



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

Doctorado en Biología Experimental.

“Efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica y del ciclo celular en semillas  
de maíz en germinación.”

T E S I S

**para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental**

presenta:

M. en B. E. Alma Xochil Avila Alejandre.

Cómite Tutorial

Directora: Dra. Laura J. Pérez Flores

Asesora: Dra. Estela Sánchez de Jiménez.

Asesora: Dra Tzvetanka Dimitrova Dinkova

México . D. F.

## CÓMITE TUTORAL

### **DIRECTORA**

**Dra. Laura J. Pérez Flores**

Profesor Titular "C" T. C.

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

Depto. Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I.

[ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)

### **ASESORES**

**Dra. Estela Sánchez Quintanar**

Profesor Titular "C" T. C.

Lab 103. Edif. E. Facultad de Química,

Depto. de Bioquímica, UNAM.

[estela@unam.mx](mailto:estela@unam.mx)

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

Investigador Asociado "C" T.C.

Lab 103. Edif. E. Facultad de Química.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

[cesy@unam.mx](mailto:cesy@unam.mx)

MIEMBROS DEL JURADO.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la presente tesis titulada: "Efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica y del ciclo celular en semillas de maíz en germinación."

Con fecha de examen pendiente

**Dra. Estela Sánchez Quintanar** \_\_\_\_\_

Profesor Titular "C" T. C.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

[estela@unam.mx](mailto:estela@unam.mx)

**Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova** \_\_\_\_\_

Investigador Asociado "C" T.C.

Depto. de Bioquímica, UNAM.

[cesy@unam.mx](mailto:cesy@unam.mx)

**Dra. Edith Cortés Barberena** \_\_\_\_\_

Profesor Titular "C" T. C.

Depto. de Ciencias de la Salud. DCBS UAM-I.

[cobe@xanum.uam.mx](mailto:cobe@xanum.uam.mx)

**Dr. Fernando Díaz de León Sánchez** \_\_\_\_\_

Profesor Titular "C" T. C.

Depto. Ciencias de la Salud. DCBS. UAM-I

[fdls@xanum.uam.mx](mailto:fdls@xanum.uam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco:

Al Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. El posgrado se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0 y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 185590 otorgada para la realización de este trabajo.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca 09BCD0057-11 otorgada para la realización de este trabajo.

Al financiamiento de la UAM, así como de la SEP-PROMEP al CA Ciencia y Tecnología de Plantas y Red de Cuerpos Académicos UAM-I-CA-26 para la realización del presente trabajo.

Al laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa donde se realizó el presente trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO.

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
2.1 Crecimiento.....	11
2.2 El ciclo celular en plantas. Generalidades.....	12
2.3 Regulación del ciclo celular: los puntos de restricción (checkpoints).....	17
2.4 La transición G1-S.....	18
2.4.1 Las ciclinas D y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's).....	19
2.4.2 La proteína del retinoblastoma (pRB).....	22
2.4.3 La familia de factores de transcripción E2F.....	22
2.5 Germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.....	23
2.6 Regulación del crecimiento en plantas por insulina y por los factores semejantes a insulina IGF's .....	26
2.7 Mecanismo de acción de la insulina/IGFs.....	27
2.8 Efecto de la insulina y los IGF's en la germinación y el crecimiento en maíz.....	31
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>38</b>
5.1 Objetivos particulares.....	38
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
6.1 Material biológico y tratamientos.....	39
6.2 Efecto de un pulso de insulina en el crecimiento de ejes embrionarios en germinación.....	39
6.3 Determinación de la S6K-Treonina 389.....	40
6.3.1 Obtención de proteínas.....	40
6.3.2 Determinación de la fosforilación de la proteína S6K en la Treonina 389 mediante <i>western blot</i> .....	40
6.4 Contenido de ADN por Citometría de Flujo.....	41
6.5 Aislamiento de ARN total.....	42
6.6 Aislamiento de ARN de la fracción polisomal.....	43
6.7 Análisis de la regulación de la expresión génica.....	44
6.7.1 PCR semicuantitativo.....	45

6.7.2 RT-qPCR.....	46
6.8. Síntesis <i>de novo</i> de PCNA .....	47
6.9 Análisis estadístico.....	48.
<b>7. RESULTADOS.....</b>	
7.1 Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula y el coleoptilo de ejes embrionarios de maíz en germinación.....	49
7.2 Efecto de un pulso de insulina en la fosforilación de S6K y el reclutamiento en polisomas de pS6 en las radículas y coleoptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.....	50
7.3 Análisis del ciclo celular en radículas de ejes embrionarios y su estimulación por insulina durante la germinación.....	54
7.4 Efecto de la insulina sobre los niveles de transcritos de proteínas que participan en la transición G1-S del ciclo celular.....	58
7.5 Estandarización de la RT- qPCR.....	58
7.6 Expresión de E2F y PCNA.....	62
7.7 Determinación de la síntesis de novo de PCNA en radículas de ejes embrionarios de maíz.....	65
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>11.REFERENCIAS.....</b>	<b>72</b>

## RESUMEN

Durante la germinación de las semillas, se reactiva el metabolismo, se repara el ADN y se reinicia la división celular en los meristemas. Sin embargo, los mecanismos que coordinan el crecimiento y la división celular en los ejes embrionarios de maíz en germinación no se comprenden completamente. Se ha reportado que la insulina bovina acelera la germinación y el crecimiento en ejes embrionarios de maíz y recientemente se ha descrito la presencia de un factor semejante a la insulina ó ZmIGF (por sus siglas en inglés *Zea mays Insulin-like growth factor*), que muestra efectos similares. En el presente trabajo, se estudió el efecto de la insulina en la regulación del reinicio del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz en germinación. Los resultados muestran que la insulina estimuló diferencialmente el crecimiento, la fosforilación de S6K y la acumulación de los transcritos de pS6 en la fracción polisomal, en las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios. Se observó un efecto más temprano y mayor en las radículas comparadas con los coleoptilos, por lo que se estudió el efecto de la insulina en el ciclo celular en el meristemo radicular mediante citometría de flujo, se encontró que la transición G1-S fue estimulada y se indujo la proliferación. Además, se determinó mediante qRT-PCR que la insulina incrementó la transcripción de E2F y de PCNA (proteínas reguladoras de la transición G1-S) asimismo, indujo la síntesis *de novo* de PCNA a las 15 horas de germinación. Estos resultados indican que la insulina estimula preferencialmente el crecimiento en las radículas de ejes embrionarios en germinación y sugieren que su efecto en la transición G1-S y en la activación de la proliferación celular es mediado en parte por la inducción de E2F y PCNA.

## **ABSTRACT.**

During seed germination, metabolism is reactivated, ADN is repaired and cell division is restarted in the meristems. The mechanisms that coordinate cell growth and division in maize embryonic axes during germination are not well understood. It has been reported that bovine insulin accelerates the germination and growth of embryonic axes recently described the presence of one factor or insulin-like ZmIGF (Zea mays Insulin-like growth factor) showing similar effects. In the present work, regulation of the cell cycle restart by insulin was studied in germinating embryonic axes. Our results showed that insulin differentially stimulates growth, S6K phosphorylation, S6rp transcript accumulation on the polysomal fraction, in the radicles and the coleoptiles of the embryonic axis. A stronger and earlier effect was observed in radicles compared to coleoptiles; therefore, the effect of insulin on the cell cycle of the radicular meristem was studied by flow cytometry, finding that G1-S transition was stimulated and cell proliferation was induced. Furthermore, it was determined by qRT-PCR insulin increased E2F transcription and PCNA (regulatory proteins G1-S transition) and the de novo synthesis of PCNA at 15 hours of germination. These results show that insulin preferentially stimulates growth in the radicles of germinating embryonic axes and suggest that its effect in the G1-S transition and in the activation of cell proliferation is mediated by induction of E2F and PCNA proteins.

## 1 INTRODUCCIÓN.

Una semilla madura es una estructura de dispersión y resistencia para la planta progenitora. En el caso de las semillas ortodoxas, como los cereales, una vez que se ha completado la morfogénesis del embrión, se inicia la maduración de la semilla, durante la cual, se llevan a cabo procesos de desecación y acumulación de reservas para sostener el crecimiento del embrión hasta el establecimiento de la planta autótrofa. Se ha demostrado que durante esta etapa las células del embrión detienen la división celular es decir, se arrestan, principalmente en la transición G1-S.

El primer paso para el establecimiento de una planta es la germinación de la semilla que se inicia con la imbibición. La maquinaria enzimática y molecular necesaria se encuentran en la misma semilla seca. En las primeras horas de imbibición se reactiva el metabolismo, se llevan a cabo diversos procesos de reparación celular (incluyendo ADN y organelos) y se sintetizan *de novo* proteínas a partir de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) almacenados durante la maduración. A tiempos posteriores, la síntesis de proteínas se basa en la transcripción de nuevos ARNm y su traducción. La germinación se completa cuando una parte del embrión, usualmente la radícula, se extiende para penetrar las estructuras que la circundan y emerge (protruye) de la semilla.

Diversos estudios parecen indicar que aunque el proceso de división celular no es necesario para la protrusión de la radícula, el reinicio del ciclo celular es un evento esencial para el desarrollo y establecimiento posterior de la plántula. Por lo que, en los últimos años se han realizado experimentos que analizan los eventos moleculares que le permiten al embrión reiniciar el ciclo celular. Dichos estudios han demostrado que el proceso por el cual las células del embrión llevan a cabo la transición G1-S es muy similar al proceso descrito para otros eucariontes.

Sin embargo, se ha prestado poca atención al hecho de que el embrión de las semillas, no es una estructura uniforme sino que contiene diferentes partes y meristemas (el meristemo radicular ó radícula, el meristemo aéreo ó del coleoptilo y los meristemas laterales) cuyo destino celular se encuentra comprometido desde la morfogénesis. Por lo tanto, es interesante estudiar cómo se reactivan estos meristemas y su respuesta a los estímulos hormonales y ambientales durante la germinación.

Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan el reinicio del crecimiento en cada una de las partes que forman al embrión usando como modelo la semilla de maíz (*Zea mays* L) en germinación. Se estudiaron las respuestas al crecimiento de los embriones de granos de maíz en respuesta al efector insulina. En maíz se caracterizó recientemente un homólogo de los factores semejantes a insulina o IGFs (por sus siglas en inglés *insulin like growth factor*) denominado ZmIGF (por sus siglas en inglés *Zea may Insulin like growth factor*). El ZmIGF ha mostrado tener actividad mitogénica en callos de maíz y acelerar la germinación de granos de maíz, la insulina mostró efectos similares en los mismos tejidos, por lo que se consideró relevante probar el efecto de la insulina en la reactivación del ciclo celular durante la germinación de maíz.

## **2. ANTECEDENTES.**

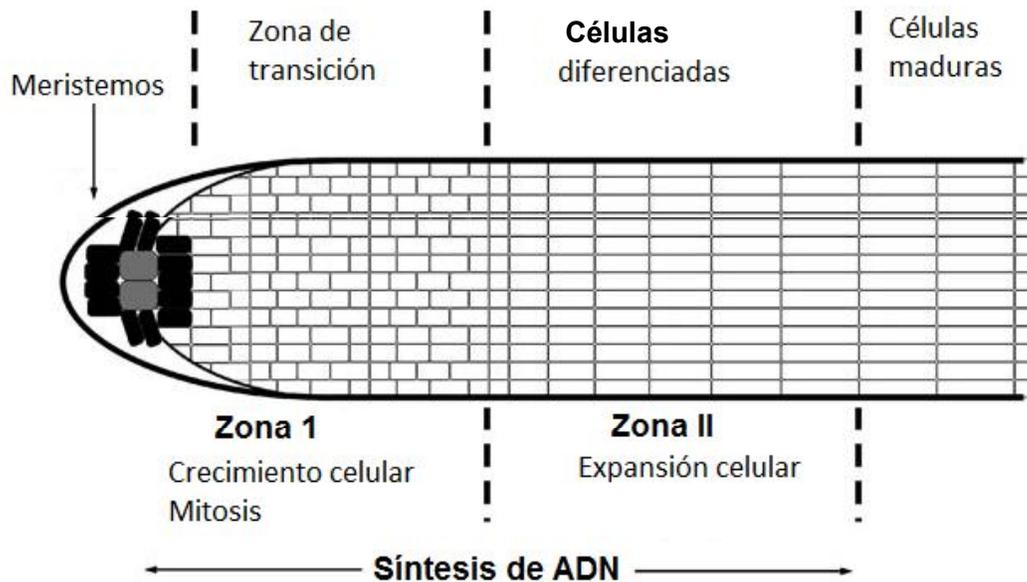
### **2.1 Crecimiento.**

En general, se considera que el crecimiento de los organismos incluye dos procesos: la expansión y la proliferación (división) celular. El alargamiento o expansión celular se define sólo como un aumento de la masa celular, generalmente es previo a la división celular. La proliferación celular por su parte, se define como el aumento del número de células. Ambos son componentes del crecimiento y determinan, por ejemplo, el tamaño de un organismo (Baserga, 2007).

Diversos estudios han demostrado que el crecimiento y la división celular son procesos separados pero acoplados. La pregunta acerca de cómo se encuentran acoplados es importante para entender en conjunto como crecen los organismos. Se sabe que el aumento de biomasa es un requerimiento para la división celular; esta conclusión proviene de estudios donde se ha demostrado que en general, las células deben duplicar su tamaño antes de duplicar su ADN (Baserga, 2007) y que las condiciones que detienen el alargamiento, como la carencia de nutrientes, arrestan el ciclo celular, mientras que mutaciones que bloquean la progresión del ciclo celular no inhiben el aumento de biomasa (Kozma y Thomas, 2002).

Lo anterior plantea la cuestión de cuáles son las vías de señalización que regulan ambos procesos y si se encuentran unidas o separadas. En general los estudios realizados en *Drosophila*, levaduras y cultivos celulares animales y vegetales, muestran que hay dos vías de transducción de señales que se encuentran involucradas en la respuesta del crecimiento ante señales como los mitógenos o los nutrientes. La vía Ras/MAPcinasa que actúa dirigiendo la expresión del factor de transcripción *myc* y la vía de la fosfatidil inositol 3-OH cinasa (PI3K) que responde entre otros, a los factores de crecimiento como los IGF's (Kozma y Thomas, 2002).

A diferencia de los animales, las plantas muestran una organogénesis continua, en las que se conservan zonas de crecimiento donde las células mantienen su capacidad de proliferación; los meristemos. Las células más alejadas de los meristemos, muestran expansión y crecimiento celular, estos procesos las llevan a la diferenciación (De Jager y col., 2005) (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática del meristemo apical de la raíz. Se ilustran las diferentes zonas de crecimiento (Tomado de Doerner, 2007)**

## 2.2 El ciclo celular en plantas. Generalidades.

El estudio de la división celular en las plantas se han basado en sus homólogos en animales. Aunque substancialmente la estructura y los elementos que participan en la división celular son muy similares entre animales y plantas, estas últimas tienen algunos rasgos particulares.

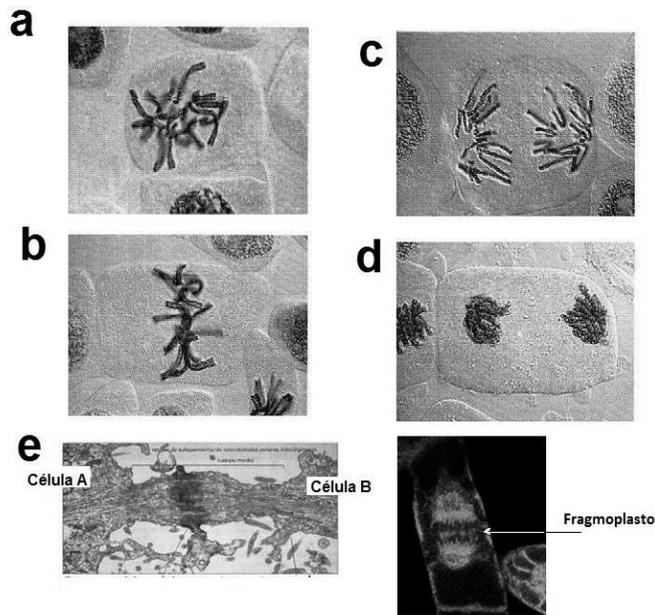
En los eucariontes, el ciclo celular es un grupo de eventos que culminan con la duplicación de la célula. Está dividido en cuatro fases: en la fase G1, la célula se prepara para duplicar el ADN y se decide si continua la división o sale del ciclo celular. En presencia de condiciones desfavorables de crecimiento (como la disminución de nutrientes), se extiende el periodo de G1. A este primer punto se le denomina *checkpoint* o punto de restricción G1-S. Cuando el primer punto de restricción es superado se entra a la fase S, donde el ADN se duplica. Este proceso comienza en sitios específicos denominados orígenes de replicación. En estos sitios, se abre la doble hélice, exponiendo el ADN a las enzimas que llevan a cabo la replicación, las cuales se mueven en ambas direcciones desde el origen de replicación. El proceso completo de duplicación incluye la

síntesis de proteínas, entre ellas las histonas que participan en el empaquetamiento del ADN en los cromosomas (Inzé y de Veylder, 2006).

En la fase G2 se acumulan moléculas que serán necesarias durante la fase M (mitosis). Aunque se ha considerado como un estado de tránsito entre las fases S y M, en esta etapa se comprueba si ha habido errores durante la replicación del ADN y si se ha producido su duplicación completa. Este punto se denomina *checkpoint* o punto de restricción G2-M. Si se detectan defectos, la célula no entrará en la fase M y el ciclo celular se detendrá hasta que los daños sean reparados o hasta que el ADN sea completamente copiado. El límite entre las fases G2 y M no está totalmente claro y algunos autores consideran este cambio en la mitad de la profase mitótica G2 un periodo en el que se realizan los preparativos para la división celular propiamente dicha y M, la fase mitótica (Suryadinata y col., 2010).

La fase M supone la división de una célula en dos células hijas. La fase M se divide en varias etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Las tres primeras están relacionadas con las modificaciones que se producen en el ADN: compactación, formación y movimiento de los cromosomas y descondensación. La citocinesis es el proceso de división del citoplasma en dos partes por estrangulamiento celular, lo que provoca la fusión y fisión de la membrana plasmática, dando como resultado dos células independientes (Suryadinata y col., 2010).

En la citocinesis en las células vegetales las células hijas se separan, no por la formación de un anillo contráctil, sino por la formación de una nueva pared celular en el interior de la célula que se va a dividir. Esta pared nace rodeada de membrana y es perpendicular y central al huso mitótico. Su posición determina la localización de las dos células hijas y por lo tanto también la dirección de crecimiento de la planta. La formación de esta nueva pared celular está mediada por lo que se denomina el fragmoplasto, que posee como componentes a los restos de los microtúbulos polares del huso mitótico y a vesículas procedentes del aparato de Golgi. Estas vesículas se transportan hasta esta zona por proteínas motoras y se fusionan entre sí y con la pared celular en crecimiento (Figura 2).



**Figura 2. Fases de la mitosis.** a) *Profase*; b) *Metafase*; c) *Anafase*; d) *Telofase*; e) *Citocinesis* (Tomado de Karp, 1998).

Se sabe también que la progresión a través de las fases del ciclo celular en plantas, al igual que en otros eucariontes, está controlada por la actividad de los complejos de las ciclinas (CYC) con las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's) (Dewitte y Murray, 2003). Se ha reportado que muchos de los elementos ya descritos en animales se encuentran también presentes en las plantas (Tabla 1) (De Jager y col., 2005).

Las CDK's de plantas son distintas a las reportadas en otros eucariontes. En animales por ejemplo; hay 7 CDK's (de CDK1 a CDK7). En plantas se usa un sufijo alfabético de CDKA (homóloga a CDK1 de animales o *cdc2* de levadura) a CDKE. Las CDKA's, contienen un dominio con la secuencia consenso PSTAIRE, las CDKB's tienen una secuencia consenso PPTTLRE donde se encuentra el sitio de unión a CYC (Dewite y Murray, 2003; De Jager y col., 2007).

Hay 13 clases de CYC en los animales (A-L y T) y sólo cinco en las plantas: A, B, C, D, H (Francis 2007). Las CYC en plantas son proteínas con baja homología entre sí, aunque muestran una región conservada en el sitio de unión con las CDKA's. En este sitio de aproximadamente 100 aminoácidos, se encuentra la caja, que se requiere para la unión a las CDKA's hay además una caja de degradación, que es susceptible de ubiquitinación la

cual conduce a una destrucción proteolítica rápida en el C-terminal. Las CYC de la fase G1 contienen la secuencia (PEST) rica en prolina, glutamato/aspartato y serina/treonina (Dewitte y Murray, 2003; Inzé y De Veylder, 2006). La unión de las CYC-CDK's requiere de la activación de la CDK mediante la fosforilación de un residuo de treonina (usualmente Tre 160) que es llevado a cabo por la proteína CAK (por sus siglas en inglés *CDK-activating kinase*). La fosforilación induce un cambio conformacional que permite la unión de la CYC. (Dewitte y Murray, 2003; Francis, 2007). La inactivación del complejo ocurre por fosforilación inhibitoria en los residuos treonina 14 y tirosina 15, que son catalizadas por la cinasa WEE1, que ha sido ya reportada en maíz y *Arabidopsis* o bien por otras proteínas inhibitoras como las KRP (por sus siglas en inglés *Kip-related proteins*), éstas proteínas impiden la interacción ciclina-CDK (Dewitte y Murray, 2003).

