes entre los oxalatos de todos esos metales [29,30].

Por otra parte, el primer hallazgo de la presencia de glushinkita en una planta, fue el descubrimiento de su presencia en la cactácea *Opuntia ellisiana*, donde se encuentra asociado con whewellita y ópalo [45].

REFERENCIAS

- [1] D.B. Martin, Bioinorganic Chemistry of Calcium. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Vol. 17, Marcel Dekker, New York, 1984, pp. 1-49.
- [2] D.T. Clarkson & J.B. Hanson, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**, 239 (1980).
- [3] R.D. Shannon & C.T. Prewitt, *Acta Crystallogr.* **B25**, 925 (1969).
- [4] S.R. Wilkinson, R.M. Welch, H.F. Mayland & D.L. Grunes, Magnesium in Plants: Uptake, Distribution, Function, and Utilization by Man and Animals. En: *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel & A. Sigel (Eds.), Vol. 26, Marcel Dekker, New York, 1990, pp. 33-56.
- [5] L.V. Kochian & W.J. Lucas, *Adv. Bot. Res.* **15**, 93 (1989).
- [6] M. Hawkesford, W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J. Schjoerring, I. Skrummsager Møller & P. White, Functions of Macronutrients. En: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd. Edit., P. Marschner (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 2012, pp. 135-189.
- [7] Z.C. Chen, W.T. Peng, J. Li & H. Liao, *Semin. Cell Developm. Biol.* **74**, 142 (2018).
- [8] O. Shaul, *Biometals* **15**, 309 (2002).
- [9] C.B. Black & A.J. Cowan, Magnesium-Dependent Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. En: *The Biological Chemistry of Magnesium*, J.A. Cowan (Ed.), Verlag Chemie, New York, 1995, pp. 137-158.
- [10] C.B. Black & J.A. Cowan, Magnesium-Dependent Enzymes in General Metabolism. En: *The Biological Chemistry of Magnesium*, J.A. Cowan (Ed.), Verlag, New York, 1995, pp. 159-183.
- [11] E.J. Baran, *Química Bioinorgánica*, McGraw-Hill Interamericana de España S.A., Madrid, 1995.
- [12] J.J. R. Fraústo da Silva & R.J.P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford, 1991.
- [13] H.B. Gray & W.R. Ellis, jr., Electron Transfer. En: *Bioinorganic Chemistry*, I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard & J. Selverstone Valentine (Eds.), University Science Books, Mill Valley, 1994, pp. 315-363.
- [14] B.C. Hanger, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **10**, 171 (1979).
- [15] H.Q. Yang & Y.L. Jie, *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* **31**, 27 (2005).
- [16] K. Thor, *Front. Plant Sci.* **10**, art. 440 (2019).
- [17] P.J. White & M.R. Broadley, *Ann. Bot.* **92**, 487 (2003).
- [18] M.A. Webb, *Plant Cell* **11**, 751 (1999).
- [19] B.W. Poovaiah & S.N. Reddy, *Crit. Rev. Plant Sci.* **6**, 47 (1987).

- [20] E.I. Ochiai, *J. Chem. Ed.* **68**, 10 (1991).
- [21] E.J. Baran, *Ciencia Investig.* **45**, 110 (1992).
- [22] P.V. Monje & E.J. Baran, Plant Biomineralization. En: *Advances in Plant Physiology*, A. Hemantaranjan (Ed.) Vol. 7, Scientific Publishers, Jodhpur, 2004, pp. 395-410.
- [23] P.M. Dove, J.J. De Yoreo & S. Weiner (Eds.), *Biomineralization*, Mineralogical Society of America, Washington DC, 2003.
- [24] E.J. Baran & P.V. Monje, Oxalate Biominerals. En: *Metal Ions in Life Sciences*, A. Sigel, H. Sigel & R.K.O. Sigel (Eds.), Vol. 4, Wiley, Chichester, 2008, pp. 219-254.
- [25] P. Nakata, *Plant Sci.* **164**, 901 (2003).
- [26] H. He, E.J. Veneklas, J. Kuo & H. Lambers, *Trends Plant Sci.* **19**, 16 (2014).
- [27] P.V. Monje & E.J. Baran, *Z. Naturforsch.* **65c**, 429 (2010).
- [28] R.A. Young & W.E. Brown, Structures of Biological Minerals. En: *Biological Mineralization and Demineralization*, G.H. Nancollas (Ed.), Springer, Berlin, 1982, pp. 101-141.
- [29] E.J. Baran, *J. Coord. Chem.* **67**, 3734 (2014).
- [30] O.E. Piro & E.J. Baran, *Crystallogr. Rev.* **24**, 149 (2018).
- [31] S. Deganello, A.R. Kampf & P.B. Moore, *Amer. Mineral.* **65**, 327 (1980).
- [32] G.L. Wheeler, M.A. Jones & N. Smirnoff, *Nature* **393**, 365 (1998).
- [33] N. Smirnoff & G.L. Wheeler, *Crit. Rev. Plant Biochem. Biol.* **35**, 291 (2000).
- [34] E.J. Baran, Oxalate Biosynthesis and Degradation in Plants and Fungi. En: *Oxalate: Structure, Functions and Occurrence*, E. Kytönen (Ed.), Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2020, pp. 95-131
- [35] B.M. Davies, J. Austin & D.A. Partridge, *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*, Royal Soc. of Chemistry, London, 1991.
- [36] V.R. Franceschi & P.A. Nakata, *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 41 (2005).
- [37] E.J. Baran, Oxalate Degradation in Plant and Fungi: The Role of Manganese Enzymes. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan, Ed., Vol. 12, Scientific Publishers, Jodhpur, 2011, pp. 369-389.
- [38] M.G. Taylor & K. Simkiss, Structural and Analytical Studies on Metal-Ion Containing Granules. En: *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb & R.J.P. Williams (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 1989, pp. 427-460.
- [39] H.J. Arnott, Three Systems of Biomineralization in Plants with Comments on the Associated Organic Matrix. En: *Biological Mineralization and Demineralization*, G.H. Nancollas (Ed.), Springer, Berlin, 1982, pp. 199-218.
- [40] P.V. Monje & E.J. Baran, *Plant Physiol.* **128**, 707 (2002).
- [41] C.C. Wu & L.L. Kuo-Hang, *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 97 (1997).
- [42] M.A. Borowitzka, Carbonate Calcification in Algae. En: *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, S. Mann, J. Webb & R.J.P. Williams (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, 1989, pp. 63-94.
- [43] E. Bäuerlein, *Angew. Chem. Internat. Edit.* **42**, 614 (2003).
- [44] M.J. Wilson, D. Jones & J.D. Russell, *Mineral. Mag.* **43**, 837 (1980).
- [45] P.V. Monje & E.J. Baran, *Phytochemistry* **66**, 611 (2005).

