

LA ONDA DE CALCIO EN CÉLULAS VEGETALES

The Calcium Wave of Vegetable Cells

GEYDAN TD¹, B.Sc.; SPINEL CLARA^{1,2}, Ph. D.

¹Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, ciudad universitaria, Carrera 30 No. 45-03. AA. 14490. Bogotá, Colombia,

²Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, ciudad universitaria, Edificio Manuel Ancizar. AA. 4948. Bogotá, Colombia.
cmspinelg@unal.edu.co

Presentado el 14 de junio de 2006, aceptado el 4 de septiembre de 2007, correcciones 2 de octubre de 2007.

RESUMEN

El calcio es un nutriente esencial para las plantas, se encuentra involucrado en procesos de desarrollo y de respuesta a factores bióticos y abióticos. Numerosas señales modifican la concentración de calcio en el citoplasma, núcleo, retículo endoplásmico o plastídios. El incremento del calcio en el citosol es rápidamente disminuido, pero en el lapso de incremento, se forman innumerables y complejas cascadas de señalización que conllevan a la respuesta celular. Este nota expone los mecanismos implicaciones de la entrada del calcio en las células vegetales.

Palabras clave: calcio, señalización celular, proteínas sensoras, membranas.

ABSTRACT

Calcium is an essential nutrient for plants; it is involved in developmental processes and in responses to biotic and abiotic factors. Several signals that modify the calcium concentration in the cytoplasm, endoplasmic reticulum, nucleus and/or plastids have been observed. These changes in the calcium concentration in the cell interior are rapidly returned to basal levels, in the meantime, innumerable and complex signaling cascades. This note exposes the mechanisms of calcium transport through the cell membranes of the entrance of calcium in the plant cells.

Key words: Calcium, cellular signaling, sensor proteins, membrane.

INTRODUCCIÓN

Las células vegetales mantienen en reposo de 80 a 200 nM de calcio libre ($[Ca^{2+}]_c$) (Bush, 1993). Estímulos bióticos como abióticos perturban la $[Ca^{2+}]_c$ en células vegetales, perturbaciones denominadas firmas de $[Ca^{2+}]_c$, y son diferencialmente descodificadas por la célula dependiendo del estatus fisiológico, la localización del estímulo, de

cuantos y cuales canales se activen y de la cinética y magnitud de la perturbación en la $[Ca^{2+}]_c$. Por lo tanto, cada estímulo se manifiesta con características particulares a las que la célula responde de forma repetible. Debido a que la difusión de Ca^{2+} en el citoplasma es baja y la capacidad tampón para el Ca^{2+} en el citoplasma es alta (White y Broadley, 2003), la apertura de canales permeables al Ca^{2+} producirá un incremento local en la $[Ca^{2+}]_c$ que será disipada rápidamente una vez se cierran los canales. En la mayoría de los casos, las diferentes proteínas y mensajeros que responden a los cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ deben estar asociados directamente al canal o anclados a la membrana, los cuales informarán a la célula sobre las condiciones medio-ambientales reinantes y la llevarán a producir una respuesta específica ante determinado estímulo. Ondas, oscilaciones y gradientes han sido descritos en muchos tipos celulares (Malhó *et al.*, 1998; Trewavas, 1999) y han sido reconocidos como las principales formas de comportamiento temporal de los $\Delta[Ca^{2+}]_c$ en la señalización celular.

LA ONDA DE Ca^{2+}

En 1978 Gilkey *et al.* reportaron en Medada, un modelo animal, elevaciones pasajeras en la $[Ca^{2+}]_c$ cuando el espermatozoide penetraba el óvulo, por luminiscencia observaron que la elevación pasajera en la $[Ca^{2+}]_c$ codificaba una única onda de Ca^{2+} libre que atravesaba el óvulo en unos 60 s. El inicio de la onda ocurría en el punto de entrada del espermatozoide y viajaba por los dominios celulares inmediatamente debajo de la membrana celular. Asociado a éste proceso observaron una onda de vesículas corticales que se fusionaban a la membrana plasmática. El fenómeno se jerarquizó así: 1- la onda se inicia en sitios celulares definidos; 2- debe de existir una amplificación de la $[Ca^{2+}]_c$ local desde el lugar de inicio de la onda; 3- una región de elevada $[Ca^{2+}]_c$ espacialmente localizada ocurre en la onda; 4- debido a que la onda no puede ser transmitida por difusión debe presentar un continuo proceso de liberación y reabsorción de Ca^{2+} desde almacenamientos intracelulares; 5- un patrón temporal puede ser reconocido a medida que la onda viaja de un lado del óvulo hacia el otro, y un período refractario de liberación de Ca^{2+} desde las vesículas de almacenamiento interno mantiene el movimiento en una dirección; 6- un punto final fisiológico resulta con la fusión de vesículas; en términos más simples la distribuciones espaciales de la $[Ca^{2+}]_c$ son importantes para evocar respuestas fisiológicas. El anterior fenómeno también ocurre en células vegetales de una gran diversidad de especies. La onda se propaga por acción de la fosfolipasa C (PLC) activada por determinadas señales (Malhó *et al.*, 1998). El sustrato de la PLC, el fosfatidil inositol-4-5 difosfato (PIP_2), es sintetizado a partir de precursores en la membrana plasmática. La PLC es activada hidroliza el PIP_2 en diacilglicérido (DAG) e inositol trifosfato ($InsP_3$). A diferencia del Ca^{2+} , el $InsP_3$ es fácilmente movilizado por el citoplasma y los canales sensibles a éste compuesto localizados en membranas plasmáticas, de organelos y de vesículas son rápidamente activados (abiertos), estos canales requieren del $InsP_3$ y del Ca^{2+} para su correcta activación (Malhó *et al.*, 1998). Cuando el $InsP_3$ se une al canal, un sitio de unión al Ca^{2+} es brevemente expuesto; si el Ca^{2+} está ausente, el canal rápidamente se inactiva, pero si se encuentra presente el sitio de unión al Ca^{2+} es rápidamente ocupado y el canal se abre permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. Ésta apertura únicamente se logra con $[Ca^{2+}]_c$ en el rango de los 100 nM a 5 μ M y con niveles adecuados de $InsP_3$ (Malhó *et al.*, 1998). Sin embargo, la unión del Ca^{2+} única-