**Tabla 1. Lista de proteínas clave del ciclo celular y sus homólogos en *Arabidopsis***  
(Tomado de De Jager y col., 2005).

<i>HOMOLOGOS</i>	<i>FASE DEL CICLO CELULAR EN QUE PARTICIPAN</i>	<i>PROTEÍNA EN ARABIDOPSIS</i>
<i>Ciclinas tipo D</i>	<i>Transición G1-S y G2-M</i>	<i>CYCD1;1</i> <i>CYCD2;1</i> <i>CYCD3;1; -3;2; -3;3</i> <i>CYCD4;1; -4;2</i> <i>CYCD5;1</i> <i>CYCD6;1</i> <i>CYCD7;1</i>
<i>Ciclinas tipo A</i>	<i>G1-S y Fase S</i>	<i>CYCA1;1; -1;2</i> <i>CYCA2;1; -2;2; -2;3; -2;4</i> <i>CYCA3;1; -3;2; -3;3; -3;4</i>
<i>Ciclinas tipo B</i>	<i>Transición G2-M</i>	<i>CYCB1;1; -1;2; -1;3; -1;4</i> <i>CYCB2;1; -2;2; -2;3; -2;4</i> <i>CYCB3;1</i>
<i>CDK's</i>	<i>Transición G1-S y Fase G2</i>	<i>CDKA;1</i>
<i>CDK's específicas de plantas</i>	<i>Transición G2-M, mitosis, Fase G2</i>	<i>CDKB1;1; -1;2</i> <i>CDKB2;1; -2;2</i>
<i>CAK's</i>	---	<i>CYCH;1/CDKD;1; -2; -3;</i> <i>CDKF;1</i>
<i>KRPs</i>	<i>G1/S transición</i>	<i>KRP1; -2; -3; -4; -5; -6; -7</i>
<i>RB's</i>	<i>G1-S</i>	<i>RBR</i>
<i>Familia E2F</i>	<i>Transición G1-S</i>	<i>E2Fa; -b; -c</i> <i>DPa; -b</i> <i>DEL1; -2; -3</i>
<i>WEE1</i>	<i>Transición G2-M</i>	<i>WEE1</i>

Estos complejos actúan como activadores o inhibidores mediante un mecanismo de regulación que involucra la fosforilación de diversos sustratos. La subunidad catalítica de la CDK reconoce un motivo en la proteína blanco (usualmente una serina o treonina seguida de una prolina) y las CYC permiten discriminar entre los diferentes sustratos (Francis, 2007). Entre los mecanismos de regulación del ciclo celular conocidos se incluyen la regulación transcripcional y traduccional de las moléculas que participan en él; incluyendo las mismas CDK's, las ciclinas y los factores involucrados en la síntesis de proteínas (Dewitte y Murray, 2003).

### **2.3 Regulación del ciclo celular: los puntos de restricción (*checkpoints*).**

Como se mencionó previamente, la transición adecuada entre cada una de las fases del ciclo celular es esencial para concluir el proceso de división. Las transiciones se encuentran reguladas por señales ambientales hormonas o factores ambientales como la luz o la disponibilidad de nutrientes (Doerner, 2007). En plantas se sabe que durante el proceso de maduración de la semilla los meristemos apicales y radicales son arrestados en la transición G1-S. En tejidos adultos la limitación de nutrientes como la sacarosa arresta el crecimiento de los meristemos en la misma fase (Inzé y de Veylder, 2006).

El proceso de división celular implica un gasto energético muy grande para la célula, por lo que una vez iniciada la duplicación del ADN, la división celular deberá completarse. Es por esto que en los puntos de restricción o *checkpoints* se llevan a cabo procesos de revisión para determinar la eficiencia de cada etapa del proceso. Hay dos puntos principales de regulación del ciclo celular, el que se encuentra en la transición G1-S, previo a la duplicación del ADN y el de la transición G2-M.

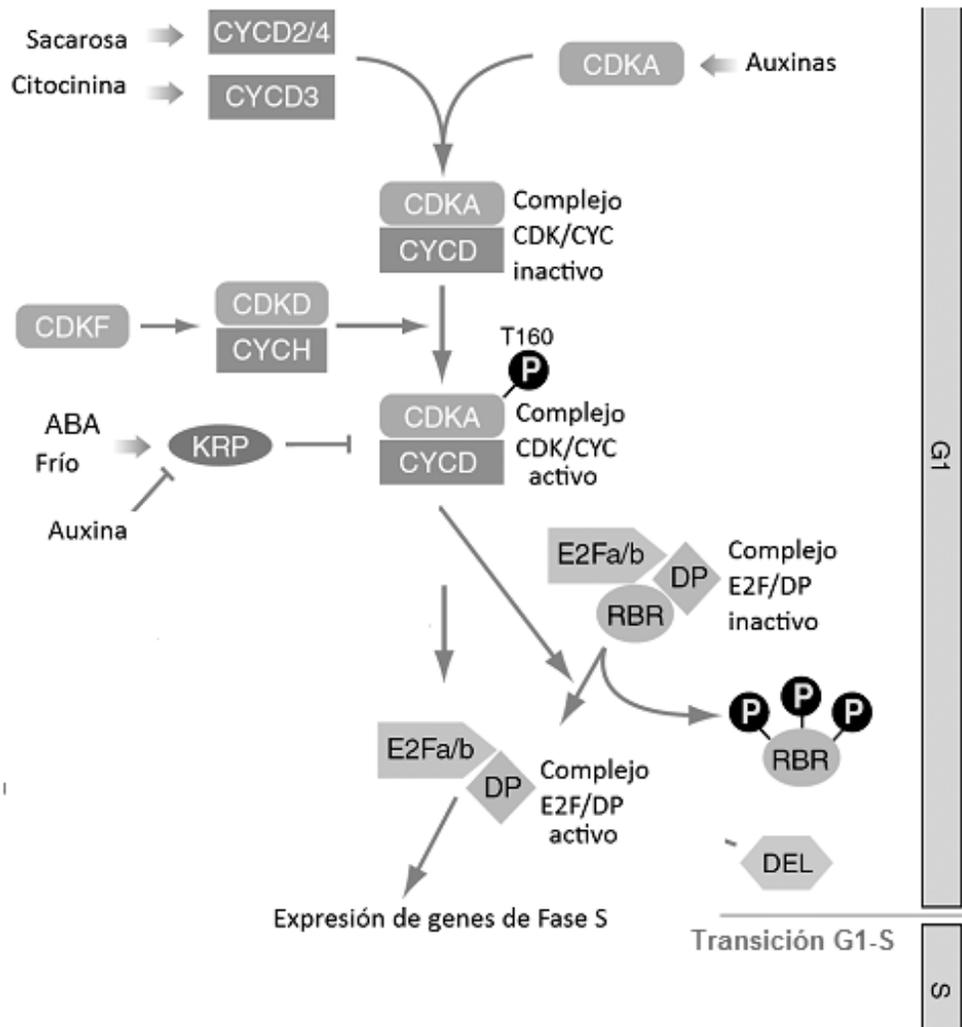
Los estudios han mostrado que la transición G1-S involucra a la vía E2F-PRB, que se encuentra conservada entre los eucariontes, incluyendo plantas y animales. La familia de factores de transcripción E2F y las proteínas RB desempeñan funciones clave en el control del ciclo celular, la diferenciación, el desarrollo y la apoptosis. En particular, se ha estudiado el efecto de los factores E2F sobre proteínas de la maquinaria de duplicación del ADN entre las que se encuentran PCNA, polimerasas etc. (Ramírez-Parra y col., 2003).

## 2.4 La transición G1-S.

En plantas se ha propuesto un modelo para el control de la transición de G1-S en el cual las ciclinas tipo D son los mediadores primarios (Hochegger y col., 2008) Como se mencionó anteriormente, uno de los puntos clave en el control del ciclo celular eucariótico es la transición de G1-S (Meijer y Murray, 2000) (Figura 3).

La transcripción de las ciclinas D es activada por señales extracelulares y lleva a la formación de un complejo activo CDKA-CYCD (CDK1-cdc2, en animales) que a su vez fosforila secuencialmente a la proteína RBR (por sus siglas en inglés *Retinoblastome-related protein*) y debilita la unión de ésta sobre el dímero E2F-DP, un factor de transcripción que a su vez participa en la transcripción de genes involucrados en la fase S (Vázquez-Ramos y De la Paz-Sánchez, 2003; Inzé y De Veylder, 2006).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que la activación del ciclo celular dentro de los meristemas de la raíz precede a la protrusión; además se ha observado que en distintos tiempos de germinación el tipo de ciclinas expresadas varía. En maíz, las ciclinas CYCD1;1 CYCD2;2 y la CYCD4;1, se definieron como “tempranas” y al parecer participan en la activación de los meristemas de la raíz y se observa un incremento en su expresión en los ejes embrionarios en germinación (Buendía-Monreal y col., 2011) . Por otro lado, la CYCD3;1 se empieza a expresar durante los eventos post-germinativos (Masubelele y col., 2005) y participa en el alargamiento del mesocótilo de la plántula de maíz (Buendía-Monreal y col., 2011)



**Figura 3. Representación esquemática de la regulación de la transición G1-S en plantas**  
(Tomado de Inzé y De Veylder, 2006)

#### 2.4.1. Las ciclinas D y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's).

Las ciclinas D (CYCD) controlan la progresión G1-S y a diferencia de las ciclinas A y B no parecen mostrar una expresión cíclica, su presencia depende de señales extracelulares que estimulan o mantienen la división (Dewitte y Murray, 2003). Se han identificado estas ciclinas en una gran variedad de plantas. Las ciclinas D fueron definidas como tales, debido a la presencia de un motivo conservado: LxCxE; el cual es responsable de su interacción con las proteínas RBR y una cierta homología en sus secuencias de aminoácidos con las ciclinas de animales (Dewitte y Murray, 2003). En *Arabidopsis* se han descrito 10 tipos de ciclinas y han sido clasificadas en 7 subclases, las CYCD3 tienen

tres miembros, las CYCD4, dos, y el resto sólo un miembro. En maíz, el genoma contiene al menos 17 genes diferentes de CYCD distribuidos en los subgrupos que se han descrito previamente para otras plantas como se muestra en la Tabla 2 (Buendía-Monreal y col., 2011).

La expresión de las CYCD se ha visto asociada con tejidos en proliferación y se encuentra excluida de tejidos diferenciados aunque recientemente Buendía-Monreal y colaboradores (2011) mostraron que en maíz hay una gran cantidad de transcritos de CYCD probablemente asociados con procesos de diferenciación. Por otro lado, se sabe que las ciclinas D de la misma clase se expresan diferencialmente en tejidos en división durante el desarrollo. Por ejemplo, la CYCD4;1 se asocia al desarrollo de raíces laterales, embriogénesis y tejidos vasculares (De Veylder y col., 1999). La CYCD3;1 se acumula en tejidos en proliferación como los meristemos, las hojas jóvenes y los tejidos vasculares (Riou-Khamlichi y col., 1999; Dewitte y Murray, 2003, Inzé y de Veylder 2006). La CYCD1, se expresa en las inflorescencias (Gaudin y col., 2000). Se ha demostrado que la expresión de algunas de estas ciclinas, como la CYCD2;1 y la CYCD3;1 responden a señales extracelulares como la disponibilidad de azúcares y a hormonas como las auxinas, las citocininas y los brasinosteroides (Buendía-Monreal y col., 2011).

Como ya se mencionó, las CDKA y CDKB controlan las transiciones durante el ciclo celular. Sin embargo, la CDKA se asocia con todos los tipos de ciclinas. Sus niveles de transcrito y proteína son constantes a través del ciclo celular (Inzé y De Veylder, 2006). Sin embargo, su actividad se incrementa durante la transición G1-S, continua siendo alta en la fase S, y muestra un pico en G2-M, en células en cultivo de tabaco y *Arabidopsis* (Oakenfull y col., 2002).

En maíz, hay dos genes prácticamente idénticos que codifican para CDKA que han sido clonados, difiriendo sólo en las 3' y 5' UTRs (regiones no traducidas), (Vázquez-Ramos y De la Paz-Sánchez, 2003). Adicionalmente, se ha determinado que el inicio de la diferenciación del endospermo se realiza inhibiendo la actividad de CDKA (Coelho y col., 2005) y se ha determinado que las hormonas tales como auxinas o benciladenina, estimulan la actividad del complejo CDKA-Ciclina D durante la germinación (Sánchez y col., 2005). Por otra parte, se determinó que en maíz, anticuerpos anti-PCNA co-inmunoprecipitan por un lado con una proteína tipo CYCD (esta asociación termina

cuando la presunta CYCD desaparece durante la germinación) y también con una proteína identificada como CDKA durante las primeras 6 h de germinación (Sánchez y col., 2002). Esta cinasa puede fosforilar eficientemente a la proteína ZmRBR, *in vitro*. Estos resultados demuestran que las semillas de maíz activan el ciclo celular con un mecanismo similar al descrito en animales y que lo tienen disponible durante la germinación temprana

**Tabla 2. Ciclinas tipo D en *Arabidopsis* y sus homólogos en maíz y arroz .(Tomado de Buendía Monreal y col., 2011)**

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Zea mays</i>
D1	CycD1;1	CycD1;1 CycD1;2 CycD1;3	CycD1;1
D2/D4	CycD2;1  CycD4;1  CycD4;2	CycD2;1 CycD2;2  CycD2;3 CycD4;1  CycD4;2	CycD2;1 CycD2;2a CycD2;2b  CycD2;3 CycD4;1a CycD4;1b  CycD4;2
D3	CycD3;1 CycD3;2 CycD3;3	CycD3;1	CycD3;1a CycD3;1b
D5	CycD5;1	CycD5;1 CycD5;2  CycD5;3	CycD5;1 CycD5;2a CycD5;2b CycD5;3a CycD5;3b
D6	CycD6;1	CycD6;1	CycD6;1
D7	CycD7;1	CycD7;1	CycD7;1
Total	10	14	17

#### **2.4.2 La proteína del retinoblastoma (pRB).**

En plantas a la proteína del retinoblastoma (pRB) se le denomina proteína relacionada a RB (pRBR), igual que en otros eucariontes se encuentran en el núcleo y se caracterizan por presentar varios dominios. Los dominios A y B están altamente conservados entre humanos y plantas (Harbour y Dean, 2011). La proteína muestra varios sitios disponibles para ser fosforilados. Hasta el momento, se ha reportado un sólo gen para la pRBR en *Arabidopsis*. Pero en maíz hay dos genes (RBR1 y RBR2) que muestran niveles de expresión diferenciales entre sí; aunque el significado funcional de esta diferencia es aún desconocido (Ach y col., 1997). En maíz, los genes pRBR son expresados en todos los tejidos, pero la mayor expresión está asociada con el ápice del tallo (Francis, 2007).

Cuando se examinó la abundancia de la pRBR durante el desarrollo de las hojas de maíz se encontró un gradiente a lo largo de la lámina de la hoja, con altos niveles asociados a tejidos ya diferenciados y bajos niveles en la zona proliferativa en la base de la hoja (Huntley y col., 1998). De la misma manera que en animales, las pRBR de plantas interactúan con varias proteínas incluyendo a la familia de factores de transcripción E2F, las CYCD, etc., a través de la región carboxilo terminal. Estudios en animales han demostrado que las pRBR actúan principalmente como supresores de la transcripción mediante dos mecanismos, el primero involucra su unión a factores tales como E2F inhibiendo su actividad; en el segundo, el complejo pRBR–E2F actúa como promotor que activa a represores de la transcripción (Harbour y Dean, 2011). En plantas el mecanismo principal es el primero (Vázquez–Ramos y De la Paz–Sánchez, 2003). Estos resultados apoyan la relación entre pRBR y el control del ciclo celular y la diferenciación.

#### **2.4.3 La familia de factores de transcripción E2F.**

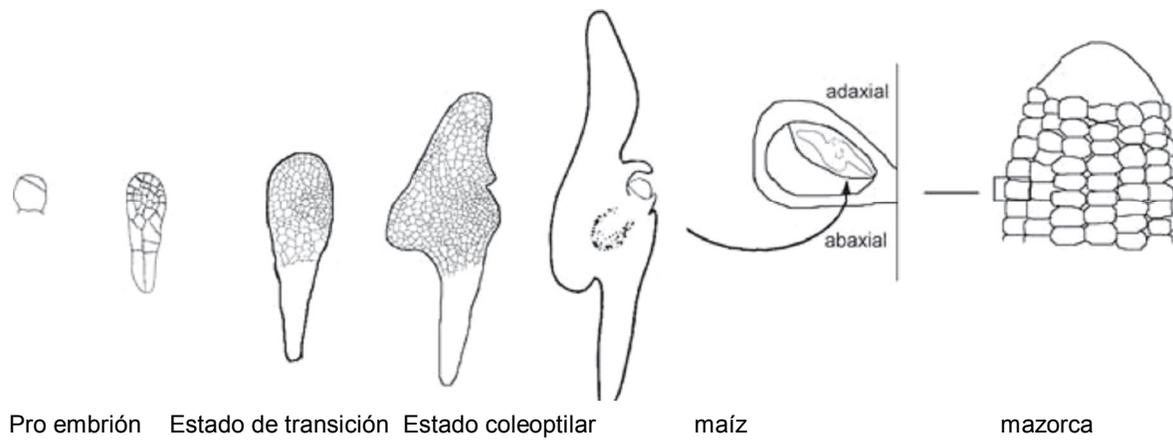
Los factores E2F representan una familia de proteínas relacionadas. En los humanos, comprende seis tipos (E2F1-E2F6) y dos relacionadas lejanamente (DP1 y DP2). Tanto las proteínas DP como los factores E2F han sido identificados en varias especies incluyendo trigo, tabaco, zanahoria, arroz y *Arabidopsis*. En *Arabidopsis*, se han descrito ocho proteínas que por homología en sus secuencias pueden ser clasificadas como E2F, DP y DEL (DP y E2F-like). En las diversas especies de plantas las proteínas clasificadas como E2F muestran una organización de dominios similar a las proteínas

animales: un dominio de unión al ADN altamente conservado del tipo cierre de leucinas y un C-terminal donde se encuentra el sitio de unión a pRBR (Figura 3). En general se sabe que los genes de la familia E2F participan en la regulación del ciclo mitótico y la endoreplicación durante el desarrollo vegetal. Mediante análisis de hibridación *in situ* se ha demostrado que AtE2Fa y AtDEL-3 se expresan en regiones que se encuentran en división activa (por ejemplo el ápice de la raíz, el meristemo apical del tallo y los primordios foliares (Francis, 2007).

Entre las proteínas que son reguladas por E2F se encuentran algunas polimerasas (Dewitte y Murray, 2003) y la proteína PCNA. La proteína PCNA ha sido descrita en *Arabidopsis*, chícharo, frijol y zanahoria. Dicha molécula juega un papel fundamental en la replicación y reparación del ADN. Recientemente se ha clonado en maíz y se le ha encontrado asociada a proteínas que participan en el control de la fase G1 del ciclo celular, tales como las CYCD (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). Se ha observado además que esta proteína se encuentra en niveles constantes durante el desarrollo del embrión y disminuye hasta niveles muy bajos en la semilla madura. Durante la germinación se ha observado que la proteína se acumula lentamente, llegando a un pico alrededor de las 20 h de imbibición. La benciladenina, un inductor de la proliferación en plantas acelera este proceso y la proteína es detectable entre 3-6 h después de iniciada la imbibición (Herrera y col., 2000).

## **2.5 Germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.**

El ciclo de vida de las plantas con semillas comienza con un evento de doble fertilización, característico para las angiospermas. Un espermatozoide se fusiona con la célula del óvulo, mientras que el segundo espermatozoide se fusiona con la célula binucleada central del saco embrionario para dar lugar al endospermo. Alrededor de 7-9 días después de la polinización (DAP) comienza la embriogénesis con una división asimétrica del cigoto que resulta en una célula apical pequeña y una basal grande. Eventualmente estas células desarrollarán dos zonas de crecimiento bien diferenciadas, el meristemo apical y el radicular (Figura 4) (Nardmann y Werr, 2009).



**Figura 4. Embriogénesis de maíz** (Tomado de Nardmann y Wer, 2009).

En el caso específico del maíz, el cariopse es en realidad un fruto, ya que una gran parte de su estructura es de origen materno. Para fines de este trabajo se utilizará el término *semilla* para referirse a ella. Los granos de cereales o (cariopses) pueden dividirse en tres partes: el embrión diploide (plantúla en miniatura), el endospermo triploide (reserva de nutrientes) y la testa (cubierta protectora). La testa generalmente es dura, formada por una capa interna y una cutícula. Estas características le confieren a las semillas cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases y permiten regular el metabolismo de la semilla (germinación y crecimiento) (Moreno, 1996).