CAPITULO 9 COMENTARIOS SOBRE LA HIPERACUMULACIÓN DE METALES POR PLANTAS

INTRODUCCIÓN

Ya en su clásico tratado de metalurgia, *De Re Metallica* [1], publicado en latín en Basilea en el año 1556, Georg Agricola (1494-1555) (Fig. 1) menciona el hecho de que algunas plantas muestran la propiedad de acumular ciertos metales, lo que produce diversos cambios en sus colores y formas de crecimiento, y sugiere la utilización de esta observación empírica, en la búsqueda y localización de determinadas vetas metalíferas.

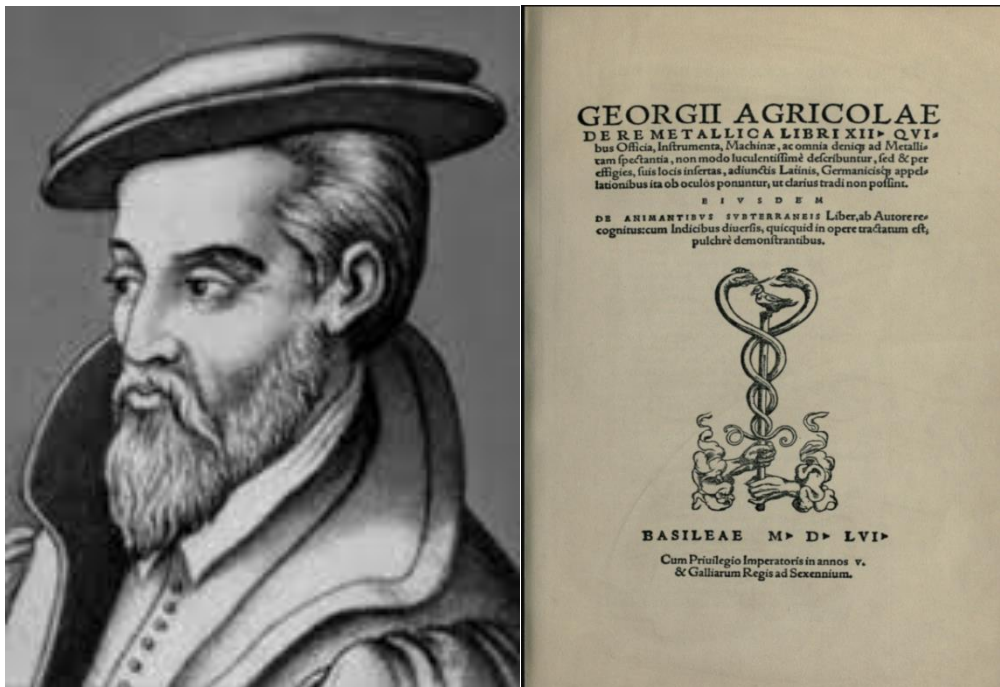


Fig.1. Georg Agricola y portada de la edición original de *De Re Metallica*.

Esta antigua observación constituye en la actualidad la base de la llamada *prospección biogeoquímica*, realizada por vía aérea o satelital para localizar depósitos metalíferos.

El tema de la hiperacumulación de metales por parte de las plantas ha sido discutido y analizado muy detalladamente en un artículo recientemente publicado en los *Anales* de esta Academia [6], y por lo tanto aquí se presentará sólo un panorama muy breve y general de la temática. Los lectores interesados en ampliar esta información pueden obtenerla fácilmente recurriendo al artículo recién mencionado.

Cuando crecen en suelos con concentraciones normales de metales, las especies hiperacumuladoras captan concentraciones metálicas mucho más altas que lo que hacen las plantas normales. Sin embargo, cuando son trasplantadas a suelos conteniendo bajos niveles de esos iones, las hiperacumuladoras muestran cuadros normales de desarrollo y crecimiento, indicando que no existen requerimientos fisiológicos esenciales para disponer de elevadas concentraciones metálicas [3,7].

Obviamente, la concentración límite por encima de la cual la planta se considera hiperacumuladora varía con cada metal [2,4]. Así, por ejemplo, una planta se considera hiperacumuladora de manganeso si acumula más de 10.000 $\mu\text{g/g}$ de masa seca o de cobre si acumula más de 300 $\mu\text{g/g}$, o de oro si acumula más de 1 $\mu\text{g/g}$.

1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y ELEMENTOS HIPERACUMULADOS

Existen cuatro tipos de suelos metalíferos que usualmente albergan plantas hiperacumuladoras, estos son: a) suelos serpentínicos derivados de rocas ultramáficas ricas en Mg y Fe y enriquecidas en Cr, Co y Ni; b) suelos seleníferos, derivados de rocas ricas en Se; c) suelos de calamina enriquecidos con Zn, Cd y Pb; d) suelos conteniendo Cu y Co, derivados de argilitas y dolomitas [3].

Pero la presencia de suelos metalíferos no necesariamente permite inducir la presencia de hiperacumuladoras, ya que ellas en general sólo han sido descubiertas en regiones tropicales y templadas. Esta distribución de especies a nivel mundial sugiere que la evolución ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de esta peculiaridad y que esta evolución ha ocurrido en un tiempo relativamente prolongado. La glaciación cuaternaria seguramente ha eliminado a todas las especies hiperacumuladoras que podían haber existido fuera de los entornos templados y tropicales contemporáneos.