mente sirve para retrasar la eventual inactivación de canal, ya que posteriormente mediante fosforilación del canal se altera la sensibilidad del canal por el Ca^{2+} y eventualmente se inactiva. De esta forma, la movilización de Ca^{2+} a través de un canal dependiente de InsP_3 es breve y autolimitante. Éste mecanismo permite que los canales sensibles al InsP_3 actúen como contadores coincidentes de las concentraciones de Ca^{2+} y de InsP_3 evitando aperturas espontáneas de los canales (Trewavas, 1999). Estudios cinéticos de dichos canales indican que poseen gran flexibilidad en los requerimientos de Ca^{2+} y de InsP_3 , ya que altas concentraciones de Ca^{2+} necesitan bajas concentraciones de InsP_3 para activar el canal, mientras altas concentraciones de InsP_3 necesitan bajas concentraciones de Ca^{2+} .

MOVIMIENTO DE LA ONDA DE Ca^{2+}

Cuando las células son levemente excitadas o parcialmente estimuladas, pequeños incrementos en las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ son detectados. Éstas regiones dependiendo del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ han recibido varios nombres: *quarks*, *clips*, *bumps*, *puffs* y *sparks* siguiendo un orden de intensidad. Si una señal inicial es leve, pequeñas concentraciones de InsP_3 son generadas, pocas vesículas liberan Ca^{2+} y la onda es truncada. Por lo tanto, estos pequeños incrementos son considerados como unidades elementales en la señalización por Ca^{2+} capaces de liberar cuantos de Ca^{2+} cuando son activadas (Malhó *et al.*, 1998). Cuando los canales dependientes de InsP_3 se activan, la concentración de Ca^{2+} que rodea a los canales incrementa, de esta manera, los sitios de unión para el Ca^{2+} en estos canales son ocupados y el canal se abre por un breve lapso permitiendo el flujo de Ca^{2+} y la activación de otros canales. Por ello el Ca^{2+} es responsable de la inducción de liberación de más Ca^{2+} , lo cual ha sido designado liberación de calcio inducida por calcio (CICR), y es ésta liberación lo que forma la onda. Por lo tanto, la onda no es un movimiento de Ca^{2+} sino un movimiento de liberación de Ca^{2+} . La dirección de la onda se mantiene hacia adelante debido al período refractario que sigue la apertura y cierre de los canales (Malhó *et al.*, 1998). Los canales sensibles al InsP_3 se encuentran localizados en las membranas, lo cual permite que la onda se mueva por los dominios inmediatamente cercanos a ellas. Muchas proteínas sensibles al Ca^{2+} se encuentran ancladas o cercanas a las membranas, por lo cual la difusión de la onda activará dichas proteínas y desencadenará distintas cascadas de señalización. Otros segundos mensajeros como el cADP-R (*cyclic adenosin diphosphate Ribose*) también pueden colaborar en la movilización y liberación de Ca^{2+} de almacenamientos intracelulares (Trewavas, 1999).