Una vez terminado el proceso de organogénesis, la semilla madura acumula reservas y ocurre un proceso de desecación, durante este proceso se sintetizan una familia de proteínas denominada MAT (proteínas de por sus siglas en inglés *maturation genes*). Entre los genes de esta familia se encuentran los que codifican para enzimas que participan en la producción de azúcares, los de proteínas que participan en la adquisición a la tolerancia a la desecación y también son reprimidos los genes que participan en la síntesis de ADN y en la remodelación de las histonas (Angelovici y col., 2010). Estos procesos dan lugar al arresto en la fase G1 del embrión y éste detiene su crecimiento.

Durante la germinación, las células de la semilla reactivan su metabolismo. El reinicio de la actividad metabólica en las semillas está relacionado con la rehidratación o imbibición. Las semillas absorben agua en una curva trifásica (Figura 5). A lo largo de estas fases las células realizan diversos procesos de reparación en organelos como las mitocondrias, en el ADN y se reactiva la síntesis de proteínas (Nonogaki y col., 2010).

Se han llevado a cabo distintos experimentos para entender los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren durante la germinación de las semillas. Entre ellos se ha establecido que los ejes embrionarios de semillas de cereales reinician la síntesis de proteínas temprana durante las primeras etapas de la imbibición, basándose en la traducción de ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) que quedaron almacenados en los ejes embrionarios durante su maduración (Sánchez de Jiménez y col., 1981). Con base en estos antecedentes se ha demostrado que en las primeras fases de la imbibición de las semillas la síntesis de proteínas está basada principalmente en la traducción de ARNm almacenados, mientras que a tiempos posteriores se basa en la transcripción de nuevos ARNm y su traducción. Entre los mensajes almacenados se encuentran proteínas ribosomales y polimerasas (Rincón-Guzmán y col., 1998; Sánchez de Jiménez, 2000; Gómez y Vázquez-Ramos, 2003).

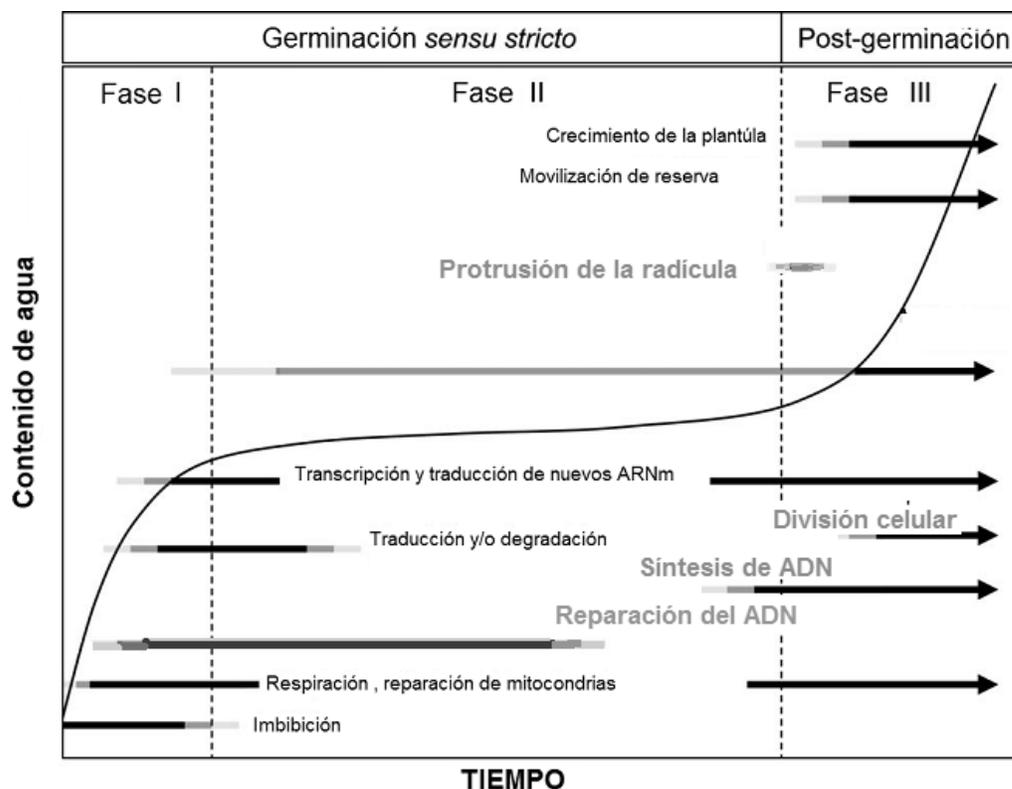


Figura 5. Eventos metabólicos durante la germinación (Tomado de Nonogaki y col., 2010).

Se ha demostrado que algunas ciclinas como las CYCD4, CYCD5 y CYCD6 de maíz, no existen como mensajes almacenados en la semilla seca y que su transcripción se inicia alrededor de las 6 h (Buendía-Monreal y col., 2011).

Finalmente, las células meristemáticas son estimuladas a reiniciar el ciclo celular, este proceso ocurre alrededor del momento de protrusión de la radícula (Gendreau y col., 2008; Vázquez- Ramos y De la Paz-Sánchez, 2003). Estos eventos están regulados en forma muy precisa para que las células del eje embrionario sean competentes para pasar de la fase G0 ó G1 a S del ciclo celular (Sánchez de Jiménez, 2000). En este momento, la decisión de reentrar al ciclo celular o permanecer arrestado es crucial para determinar la formación de la plántula (Barroco y col., 2005).

## **2.6 Regulación del crecimiento en plantas por Insulina y los factores semejantes a insulina IGF's .**

La insulina madura es un polipéptido de 6 KDa constituido por dos cadenas A y B las cuales cuentan con 21 y 30 aminoácidos, respectivamente; las cadenas están unidas por puentes disulfuro (Mathews y col., 2000). En células animales, las respuestas inmediatas de esta hormona incluyen el transporte de glucosa y la activación o inhibición de la actividad de algunas enzimas. En períodos más largos, la insulina estimula la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y promueve el crecimiento celular (Proud y Denton, 1997; Mounier y Posner, 2006). Los IGF's también regulan el crecimiento. En particular, se ha determinado que los IGF1 incrementan la expresión de CYCD1 en células de la tiroides y también incrementan la actividad de NF-kB, lo que podría acelerar la transición G1-S, por una vía mediada por PI3K (Ren y col., 2009).

Los vegetales no producen insulina pero sí se ha podido demostrar la existencia de factores semejantes a insulina. En espinaca se reportó un péptido reconocido por anticuerpos contra insulina y en soya un péptido de 4KDa que es reconocido por los receptores de insulina bovinos (Collier y col., 1987; Hanada y Hirano, 2004). También se han realizado estudios en semillas de frijol, donde se caracterizó un IGF que participa en el transporte de azúcares en la semilla durante la germinación (Olivieria y col., 2004).

Recientemente se ha descrito en maíz un péptido de 5.7 KDa que ha sido caracterizado como un IGF, el denominado ZmIGF (por siglās en inglés *Zea mays insulin-like growth factor*) (Rodríguez –López y col., 2011), que se encuentra ubicado principalmente en las zonas meristemáticas, lo que sugiere que participa en el crecimiento y la división celular. En semillas de maíz la insulina y el ZmIGF aceleran la germinación y el crecimiento de las plántulas (García Flores y col., 2001) y promueve el paso de la fase G<sub>1</sub> a S en cultivos de células de maíz (Sotelo y col., 2010). Este efecto está acompañado de la estimulación de la síntesis de proteínas (Paz Lemus, 2005). Como se mencionó previamente, los ejes embrionarios quiescentes de maíz contienen una gran cantidad de ARNm almacenados. Se ha observado que dichos ARNm y una poza abundante de subunidades ribosomales, se encuentran en el eje embrionario de la semilla seca y que cuando la imbibición comienza son utilizados directamente en la síntesis de proteínas (Rincón Guzmán y col., 1998).

Por lo que resulta relevante investigar cuál es el patrón de expresión de proteínas que participan en la transición G<sub>1</sub>-S, durante la germinación ya que se sabe además que un porcentaje importante de las células de la semilla de maíz se encuentran arrestadas precisamente en la fase G<sub>1</sub> (Baiza y col., 1989, Vázquez-Ramos y De la Paz-Sánchez 2003).

## **2.7 Mecanismo de acción de la insulina/IGFs.**

Se han encontrado varias secuencias de elementos de respuesta a insulina (IRE's por sus siglas en inglés *insulin response elements*), aunque no existe una secuencia consenso universal. Al parecer la insulina regula la transcripción afectando el nivel, la localización y la actividad de los factores de transcripción (Mounier y Posner, 2006). La inhibición de la expresión génica en respuesta a insulina, es mediada por la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K) y AKT (Nakae y col., 2001). Los principales factores de transcripción involucrados en la regulación transcripcional en respuesta a insulina son las proteínas Foxo, las SREBP y las Sp1 (Mounier y Posner, 2006). Las proteínas Foxo, son una familia de factores de transcripción que muestran un efecto de represión de la transcripción en presencia de insulina (Mckinnon y col., 2006).

Las SREBP, son una familia de factores de transcripción con tres isoformas, que contienen un motivo del tipo cierre de leucina, en el hígado SREBP-1c regula la síntesis de lípidos, mientras SREBP-2, regula la síntesis de colesterol. La expresión del gen SREBP1 está regulada por insulina en el hígado y los adipocitos, vía la activación de PI3K y AKT (Eberle y col., 2004).

Finalmente, las proteínas Sp1, son activadores ubicuos que contienen tres regiones de tipo dedos de zinc en el extremo carboxilo terminal, y se unen a motivos ricos en GC en los promotores de los genes involucrados en la respuesta a insulina. Su efecto sobre la transcripción depende del carácter de cada gen (Barroso y Santisteban, 1999; Chakravarty y col., 2004).

Los resultados de estudios de la señalización de insulina y de los IGF's revelan que la interacción de estos efectores con sus receptores (del tipo tirosina-cinasa) activan a la cinasa del fosfatidil-3-inositol (PI3K).

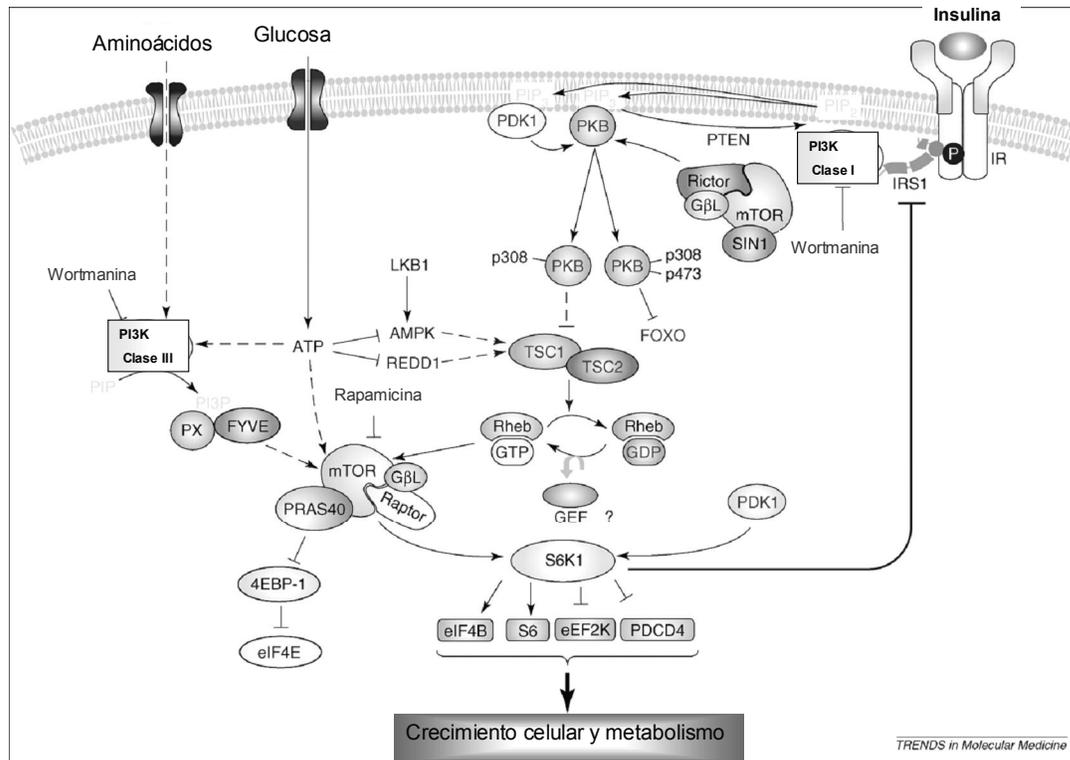
En la Figura 6 se muestran algunos de los componentes más importantes de la vía PI3K-TOR, esta vía se ha estudiado intensamente porque como se observa participa en la biogénesis de ribosomas. Las proteínas constituyen la mayoría de la masa seca de una célula y la cantidad de proteína por célula está influenciada por el número de ribosomas, por lo tanto el tamaño celular está determinado por la biogénesis de ribosomas (Baserga, 2007).

La biogénesis de ribosomas, es esencial para la transición G1-S ya que se requiere incrementar la síntesis de proteínas para el crecimiento, además se ha observado que la alteración de la expresión o función de los componentes de la vía PI3K como TSC1, TSC2, S6K, 4EBP, TOR, Rhan o los factores de transcripción Foxo derivan en cambios células de tamaño anormal, las mutaciones en la vía llevan al arresto de las células en G1, la sobreexpresión de los mismos elementos promueven la transición G1-S (Jorghensen y Tyers, 2004).

La activación de PI3K genera PIP3 que une a PKB y la recluta a la membrana celular donde se activa por fosforilación por las cinasas PDK1 y TOR. La fosfatasa PTEN revierte este paso transformando PIP3 a PIP2. A su vez, la PKB/Akt activada tiene varios

sustratos, incluyendo la glucógeno sintasa, factores de transcripción y la proteína 2 de esclerosis tuberosa (TSC2) del complejo TSC1-TSC2, que actúa como un complejo supresor de tumor, inhibidor del crecimiento celular. La fosforilación de TSC2 resulta en la disociación y degradación del complejo TSC1-TSC2, liberando la GTPasa homóloga de RAS (denominada Rheb), y permitiéndole alcanzar el estado activo (unión a GTP), lo que activa TOR y facilita a su vez la transmisión de la señal a sus sustratos (Dann y col., 2007). Entre los sustratos de TOR se encuentran 4E-BP1 y S6K, mTOR fosforila e inhibe a 4E-BP1, liberando de la represión al factor eIF4E y activando la síntesis de proteínas y la progresión del ciclo celular. mTOR también activa a la cinasa S6K1, que se propone está involucrada en la regulación de la síntesis de proteínas, tamaño celular, progresión del ciclo celular y homeostasis de la glucosa. La vía de señalización PI3K también es activada por otros factores de crecimiento, tales como el epidérmico (EGF), los semejantes a insulina (IGFs) y el derivado de plaquetas (PDGF). Una vez activada PKB a través de estas vías, puede mediar la fosforilación de varios sustratos específicos, como los descritos anteriormente, además de la caspasa 9 y la proteína antagonista de muerte celular BCL-2, culminando en la respuesta de sobrevivencia. La regulación de la actividad de TOR también está mediada por nutrientes y la energía celular (Harrington y col., 2005; Dann y col., 2007; Patursky-Polischuk y col., 2009).

La cinasa TOR pertenece a una familia de cinasas de serina/treonina denominada PIKK's (cinasas relacionadas con la cinasa de fosfatidil inositol) (Raught y col., 2001). Como ya se mencionó, TOR es conocida por tener un papel central en la regulación del crecimiento celular y la proliferación. Su actividad ha sido relacionada con varios fenómenos celulares incluyendo la transición G0- G1-S (Yoonseok y Exton, 2004). La vía de señalización de la cinasa TOR integra varias señales como las de los niveles de nutrientes, de energía y de factores de crecimiento que regulan procesos como la autofagia, la biogénesis de ribosomas y es una molécula clave de la vía de señalización de insulina. Para determinar la participación de la cinasa TOR en una vía de señalización se utiliza la rapamicina, un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. La rapamicina tiene un receptor intracelular específico llamado FKBP12. El complejo rapamicina-FKBP12 interactúa con la proteína cinasa TOR inhibiéndola (Raught y col., 2001).



**Figura 6** Vía de señalización PI3K-TOR (Tomado de Dann y col., 2007).

La TOR de mamíferos (mTOR) está constituida de varios dominios que forman complejos con otras proteínas, algunas de las cuales al parecer regulan su actividad (como la proteína G Rheb), mientras otras como raptor o rictor están involucradas en la señalización río abajo mediando su interacción con los sustratos que fosforila. Las interacciones de mTOR con raptor y rictor son mutuamente excluyentes. Los complejos en los cuales participa son llamados complejo 1 de mTOR (TOR C1) y complejo 2 de mTOR (TOR C2), respectivamente (Sarbasov y col., 2005). Raptor participa en la respuesta de señalización cuyo control es sensible a rapamicina, como la fosforilación de la proteína S6K y el factor de unión al eIF4E (eIF4E-BP1). Los motivos que participan en la unión Raptor-TOR son denominados TOS (motivos de señalización de TOR). TOS1 participa en la vía sensible a rapamicina, mientras que TOS 2 es insensible a éste antibiótico (Averous y Proud, 2006).

En el caso de la regulación traduccional mediada por insulina, aparentemente están involucradas distintas vías de señalización (Proud, 1997). Una vía de señalización regula la iniciación mediante la fosforilación del factor eEIF2. Además, la insulina regula la

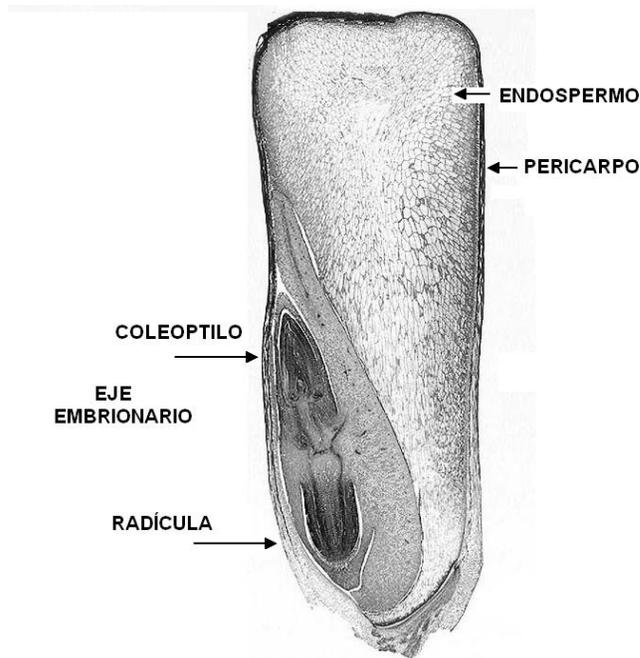
formación del complejo 43S, al fosforilar a la proteína 4E-BP1 permitiendo la liberación del factor eIF4E que forma parte del complejo de iniciación. Otro mecanismo es a través de la fosforilación de pS6 que se sugiere regula la traducción selectiva de algunos mensajes entre los que se encuentran los que codifican para proteínas ribosomales y factores de elongación. En todos estos efectos participa la proteína TOR (Proud, 1997; Averous y Proud, 2006; Ruvinski y Meyuhas, 2006).

Algunos de los elementos descritos para la vía de PI3K se encuentran ya descritos en plantas donde se ha podido demostrar también la participación de dicha vía en la regulación del crecimiento y la biogénesis de ribosomas.

## **2.8 Efecto de la insulina y los IGF's en la germinación y el crecimiento en maíz.**

El maíz es una planta de gran importancia económica, originaria del Continente Americano. Es una herbácea monocotiledónea pertenece a la clase *Liliopsida*, y la subclase *Commelinidae*, la orden *Cyperales*, y la familia *Poaceae* (o Gramíneas). Los tres géneros americanos son: el *Zea*, de alta importancia económica y alimenticia, representado por la especie *Zea mays*, el *Tripsacum*, de cierto valor como cultivo forrajero, pero escaso o ninguno como grano para consumo humano y *Euchlaena* (teosintle), el pariente silvestre más cercano al maíz (Jugengheimer, 1988).

La semilla de maíz, contiene un solo embrión rodeado por el tejido de reserva, el endospermo (Figura 7). El endospermo de maíz contiene tres tipos de tejidos, la capa de aleurona exterior, el endospermo almidonoso, la capa de transferencia basal del endospermo (BETL). El eje embrionario como en otras monocotiledóneas está precozmente desarrollado y se pueden observar meristemas bien definidos. Contiene un meristemo radicular, que dará origen a la raíz, un meristemo aéreo donde hay varios primordios foliares pequeños dentro de una cubierta protectora, que en conjunto a esta estructura se le llama coleoptilo. Además, se encuentra unido mediante el mesocotilo (éste término se refiere al primer internodo, entre el nudo del coleoptilo y el nudo escutelar) a una estructura denominada escutelo que lo rodea completamente. (Jugengheimer, 1988).