Un problema actual, de constante debate en los medios académicos abocados a esta temática, es que no se conoce con exactitud cuántas especies hiperacumuladoras realmente existen, dado que la información referida a ellas está dispersada en una variedad de diferentes tipos de fuentes. Esto hace deseable disponer de una base de datos completa y confiable que reúna toda esta información [8]. Después de diversos intentos de establecer algún tipo de base de datos especializada, realizados en Canadá y en el Reino Unido, finalmente y a partir de 2015 se estableció la *Global Hyperaccumulator Database* (www.hyperaccumulators.org), administrada por el Centre for Mined Land Rehabilitation of the University of Queensland (Brisbane, Australia), base de datos que está habilitada, sin restricciones, a cualquier interesado [8].

En la **Tabla 1** se listan todos los metales hiperacumuladores hasta ahora conocidos y se muestran los valores límites que permiten definir la hiperacumulación en base al contenido de metal en los tejidos foliares desecados de las plantas, cuando las mismas crecen en su hábitat natural [8]. Como puede verse, la misma reúne un total de 755 especies, algunas de las cuales pueden hiperacumular más de un metal [2,8]. Estos números seguramente van a irse modificando, a medida que se hagan

nuevos descubrimientos, así como si algunos de los reportes anteriores resultaran descartados. Estas 755 especies pertenecen a 52 familias y casi 130 géneros de plantas. Las familias más fuertemente representadas son la Brassicaceae (83 especies) y la Phyllanthaceae (59 especies).

Tabla 1

Número de especies hiperacumuladoras listadas en la *Global Database* (hasta setiembre de 2017), indicando también los valores límites (referidos a material foliar seco) para los cuales se estima que ocurre el fenómeno [8].

Elemento	Valor límite (µg/g)	Especies
Arsénico	> 1.000	5
Cadmio	> 100	7
Cobre	> 300	53
Cobalto	> 300	42
Manganeso	> 10.000	42
Níquel	> 1.000	532
Plomo	> 1.000	8
T.R. ^{a)}	> 1.000	2
Selenio	> 100	41
Talio	> 100	2
Cromo	> 300	1
Zinc	> 3.000	20

^{a)}T.R. = Tierras raras (elementos lantánidos)

Como puede verse de esta Tabla el níquel es, por lejos, el metal más frecuentemente hiperacumulado, seguido por cobre, cobalto manganeso y selenio.

2. ALGUNOS EJEMPLOS DE HIPERACUMULACIÓN

La mayor parte de plantas hiperacumuladoras de **cobre** y **cobalto** se encuentran localizadas en la provincia de Shaba, República Democrática del Congo y varias de ellas son capaces de hiperacumular a ambos elementos [2]. En el caso del cobre la especie que llega a acumular la mayor concentración de este metal es la planta *Aeollanthus biformifolius*, que llega a acumular hasta 13.500 µg/g del mismo [2]. Por otra parte, las especies del género *Haumaniastrum*, recogidas en la misma región geográfica, muestran una fuerte tendencia a la acumulación de cobre pero una de ellas, *Haumaniastrum robertii*, es particularmente interesante porque aparte de hiperacumular cobre también hiperacumula cobalto, en cantidades del orden de los 4.300 µg/g, siendo este el mayor valor hiperacumulado, reportado hasta el presente [8].

En lo que respecta a la hiperacumulación de **zinc**, se han descrito muchas plantas capaces de acumular más de 10.000 $\mu\text{g/g}$ de zinc en sus partes aéreas, cuando crecen y se desarrollan en su hábitat natural. Así, por ejemplo, la *Arabidopsis halleri* y la *Noccaea caerulescens* tienen la capacidad de hiperacumular concentraciones de Zn del orden de los 13.600 y 43.700 $\mu\text{g/g}$ del metal, respectivamente [9]. Este último valor representa la mayor concentración hiperacumulada conocida hasta ahora [8].

Las primeras especies hiperacumuladoras de zinc fueron descritas en suelos ricos en este elemento, localizados en el oeste de Alemania y en el este de Bélgica, donde existe una flora hiperacumuladora fuertemente dominada por las especies *Viola calaminaria* y *Thlapsi calaminare* [8]. Hay una variedad de plantas que además de Zn suelen incorporar cantidades importantes de Cd o Pb.

En lo que hace a la hiperacumulación de **cadmio** y **plomo**, es interesante de mencionar que en años recientes se han encontrado una gran variedad de hiperacumuladoras de estos metales en diferentes regiones de China [10], algunas de las cuales acumulan también, como recién se dijo, zinc. Entre las hiperacumuladoras más importantes podemos mencionar a la *Silene viscidula* llega a acumular unos 3.900 $\mu\text{g/g}$ de Pb, 11.155 $\mu\text{g/g}$ de zinc y 236 $\mu\text{g/g}$ de cadmio, mientras que *S. gracilicanlis* y *Onosma paniculatum* demostraron ser potentes hiperacumuladoras de plomo, acumulando unos 3.600 $\mu\text{g/g}$ y 1.840 $\mu\text{g/g}$ de Pb, respectivamente [11]. Otras especies hiperacumuladoras de cadmio, descritas también en China son *Roripa globulosa*, *Solanum nigrum* y *Sedum alfredii* [9].

Los mayores valores de hiperacumulación para estos dos elementos fueron observados en *Arabidopsis halleri* (Cd) = 3.600 $\mu\text{g/g}$ y en *Noccaea rotundifolia* (Pb) = 8.200 $\mu\text{g/g}$ [8].

En los últimos años ha habido avances interesantes y continuados en cuanto al conocimiento de especies hiperacumuladoras de **manganeso**. Un primer ejemplo interesante de mencionar es una planta nativa de Australia, *Austromyrtus bidwillii*, que llega a contener hasta 26.500 $\mu\text{g/g}$ de Mn [12]. Un aspecto remarcable, es que casi un 40% del manganeso contenido en las hojas de esa planta puede ser extraído con agua, sugiriendo que una parte del metal está asociada a compuestos solubles, tales como ácidos orgánicos. Este aspecto, fue confirmado mediante el uso de técnicas cromatográficas y espectrometría de masas, mostrando la presencia de los ácidos succínico, málico, malónico, oxálico y cítrico [12].