RESTRICCIONES EN LA FORMACIÓN Y MOVILIZACIÓN DE LA ONDA

En presencia de concentraciones óptimas de InsP_3 y de Ca^{2+} es bastante probable que la onda se propague. La onda se moverá progresivamente desde su lugar de origen a través de la célula. No se conocen las características específicas de iniciación de la onda, se piensa que debe tener una aglomeración inusual de receptores o una mayor densidad de canales (Trewavas, 1999). Sin embargo, en algunos casos la onda se verá truncada y la elevación de concentración de Ca^{2+} permanecerá limitada a regiones particulares de la membrana. 1- El InsP_3 es rápidamente hidrolizado por fosfatasas específicas, por lo tanto si la señal inicial es débil, las elevaciones en la concentración de InsP_3 serán bajas y caerán rápidamente sin alcanzar el umbral crítico. 2- La separación espacial entre la PLC

y las fosfatasa específicas del InsP_3 generaran gradientes transitorios de InsP_3 . 3- Se sabe que el contenido de Ca^{2+} en las diferentes regiones del ER (retículo endoplásmico) varían (Trewavas, 1999), por lo tanto en regiones que posean insuficientes cantidades de Ca^{2+} la propagación de la onda cesará, de ésta forma, la onda final tendrá una topología compleja compuesta de regiones con altos y bajos niveles de Ca^{2+} además con regiones sin elevaciones de Ca^{2+} . Así, conformaciones diferenciales de proteínas dependientes de Ca^{2+} asociadas a membranas permitirán diferentes combinaciones de activación durante la señalización (Trewavas, 1999). 4- Si ATPasas dependientes de Ca^{2+} se encuentran presentes en la membrana en cuestión, de nuevo resultará una compleja topología en dicha onda. 5- Si las ondas se transmiten de la superficie de una membrana a otra esta transmisión dependerá de la distancia entre las membranas y la intensidad de la señal.

LA OSCILACIÓN DE Ca^{2+}

Hasta el momento, un solo tipo de oscilación en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ha sido descrita basada en picos o elevaciones transitorias, este tipo de oscilación en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es una función de la intensidad del estímulo, por tal razón se han denominado respuestas graduadas (Malhó *et al.*, 1998). La elevación transitoria en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ puede resultar en un solo pico, en dos picos (bifásica) o en múltiples picos (oscilaciones). Los diferentes tipos de elevaciones pueden diferir en su amplitud, periodicidad y duración (White y Broadley, 2003). Por ejemplo, el enfriamiento constante ha demostrado dar una respuesta bifásica en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, en la cual el pico inicial del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es seguido por un segundo pico más prolongado (Sanders *et al.*, 1999), de forma similar, estrés por calor, salino, oxidativo e hiperosmótico resultan en respuestas bifásicas, lo anterior también ha sido reportado en respuesta a elicitores y patógenos (Gelli *et al.*, 1997). Las oscilaciones incrementan la diversidad de la señalización por Ca^{2+} disponible para las células. Muchos sistemas excitables poseen la habilidad de responder a perturbaciones mediante la expresión de oscilaciones de componentes claves (Malhó *et al.*, 1998). Por ejemplo, la retroalimentación negativa con una demora en la transferencia de la información para efectuar dicha retroalimentación, es generalmente responsable de una oscilación. De forma similar, interacciones entre dos componentes reguladores como lo son Ca^{2+} e InsP_3 también pueden causar que el sistema oscile. Diferentes estímulos generan perturbaciones espaciales en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ contrastantes debido a la movilización de Ca^{2+} de diferentes almacenamientos intracelulares y/o por la activación de canales permeables al Ca^{2+} en localizaciones restringidas. Varias hipótesis han sido propuestas explicando la generación de oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, estos incluyen modelos basados en la sucesiva liberación y realmacenamiento de Ca^{2+} en organelos o medio apoplástico (Harper, 2001); sucesivas activaciones y desactivaciones de canales blanco de Ca^{2+} a través de cascadas de señalización coincidentes (Sanders *et al.*, 1999); y finalmente estiramiento y relajación de las membranas (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997 en White y Broadley, 2003).

AGRADECIMIENTOS

A la División de Investigación DIB y al Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Igualmente, al Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física.

BIBLIOGRAFÍA

- BUSH D. Regulation of Cytosolic Calcium in Plants. *Plant Physiol.* 1993;103:7-13.
- GELLI A, BLUMWALD E, HIGGINS V. Activation of Plant Plasma Membrane Ca^{2+} Permeable Channels by Race Specific Fungal Elicitors. *Plant Physiol.* 1997;113:269-279
- GILKEY J, JAFFE L, RIDGWAY E, REYNOLDS G. A Free Calcium Wave Traverses the Activating Egg of the Medaka. *J Cell Biol.* 1978;76:448-466.
- HARPER J. Dissecting Calcium Oscillations in Plant Cells. *Trends Plant Sci.* 2001;6:395-397.
- MALHÓ R, MOUTINHO A, VAN DER LUIT A, TREWAVAS A. Spatial Characteristics of Calcium Signaling: The Calcium Wave as A Basic Unit in Plant Cell Calcium Signaling. *Phil Trans R Soc B.* 1998;353(1374):1463-1473.
- SANDERS D, BROWNLEE C, HARPER J. Communicating With Calcium. *Plant Cell.* 1999;11:691-706.
- TREWAVAS A. Le calcium c'est la vie: Calcium makes waves. *Plant Physiol.* 1999;120:1-6.
- WHITE P, BROADLEY M. Calcium in Plants. *Ann Botany.* 2003;92:487-511.