**Figura 7. Estructura del grano maduro de maíz. Sección longitudinal. 40X .**

En maíz, como en otras semillas la germinación es el proceso por el cual la semilla reinicia el crecimiento, este proceso está bajo el control de señales ambientales complejas, y hormonas vegetales que afectan a la expresión de una gran variedad de genes a nivel transcripcional y traduccional (Holdsworth y col., 2008). En el maíz, la expresión génica *de novo* en las primeras etapas de la germinación se debe exclusivamente al grupo de ARNm almacenados en los ejes embrionarios (Sánchez de Jiménez y col., 1981). En etapas posteriores de la germinación, nuevos ARNm son sintetizados para completar la protrusión de la radícula. Los dos tipos de ARNm (los almacenados o los recién sintetizados) son selectivamente traducidos a diferentes tiempos durante la germinación y en esta regulación participan los factores de inicio de la traducción eIF4E y eIF(iso)4E (Dinkova y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, en maíz, se han identificado varios elementos que participan en el ciclo celular y en particular en la transición G1- S. En estudios previos se demostró que la mayoría de las células del eje embrionario se encuentran arrestadas en G1-S (Baíza y col., 1989). Aunque en dichos estudios no profundizó en el mecanismo de reactivación del ciclo celular en cada parte del eje embrionario de maíz durante la germinación.

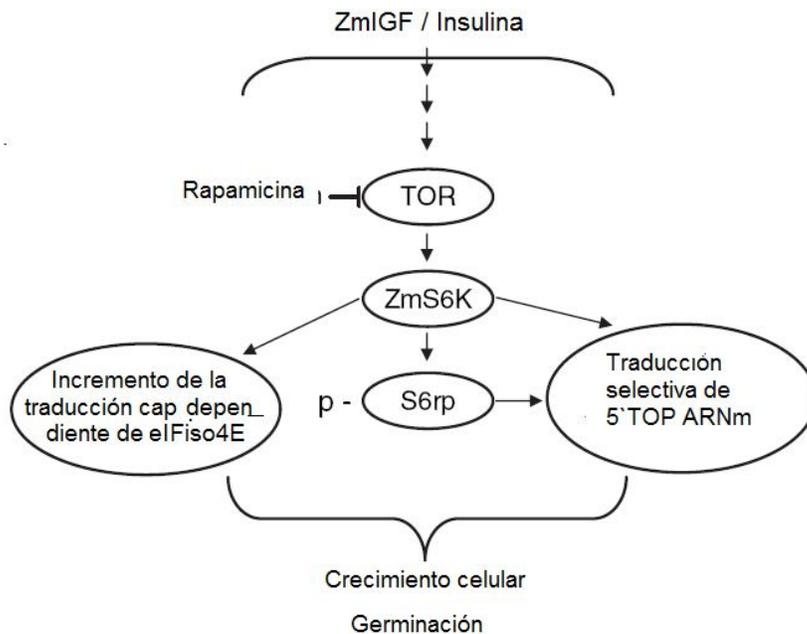
Como se mencionó, entre las proteínas involucradas en la transición G1-S se han descrito las ciclinas, las CDK's y dos isoformas de las proteínas RBR. Se sabe que la ciclina D2 es estimulada por citocininas en la imbibición temprana (Gutiérrez y col., 2005). Sin embargo, no existen datos suficientes acerca de la regulación de otros componentes importantes en la transición G1-S, por ejemplo otros tipos de ciclinas D y las proteínas E2F. Los datos disponibles mencionan que las ciclinas D son inducidas por señales extracelulares, sin embargo, no se ha determinado si la inducción se lleva a cabo mediante la transcripción *de novo* o por la traducción de mensajes almacenados durante el desarrollo.

Se ha descubierto también un factor endógeno semejante a insulina en maíz, el ZmIGF (Rodríguez-López y col., 2011) ubicado en los tejidos meristemáticos del eje embrionario (García-Flores, 2001). Dicho péptido estimula la germinación, el crecimiento e induce la fosforilación de S6 de manera similar a la reportada para insulina.

Recientemente se ha estudiado el efecto de la insulina en cultivos de células de maíz. En este sistema la insulina y el ZmIGF, incrementaron la síntesis de ADN y aumentaron el reclutamiento preferente en los polisomas de los mensajes de CYCD, PCNA y E2F, además de los mensajes que codifican proteínas de la maquinaria de traducción. Todos estos efectos fueron revertidos por rapamicina (Sotelo y col., 2010).

No se conoce en detalle el mecanismo por el que la insulina regula el crecimiento en los ejes embrionarios de maíz; sin embargo, se sabe que incrementa la síntesis de ADN y de proteínas, en particular las proteínas ribosomales (Paz-Lemus, 2005). Por lo que es posible que regule la biogénesis de ribosomas que como se mencionó previamente es un prerequisite para la duplicación del ADN y la división celular.

Como se mencionó anteriormente, la vía de transducción de señales mediante la cual actúa la insulina en animales incluye a la proteína cinasa TOR. Se ha reportado en maíz el homólogo ZmTOR (Agredano-Moreno y col., 2007), así como otros componentes de la vía y también se ha demostrado la activación de S6K y la fosforilación de pS6, estos efectos son revertidos por rapamicina, el inhibidor de TOR. Por lo que se ha propuesto que la vía PI3K-TOR está conservada en plantas y es la responsable de la acción de insulina/ZmIGF en semillas de maíz en germinación (Figura 8) (García Flores y col., 2001; Dinkova y col., 2007; Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012).



**Figura. 8. Vía de transducción de señales para TOR-S6K en semillas de maíz en germinación** (Tomado de Dinkova y col., 2007).

Resultan interesantes los antecedentes que muestran que existe un patrón de respuesta diferencial entre los meristemas apical y radicular. En este sentido, se reportó que los patrones de fosforilación de la pS6 en respuesta a insulina o auxinas, son diferentes dependiendo del efector y de la parte del eje embrionario analizado (Buentello y col., 2010); asimismo, en estudios previos se encontró que hay una respuesta diferencial a insulina en la síntesis de proteínas ribosomales y de ADN entre la radícula y el coleoptilo (Paz Lemus, 2005).

En este trabajo, se estudió la regulación del reinicio del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz en germinación en presencia del efector insulina. Como se mencionó

previamente, la mayoría de las células de ejes embrionarios de las semillas de maíz, se encuentran arrestadas en G1-S, por lo que también se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de algunos de los genes involucrados en la transición G1-S como PCNA y E2FB que forman parte del principal mecanismo de regulación de dicha transición.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

En las semillas maduras, las células se encuentran deshidratadas y con actividad metabólica muy baja. El proceso de imbibición reactiva el metabolismo e induce la germinación que culmina con la protrusión de la radícula. Entre los principales eventos metabólicos que se reactivan está el ciclo celular. La mayoría de las células de los ejes embrionarios de semillas de maíz quiescentes se encuentran mayoritariamente arrestadas en G1

El mecanismo de arresto es muy similar al descrito para animales e involucra a la proteína del retinoblastoma RB, la cual inhibe la activación del complejo de transcripción E2F-DP, e impide la activación de los genes que permiten la duplicación del ADN, como PCNA. Entre los elementos que participan en dicha transición y que se han caracterizado en semillas de maíz, se encuentran las ciclinas D; las proteínas RBR homólogos de la proteína RB de animales, así como PCNA, varias CDK's y se han determinado a través de EST's la presencia de secuencias homólogas a la familia de proteínas E2F.

Los mitógenos como la insulina o los IGF's, inducen la fosforilación de las ciclinas por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's), dando lugar a la formación de los complejos CDK-ciclina lo que activa a la CDK, que a su vez fosforila secuencialmente a la pRBR, disociándola de los factores de transcripción E2F, activando así la transcripción de los genes regulados por estos factores, lo cual lleva a la transición hacia la fase S

En maíz, se ha purificado y caracterizado un péptido de 5.7 kD con una estructura semejante a la reportada para insulina y para el IGF-1; al que se ha denominado factor semejante a insulina de maíz, ZmIGF. Se ha demostrado que tanto la insulina, como el ZmIGF, tienen actividad mitogénica e incrementan la síntesis de ADN en cultivos de tejidos de maíz, movilizándolo a polisomas los ARNm de las proteínas de ciclo celular que participan en la transición G1-S como PCNA y Ciclina D1. En ejes embrionarios inducen la germinación y el crecimiento, así como patrones diferenciales de síntesis de proteínas (citósolicas y ribosomales), de ADN y de inducción de genes de la maquinaria traduccional en la radícula y el coleoptilo de ejes embrionarios de maíz. Sin embargo, no se ha determinado cual es el mecanismo exacto por el cual realiza estos efectos.

Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar los mecanismos de coordinación del crecimiento y la división celular en los coleoptilos y radículas de ejes embrionarios de

maíz, con el propósito de profundizar en el mecanismo por el cual la insulina realiza su efecto durante la germinación. Se trabajó con las partes separadas del eje embrionario de maíz para determinar en que parte del eje embrionario se ubica la respuesta a este efector. También se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de algunos de los genes involucrados en la transición G1-S como PCNA y E2F ya que como se mencionó previamente la mayoría de las células de ejes embrionarios de las semillas de maíz, se encuentran arrestadas dicha transición.

#### **4. HIPÓTESIS.**

Si la insulina en animales promueve el crecimiento regulando la progresión del ciclo celular (transición G1-S) es posible que este mismo mecanismo sea utilizado para regular la reactivación del ciclo celular y el crecimiento de semillas de maíz en germinación.

#### **5. OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el efecto de la insulina en la reactivación del ciclo celular de las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

##### **5.1 Objetivos Particulares:**

1. Determinar el efecto de la insulina en el crecimiento de las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios en germinación.
2. Determinar el efecto de la insulina en las fases del ciclo celular en las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios en distintas etapas de germinación (0, 15 18, 24 y 36 h).
3. Determinar si los ARNm de proteínas que participan en la transición G1-S (E2F y PCNA) se encuentran almacenados en las semillas quiescentes y en que parte se encuentran (radícula y/o coleoptilo).
4. Determinar los niveles de transcritos de los ARNm de proteínas involucradas en la transición G1-S (E2F y PCNA) en el ARN total de las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios sin tratar o tratados con insulina en distintas etapas de germinación (15 y 24 h).
5. Determinar los niveles de transcritos de los ARNm de proteínas involucradas en la transición G1-S (E2F y PCNA) en el ARN de la fracción polisomal de las radículas y los coleoptilos de ejes embrionarios sin tratar o tratados con insulina en distintas etapas de germinación (15 y 24 h).
6. Determinar en su caso, el nivel al que se encuentra la regulación de la expresión génica por insulina (transcripcional o traduccional) de mensajes involucrados en la transición G1-S (E2F y PCNA).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1 Material biológico y tratamientos.**

En todos los experimentos se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) var. Chalqueño. Todos los reactivos utilizados fueron de Sigma-Aldrich, (St Louis MO USA) excepto en los casos donde se indique lo contrario. Las semillas se desinfectaron superficialmente, se imbibieron y se trataron con un pulso de insulina bovina 200 mU mL<sup>-1</sup> por 2 h, siguiendo la metodología descrita por Buentello y colaboradores (2010). Los tiempos de imbibición se describen en cada experimento. Las muestras usadas en la Citometría de Flujo para los estudios del efecto de la insulina en las fases del ciclo celular, se procesaron inmediatamente. Las muestras para los estudios del efecto de la insulina en la regulación de la expresión génica, se congelaron y pulverizaron con N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado.

### **6.2 Efecto de un pulso de insulina en el crecimiento de ejes embrionarios en germinación.**

El efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios de maíz se determinó usando lotes de 50 semillas imbibidas por 22h en algodón húmedo. Los ejes se disectaron y se incubaron sin o con insulina 200µUmL<sup>-1</sup> en medio Murashige y Skoog (MS). Finalizado el tiempo de imbibición, los ejes embrionarios se enjuagaron con agua destilada estéril y se midió la longitud de la radícula y el coleoptilo usando un vernier. Posteriormente, se colocaron en cajas de Petri de 100 mm con papel filtro humedecido con 5 mL de medio MS y se incubaron a 25 ± 2 °C por 96 h más en oscuridad. Cada 24 h se midió la longitud de la radícula y el coleoptilo y se cambiaron los ejes a cajas Petri con medio MS nuevo.

## **6.3 Determinación de la fosforilación de la S6K-Treonina 389.**

### **6.3.1 Obtención de proteínas.**

Se utilizaron lotes de 100 semillas de maíz imbibidos por 22h en algodón húmedo, posteriormente los ejes se disectaron manualmente y se incubaron sin o con insulina  $200\mu\text{U mL}^{-1}$  en medio MS. Después de la incubación se separaron las radículas y los coleoptilos, el tejido correspondiente se congeló con  $\text{N}_2$  y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se obtuvo el extracto de proteínas totales usando la técnica descrita por Reyes de la Cruz y colaboradores (2004) con las siguientes modificaciones: 1g de radículas o coleoptilos tratados como se mencionó anteriormente, se pulverizaron con  $\text{N}_2$  líquido y se homogeneizaron con 3 mL de amortiguador de extracción frío (HEPES 50mM, pH 7.6, pirofosfato de sodio 50 mM, vanadato de sodio 1mM, molibdato de sodio 1mM, EDTA 4mM EGTA 20mM, benzamidina 1mM, fluoruro de sodio 20mM,  $\beta$ -glicerofosfato 80mM, manitol 200mM, PMSF 0.2mM, DTT 2mM y PVPP 0.7%p/v, este último se agregó al momento de la extracción. El homogenado se centrifugó en un rotor de angulo fijo F1010 de Beckman a 19000 xg durante 45 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante. Las proteínas totales se cuantificaron con el ensayo comercial de Bradford en una alícuota de  $10\mu\text{L}$ , usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La fosforilación de S6K en la treonina 389, se determinó por *Western blot*. Se usaron  $25\mu\text{g}$  de proteínas totales, las cuales se separaron en un gel SDS-PAGE al 12% p/v de acrilamida, por 2 h a 120 V. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de Nylon, Hybond-P (Amersham CA USA) por transferencia semi-seca a  $8\text{ mA cm}^{-2}$ . La membrana se dejó secar completamente y se utilizó inmediatamente o se guardó un máximo de 48 h a  $-20^\circ\text{C}$ .

### **6.3.2 Determinación de la fosforilación de S6K en treonina 389, mediante *western blot*.**

Las membranas se descongelaron o no y se hidrataron por 10 min con buffer salino de fosfatos (PBS) 1X (Biorad® CA USA). Posteriormente, se realizó un bloqueo por 45 min usando leche al 8% p/v en PBS 1X-Tween 0.5% v/v la solución se cambió cada 15 min. La membrana se incubó en agitación por una noche a  $4^\circ\text{C}$  usando una dilución 1:2000 del anticuerpo primario para la  $\text{p70}^{\text{S6K}}$  humana fosforilada en la Treonina 389 (Sc-11759. Santacruz Biotechnology Inc. CA. USA) en PBS 1X, Tween 0.5% v/v y albúmina 1% p/v.

Posteriormente, la membrana se lavó dos veces con PB 1X, Tween 0.5 % v/v en periodos de 10 min a temperatura ambiente y se incubó en agitación constante por 1 h con una dilución 1:5000 del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Sc-2769 Santacruz Biotechnology Inc. CA. USA) en PBS 1X, Tween 0.5% v/v y leche al 8% p/v. La membrana se lavó dos veces por 10 min con PBS 1X, Tween 0.5% v/v, en agitación y se mantuvo en PBS 1X. La reacción se detectó por método de quimioluminiscencia con una mezcla 1:1 v/v de los reactivos del kit Western Lighthing Plus-ECL (Perkin Elmer, Inc., MA USA), usando una película KODAK, Blue x-Omat.

#### **6.4 Contenido de ADN por Citometría de Flujo.**

Se imbibieron lotes de 100 semillas de maíz por 13, 16, 22 y 34 h. Para el tiempo 0 h se usaron ejes embrionarios aislados de semillas sin imbibir. Los ejes embrionarios completos se disectaron y se trataron sin o con insulina  $200\mu\text{U mL}^{-1}$ . Al final del tratamiento, se separaron las radículas. Los núcleos se aislaron a partir de 0.5g de ápices de radículas de 3-4mm de largo; los cuáles se fijaron en acetona por 2h, se pulverizaron con  $\text{N}_2$  líquido y se homogeneizaron en 5mL de amortiguador de aislamiento, Tris-HCl 10mM, pH. 7.2, sacarosa 1M,  $\text{MgCl}_2$  5mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2mM y media tableta de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche®) por cada 100mL de amortiguador. Posteriormente, el homogenado se filtró a través de una capa de malla Miracloth (Calbiochem CA. USA) con un tamaño de poro de 22-25 $\mu\text{m}$ . El filtrado se centrifugó por 10min a 5,000xg a 4 °C, la pastilla se resuspendió en 1.5mL de amortiguador Tris-HCl 10mM pH 7.2, sacarosa 1M,  $\text{MgCl}_2$  5mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2mM, Tritón X-100 0.5% v/v y media tableta del inhibidor de proteasas COMPLETE (Roche®) por cada 100mL de amortiguador. Los núcleos se purificaron en un gradiente discontinuo 80, 40 y 20 %v/v de Percoll®, de acuerdo a Luthe y Quatrano (1980). Los núcleos se obtuvieron entre la fracción 40 y 80 y se diluyeron hasta 1 mL con el amortiguador de aislamiento y se centrifugaron por 20min a 10,000xg a 4 °C. La pastilla con los núcleos se resuspendió cuidadosamente en 360 $\mu\text{L}$  de amortiguador salino de fosfatos con NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, pH 7.4, en PBS 1X. Los núcleos se incubaron con Ribonucleasa A de Promega,  $50\text{mg mL}^{-1}$  30 min a temperatura ambiente; los últimos 10 min se les agregó Yoduro de propidio (IP) a una concentración final de  $50\text{ mg mL}^{-1}$  y se mantuvieron en oscuridad. El contenido de ADN de los núcleos en un volumen total de 500  $\mu\text{L}$  se determinó por Citometría de Flujo usando un citómetro FACScan (Beckman CA

USA) equipado con un láser de ión argón a 488 nm; la fluorescencia se detecto en un rango de 605 a 635 nm. Como control interno se utilizaron leucocitos de pollo del kit BD™ ADN QC Particles (BD USA) y núcleos de hoja de maíz, obtenidos mediante la técnica descrita por Sliwinska y colaboradores (2005). Las muestras de núcleos de radículas se leyeron en el citómetro de flujo por duplicado con 30,000 eventos en cada determinación. Los datos se analizaron usando el programa MODFIT- LT Ô para Mac 3.0. La cantidad de ADN es proporcional a la señal de fluorescencia, el valor 1C representa la cantidad de ADN en el cromosoma haploide sin replicar. La frecuencia de núcleos en 2C y 4C se calculó como  $[\text{núcleos } 2C / (\text{núcleos } 2C + \text{núcleos } 4C)] \times 100$  y  $[\text{núcleos } 4C / (\text{núcleos } 2C + \text{núcleos } 4C)] \times 100$  respectivamente, según Gendreau y colaboradores (2008). Asimismo, la cantidad de ADN se expresó como porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular.

### **6.5 Aislamiento de ARN total.**

La extracción de ARN total se realizó usando el reactivo de Trizol (Invitrogen® CA USA) modificada para tejidos vegetales de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La modificación realizada consistió en agregar un paso extra en la extracción con la finalidad de precipitar los carbohidratos presentes en las muestras, debido a que las células vegetales tienen altos contenidos de estos compuestos.

Una muestra de 0.1g de cada tejido se pulverizó con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió el reactivo de TRIZOL (1 mL/50-100 mg de tejido) y el homogenado se centrifugó a 12000 xg por 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de cloroformo por ml de Trizol. Se dió un pulso de 30s en el vortex y se centrifugó a 12 000xg por 15 min. a 4°C y se repitió el paso anterior. Posteriormente, de acuerdo con las modificaciones del fabricante para las muestras vegetales, al sobrenadante se añadieron 250µL de isopropanol y 250µL de la mezcla de Citrato de sodio 0.8M/Cloruro de sodio 1.2M; se mezcló e incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000xg por 10 min. a 4°C. La pastilla de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% v/v recién preparado y frío y se centrifugó nuevamente a 10 000xg por 10 min. a 4°C. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua libre de ARNasas y se almacenó a -70 °C.

Todas las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada GR50 con un rotor de angulo fijo F2404H ambos de Beckman

## **6.6 Aislamiento de ARN de la fracción polisomal.**

Para el ARN polisomal, se realizó la separación los polisomas de acuerdo a la técnica de Beltrán y colaboradores (1995) y posteriormente se aisló el ARN siguiendo la técnica descrita por Dinkova y colaboradores (2007).