Las plantas hiperacumuladoras de manganeso parecen ser muy abundantes en la isla de Nueva Caledonia [13]. Una de las especies endémicas que se desarrolla en esa isla es el arbusto *Maytenus founieri*, que puede hiperacumular una cantidad muy importante de Mn, del orden de 20.000 $\mu\text{g/g}$ en sus hojas [13], mientras que *Virotia neurophylla*, una planta de la familia Protaceae, también endémica de Nueva Caledonia que puede llegar a acumular hasta 55.000 $\mu\text{g/g}$ en sus hojas, parece ser hasta ahora la mayor hiperacumuladora de este metal [8].

Por otra parte, parece ser que plantas hiperacumuladoras de **selenio** están ampliamente difundidas en diversas regiones de los EEUU de NA y de Australia y la mayoría de ellas pertenecen a las familias de las Fabaceae tales como el género *Astragalus*, incluyendo *Astragalus bisulcatus* y a las Brassicaceae, incluyendo *Stanleya pinnata*; estas dos especies hiperacumulan más de 10.000 µg/g [10].

Entre otras especies que hiperacumulan fuertemente al selenio debemos mencionar además a *Dieteria canescens*, *Oenopsis foliosa*, *Oenopsis wardii*, *Xylorhiza parryi*, *Astragalus crotalariae* y *Astragalus racemosus* [14]. El *Astragalus bisulcatus* parece ser el mayor hiperacumulador de Se reportado hasta ahora, acumulando hasta unos 15.000 µg/g, en el período anual en el que su poder acumulativo es máximo [8].

Concentraciones relativamente altas de **arsénico** han sido reportadas muchas veces en diverso tipo de helechos, en áreas fuertemente contaminadas por producciones industriales [10]. La hiperacumulación de As ha sido descrita para un cierto número especies de *Pteris* (un género de helechos, perteneciente a la familia *Pteridaceae*), muy notablemente en *Pteris vittata*, que acumula hasta 22.630 µg/g de As [10], este fue el primer helecho reconocido como hiperacumulador de arsénico y es, entre todas las especies descritas hasta el presente, la que más As es capaz de acumular [8]. Otra especie de helecho capaz de acumular cantidades importantes de As es *Pytiogramma calomelanos*, que acumula hasta 8.350 µg/g del elemento [10].

En el caso del **talio**, sólo existen unos pocos ejemplos de especies hiperacumuladoras, todas ellas localizadas en el sur de Francia [10]. La hierba perenne *Biscutella levigata*, que acumula hasta 19.400 µg/g de Tl, es hasta ahora la mayor hiperacumuladora conocida [8]. Por su parte, la planta herbácea *Iberis intermedia*, que es otro fuerte hiperacumulador, llega a acumular hasta 2.800 µg/g de talio [10].

No existe todavía mucha información precisa y segura sobre la hiperacumulación de **chromo**. Los reportes hasta ahora publicados indican que las especies *Leersia hexandra* y *Spartiana argentinensis* serían buenas hiperacumuladoras de este metal [10]. Sin embargo, en general, los valores de Cr acumulados difieren marcadamente según los sitios y plantas analizadas, lo que sugiere una cierta contaminación superficial de las especies, razón por la cual se debería continuar investigando más detenidamente estas primeras y, aparentemente, prometedoras especies [10].

Recientemente, se ha reportado la acumulación de algunos **lantánidos** livianos (La, Ce, Pr, Nd), especialmente en diversas regiones de China [10,15]. Se llevan identificadas más de 20 especies capaces de acumular o hiperacumular elementos lantánidos, el mayor número de ellas se encuentra entre los helechos [15]. Como ejemplo, el helecho *Dichropteris dichotoma*, hiperacumula hasta 7.000 µg/g de lantánidos livianos [16]. Otras especies hiperacumuladoras, capaces de acumular

más de 1.000 $\mu\text{g/g}$ de elementos lantánidos son *Carya tormentosa*, *Carya cathayensis*, *Blechnum orientale* y *Pronephrium triphyllum* [15].

Como se mencionara más arriba, y quedó claramente evidenciado en la Tabla 1, el **níquel** es, por lejos, el metal del cual más ejemplos de hiperacumulación se conocen. Por lo tanto, también ha sido hasta el presente el elemento más investigado en relación a este fenómeno. Las plantas que hiperacumulan níquel están distribuidas especialmente en ocho regiones geográficas principales: Nueva Caledonia, Australia, Sud de Europa y Asia Menor, el archipiélago malayo, Cuba, Oeste de los EEUU de NA, centro de Brasil y sur de África [2]. La mayor concentración y diversidad de plantas de este tipo ha sido encontrada en dos islas: Nueva Caledonia y Cuba.

El caso de Nueva Caledonia es muy particular y merece un comentario adicional. Los suelos de este grupo de islas son muy ricos en níquel, tanto es así que han transformado a Nueva Caledonia en uno de los principales productores de níquel a nivel mundial. Por otro lado, la flora de las islas está conformada por unas 3.300 especies, un 75% de las cuales es endémica de las islas y unas 40 de estas plantas endémicas han sido reconocidas como hiperacumuladoras de níquel [17]. Las mismas pertenecen a 14 géneros y 8 familias diferentes, a saber: *Agatea* (Violaceae), *Argophyllum* (Escalloniaceae), *Casearia* (Flacourtiaceae), *Cleidion* (Euphorbiaceae), *Geissois* (Cunoniaceae), *Homalium* (Flacourtiaceae), *Hybanthus* (Violaceae), *Lasiochlamys* (Flacourtiaceae), *Onconthea* (Oconthecaceae), *Pancheria* (Cunoniaceae), *Phyllanthus* (Euphorbiaceae), *Psychotria* (Rubiaceae), *Sebertia* (Sapotaceae) y *Xylosma* (Flacourtiaceae) [2].

El ejemplo más extremo de hiperacumulación de níquel reportado hasta el presente, se da precisamente en una de esas plantas endémicas de Nueva Caledonia, *Sebertia acuminata* Pierre ex Baillon (recientemente denominada *Pycnandria acuminata*). La concentración de Ni en el látex de esta planta fue determinada como $\sim 25\%$ de la masa seca y esta es la concentración más alta de níquel encontrada hasta ahora en cualquier fluido biológico [3,18]. La masa total de níquel contenida en una única planta, que suele alcanzar hasta los 15 m de altura, se ha estimado en unos 37 Kg [19]. Por otro lado, la concentración de níquel encontrada en las hojas de la planta, es de *ca.* 25.000 $\mu\text{g/g}$ [17].

La acumulación más importante de níquel reportada hasta ahora en hojas, fue determinada en *Berkheya coddii* Roessler, una planta herbácea endémica que crece en suelos ultramáficos, enriquecidos en níquel, de Sudáfrica. En las hojas de algunas plantas de esa especie se han reportado valores de níquel de hasta 76.100 $\mu\text{g/g}$ [8].

Desde el punto de vista histórico, la especie vegetal inicialmente más estudiada por su capacidad acumuladora de níquel fue el *Alyssum*. El *Alyssum* es un género de unas 150-170 especies de plantas, de la familia Brassicaceae, nativas de Europa, Asia y el norte de África, cuya mayor diversidad se encuentra en la región mediterránea. Los primeros estudios se publicaron a mediados del siglo pasado, revelando contenidos de Ni superiores a 1.000 $\mu\text{g/g}$ y demostrando posteriormente

que estas plantas crecen en suelos serpentinos ultramáficos extendidos por todo el sur de Europa desde Portugal hasta el este de Turquía [2]. El centro de máxima diversidad y multiplicidad se encuentra en Anatolia y el grado de endemismo de estas plantas es marcadamente elevado [2].

Otra región geográfica particularmente interesante de analizar es la de Cuba y otras islas aledañas del Caribe. En esta región se han descrito 157 especies de plantas capaces de acumular níquel, 122 de ellas son hiperacumuladoras y las familias más numerosas son *Astaraceae*, *Euphorbiaceae* y *Rubiaceae*. Además, todos los taxones son caribeños, 152 de los cuales son cubanos [20]. La cantidad de plantas hiperacumuladoras de Ni descritas en Cuba, constituye hasta el presente el mayor número de especies de este tipo encontradas en un único país [20,21]. Una investigación detallada de estas plantas y de los suelos en los que habitan, reveló que el número de hiperacumuladoras es mayor en los suelos serpentinos más antiguos, que se supone estuvieron disponibles para su colonización durante los últimos 10-30 millones de años. Tanto las hiperacumuladoras de Ni como las especies endémicas generalmente son mucho más frecuentes en esos suelos antiguos, existentes en ambos extremos de la isla, que en aquellos desarrollados durante el último millón de años, y localizados en la parte central de la isla [21]. Por otra parte, más de 50 especies hiperacumuladoras estudiadas en Cuba son capaces de acumular concentraciones de níquel superiores a los 10.000 µg/g [21].

En los suelos ultramáficos del estado de Goias, en Brasil existe una gran diversidad de especies hiperacumuladoras de níquel; las más notables incluyen *Pfaffia sarcophylla* (Amarantaceae), especies de *Justicia*, *Lophosyachys* y *Ruellia* (Acanthaceae), *Porohyllum* (Asteraceae) y otras [22]. Es interesante de mencionar que una planta, de la familia Euphorbiaceae, y que puede crecer hasta una altura de dos metros, produce un látex muy rico en Ni, conteniendo hasta 1,35% del metal. Esta planta, inicialmente fue clasificada incorrectamente como una especie de *Jatropha* [2,22] y corregida posteriormente como *Cnidocolus* [22].

Un problema muy importante e interesante en relación a la hiperacumulación de metales es la forma en la que las especies metálicas quedan complejadas en la planta. Está claro, que solo una pequeña fracción del metal contenido en las plantas está presente en forma de su acuo-ion libre, esto es, $[M(H_2O)_6]^{n+}$. Se presume que los cationes metálicos están unidos a ligandos de bajo peso molecular o a proteínas [3]. Las mismas plantas pueden generar un cierto número de posibles ligandos, incluyendo ácidos orgánicos, aminos ácidos, péptidos y proteínas.

Se piensa que ligandos con donores nitrogenados deben desempeñar un papel importante en estos procesos de hiperacumulación. En particular, el amino ácido histidina (Fig. 2) es considerado como de importancia central en los procesos de hiperacumulación de níquel [23]. La histidina puede actuar como ligando tridentado a través de su grupo carboxilato, y sus funciones amino e imidazol y es un ligando sumamente versátil, con un variado número de modos de coordinación conocidos.

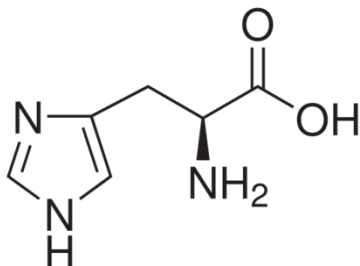


Fig.2. Estructura esquemática de la histidina.

Diferentes estudios de un importante número de especies de plantas (hipertacumuladoras y no-hipertacumuladoras) sugieren claramente que la histidina debe estar involucrada en la hiperacumulación. Sin embargo, su forma de implicancia en este proceso todavía no está claramente definida [3].

Es bien conocido el hecho de que varios ácidos carboxílicos simples se encuentran presentes en concentraciones relativamente elevadas en las vacuolas celulares de tejidos fotosintéticos, incluyendo los ácidos cítrico, *iso*-cítrico, tartárico, málico, malónico, oxálico y aconítico. Diversos estudios han demostrado que estos ácidos podrían desempeñar un papel en la hiperacumulación, dado que muchas veces se ha observado un aumento en los niveles de alguno de ellos en respuesta a un aumento de la concentración de metales en el suelo [3].