### *Separación de polisomas.*

Todos los pasos se realizaron en frío. Se pulverizaron 0.5g de radículas o coleoptilos y se homogenizaron con 5 mL de buffer de extracción frío (Tris HCl 200mM, pH9, KCl 200mM, MgCl<sub>2</sub> 35mM, EGTA 25mM, sacarosa 200 mM, PTE 2% p/v; Heparina 0.5mg/mL y β-Mercaptoetanol 100mM). Se centrifugó el homogenado a 12 000 xg por 15 minutos a 4°C, en un rotor de angulo fijo F1010 de Beckman. Posteriormente, al sobrenadante se le retiró la capa superior de lípidos con una pipeta pasteur y se colocó en un tubo de policarbonato con 5 mL de colchón de sacarosa 1.5 M y se centrifugó en una ultracentrifuga Beckman refrigerada por vacío usando un rotor de ángulo fijo Ti 80 a 50 000 xg por 3.30 h a 4 °C. Se desechó completamente el sobrenadante y la pastilla con la fracción polisomal se resuspendió en aprox. 500µL agua libre de ARNasas. Las muestras se almacenaron a –20 °C hasta su uso.

### *Aislamiento de ARN polisomal.*

A los 500µL de la resuspensión de polisomas obtenida previamente se añadieron 20µL de EDTA 0.5 M pH 8.5 hasta una concentración final de 20mM y 25µL de SDS 10 % para una concentración final de 0.5% v/v; 500 µL de Fenol para ARN y 100 µl de alcohol isoamílico (49:1 v/v). La mezcla se agitó en el vórtex por 30 s y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se recuperaron 450 µl de sobrenadante, se le añadió un volumen de Acetato de potasio 2M, pH 4.8 e incubó en hielo por 45 minutos antes de centrifugarlo a 44 000 xg por 20 min a 4°C, en una ultracentrifuga TL100 de Beckman usando un rotor de angulo fijo.

Se separaron 650 $\mu$ L de sobrenadante y se adicionó un volumen igual de Isopropanol helado, se mezcló en el vórtex e incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos y se centrifugó a 10 000 xg por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La pastilla resultante se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y centrifugó a 10 000 xg por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente la pastilla se resuspendió en aprox. 80  $\mu$ l de agua libre de ARNasas con 20  $\mu$ L de Cloruro de litio 10M. Se mezcló en un pulso en el vórtex y se incubó por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de centrifugar a 13 000xg por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% v/v y se centrifugó a 13 000 xg por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El paso anterior se repitió una vez más. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de buffer TEN (Tris 10 mM, EDTA 1mM; NaCl 0.1M, pH 8); se añadieron 300  $\mu$ L de Etanol absoluto; la mezcla se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 h y se centrifugó a 13 000 xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de Etanol al 70% v/v y se centrifugó a 13 000 xg por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente la pastilla se resuspende en 40-50  $\mu$ l de agua libre de ARNasas y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para ambos, el ARN total y el ARN de la fracción polisomal, el rendimiento expresado como  $\mu$ g de ARN por g de peso fresco; se calculó con una alícuota de 1 $\mu$ L a partir de la determinación de la absorbancia a 260 nm usando un Nanodrop 2000c (Thermo scientific Texas USA). La pureza del ARN se calculó usando la relación  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  considerando un valor de 2 para el ARN puro mediante espectrofotometría (Beckman 605). La integridad de las muestras se verificó usando 2 mg de ARN total o polisomal en geles de agarosa al 1.5% p/v en amortiguador TAE 1X (Tris- ácido acético 1mM, EDTA 0.5 M, pH 8.5) y tiñendo los geles con bromuro de etidio 0.1mM.

### **6.7 Análisis de la regulación de la expresión génica.**

Una vez que se verificó la integridad de las muestras a partir del ARN total y polisomal se realizó la estandarización de las condiciones de PCR para cada gen. Las secuencias de los oligos utilizados para RT-PCR semicuatitativo y para qPCR se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Secuencias de oligos utilizados.** Se muestra también el número de pares de bases del amplicón, así como el número de acceso reportado en el GenBank\*

\* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Gen	Secuencia	Número de pares de bases	Numero de acceso
PrS6	Fw:5'-TGATGCTCTGGGTGAGGAGTTAAA-3' Rv:5'-TTCCTTCAG CCTCTGGGCAAGAAG-3'	550	U92045
GA3PDH	Fw: 5'-CCTTGACCGCAGCCTTGATCCTACATC-3' Rv:5' ACCCATCCTCGTTTCCTCCGTCTAG-3'.	800	X07156
E2F	Fw:5'-TCTCCTCAAATTGACTAACTA-3' Rv:5'-ATAGGAGTTTAACTGATTGAT-3'	535	EU-973980
PCNA	Fw 5'-TGCCGACTTTTTCTCCTCTT-3' Rv: 5'-AAATCCATGGACACACAGCA-3'	146	NM_00111991.1
PrS13	Fw: 5'-AAAGAAGCTTCCACCCACCT-3' Rv:5'-GATGAGGTCCGTTGTCCATT-3',	151	NM_0011122.38
18S	Fw:5' –GGAAACTTACCAGGTCCAGAGATAG –3' Rv: 3' –GTGGGCCTAAACGGCCATA GTCCCTC	300	AF168884

### 6.7.1 PCR semicuantitativo.

Para verificar el efecto de insulina sobre el reclutamiento de ARNm en polisomas; se amplificó la prS6 por RT-PCR semi-cuantitativo a partir de ARN total y de ARN de la fracción polisomal aislado como se describió anteriormente.

Los cebadores utilizados se diseñaron a partir de secuencias de maíz, para prS6 y para el gen de referencia 18S (ver Tabla 3).

Para verificar que la amplificación se encontraba dentro de un rango lineal, se estandarizó el número de ciclos de amplificación y la concentración óptima de ARN mediante RT-PCR en un solo paso usando RT-PCR-one step® (Invitrogen™ CA USA). La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo a 55 °C durante una hora, usando oligos específicos para los genes de interés. La amplificación por PCR se realizó en las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min y 26 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C ó 60 °C por 60 s y 72 °C por 60s. Las muestras se almacenaron a –70 °C .

La expresión se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0%p/v, para separar el ARN. El gel fue teñido con bromuro de etidio 0.1mM y se corrió en amortiguador TAE (Tris- ácido acético 1mM, EDTA 0.5M, pH 8.5), por 1.5h a 95 volts. En cada caso se realizó una densitometría utilizando el programa ImageJ.

### **6.7.2 RT-qPCR**

Las reacciones de RT-qPCR para E2F y PCNA de las muestras experimentales se realizaron como se indica a continuación.

Previo a los ensayos de retrotranscripción 2µg de ARN total o de la fracción polisomal, fueron tratados con 1.5U ADNasa (Promega CA USA) por 60 min a 37 °C de acuerdo a las instrucciones del fabricante La reacción se detuvo usando 1µL de EDTA 250mM, el volumen final de la reacción fue de 11µL. La reacción de retrotranscripción, RT, se realizó usando 1µg de las muestras de ARN tratadas con ADNasa. Se utilizó 1U de la enzima MMLV-RT (Promega CA USA) en la mezcla de reacción recomendada por el fabricante, la mezcla se incubó a 37 °C por 60 min, el volumen final de la reacción fue de 20 µL. A continuación, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo usando 1 µL de la RT obtenida anteriormente, las amplificaciones se realizaron con el kit One step qPCR (Invitrogen™ CA USA) en un Rotor gene 3000 (Corbett Research Quiagen, CA USA). Los cebadores utilizados en la amplificación se diseñaron a partir de secuencias de maíz. Las secuencias usadas se muestran en la Tabla 3. Como gen de referencia se utilizó prS13. Previo a los ensayos de regulación de la expresión génica por insulina, se revisó que la eficiencia de amplificación para cada uno de los genes estudiados (E2F, PCNA) y el gen de referencia (prS13) tuviera valores entre 95 y 100 %, (Bustin y col., 2009). Asimismo, se verificó que el tratamiento con insulina y el tiempo de imbibición no alteran la expresión del gen de referencia usando el programa GeNorm versión 3.5 (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

Las condiciones de amplificación fueron en el caso del E2F 5 min a 94 °C, 30 ciclos 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 50 seg y 7 min a 72 °C para la extensión final; para PCNA, 5 min a 94 °C, 30 ciclos 94 °C por 20 seg, 58 °C por 20 seg, 72 °C por 20 seg

y 7 min a 72 °C para la extensión final. El gen prS13 se amplificó simultáneamente usando las condiciones indicadas para cada uno de los genes estudiados sin que se afectara su eficiencia. Los resultados de la amplificación por RT-qPCR fueron estandarizados según Willems y colaboradores (2008).

### **6.8 Síntesis *de novo* de PCNA.**

Para determinar el efecto de la insulina en la síntesis *de novo* de la proteína PCNA se imbibieron lotes de 100 semillas de maíz durante 13 horas en algodón humedecido a  $25 \pm 2$  ° C en la obscuridad. Se disectaron los ejes embrionarios e inmediatamente se incubaron durante 2 h en presencia de  $450 \mu\text{Ci ml}^{-1}$  de [ $^{35}\text{S}$ ]-metionina disuelta en 3.5 ml de medio MS sin o con insulina  $200 \mu\text{U ml}^{-1}$ . Al final del tratamiento, los ejes se lavaron con agua destilada y se separaron las radículas. Las muestras se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido hasta su uso. Se obtuvo el extracto de proteínas totales usando 0.5 g de radículas tratadas o no como se mencionó anteriormente, se pulverizaron con  $\text{N}_2$  líquido y se homogeneizaron con 3 mL de amortiguador de extracción frío (PBS 1X, NaCl 100mM adicionado con inhibidores de proteasas COMPLETE® de Roche, el amortiguador se agregó al momento de la extracción. El homogenado se centrifugó a  $15\,000\times g$  durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó 1mL del sobrenadante de proteínas totales. A partir del extracto anterior se cuantificaron las proteínas totales con el ensayo comercial de Bradford en una alícuota de 15  $\mu\text{L}$ , usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ] metionina se cuantificó en un contador de centelleo Beckman usando 25  $\mu\text{L}$  del homogenado de proteínas en 5 mL de líquido de centelleo, Los resultados se reportaron como porcentaje de incorporación de [ $^{35}\text{S}$ ] metionina en relación con las radículas sin tratamiento con insulina.

La proteína PCNA fue inmunoprecipitada usando el protocolo de Dynabeads® (Invitrogen Life Technologies, CA, EE.UU.) descrito por el fabricante con las siguientes modificaciones: Se ligaron 35 $\mu\text{g}$  de anticuerpo PCNA ( sc-33756; Sta Cruz Biotechnology Inc) a 1.5 mg de Dynabeads siguiendo las instrucciones del fabricante (aprox 250 $\mu\text{L}$ ) y éstos a su vez se agregaron a 700 $\mu\text{L}$  de extracto de proteínas totales marcadas con [ $^{35}\text{S}$ ] metionina y se incubaron en un rotador a velocidad baja por 30 minutos en un cuarto refrigerado a  $6 \pm 2$ °C. Las muestras se colocaron sobre un magneto por 60 seg hasta la

adhesión de las Dynabeads a la pared del tubo eppendorf y se removió el sobrenadante usando una pipeta, Posteriormente, el tubo se retiró del magneto y los Dynabeads se lavaron con 200 $\mu$ L de amortiguador de extracción resuspendiendo cuidadosamente con la pipeta, y el tubo se regresó al magneto por 60 s, esto se repitió dos veces, hasta completar 3 lavados. Para eluir la proteína se agregaron a los Dynabeads sin sobrenadante, 60 $\mu$ L de PBS 1X, pH 2.8, se mezclaron e incubaron en un rotador a velocidad baja por 5 min a temperatura ambiente. A continuación el tubo eppendorf se colocó por 60 s en un magneto y se transfirió el sobrenadante con la proteína PCNA inmunoprecipitada a un tubo nuevo y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se usaron 25 $\mu$ L del inmunoprecipitado en 5mL de líquido de centelleo para cuantificar la incorporación de marca radioactiva en cada muestra y 10 $\mu$ L para cuantificar las proteínas inmunoprecipitadas usando el método de Bradford.

## **6.9 Análisis estadístico**

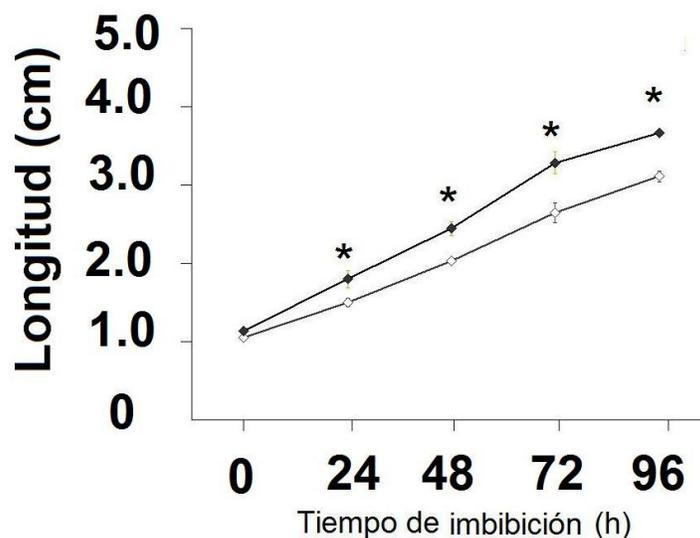
Se utilizó el programa NCSS (Utah, USA) para obtener los parámetros de estadística descriptiva (promedio y DS), así como para determinar las diferencias entre los tratamientos, mediante la prueba de comparación de medias contra testigo de Dunnett, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Efecto de la insulina en el crecimiento de la radícula y el coleoptilo de ejes embrionarios de maíz en germinación.

Para determinar si la insulina ejercía un efecto específico en el crecimiento de las partes del eje embrionario se usaron ejes disectados de semillas imbibidas por 22h y tratados por 2h sin o con insulina  $200\mu\text{U mL}^{-1}$ . Se midió la longitud tanto de los ejes completos, como de las radículas y los coleoptilos cada 24h hasta las 96h como se describió en Materiales y Métodos.

Los ejes completos tratados con un pulso de insulina mostraron un incremento significativo de aproximadamente 20% en el crecimiento después de 24h de tratamiento, el cual se mantuvo durante todo el período de tiempo estudiado (Figura 9).

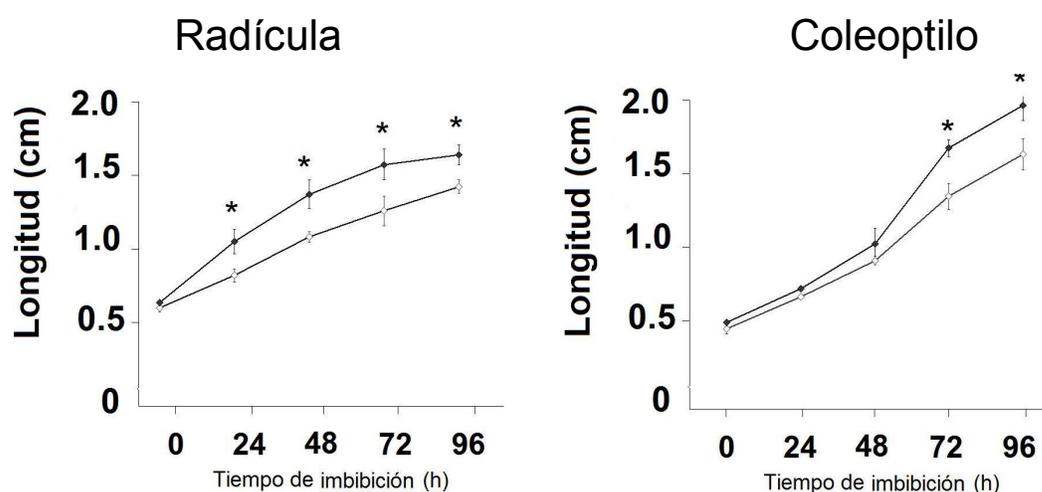


**Figura 9. Efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios.** Se imbibieron lotes de 50 semillas por 22 h se disectaron los ejes embrionarios y se incubaron por 2 h en medio MS (○) o MS + insulina  $200\mu\text{U mL}^{-1}$  (●). Posteriormente, se incubaron en MS a  $26 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  en la oscuridad y se midió la longitud del eje completo cada 24 h. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como longitud  $\pm$  DE. El \* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha= 0.05$ ).

Para determinar si la insulina afectaba de manera diferencial al eje embrionario, se midieron las partes por separado. En las radículas se observó un incremento promedio del

25% en el crecimiento, a partir de las 24 h; mientras que el coleoptilo respondió hasta las 48 h de tratamiento con un incremento promedio en el crecimiento del 12% con respecto al testigo (Figura 10).

Estos resultados muestran que las diferentes partes del eje embrionario responden de manera distinta a la insulina y que en particular la radícula mostró una respuesta más temprana y ligeramente mayor que el coleoptilo. Debido a lo anterior, en los siguientes experimentos se analizó el efecto de la insulina tanto en las radículas como en los coleoptilos de ejes embrionarios.



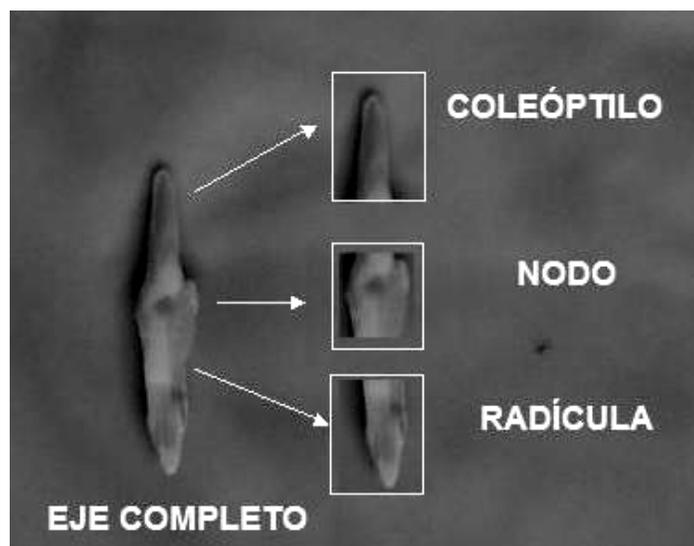
**Figura 10. Efecto de la insulina en el crecimiento de ejes embrionarios.** Se imbibieron lotes de 50 semillas por 22 h se disectaron los ejes embrionarios y se incubaron por 2 h en medio MS (○) o MS + insulina  $200 \mu\text{U mL}^{-1}$  (●). Posteriormente, se incubaron en MS a  $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  en la oscuridad y se midió la longitud de coleoptilos y radículas cada 24 h. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como longitud  $\pm\text{DE}$ . El \* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha= 0.05$ ).

## 7.2 Efecto de un pulso de insulina en la fosforilación de S6K y el reclutamiento en polisomas de prS6 en las radículas y coleoptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.

La vía de transducción de señales mediada por insulina ó ZmIGF en maíz, es muy similar a la reportada en animales. Como parte de la activación por insulina se induce la vía PI3K-TOR y se fosforila la proteína S6K en la treonina-389 (Meyuhas y Drazzen, 2009). Como se mencionó previamente, en este trabajo se encontró que las radículas de ejes embrionarios, responden al tratamiento con insulina creciendo más rápido y en mayor

proporción que los coleóptilos. Por lo anterior, se decidió comparar el efecto de la insulina en la fosforilación de la S6K, tanto en los coleóptilos como en las radículas. Para lo cual se realizó un *western blot* usando un anticuerpo específico que detecta la forma fosforilada de la treonina-389 en S6K (Reyes de la Cruz y col., 2004).

Se utilizaron semillas de maíz imbibidas por 22 h, se disectaron los ejes embrionarios completos y se incubaron 2 h más en medio MS con o sin insulina como se describió en “Materiales y Métodos”. Posteriormente, se disectaron el coleóptilo, el nodo y la radícula del eje embrionario como se muestra en la Figura 11. El corte se realizó hasta terminada la incubación para evitar que respuestas de daño por herida interfirieran con el tratamiento con el efector insulina. Se obtuvieron tres muestras independientes de cada tratamiento.



**Figura 11.** Muestra ejes embrionarios de semillas de maíz Chalqueño utilizadas en el experimento. En el lado izquierdo se muestra un eje embrionario completo disectado y en los recuadros se muestran los sitios de corte del coleóptilo, el nodo y la radícula después del tratamiento.

Se observó que la insulina indujo un incremento significativo de 30% en la fosforilación de la treonina 389 de la S6K en las radículas de maíz, dicho efecto no se observó en los coleóptilos (Figura 12a).