En el caso particular del níquel, se ha encontrado que existe una clara correlación entre Ni(II) y ácido cítrico (Fig. 3) en el caso de las plantas más fuertemente hiperacumuladoras de níquel de Nueva Caledonia. Niveles del ácido entre 1000-4000 $\mu\text{g/g}$ son característicos de especies que contienen menos de 100 $\mu\text{g/g}$ de níquel. Cuando el níquel está presente en cantidades del orden de 100-1000 $\mu\text{g/g}$, se observa un fuerte incremento en la concentración de ácido cítrico (4000-8000 $\mu\text{g/g}$) y las hiperacumuladoras de níquel muestran niveles de ácido de 8000-20000 $\mu\text{g/g}$ [24]. En el caso extremo del látex de *Sebertia acuminata*, la remoción de agua genera un sólido que contiene un 16.7% de níquel y un 25% de citrato [24]. En el látex, el níquel está presente tanto como catión $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ como en forma de un complejo aniónico de citrato-niquelato [24].

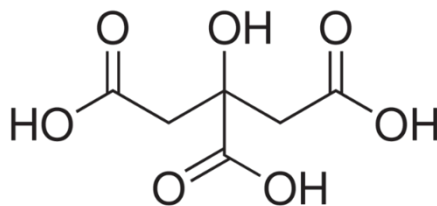


Fig.3. Estructura esquemática del ácido cítrico

Otra molécula orgánica muy interesante, presente en plantas es la nicotianamina (Fig. 4), el precursor de los fitosideroforos y fuertemente relacionado al metabolismo del hierro [25], Las constantes de estabilidad de los complejos

M(II)/nicotianamina siguen el ordenamiento de la bien conocida serie de Irving-Williams, esto es: $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$, mientras que el complejo de Fe(III) muestra un valor mucho más elevado [25].

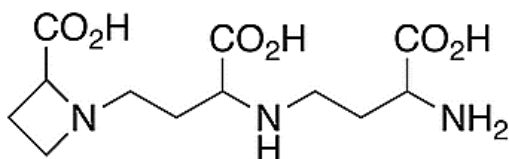


Fig.4. Estructura esquemática de la nicotianamina.

Se ha sugerido que la nicotianamina podría estar involucrada en el transporte de algunos metales durante su acumulación, pero probablemente no como un complejante final del metal [3]. Por otra parte, también está casi descartado que tanto las fitoquelatinas como las metalotioneínas estén directamente involucradas en estos procesos [3,26].

3. CÓMO Y POR QUÉ LAS PLANTAS HIPERACUMULAN METALES ?

Cómo se produce la hiperacumulación de metales en plantas es una pregunta sumamente interesante, pero extremadamente complicada de responder. Evidentemente existe una concurrencia de factores que permiten lograr la hiperacumulación, habiéndose identificado ya varias características y aspectos básicos que permiten empezar a comprender este complejo fenómeno [4,27]. Entre ellos podemos remarcar los siguientes:

1. La planta debe ser capaz de tolerar elevados niveles del elemento en las células de raíces y brotes y tener una elevada capacidad de captación. La hipertolerancia es la propiedad clave que hace posible la hiperacumulación. Se supone que esta tolerancia resulta de la compartimentación y quelación vacuolar [27-29].

2. La planta debe tener la capacidad de translocar un elemento desde las raíces hacia los brotes a velocidades elevadas. Normalmente, las concentraciones de Zn, Ni o Cd en las raíces son 10 o más veces mayores que las concentraciones en los brotes, pero en las hiperacumuladoras la concentración del metal en los brotes excede los niveles de las raíces [27-29].

3. Debe haber una rápida velocidad de captación para el elemento a los niveles que ocurren en las soluciones del suelo [27] y además deben existir mecanismos eficientes para la distribución y redistribución del metal dentro de la planta y una alta capacidad de acumulación vacuolar [29].

Y la siguiente pregunta interesante es: por qué las plantas hacen esto? En otros términos, cuáles son las funciones que origina la hiperacumulación en estas plantas y cuáles son sus beneficios? [4]. Se han propuesto una variedad de hipótesis para explicar el fenómeno: tolerancia a metales por retención en las hojas, resistencia a la sequía, interferencia con plantas vecinas o defensa frente enemigos naturales [4,30]. De acuerdo a la primera hipótesis, el mecanismo de hiperacumulación

permitiría a las plantas a desplazar los metales tóxicos de las raíces y secuestrarlas a los tejidos, más tolerantes, de las hojas. Otra explicación que ha sido postulada, es que altas concentraciones metálicas aumentarían la resistencia de las plantas a la sequía, con un papel de conservantes de la humedad en las paredes celulares o actuando como osmolitos en el interior de las células. Sin embargo, ambas hipótesis no han encontrado hasta el presente suficiente evidencia experimental.

En cambio, la hipótesis de interferencia, a veces llamada también “alopatía elemental”, sugiere que las plantas hiperacumuladoras perennes podrían interferir con el desarrollo de plantas vecinas, por enriquecimiento metálico de la superficie del suelo. Esto impediría el establecimiento de especies vegetales menos tolerantes. Sin embargo, también esta hipótesis encierra muchas controversias y ha sido fuertemente cuestionada.

La hipótesis que ha generado la mayor atención sugiere que las elevadas concentraciones de metal en las partes aéreas de las plantas podrían funcionar como una estrategia desarrollada por las plantas hiperacumuladoras para enfrentar a algunos enemigos naturales, tales como los herbívoros o los patógenos. Esta hipótesis de “defensa elemental” ha sido testeada en muchas oportunidades y aunque todavía existen resultados contradictorios, se ha demostrado una función defensiva por parte de Ni, Cd, Zn, As y Se [4,31]. De todas formas, es evidente que esta hipótesis debe ser confirmada por más estudios experimentales, sobre todo, variando el tipo de especies de plantas y realizando mayor cantidad de estudios de campo [4].

4. POTENCIALES APLICACIONES PRÁCTICAS DE PLANTAS HIPERACUMULADORAS

Aparte de su interés fisiológico y ecológico, en años recientes las plantas hiperacumuladoras han recibido considerable atención debido a la posibilidad de explotar su facilidad de acumulación para ciertas aplicaciones prácticas, en particular para el desarrollo de tecnologías de fitoremediación de suelos contaminados por metales pesados o para ser utilizadas para la extracción de diversos metales de suelos o sitios mineralizados (fitominería) [4].