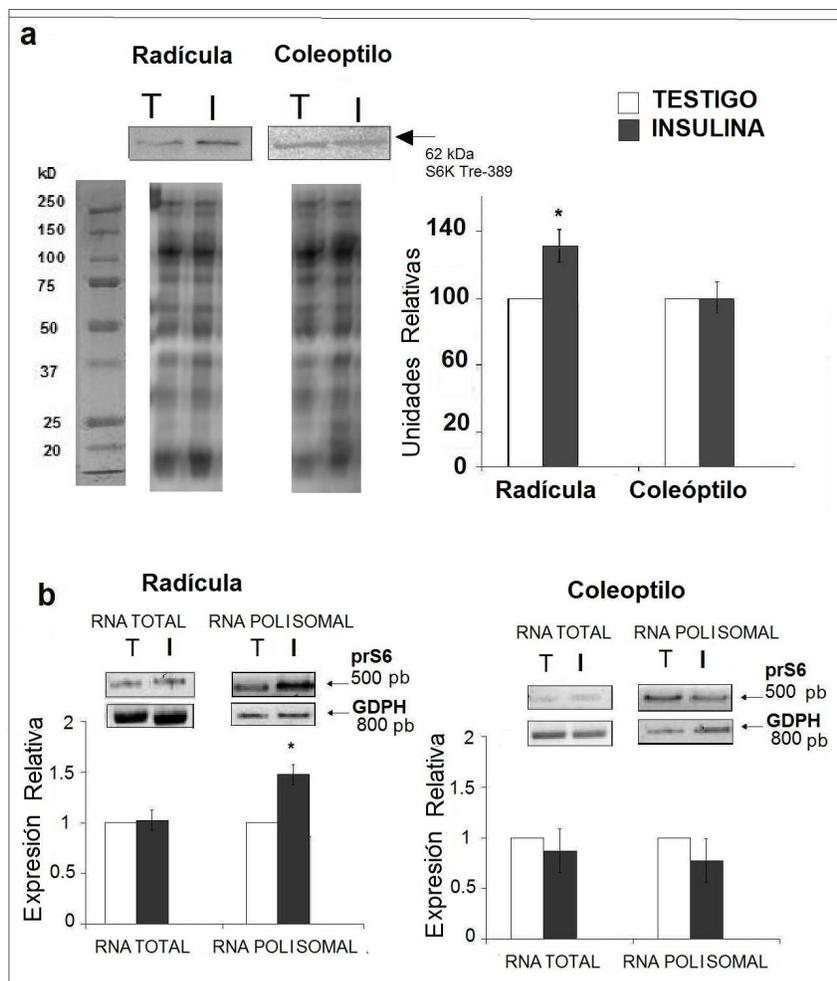
Por otro lado, se ha reportado que la insulina regula la síntesis de proteínas en ejes embrionarios de maíz mediante un mecanismo que incluye la acumulación de mensajes

específicos en la fracción polisomal. Entre los mensajes reportados que se acumulan, se encuentran el de prS6 (Dinkova y col., 2007). Debido a lo anterior, se analizó la acumulación en la fracción polisomal de los ARNm de prS6 en las radículas y los coleoptilos de maíz tratados con insulina y se compararon con el eje embrionario completo (Figura 12b).

La expresión de prS6 se verificó usando PCR semicuantitativo. Para estudios de RT-PCR semicuantitativo es necesario estandarizar la temperatura de alineamiento, el número de ciclos de amplificación y la cantidad de ARN. En el caso de los genes estudiados (prS6 y GADPH usada como sonda de normalización), en estudios previos del grupo de trabajo en maíz, se había establecido la temperatura óptima de alineamiento y el número de ciclos (Dinkova y col., 2007). Por lo que solamente se estandarizó la cantidad de ARN para la mezcla de reacción utilizada.

En “Materiales y Métodos” se presentan las condiciones de temperatura, de alineamiento, número de ciclos y cantidad de ARN utilizadas para cada gen. A continuación se presentan la estandarización para el gen de normalización GADPH y prS6 como ejemplo de los experimentos realizados para este fin. Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se utilizó un termociclador de gradiente donde se probaron 3 diferentes temperaturas: 55, 58 y 60°C. En todas las temperaturas se observó una sola banda bien definida (datos no mostrados). Se eligió la temperatura de 58°C para las pruebas de concentración debido a que varios de los genes de interés, tenían esa temperatura óptima de alineamiento. Posteriormente, se realizó una curva de concentración de ARN contra número de ciclos. En el caso de los coleoptilos, no se observó ningún cambio en la expresión de esta proteína mediada por insulina, mientras que en la radícula se observó un incremento en el reclutamiento de este mensaje de 30% (Fig 12b).

Estos resultados demuestran que la insulina tiene un efecto tejido específico ubicado en las radículas, por lo que los siguientes experimentos se realizaron únicamente en esta parte del eje embrionario.



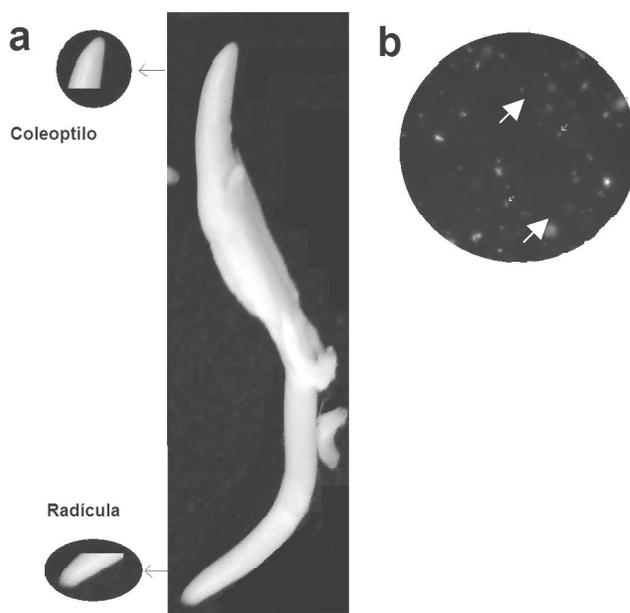
**Figura 12. Efecto de la insulina en la fosforilación de la proteína S6K y la acumulación en la fracción polisomal de la prS6 en las radículas y coleóptilos de ejes embrionarios de maíz en germinación.**

Las semillas se imbibieron por 22 h se disectaron los ejes y se incubaron por 2 h sin o con insulina  $200 \text{ mUmL}^{-1}$  y se separaron las radículas y los coleóptilos.

a) Determinación por western blot de la forma fosforilada de S6K tre-389 a partir de las proteínas totales (20 mg) aisladas de las radículas o los coleóptilos y separadas mediante SDS-PAGE; b) Expresión de la prS6 en radículas o coleóptilos determinada mediante RT-PCR semicuantitativo. Los valores son promedio de tres experimentos independientes, se expresan como Unidades relativas  $\pm$  DE. El \* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

### 7.3 Análisis del ciclo celular en radículas de ejes embrionarios y su estimulación por insulina durante la germinación.

El análisis del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se realizó mediante Citometría de flujo en el meristemo radicular que como se mencionó, es el primero en responder a insulina y en reiniciar el ciclo celular. Se disectaron los ápices de las radículas de ejes embrionarios sin imbibir (0 h) e imbibidos por 15, 18, 24 y 36h, sin tratar o tratados con un pulso de 2h de insulina, y se separaron los núcleos como se describió en “Materiales y Métodos”. Se usaron exclusivamente ápices de radículas para garantizar que se utilizara solo la zona meristemática. En la Figura 13 se muestra el sitio de corte de los ápices y una muestra al microscopio de los núcleos obtenidos del gradiente de Percoll y teñidos con yoduro de propidio.

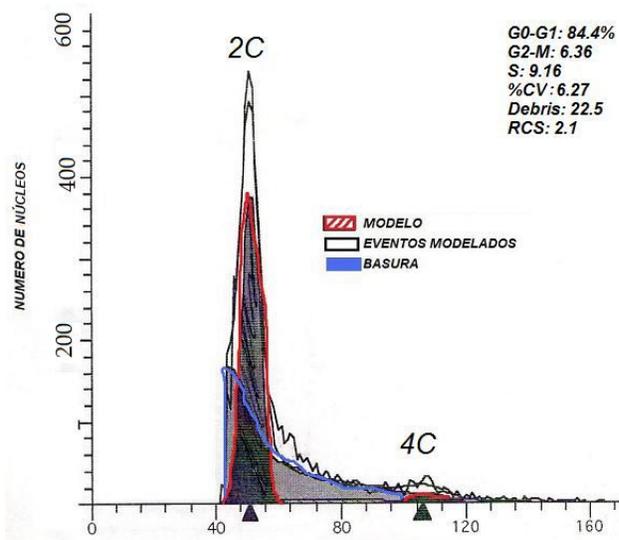


**Figura 13. Ejes embrionarios usados en la Citometría de Flujo** a) se muestra un eje embrionario de 36 h y los sitios de corte de radículas y coleoptilos, el tamaño aproximado de las puntas fue de 3-5 mm; b) Muestra de núcleos teñidos con IP, las flechas señalan los núcleos. 40X.

El análisis de Citometría de flujo se realizó en un FACScan, usando cada vez 500  $\mu$ L de núcleos. No existe un estándar universal para el análisis por Citometría de flujo en plantas, por lo que previo a los ensayos con las muestras el citómetro se realizó la calibración absoluta del Citómetro usando el kit BD™ ADN QC Particles (BD USA) y núcleos de hojas jóvenes de maíz (8 días de germinación), obtenidos mediante la técnica descrita por Sliwinska y colaboradores (2005).

En la Figura 14 se muestra el histograma de hojas de maíz, la línea negra indica los núcleos, la línea roja muestra el ajuste con respecto al modelo propuesto por el equipo. Se ubicaron los puntos correspondientes a las células diploides (2C) y las células en replicación (4C). Los parámetros usados para determinar si las muestras experimentales se ajustaban al control de núcleos de hoja fueron el coeficiente de variación (%CV) y el valor de RCS.

El coeficiente de variación se refiere a la dispersión relativa de la población de núcleos y refleja la imprecisión del aislamiento, la tinción y la medición (Marie y Brown, 1992) y no deben ser mayores a 10, para el control de hojas fue de 6.27. El RCS, es el valor de ajuste entre el modelo proporcionado por el programa del citómetro y la muestra en este caso se verificó que tuviera un valor menor a 5. Todas las muestras utilizadas en el estudio, tuvieron en promedio un  $\%CV \geq 10$  y un promedio de  $RCS < 3.8$ .



**Figura 14. Histograma de núcleos de hoja de maíz.** Se muestran con línea negra los núcleos (eventos) detectados y en rojo se destaca el modelo de comparación del equipo, en azul se muestra los debris (basura).

Una vez realizada la calibración se determinó el contenido de ADN en las semillas quiescentes (0 h de imbibición). El 88% de las células presentes en el ápice radicular se encontraron arrestadas en la transición G1-S (núcleos 2C) y el 12% de células restantes en la transición G2-M (núcleos 4C) (Figura 15). La relación 4C/2C fue de 0.14 (Tabla 4).

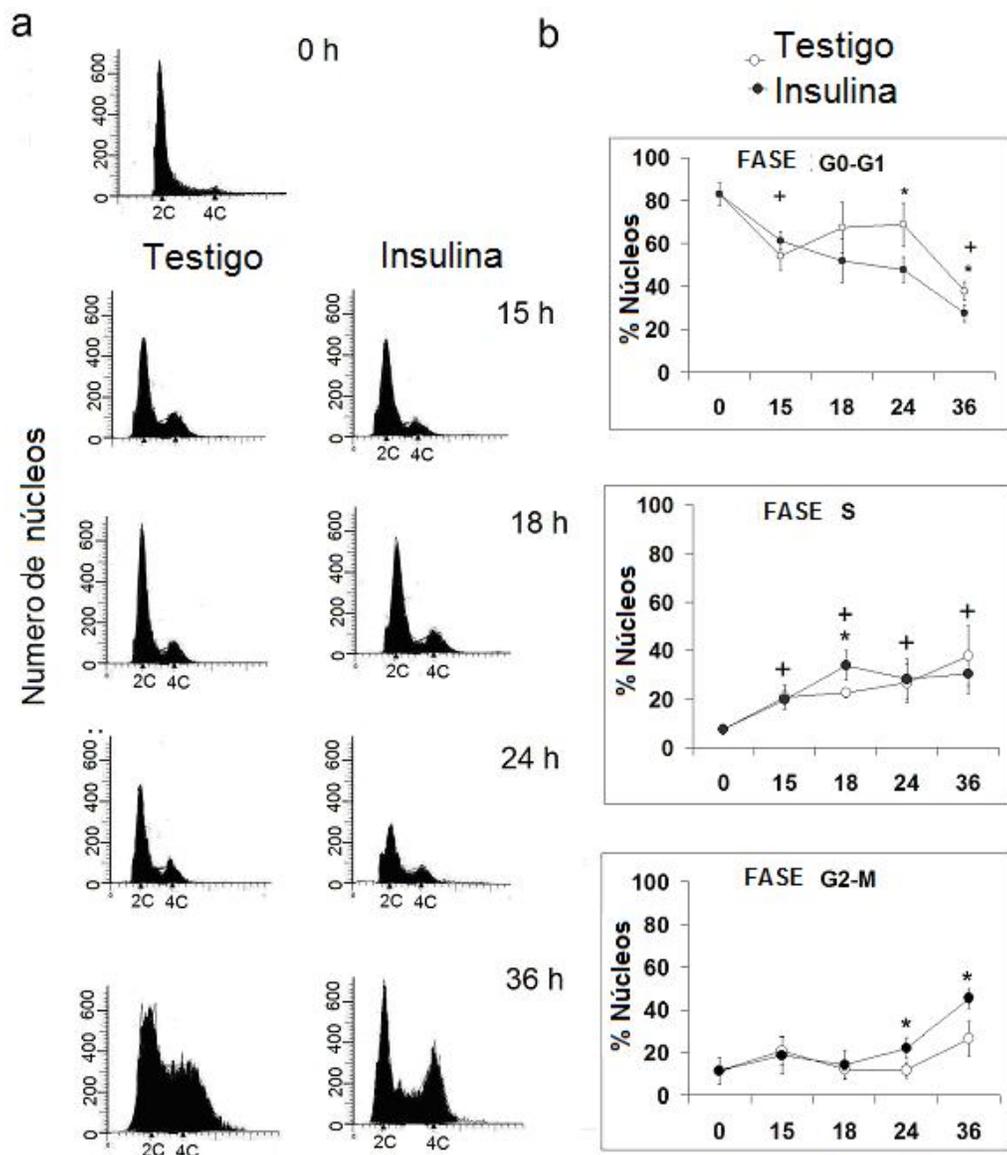
Durante la imbibición, en el tratamiento testigo, se observó un incremento de la relación 4C/2C a 0.38 a las 15 h, disminuyendo a tiempos posteriores (24 h) e incrementándose nuevamente a 0.74 a las 36 h de germinación. En presencia de insulina, la relación 4C/2C

se incrementó progresivamente durante el tiempo de tratamiento, presentando valores superiores a los del testigo. A las 18 h el incremento fue de 55%, a las 24 h de 228 % y de 122 % a las 36 h, con respecto al testigo correspondiente. Estos resultados indican que el incremento en el crecimiento de las radículas por efecto de la insulina se puede atribuir al menos en parte a su inducción de la proliferación celular en los ápices de las radículas de maíz en germinación (Tabla 4).

Con el objetivo de identificar como afecta la insulina al ciclo celular se determinó el porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo (Figura 15). Se observó que el porcentaje de núcleos en G1 disminuyó durante la imbibición con respecto a las semillas sin imbibir, esta disminución fue significativamente mayor en presencia de insulina, a partir de las 24 h de imbibición, con un incremento paralelo en el porcentaje de núcleos en G2. La insulina también indujo un incremento en la fase S aparente a las 18 h de imbibición (Figura 15b). Estos resultados indican que la insulina estimuló a las células de las radículas arrestadas en la transición G1-S a continuar el ciclo celular.

**Tabla 4.- Porcentaje de núcleos en 2C, 4C y relación 4C/2C en radículas de maíz.**

Porcentaje de núcleos			
Tiempo de germinación (h)	2C	4C	4C/2C
0	88	12	0.14
Testigo 15	72	28	0.38
18	85	15	0.18
24	85	15	0.17
36	59	41	0.70
Insulina 15	77	23	0.30
18	78	22	0.28
24	68	32	0.46
36	38	62	1.65



**Figura 15. Citometría de flujo.** Se muestra el contenido relativo de ADN en los núcleos provenientes de los ápices de radículas de semillas de maíz sin imbibir (0 h) o imbibidas por 15, 18, 24 y 36 h, tratados sin o con insulina 200  $\mu\text{U mL}^{-1}$  durante las últimas 2 h de imbibición. a) Histograma representativo del contenido de ADN. El primer pico indica los núcleos 2C (G1) y el segundo pico los núcleos 4C (G2). Los resultados se obtuvieron con el Programa ModFit-L usando 30 000 eventos en cada determinación. b) Se muestran los cambios en el porcentaje de núcleos para cada fase del ciclo celular. Los valores son promedio de tres experimentos independientes se expresan como porcentaje de núcleos en cada fase  $\pm$  DE. El + representa diferencias significativas entre tiempos de imbibición y \* representa diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

#### **7.4 Efecto de la insulina sobre los niveles de transcritos de proteínas que participan en la transición G1-S del ciclo celular.**

Los resultados anteriores mostraron que el efecto de la insulina en el crecimiento se localizó preferencialmente en las radículas. Por lo que se consideró relevante estudiar el efecto de la insulina en la expresión de los marcadores de la transición G1-S: E2F y PCNA mediante RT qPCR, la expresión de esta última proteína depende del factor de transcripción E2F. Para lo cual, se obtuvo el ARN total y el ARN de la fracción polisomal de ápices de radículas de ejes embrionarios imbibidos por 15 y 24 h e incubados con insulina las dos últimas horas como se describió en “Materiales y Métodos”. Asimismo, se aisló el ARN de radículas de ejes embrionarios secos (0 h).

#### **7.5 Estandarización de la RT- qPCR.**

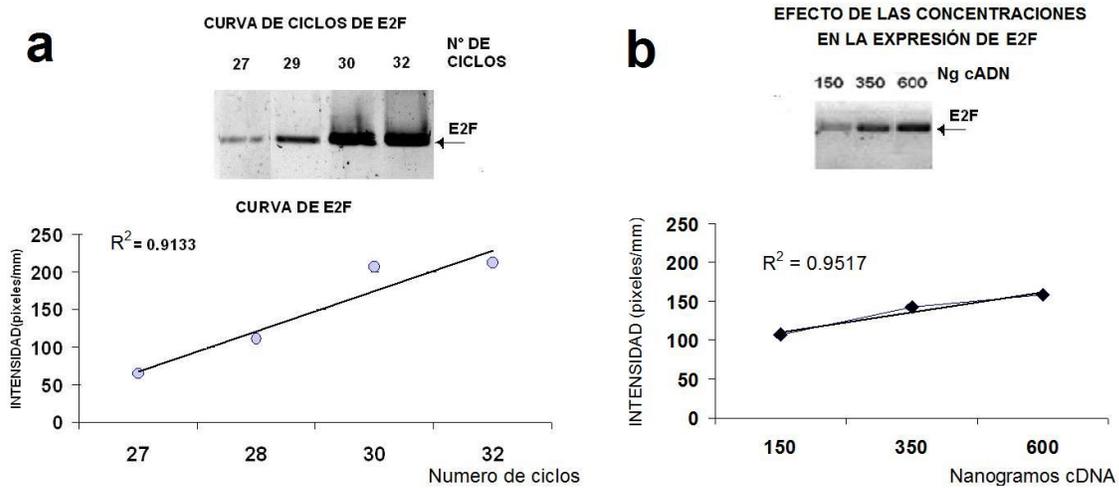
La estandarización de la amplificación mediante RT qPCR se realizó en varias etapas. Inicialmente se probaron los oligos usando amplificación semicuantitativa para determinar la temperatura óptima de alineamiento, el número de ciclos, y descartar alineaciones inespecíficas.

En la Figura 16 se muestran las curvas de expresión para E2F. Para determinar la temperatura de alineamiento óptima, se utilizó un termociclador de gradiente Corbett Research (Corbett Aust) donde se probaron 3 diferentes temperaturas: 50, 55 y 60 °C. En todas las temperaturas se observó una sola banda bien definida. Se eligió la temperatura de 58 °C para las pruebas de concentración debido a que se encontraba dentro del rango que se probó previamente y además coincidía con la temperatura óptima de alineamiento de los genes de interés.

Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar el número de ciclos usando 300 ng de cADN y a continuación se realizó una curva de concentración de cADN usando 150, 350 y 600 ng en un volumen final de 25  $\mu$ L.

Los resultados muestran que hay un incremento lineal de la banda de amplificación con respecto al número de ciclos. Sin embargo, la pendiente de la recta es menor de 350 a 600 ng indicando que ésta concentración se encuentra cercana a la saturación, por lo que

se seleccionó la concentración de 250 ng y 28 ciclos para la amplificación de este gen. Se realizó el mismo procedimiento para los genes de PCNA y prS13. Los resultados fueron similares.