4.1. Fitoremediación

La fitoremediación se refiere a la utilización de plantas para transformar a contaminantes tóxicos que se encuentran en los suelos, en especies no tóxicas. A veces es llamada también bioremediación, remediación botánica o Remediación Verde. Las categorías de la fitoremediación incluyen la fitoextracción (uso de plantas para remover contaminantes de los suelos), la fitovolatilización (uso de plantas para transformar elementos del suelo en especies químicas volátiles), la rizofiltración (uso de raíces de plantas para eliminar contaminantes de flujos de agua) y fitoestabilización (uso de plantas para transformar metales del suelo en formas menos tóxicas, pero sin remover el metal del suelo). Todas estas temáticas están

detalladamente discutidas en varios artículos de revisión [4,6,27,32-34] y por lo tanto no serán analizados en mayor detalle aquí.

Si bien a primera vista las plantas hiperacumuladoras aparecen como excelentes candidatas para ser utilizadas en estos procesos, las mismas muestran, en realidad, ciertas limitaciones para la fitoremediación debido a que la mayoría de ellas son metal selectivas, no se conocen especies de este tipo para todos los elementos contaminantes de interés, usualmente sólo se los puede utilizar en sus hábitats naturales y, ante todo, tienen generalmente una muy baja biomasa y, usualmente, muestran también crecimientos muy lentos [4].

Otro aspecto de estas tecnologías que empieza a tener un cierto desarrollo es la llamada fitoextracción asistida por agentes quelantes [35]. En estos casos, cuando la planta extractora está creciendo y un tiempo antes de su cosecha (pueden ser días o semanas, según la planta y el metal a extraer) se agrega al suelo una cierta concentración de agente quelante tal como EDTA o ácido cítrico, que suelen aumentar notablemente la solubilidad del metal y facilitar su hiperacumulación. También se han hecho ya ensayos con varios otros agentes quelantes multidentados (p. ej. ácido dietilentriamino-pentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido *trans*-1,2 ciclohexilene-dinitro-tetraacético (CDTA) o la sal trisódica del ácido metilglicindiacético (MGDA), entre otros) con variado éxito [4,35].

4.2. Fitominería

La fitominería es la producción de una “cosecha” de un metal por crecimiento de plantas de elevada biomasa y capaces de acumular altas concentraciones de ese metal. Algunas de esas plantas son hiperacumuladoras naturales y en otras, se puede inducir esa propiedad. Experimentos pioneros en este campo conducen a ubicar a estos procesos como una alternativa “verde” a las prácticas habituales de minería a cielo abierto, que suelen ser nocivas para el medio ambiente. La fitominería, para todo un variado grupo de metales aparece como una posibilidad real, con el potencial adicional de la explotación de depósitos metalíferos cuya explotación minera resulta antieconómica, utilizando las metodologías convencionales [36,37].

Los primeros ensayos científicos de campo con esta tecnología se realizaron a mediados de los '90 en U.S. Bureau of Mines (Reno, Nevada) utilizando una arboleda natural de la especie *Streptanthus polygaloides*, que es una conocida hiperacumuladora de níquel. El suelo de la región de estudio tenía un 0,35% de Ni, claramente por debajo de la concentración económicamente viable para una explotación minera convencional. Al final de este estudio se calculó que, trabajando bajo ciertas condiciones óptimas, se podía obtener una ganancia neta de U\$S 513 por cada hectárea trabajada [36]. Este primer ensayo fue seguido por algunos otros, por ejemplo en Italia trabajando con la hiperacumuladora de níquel *Alyssum bertolonii* o en Sudáfrica, con otra hiperacumuladora de níquel, *Berkheya codii* [36]. Estos primeros resultados, que fueron muy promisorios, alentaron a seguir explorando esta tecnología para encontrar nuevas especies de plantas aptas para la

extracción de otros metales diferentes al níquel. También esta temática está excelentemente analizada en una serie de artículos de revisión [4,6,37,38] y sobre todo en un libro de reciente aparición que compendia en forma muy adecuada y ordenada el estado de situación actual de la fitominería [39].

Un aspecto muy interesante de comentar aquí es que la compañía minera Anglo-American Platinum Corporation (Amplats), que opera en Rustenberg (Sudáfrica) y realiza procesos de recuperación y refinado de diversos metales, encontró importante contaminación con níquel en la zona de operaciones y lanzó un proyecto para la utilización de la planta *B. codii* para la fitoremediación del área. La biomasa de la planta fue colectada e incinerada y el bio-mineral fue luego fundido. El metal crudo fue refinado y moldeado en forma de pequeños lingotes, conteniendo predominantemente níquel. Esta fue la primera demostración, a nivel mundial, de que el metal recuperado a través de una hiperacumuladora puede ser efectivamente obtenido en forma relativamente pura [37].

Para finalizar vale la pena remarcar que a pesar de los muy exitosos y prometedores resultados obtenidos a partir de algunos estudios de campo, hasta el presente no se han reportado todavía operaciones de fitominería comercialmente exitosas y realizadas de manera continuada [4]. Hasta ahora el único emprendimiento comercial de este tipo ya claramente establecido parece ser la extracción de níquel en Albania, mediante la utilización del *Allysum murale* [40], así como el inicio reciente de tareas similares en Sabah, Malasia, utilizando *Phyllanthus securinegioides*, otra conocida hiperacumuladora de níquel [41].