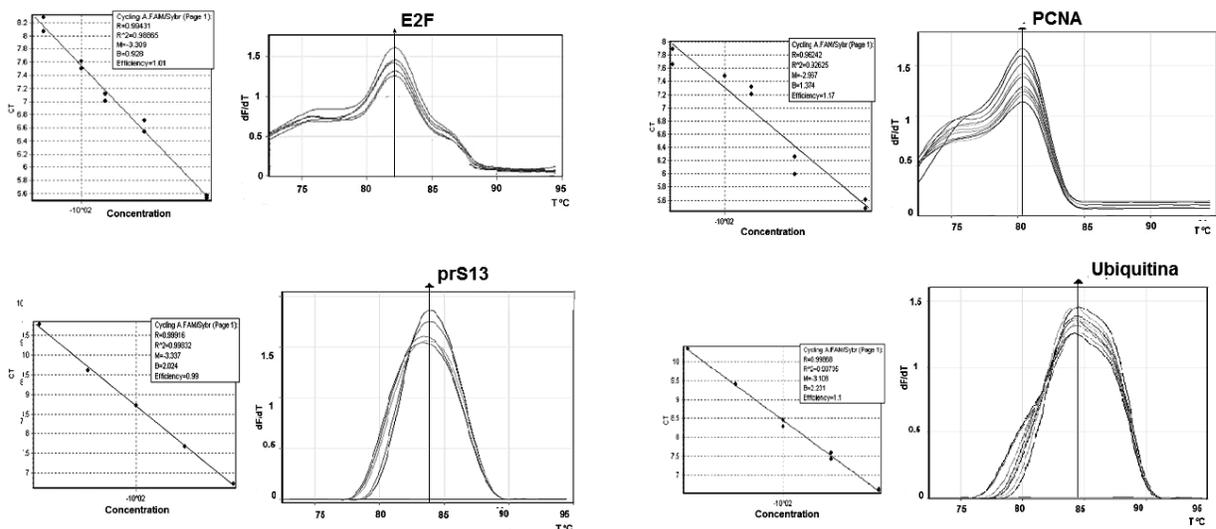


**Figura 16. Estandarización de la expresión de E2F por RT-PCR semicuantitativo.** Se muestran en a) los cambios en la amplificación dependiendo del número de ciclos. En b) se muestra la expresión a diferentes concentraciones de cADN en una PCR con 28 ciclos de amplificación.

Se pudo determinar a partir de los ensayos previos que E2F, PCNA y el gen de referencia prS13 mostraban un rango de amplificación lineal a una temperatura de 58 °C, con 250 ng cADN, después de 28 ciclos de amplificación.

Para estandarizar la amplificación por qPCR a partir de las condiciones anteriores se realizaron curvas de eficiencia usando un purificado de cada uno de los genes estudiados. Dichas curvas permitieron determinar el comportamiento de los oligos durante la amplificación a diferentes concentraciones. La especificidad de los oligos se estableció mediante el análisis de la curva *melting*. La curva *melting* permite identificar la  $T_m$  (por sus siglas en inglés *melting temperature temperatura de desnaturalización*) de los fragmentos amplificados de ADN, considerando que la  $T_m$  es específica para cada fragmento amplificado, ya que es resultado del porcentaje de G-C que contiene y del tamaño del amplicón. Se pueden distinguir dentro de una misma reacción de PCR cada uno de los productos, los dímeros se observan a temperaturas menores a 70 °C del lado izquierdo de la curva. En la Figura 17 se muestran las curvas *melting* (o de desnaturalización) para E2F, PCNA y S13. Se observó un solo pico bien definido, esto

permitió demostrar que el diseño de oligos se realizó correctamente y que no había amplificaciones inespecíficas ni dímeros. La  $T_m$  de los productos fue de 82 °C para E2F, 79 °C para PCNA y 82 °C para prs13. En cada uno de los ensayos posteriores con las muestras experimentales se verificó que la *melting* del producto de amplificación de las muestras coincidiera en temperatura con el observado para el amplicón purificado.



**Figura 17. Curvas de eficiencia de amplificación de E2F, PCNA, y los genes de referencia ubiquitina, 18S y prs13. Se muestra la especificidad de los oligos mediante el análisis de la curva melting (o desnaturalización).**

Finalmente, para determinar que ni el tratamiento con insulina, ni el tiempo afectarían la expresión del gen de normalización se realizaron curvas de amplificación para tres genes de referencia, el 18S, la ubiquitina y la prS13 y se compararon entre sí usando el programa geNorm. El software de geNorm es un algoritmo basado en las fórmulas descritas por Vandesompele y colaboradores (2002) para determinar el gen de referencia (*housekeeping*) más estable de entre un conjunto de genes candidatos. Para esto se calcula el factor de normalización de expresión del gen en cada muestra basada en la media geométrica de un número definido por el usuario de los genes de referencia. En cada caso el GeNorm proporcionó una gráfica en la que se observó cuál de los genes de referencia probados es más estable en las condiciones propuestas (tiempo o tratamiento con insulina).

Para validar los genes de referencia, se utilizó el ARN total de radículas de 0, 15, 18 y 24 h testigo y tratados con insulina. Se calcularon los valores de  $\Delta\Delta Ct$  para las muestras y se evaluaron usando el GeNorm. Los resultados mostraron que 18S y prS13 tienen la misma estabilidad y el menos estable es ubiquitina. En la Tabla 5 se muestran los resultados de la comparación de valores de Ct y de  $\Delta\Delta Ct$  para cada gen. Los valores de Ct corresponden a ensayos que se realizaron por duplicado en muestras independientes con tres repeticiones para cada tiempo. Se observa que para 18S y prS13 los promedios de Ct tienen una desviación estándar de menos de un ciclo entre las muestras testigo e insulina, es decir la insulina no induce cambios en los niveles del mensajero. Los valores de  $\Delta\Delta Ct$  de los genes de 18S y prS13 no varían ni a lo largo del tiempo ni con el tratamiento con insulina. Por el contrario, la expresión de ubiquitina si varió con en el tratamiento y durante el tiempo de imbibición, por lo que se descarto como gen de normalización. Al comparar los valores de expresión de los genes experimentales con 18S o prS13 se observó que los niveles de expresión obtenidos eran similares, por lo que para los experimentos finales se utilizó únicamente prS13 como gen de referencia.

**Tabla 5. Validación de los genes de referencia.**

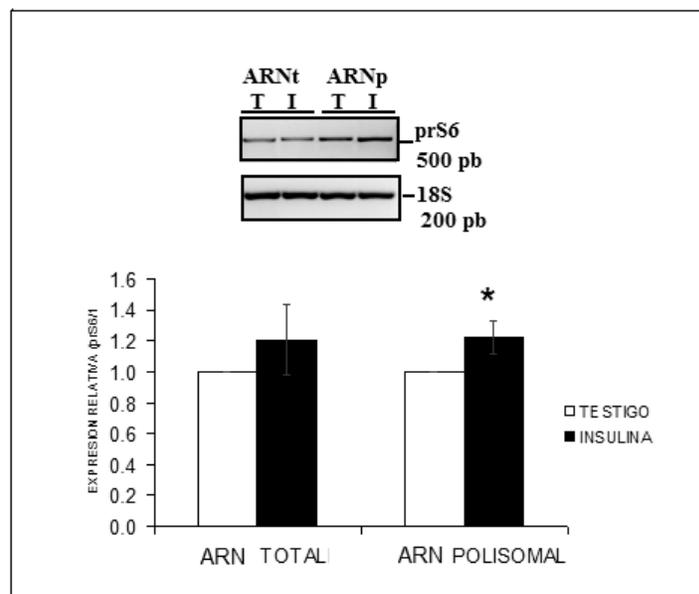
H DE IMBIBICION	VALORES DE Ct						
	TESTIGO	INSULINA	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	PROMEDIO Ct*	DE*
<b>18S</b>							
0	3.82	3.80	-0.02	0.00	1.00	3.80	0.05
15	3.81	3.84	0.03	0.04	0.97		
18	3.72	3.86	0.14	0.16	0.90		
24	3.76	3.77	0.01	0.03	0.98		
<b>UBIQUITINA</b>							
0	20.30	20.45	0.15	0.00	1.00	20.69	0.83
15	20.41	20.37	-0.05	-0.19	1.14		
18	20.41	21.40	0.99	0.84	0.56		
24	19.79	22.43	2.64	2.50	0.18		
<b>prS13</b>							
0	18.37	19.50	1.13	0.00	1.00	19.36	0.41
15	19.43	19.51	0.08	-1.06	2.08		
18	19.43	19.47	0.03	-1.10	2.14		
24	19.67	19.53	-0.13	-1.27	2.41		

\* Los valores corresponden al promedio de los Ct de las muestras testigo y tratadas con insulina

## 7.6 Expresión de E2F y PCNA.

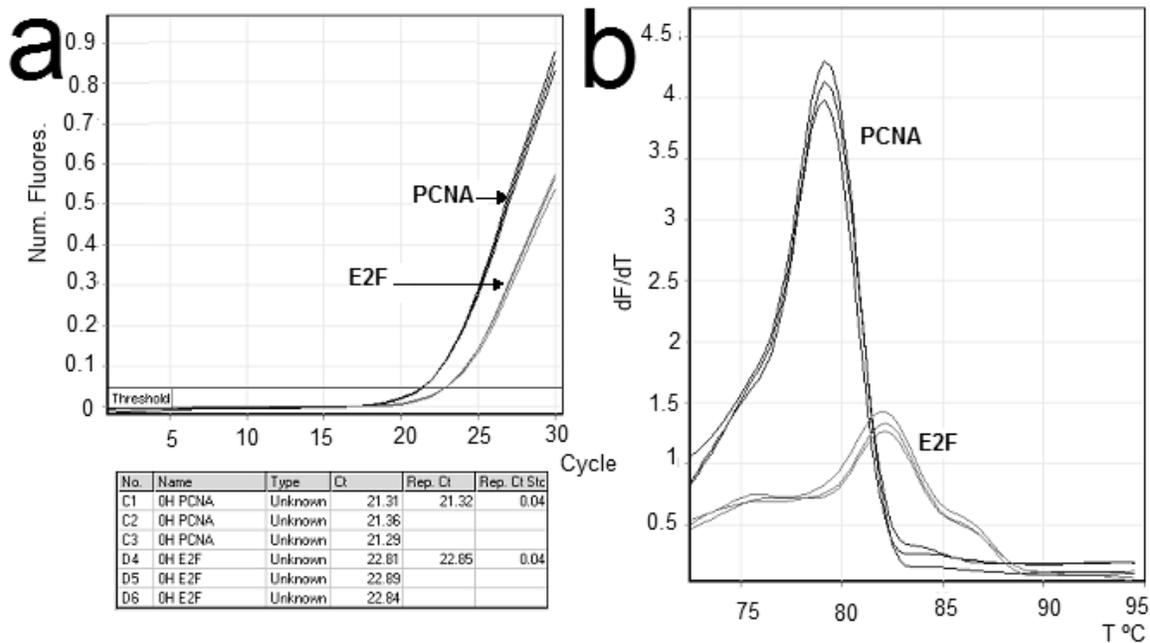
Uno de los efectos mejor estudiados de la insulina en el eje completo es la acumulación del ARNm de prS6 en la fracción polisomal, estudios previos en nuestro grupo de trabajo indican que este efecto se ubica en la radícula, por lo que previo a los ensayos de qPCR, se determinó por PCR semicuantitativo dicha acumulación en las radículas de 24 h, en las muestras que posteriormente se analizaron por qPCR a manera de control positivo del tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 18, donde se observa que hay un incremento significativo en la acumulación del mensaje de prS6 en ARN polisomal entre el testigo y las muestras tratadas con insulina

Para determinar si los mensajes de E2F y PCNA se encuentran almacenados en la semilla seca quiescente (0 h) se aisló el ARN total de radículas de semilla seca como se describió previamente. En este caso no se utilizó ARN polisomal debido a que en la semilla seca no existen ribosomas ensamblados (Bewley, 1997). Es importante comentar que en este caso la expresión era de tipo cualitativo (si esta presente o no) ya que no se comparó contra ninguna otra condición o tejido.



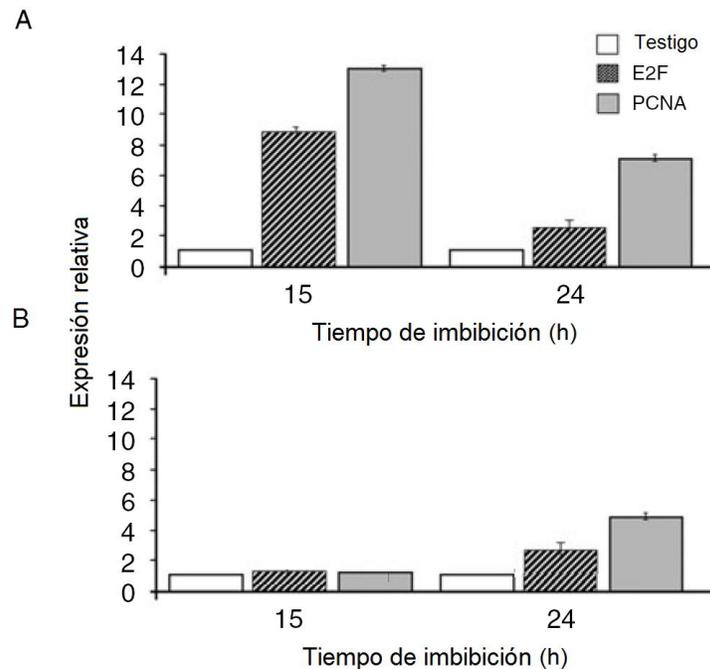
**Figura 18. Expresión de prS6 en radículas.** Se muestra la expresión por RT-PCR semicuantitativo de la prS6 en radículas de maíz con 22 h de imbibición y las últimas 2 horas tratadas con insulina 200 μU/mL. Se muestra una imagen representativa de las tres réplicas independientes y la gráfica de promedios y DE. El (\*) indica diferencias significativas  $\alpha=0.05$ .

En ensayos previos usando PCR semicuantitativo estos mensajes no pudieron ser detectados. En este trabajo usando PCR cuantitativo, se detectó amplificación para PCNA en el ciclo 21 y para E2F a partir del ciclo 22 (Figura 19). Estos resultados indican que ambos mensajes se encuentran en una proporción similar entre ellos en los ARNm almacenados en las semillas quiescentes.



**Figura 19. Expresión de E2F y PCNA por RT-PCR cuantitativo en ejes secos.** Se muestra en a) una amplificación representativa de E2F y PCNA en radículas de ejes embrionarios secos y en la parte inferior el Ct de cada uno. En b) se muestra la curva melting (desnaturalización) del producto de amplificación.

Los datos de Citometría de flujo indicaron que hay un incremento en la síntesis de ADN alrededor de las 18 h; por lo que se decidió observar el efecto de la insulina sobre la transcripción de los mensajes de E2F y PCNA, ya que como se mencionó previamente ambas proteínas participan en la transición G1-S. Se utilizaron radículas con 15 h y 24 h de imbibición. Se observó que el tratamiento con insulina incrementó la transcripción de ambos mensajeros con respecto al testigo en los dos tiempos analizados (Figura 20).



**Figura 20. Efecto de insulina sobre los niveles de transcritos de E2F y PCNA en radículas de maíz con 15 y 24 h de germinación.**

Se muestra la expresión de los ARNm de E2F y PCNA determinada mediante qRT-PCR usando a) ARN total y b) ARN acumulado en la fracción polisomal de los ápices de radículas de ejes embrionarios germinados por 15 y 24 h y tratados sin o con insulina  $200 \mu\text{M}^{-1}$  durante las últimas 2h de imbibición. Los valores son promedio de tres experimentos independientes y se representan como expresión relativa con respecto al testigo que se consideró como  $1 \pm \text{DE}$ . El \* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha= 0.05$ ).

A las 15 h de imbibición se observó un incremento de 8.8 veces en la transcripción de E2F y de 13 veces para PCNA. Sin embargo, en este tiempo de imbibición no se observó un incremento en la acumulación de ninguno de los dos mensajes estudiados en la fracción polisomal, lo que implica que el efecto de insulina fue a nivel transcripcional. A las 24 h el incremento en la transcripción por insulina fue de 2.6 veces para E2F y de 7.2 veces para PCNA, lo que explica el aumento observado de estos mensajes en la fracción polisomal (2.2 veces para E2F y de 5 veces para PCNA). Es interesante mencionar que el efecto de la insulina fue mayor en ambos casos para PCNA.

Estos resultados demuestran que la insulina regula la expresión de los genes E2F y PCNA a nivel transcripcional a partir de las 15 h de imbibición y de esa manera ejerce el

control en la transición G1-S observada mediante Citometría de Flujo a las 18 h de tratamiento.

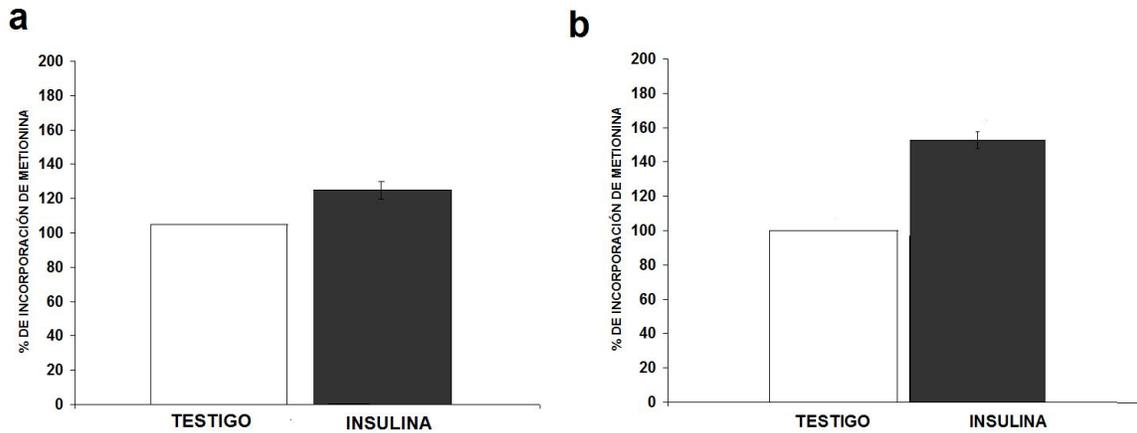
### **7.7 Determinación de la síntesis *de novo* de PCNA en radículas de ejes embrionarios de maíz.**

Para determinar si el efecto de la insulina observado sobre la transcripción de PCNA resulta en un incremento real en la síntesis de proteína, se inmunoprecipitó la proteína PCNA de radículas de maíz tratadas con insulina de 15 h de imbibición usando Dynabeads.

Para corroborar la especificidad del procedimiento de Dynabeadas se realizó la inmunoprecipitación de la proteína PCNA en una muestra de radículas de maíz sin marca radioactiva siguiendo el mismo procedimiento descrito en Materiales y métodos. En el gel de acrilamida se observó una sola banda del peso esperado, 32 kd (Datos no mostrados).

Los resultados de la extracción de proteínas mostraron que hay un incremento de aproximadamente el 20% en la síntesis *de novo* de proteínas totales en las muestras tratadas con insulina como se observa en Figura 21a. Esto sugiere que la insulina estimula, en general, la traducción en las radículas de maíz.

Por otro lado, dado que la síntesis de proteínas es un prerrequisito para la división celular, los datos de citometría muestran un incremento en la síntesis de ADN y el análisis de qPCR a su vez, indica un incremento en la transcripción de PCNA. La inmunoprecipitación de PCNA mostró que en muestras de radículas tratadas con insulina, hay un aumento del 50% en la incorporación de marca radioactiva con respecto al testigo (Figura 21b), lo anterior indica que el efecto de la insulina en el crecimiento en las radículas incluye la regulación de la transcripción y de la síntesis *de novo* de proteínas del ciclo celular que regulan la transición G1-S como PCNA.



**Figura 21. Efecto de insulina sobre la síntesis *de novo* de PCNA en radículas de maíz con 15 h de germinación.**

Se muestra la incorporación de marca radioactiva expresada como porcentaje de a) proteínas totales y b) proteína PCNA inmunoprecipitada en las radículas de ejes embrionarios germinados por 13 h y tratados sin o con insulina  $200 \mu\text{U mL}^{-1}$  durante las últimas 2h de imbibición. Los valores son promedio de tres experimentos independientes y se expresan como incremento en el porcentaje de incorporación de marca radioactiva con respecto al testigo que se consideró como 1.