REFERENCIAS

- [1] P.T. Craddock, *Endeavour* **18**, 67 (1994).
- [2] R.R. Brooks, Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. En: *Plants and the Chemical Elements*, M.E. Farago (Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 1994, pp. 87-115.
- [3] D.L. Callahan, A.J.M. Baker, S.D. Kolev & A.G. Wedd, *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 2 (2006).
- [4] N. Rascio & F. Navari-Izzo, *Plant Sci.* **180**, 169 (2011).
- [5] A.J.M. Baker, *J. Plant Nutrit.* **3**, 643 (1981).
- [6] E.J. Baran, *Anales Acad. Nac. Cs. Ex. Fis. Nat.* **72**, 76 (2021).
- [7] R.D. Reeves & A.J.M. Baker, *New Phytol.* **98**, 191 (1984).
- [8] R.D. Reeves, A.J.M. Baker, T. Jaffré, P.D. Erskine, G. Echevarría & A. van der Ent, *New Phytol.* **218**, 407 (2018).
- [9] H. Balafrej, D. Bogusz, Z.E.A. Triqui, A. Guedira, N. Bendaou, A. Smouni & M. Fahr, *Plants* **9**(5), 562 (2020).
- [10] van der Ent, A.J.M. Baker, R.D. Reeves, A.J. Pollard & H. Schat, *Plant Soil* **362**, 319 (2013).
- [11] S.L. Wang, W.B. Liao, F.Q. Chu, B. Liao & W.S. Shu, *Environm. Geol.* **58**(3), 471 (2009).
- [12] S.D. Biswell, I.E. Woodrow, G.N. Batianoff & J. Sommer-Knudsen, *Funct. Plant Biol.* **29**, 899 (2002).

- [13] D.R. Fernando, I.E. Woodrow, T. Jaffré, V. Dumontet, A.T. Marshal & A.J.M. Baker, *New Phytol.* **117**, 178 (2008).
- [14] P.J. White, *Ann. Bot.* **117**, 217 (2016).
- [15] C. Liu, W.S. Liu, M.N. Guo, H. Huot, Y.T. Tang, B. Laubie, M.O. Simonnot, J.L. Morel & R.L. Qiu, Element Case Studies: Rare Earth Elements. En: *Agromining: Farming for Metals*, A. van der Ent, G. Echevarría, A.J.M. Baker & J.L. Morel (Eds.), Springer Internat. Publish., New York, 2018, pp. 297-308.
- [16] X. Shan, H. Wang, S. Zhang, H. Zhou, Y. Zheng, H. Yu & B. Wen, *Plant Sci.* **165**, 1343 (2003).
- [17] N. Perrier, F. Colin, T. Jaffré, J.P. Ambrosi, J. Rose & J.Y. Bottero, *Compt. Rend. Geosci.* **336**, 567 (2004).
- [18] T. Jaffré, R.R. Brooks, J. Lee & J.D. Reeves, *Science* **193**, 579 (1976).
- [19] S. Sagner, R. Kneer, G. Wanner, J.P. Cosson, B. Deus-Neumann & M.H. Zenk, *Phytochemistry* **47**, 339 (1998).
- [20] R. Berazaín-Iturralde, *Rev. Jardín Bot. Nac. (Cuba)* **20**, 17 (1999).
- [21] R.D. Reeves, A.J.M. Baker, A. Borhidi & R. Berazaín, *Ann. Bot.* **83**, 29 (1999).
- [22] R.D. Reeves, A.J.M. Baker, T. Becquer, G. Echevarría & Z.J.G. Miranda, *Plant Soil* **293**, 107 (2007).
- [23] U. Krämer, J.D. Cotter-Howells, J.M. Charnock, A.J.M. Baker & J.A.C. Smith, *Nature* **379**, 635 (1996).
- [24] J. Lee, R.D. Reeves, R.R. Brooks & T. Jaffré, *Phytochemistry* **17**, 1033 (1978).
- [25] E.J. Baran, Phytosiderophores and Related Systems. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 14, Scientific Publishers, Jodhpur, 2013, pp. 1-27.
- [26] E.J. Baran, Phytochelatins: Natural Chelating Agents Involved in Plant Protection. En: *Advances in Plant Physiology*, H. Hemantaranjan (Ed.), Vol. 13, Scientific Publishers, Jodhpur, 2012, pp. 389-414.
- [27] R.L. Chaney, Z. Malik, Y.M. Li, S.L. Brown, E.P. Brewer, J.S. Angle & A.J.M. Baker, *Curr. Op. Biotechnol.* **8**, 279 (1997).
- [28] R. Vogeli-Lange & G.J. Wagner, *Plant Physiol.* **92**, 1086 (1990).
- [29] S. Merlot, V. Sánchez García de la Torre & N. Hanikenne, Physiology and Molecular Biology of Trace Element Hyperaccumulation. En: *Agromining: Farming for Metals*, A. van der Ent, G. Echevarría, A.J.M. Baker & J.L. Morel (Eds.), Springer Internat. Publish., New York, 2018, pp. 93-116.
- [30] T. Jaffré, R.D. Reeves, A.J.M. Baker, H. Shat & A. van der Ent, *New Phytol.* **218**, 397 (2018).
- [31] M. Schiavon & E.A.H. Pilon-Smits, *New Phytol.* **213**, 1582 (2017).
- [32] E. Pilon-Smits, *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 16 (2005).
- [33] P.K. Padmavathiamma & L.Y. Li, *Water Air Soil Pollut.* **184**, 105 (2007).
- [34] J.H. Lee, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **18**, 431 (2013).
- [35] D.E. Salt, R.D. Smith & I. Raskin, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 643 (1996).
- [36] R.R. Brooks, M.F. Chambers, L.J. Nicks & B.H. Robinson, *Trends Plant Sci.* **3**, 359 (1998).

- [37] V. Sheoran, A.S. Sheoran & P. Poonia, *Miner. Engin.* **22**, 1007 (2009).
- [38] V. Sheoran, A.S. Sheoran & P. Poonia, *J. Geochem. Explorat.* **128**, 42 (2013).
- [39] A. van der Ent, G. Echevarría, A.J.M. Baker & J.L.Morel (Eds.) *Agromining: Farming for Metals*, Springer Internat. Publish., New York, 2018.
- [40] A. Bani, G. Echevarría, S. Sulce, J.L.Morel & A. Mullai, *Plant Soil* **293**, 79 (2007).
- [41] R.L. Chaney, A.J.M. Baker & J.L. Morel, The Long Road to Developing Agromining/Phytomining. En: *Agromining: Farming for Metals*, A. van der Ent, G. Echevarría, A.J.M. Baker & J.L. Morel (Eds.), Springer Internat. Publish., New York, pp. 1-17.



Metaloenzimas de Plantas



ANCEFN

Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

ISBN 978-987-4111-16-6



9 789874 111166