## 8. DISCUSIÓN.

La imbibición de la semilla reactiva el metabolismo e inicia la germinación que termina con la protrusión de la radícula. Entre los eventos más relevantes de la germinación se encuentra la reactivación del ciclo celular (Barroco y col., 2005; Nonogaki y col., 2010). Dicho proceso es requerido para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Las semillas de maíz deshidratadas se encuentran en estado quiescente y sus células arrestadas en la transición G1-S (Vázquez-Ramos y De la Paz-Sánchez, 2003). Asimismo, el crecimiento y la división celular son estimulados por fitoreguladores como las auxinas y la benciladenina (Herrera y col., 2000). Recientemente, se ha reportado en semillas de maíz, un factor semejante a insulina, denominado ZmIGF (Rodríguez-López y col., 2011). En estudios previos, se reportó que la insulina produjo efectos similares al factor endógeno ZmIGF, estimulando la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz, en la concentración utilizada en el presente trabajo (García Flores y col., 2001; Sotelo y col., 2010, Rodríguez-López y col., 2011). Debido a su disponibilidad, en este trabajo se usó insulina como efector.

El tratamiento con un pulso de insulina usado en este trabajo, fue suficiente para inducir el crecimiento de los ejes embrionarios de maíz durante la germinación, en forma similar a la reportada previamente en tratamientos continuos con este efector (García-Flores y col., 2001; Dinkova y col., 2007). Nuestros resultados mostraron que la radícula tiene una respuesta mayor y más temprana que el coleoptilo. En estudios previos de dosis-respuesta con el factor endógeno ZmIGF, se observó también que las raíces tuvieron en todas las concentraciones probadas un crecimiento mayor al de los coleoptilos (Dinkova y col., 2007).

En reportes previos se demostró que la insulina y el ZmIGF activan la vía de señalización PI3K-TOR en ejes embrionarios de maíz (Dinkova y col., 2007). En este trabajo la activación de esta vía medida a través del incremento en S6K-tre 389 (Reyes de la Cruz y col., 2004) y de la acumulación preferencial del mensaje de prS6 en la fracción polisomal se observó únicamente en las radículas y no en los coleoptilos. En este trabajo se demuestra por primera vez que la respuesta a insulina es diferencial en los partes del eje

embrionario, siendo las radículas las que presentan mayor capacidad de respuesta y más temprana a este efector (Figura 9).

El crecimiento en las plantas está dado por incremento del tamaño y/o proliferación celular. El tamaño celular tiene un papel indirecto en la proliferación celular, ya que las células deben duplicar su tamaño antes de dividirse. La cantidad de proteínas que determinan en gran medida la biomasa celular, está influenciada por el número de ribosomas (Baserga, 2007) y en consecuencia la biogénesis de ribosomas esta fuertemente acoplada al crecimiento (Urban y col., 2007).

En estudios previos se demostró que la insulina indujo de manera preferencial en las radículas la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales y de ADN; confirmando reportes previos en los que se encontró que los IGF's estimulan la proliferación, regulando la síntesis de ADN y proteínas reguladoras del ciclo celular como la ciclina D1 (Mairet-Coello y col., 2009). Sotelo y colaboradores (2010) también han reportado que la insulina y el ZmIGF inducen la división celular en callos de maíz. En este sentido, los resultados de este trabajo corroboran reportes previos acerca del papel de la insulina en la coordinación del crecimiento y división celular mediante la vía S6K-TOR y además demuestran que las células responden al efecto inductor en forma selectiva como se muestra en este caso al observar los efectos en la radícula y los coleoptilos (Fig. 10)

Debido a lo anterior, se analizó mediante Citometría de flujo, el efecto de la insulina en las fases del ciclo celular en los meristemos radiculares, de 0 a 36 h de imbibición. Los resultados revelaron que la mayoría de las células estaban arrestadas en la transición G1-S, confirmando reportes previos en semillas de maíz (Sánchez y col., 2005), *Arabidopsis* (Barroco y col., 2005) y cebada (Gendreau y col., 2008). En animales, también se ha reportado que esta transición es la única parte del ciclo celular que depende de factores de crecimiento (Blagosklonny y Pardee, 2002). Los resultados de este trabajo mostraron que a las 24 h de imbibición, la insulina indujo en los meristemos de las radículas de semillas de maíz en germinación, una disminución en el porcentaje de núcleos en G1 de 68.7 a 47.8 % (aproximadamente 30%) y un aumento en el porcentaje de núcleos en G2 de 11.8 a 22.1% (aproximadamente 87%), con respecto al testigo (Tabla 4 , Fig. 15). Estos resultados confirman reportes previos en maíz en los que se encontró que la reactivación del ciclo celular durante la imbibición de ejes embrionarios, está asociada a

una disminución del porcentaje de células en G1 y a un aumento en el porcentaje de núcleos en G2, (Sánchez y col., 2005). La inducción por insulina de la transición G1-S observada en este trabajo, es superior a la reportada previamente en maíz, para la hormona mitogénica sintética benciladenina, con la que se observó una disminución en el porcentaje de núcleos en G1 de 68.4 a 58.3 % (aproximadamente 14.7%) y un incremento en el porcentaje de núcleos en G2 de 19.9 a 29.7% (aproximadamente 67%) con respecto al testigo (Figura 15) (Sánchez y col., 2005). Estos resultados demuestran que la insulina actuó como mitógeno en los meristemos de radículas de ejes embrionarios de maíz en germinación y son consistentes con reportes anteriores, en cultivos de células de maíz en suspensión, en los que se encontró que tanto la insulina como el ZmIGF, incrementan considerablemente el índice mitótico de las células (Sotelo y col., 2010).

La inducción por insulina en la expresión de genes que regulan la transición G1-S por insulina, tales como E2F y PCNA se confirmó mediante RT-qPCR en las radículas de maíz. Se encontró que tanto a las 15 h como a las 24 h de imbibición, la insulina incrementó la transcripción de los mensajes de E2F y PCNA. Como resultado de lo anterior, a las 24 h de imbibición se observó un efecto de la insulina en la movilización de estos mensajes a los polisomas (Figura 20). En los últimos años se ha investigado intensamente el ciclo celular de plantas (Vázquez-Ramos y De la Paz-Sánchez, 2003; Barroco y col., 2005). Se han estudiado los genes que participan en el reinicio y la progresión del ciclo celular. Los factores de transcripción E2F forman parte de la vía RBR-E2F, que participa en la apoptosis, la diferenciación celular y el desarrollo y tiene un papel crucial en la regulación de la expresión de genes que participan en la transición G1-S y en la replicación del ADN (Lammens y col., 2009), acortando los tiempos de replicación y la división celular (Magyar y col., 2005). Los factores E2F promueven la transcripción de un número de genes entre ellos PCNA (Sozzani y col., 2010).

El gen PCNA se ha correlacionado con la replicación de ADN, y en años recientes con la reparación del ADN y la remodelación de la cromatina, (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). La mayor expresión y traducción de PCNA observada en este trabajo podría deberse a las distintas funciones propuestas para esta proteína en la célula. En este sentido, en reportes previos se encontró en semillas de maíz imbibidas por 15 h, incorporación de timidina que se asoció a eventos reparativos (Baíza y col., 1989) y también se encontró

que la hormona mitogénica benciladenina induce la acumulación de la proteína PCNA (Herrera y col., 2000).

En este trabajo se detectaron mediante RT-qPCR los ARN mensajeros para PCNA y para E2F entre los mensajeros almacenados en la semilla quiescente, a pesar de que en estudios previos de Sánchez y colaboradores (2005) no se encontraron los ARNm para PCNA entre los mensajes almacenados en la semilla, esto puede deberse a la sensibilidad de la técnica utilizada.

Este trabajo aporta una mayor comprensión del mecanismo por el que la Insulina/IGFs inducen el crecimiento en ejes embrionarios de maíz en germinación. Asimismo, indica que la respuesta a este efector es tejido específica siendo las radículas las que presentan una respuesta más temprana y mayor a la insulina. Los resultados obtenidos también apoyan que el crecimiento se debe al menos en parte, a la reactivación del ciclo celular, en particular acelerando la transición G1-S y esto al parecer ocurre al menos en parte por la inducción de los genes del factor de transcripción E2F y de la proteína PCNA, marcadores de dicha transición.

## **9. CONCLUSIONES.**

Las conclusiones obtenidas de este trabajo son:

- El efecto de la insulina es tejido específico, localizándose en las radículas,
- El efecto de la insulina en la división celular se debe a que acelera la transición G1-S como se ha reportado en células eucariontes animales.
- El mecanismo que acelera el ciclo celular se debe en parte a la inducción de la expresión del factor de transcripción E2F y de genes de ciclo celular dependientes de E2F, tales como PCNA.

## **10. PERSPECTIVAS.**

Considerando que la insulina acelera el crecimiento de manera tejida específica en la radícula sería interesante estudiar cual es su efecto en las otras partes del eje embrionario (coleoptilo y el internodo) y determinar si la diferencia en la respuesta se mantiene durante y después de la germinación. Para lo cual se propone

Determinar el efecto de insulina sobre la transcripción y traducción de las proteínas E2F y PCNA durante la germinación en el coleoptilo para conocer si su comportamiento es similar.

Asimismo, determinar los niveles de fosforilación de pRBR en coleoptilos y radículas de maíz imbibidas tratadas sin y con un pulso de insulina en diferentes estadios de germinación (15 y 24 h) para determinar la diferencias en la transición G1-S entre las dos partes.

## 11. REFERENCIAS.

**Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A.** 2010. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* **15**:211-218.

**Ach RA, Durfee T, Miller AB, Zambryski PC, Hanley-Bowdoin L, Gruissem W.** 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5077–5086.

**Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla LP, Sánchez de Jiménez.** 2007. Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Mol. Biosys.* **3**: 794-802.

**Averous J, Proud CG.** 2006. When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene.* **25**: 6423–6435.

**Baíza MA, Sánchez de Jiménez E.** 1989. Effect of auxin, 2-2 methyl-4-chloro-phenoxy. propionic acid on cell cycle regulation in maize embryonic tissues. *Physiol. Plant.* **75**: 261-266.

**Barroco R, Vanpoucke K, Bergervoet J, Deveylter L, Groot S, Inzé D, Englen G.** 2005. The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol.* **137**: 127-140.

**Barroso I, Santisteban P.** 1999. Insulin induces early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**:17997-18004.

**Baserga R.** 2007. Is cell size important?. *Cell Cycle.* **7**: 814-816.

**Beltrán-Peña E, Ortiz-López A, Sánchez de Jiménez E.** 1995. Synthesis of ribosomal proteins from stored RNAs early in seed germination. *Plant Mol. Biol.* **28**: 327-336.

**Bewley DJ.** 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* **9**: 1055-1066.

**Blagosklonny MV, Pardee AB.** 2002. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle.* **1**:103-110.

**Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla LP, García E, Vázquez-Ramos JM.** 2011. The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns. *Physiol Plant.* **143**: 297-308.

**Buentello-Volante B, Díaz de León-Sánchez F, Rivera-Cabrera F, Aguilar Caballero R, Ponce-Valadez M, Sánchez de Jiménez E, Pérez-Flores, LJ.** 2010. Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate *Zea mays* coleoptile growth. *Phyton* **79**:101-108.

**Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT.** 2009. The MIQE

guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55**: 611-622.

**Chakravarty K, Wu SY, Chiang CM, Samols D, Hanson RW.** 2004. SREBP-1c and Sp1 interact to regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver. *J. Biol. Chem.* **279**: 15385-15395.

**Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA.** 2005. Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiol.* **138**: 2323-2336.

**Collier E, Watkinson A, Cleland CF, Roth J.** 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* **262**: 6238-6247.

**Dann SG, Selvaraj A, Thomas, G.** 2007. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trend. Mol. Med.* **13**: 252-259.

**Dewitte W, Murray JAH.** 2003. The plant cell cycle. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**: 235-264.

**De Jager SM, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Murray JA.** 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol.* **16**:385-396.

**De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B.** 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta.* **208**:453–62.

**Dinkova TD, Reyes de la Cruz H, García-Flores C, Aguilar R, Jiménez-García LF, Sánchez de Jiménez E.** 2007. Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiol. Plant.* **130**: 1-10.

**Dinkova TD, Márquez-Velázquez N, Aguilar R, Lázaro-Mixteco PE, Sánchez de Jiménez E.** 2011. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci. Res.* **21**: 85–93.

**Doerner, P.** 2007. Signal and mechanisms in the control of plant growth. *In* Plant Growth Signaling, Plant Cell Monogr. Bögre, L & Beemster G, ed. Springer-Verlag. Berlin. Pp 1-23.

**Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Fougelle F.** 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipids homeostasis. *Biochimie.* **86**: 839-948.

**Francis D.** 2007. The plant cell cycle 15 years on. *New Phytol.* **174**: 261-78.

**Garrocho-Villegas, V , Sánchez de Jiménez, E.** 2012. TOR pathway activation in *Zea mays* L. tissues. *Plant Sig & Beh* **7**:1-3.

**García Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, Sánchez de Jiménez E.** 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *J. Biochem.* **358**: 95-100.

- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C.** 2000. The expression of D cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol.* **122**: 1137–1148.
- Gendreau E, Romaniello S, Barad S, Leymarie J, Benech-Arnold R, Corbineau F.** 2008. Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J. Exp. Bot.* **52**: 203–212.
- Gómez E, Vázquez-Ramos J.** 2003. Maize cADN polimerase alpha is fosforilated by a PCNA associated cyclin-CDK complexes: effect of bencyl-adenine. *J. Plant Physiol.* **160**: 983-990.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos J.** 2005. Maize cyclin D2 expression, ssociated kinase activity and effect of phytohormones during germination. *Plant Cell. Physiol.* **46**: 166-173.
- Hanada K, Hirano H.** 2004. Interaction of a 43-kDa receptor-like protein with a 4kDa hormone-like peptide in soybean. *Biochem. J.* **43**: 12105-12112.
- Harbour JW, Dean DC.** 2011. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Gen. & Develop.* **14**: 2393-2409.
- Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF.** 2005. Restaining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends. Biochem. Sci.* **30**: 35-41.
- Herrera I, de la Paz Sánchez M, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM.** 2000. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol. Plant.* **110**: 1034:1399.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WWJ.** 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* **179**: 33–54.
- Hochegger H, Takeda S, Hunt T.** 2008. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 910-916.
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S.** 1998. The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol. Biol.* **37**:155–69.
- Inzé D, De Veylder L.** 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* **40**:77-105.
- Jorgensen P, Tyers M.** 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* **14**:1014-1027.
- Jugenheimer RW.** 1988. El maíz. Variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. D.F. México. pp 51- 72.

**Karp, G.** 1998. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos.* McGraw-Hill Interamericana, México.

**Kozma SC, Thomas G.** 2002. Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays.* **24**: 65-71.

**Lammens T, Li J, Leone G, De Veylder L.** 2009. A typical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends. Cell Biol.* **19**: 111-118.

**Luthe DS, Quatrano RS.** 1980. Transcription in isolated wheat nuclei: I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiol.* **65**: 305-308.

**Mairet-Coello, G, Tury, A, DiCicco-Bloom, E.** 2009. Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J. of Neurosci.* **29**: 775-788.

**Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bakó L, Inzé D, Bogre L.** 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin cell division. *Plant Cell.* **17**: 2527-2541.

**Marie D, Brown S.** 1993. A cytometric exercise in plant ADN histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell.* **78**: 41-51.

**Masubelele L, Dewitte W, Mengues M, Maughan S, Collins C, Huntley R, Nieuwland J, Scofield S, Murray J.** 2005. D- Type cyclin activated division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *PNAS.* **103**: 15694-15699.

**Mathews, H, Ahern K, Sonenberg N.** 2000. *Bioquímica.* 3° eds. Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harbor Press. pp. 31-69.

**Meijer M, Murray JAH.** 2000. The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Mol. Biol.* **43**: 621-633.

**Meyuhas O, Drazzen A.** 2009. Ribosomal protein S6 kinase: from TOP ARNms to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **90**: 109-153.

**McKinnon CM, Ravier MA, Rutter GA.** 2006. FoxO1 is required for the regulation of preproglucagon gene expression by insulin in pancreatic  $\alpha$ -(TC1-9)cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 39358-39369.

**Moreno CP.** 1996. *Vida y obra de granos y semillas.* Col. La ciencia desde México. 146. Fondo de cultura económica. México.

**Mounier C, Posner BI.** 2006. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol.* **84**: 713-724.

**Nakae J, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Accili D.** 2001. Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor foxo (Fkhr) requires kinases distinct from AKT. *Biochem. J.* **40**: 11768-11776.

**Nardmann J, Werr W.** 2009. Patterning of the maize embryo and the perspective of evolutionary developmental biology. *In Handbook of Maize: Its Biology*, J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.) Springer Science and Business Media. CA. USA pp 105-118.

**Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD.** 2010. Germination, Still a mystery. *Plant Sci.* **179**: 574-581.

**Oliveira, A, Ribeiro, ES, da Cunha, M, Gomes, VM, Fernández, K and Xavier-Filho, J.** 2004. Insulin accelerates seedling growth of *Canavalia ensiformis* (Jack bean). *Plant Growth Reg* **43**: 57–62.

**Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JAH.** 2002. Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **357**: 749–760.

**Patursky-Polischuk I, Stolovich-Rain M, Hausner-Hanochi M, Kasir J, Cybulski N, Avruch J, Rüegg MA, Hall MN, Meyuhos O.** 2009. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP ARNms by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol. Cell Biol.* **29**: 640-649.

**Paz Lemus E.** 2005. Efecto de la insulina en la síntesis de proteínas, síntesis de ADN y síntesis de ARN en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de licenciatura en Química de alimentos. UNAM. D.F. México.

**Proud CG, Denton RM.** 1997. Molecular mechanism for the control of translation by insulin. *J. Biochem.* **328**: 329-341.

**Ramírez-Parra E, Fründt C, Gutiérrez C.** 2003. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**: 801-811.

**Raught B, Gingras A, Sonenberg N.** 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *PNAS.* **98**: 7037-7043.

**Ren M, Zhong X, Ma CY, Sun Y, Guan QB, Cui B, Guo J, Wang H, Gao L, Zhao JJ.** 2009. *Acta Pharmacol. Sin.* Insulin-like growth factor-1 promotes cell cycle progression via upregulation of cyclin D1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/nuclear factor-kappaB signaling pathway in FRTL thyroid cells. **30**:113-119.

**Reyes de la Cruz H, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E.** 2004. Functional characterization of maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 (S6K). *Biochem J.* **43**: 533-539.

**Rincón-Guzmán A, Beltrán Peña E, Ortiz López A, Sánchez de Jiménez E.** 1998. Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant. Mol. Biol.* **38**: 357-364.

**Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqumard A, Murray JAH.** 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science.* **283**: 1541–1544.

**Rodríguez-López CD, Rodríguez-Romero A, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E.** 2011. Biochemical characterization of a new maize *Zea mays* L. peptide growth factor. *Prot. Pep. Lett.* **18**: 84-91.

**Ruvinsky I, Meyuhas O.** 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends. Bioch. Sci.* **31**: 342-348.

**Sánchez de Jiménez E.** 2000. Protein synthesis in seed germination: connecting External cell signals with the ribosome. *In Seed Biology: Advances and Applications.* Eds. M. Black, K.J. Bradford and J. Vázquez –Ramos. CAB International. London GB . Pp.11-24.

**Sánchez de Jiménez E, Aguilar R, López, S.** 1981. Distinctive characteristics of protein síntesis in maize embryos during early stages of germination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**: 445-450.

**Sánchez MP, Gurusinghe SH, Bradford KJ, Vázquez-Ramos JM.** 2005. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *J. Exp. Bot.* **56**: 515-523.

**Sánchez, M.D.P., Torres, A., Boniotti, M.B., Gutierrez, C & Vázquez-Ramos, J.M.** 2002 PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize. *Plant Mol. Biol.* **50**: 167–175.

**Sarbassov D, Ali S, Sabatini DM.** 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 596–603

**Sotelo R, Garrocho-Villegas V, Aguilar R, Calderón ME, Sánchez de Jiménez E.** 2010. Coordination of cell growth and cell division in maize *Zea mays*. Relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In Vitro Cell & Dev. Biol. Plant.* **46**: 578-586.

**Sliwinska E, Zielinska E, Jedrzejczyk I.** 2005. Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size?. *Cytometry.* **64**: 72-79.

**Sozzani R, Maggio C, Giordo R, Umana E, Ascencio-Ibañez JT, Hanley-Bowdoin L, Bergouieux C, Cella R, Albani D.** 2010. The E2F/DEL2 factor is a component of a regulatory and development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **72**: 381-395.

**Strzalka W, Ziemienowickz A.** 2011. Proliferating cell nuclear antigen PCNA: a key factor in ADN replication and cell cycle regulation. *Ann. Bot.* **107**: 1127-1140.

**Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B.** 2010. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci. Rep.* **4**: 243-255.

**Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple inteARNI control genes. *Genome Biol.* **3**: 34.1-34.11.

**Vázquez-Ramos J, De la Paz Sánchez, M.** 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Sci. Res.* **13**: 113-130.

**Willems E, Leyns L, Vandesompele J.** 2008. Standarization or real-time PCR gene expresión data from independent biological replicates. *Anal. Biochem.* **379**: 127-129.

**Yoonseok K, Exton JH.** 2004. Role of phospholipase D1 in the regulation of mTOR activity by lysophosphatidic acid. *J. FASEB.* **18:** 311-319.

**Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R.** 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.* **5:** 663-674.