



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL DE LA SINTESIS DE  
LIPIDOS DE RESERVA POR LA DISPONIBILIDAD DE  
ACIDOS GRASOS EN EMBRIONES INMADUROS  
DE MAIZ (*ZEA MAYS*)



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A :  
**MILTON ALTUZAR MARTINEZ**



MEXICO, 2000.

280263



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

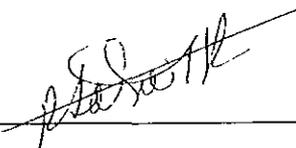
Presidente	Prof. Aguilar Caballero Raúl
Vocal	Prof. Bernal Lugo Irma Ofelia.
Secretario	Prof. Rodríguez Sotres Rogelio.
1er Suplente	Prof. Gavilanes Ruiz Marina.
2o. Suplente	Prof. Pedraza Chaverri José

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica. División de estudios de posgrado  
Facultad de Química. U N.A M.

Nombre del asesor del tema:

Rodríguez Sotres Rogelio



---

Nombre del sustentante:

Altuzar Martínez Milton



---

*Buena es dar gracia a Yahveh  
y salmodiar a tu nombre, - Altísimo,  
publicar tu amor por la mañana  
y tu lealtad por las tardes  
al son del arpa de diez cuerdas y la lira  
con un susurro de cítara.*

*Pues con tus hechos, Yahveh, me regocija,  
ante las obras de tus manos grito.  
«Qué grandes son tus obras, Yahveh,  
inescrutables tus pensamientos!»  
El hombre necio no entiende, el insensato  
no comprende estas cosas ..*

*(Sal 92, 2-7)*

## Agradecimientos.

Al concluir este trabajo, es necesario señalar la enorme ayuda, conocimientos, estímulos y paciencia que me ha brindado el Doctor Rogelio Rodríguez S.; a usted doctor, muchas gracias por facilitar la realización de esta tesis De igual modo agradezco la generosa ayuda del Dr. Fermín Pacheco M y de Lilián Valencia T, así como a todos los amigos del laboratorio 115

Agradezco a todos los profesores que en su conjunto han realizado la tarea de formar y compartir sus conocimientos y experiencias, que han despertado el interés a ir más allá, a saber aprovechar los medios que brinda la UNAM A todos ellos gracias por sus conocimientos, consejos, comentarios y observaciones. También agradezco a todos los amigos y compañeros de la facultad, ya que con su presencia, su amistad, sus comentarios y sugerencias han hecho de todo este tiempo una fase muy satisfactoria llena de alegrías y de experiencias edificantes

Agradezco a mis padres, por todo el apoyo incondicional que siempre recibo de ellos, por todas y cada una de sus enseñanzas que me han ido formando no sólo como persona, sino también como hijo, por ello este logro alcanzado no es sólo mío, es también de ustedes, ya que detrás de él se encuentra todo el esfuerzo, sacrificios y esperanza de ustedes, Gracias a mis hermanos que en todo momento me han alentado, que de una manera muy especial han compartido mis tristezas y mis alegrías, gracias por sus palabras y obras de aliento Gracias a Dios por la familia que tengo, por todas las experiencias que he vivido y por todos los logros alcanzados.

## Dedicatorias.

Dedico el presente trabajo a mis padres, que no sólo se han quedado en darme el preciso don de la vida, sino que han ido más allá, proporcionándome todo lo necesario para llegar a ser una persona, y en especial a mi madre, porque con su testimonio me ha hecho comprender que siempre quedan salidas y soluciones a los problemas no importando lo enorme que parezcan, que siempre hay y habrá un motivo por el cual esforzarse y seguir adelante. Y también a mis hermanos Yesenia, Eric y Guadalupe, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible concretizar este trabajo, el cual no solo representa una meta alcanzada por mi, es en sí mismo, un logro de todos.

También dedico este trabajo a mis amigos de la carrera que me apoyaron en todo momento: Andrés Bobadilla, Aída Hidalgo, Aurora Lara, Omar Rangel, Rosario Ayala, Lourdes Pérez, Juan C. Sigala y Jesús Recillas; a ustedes gracias, muchas gracias por haber estado en cada uno de los momentos que siempre tendré presente en donde quiera que me encuentre, mientras transcurrían los nueve semestres su amistad se fue constituyo el único reconocimiento digno de ser conservado en la interioridad de mi ser

A todos ustedes con inmenso cariño

MILTON ALTUZAR

## Índice.

1	Abreviaturas	7
2	Introducción.	9
3	Antecedentes	12
3 1	Importancia y aspectos nutricionales de los lípidos	12
3.1.1	- Producción y consumo de grasas y aceites en México	13
3 2-	Estructura del grano de maíz	17
3 3-	Desarrollo de las semillas.	19
3 3 1-	Fase de histodiferenciación	19
3 4-	Acumulación de reservas	21
3 4 1	Papel del ABA y del potencial osmótico en la acumulación de reservas	23
3 5-	Metabolismo de síntesis de los lípidos de reserva durante el llenado del grano	25
3 5.1-	Biosíntesis de ácidos grasos	26
3 5 2-	Biosíntesis de triacilglicéridos	31
3 5.3-	Regulación del proceso de acumulación de lípidos	34
3 5 3.1-	Regulación por retroalimentación	36
3 5 3 2-	Control de abastecimiento de sustrato y cofactores	38
3.5.3.3-	Control de la cantidad de aceite producido por una semilla.	39
4	Hipótesis	41
5	Objetivos	42
6	Materiales y métodos	44
6 1-	Materiales	44
6 1 1-	Sustancias químicas	44
6 1.2-	Material biológico	44
6.2-	Métodos	45
6 2.1-	Aislamiento de los embriones de la mazorca	45
6 2 2-	Efecto del ABA y del potencial osmótico sobre la acumulación de ácidos grasos	46
6 2 3-	Extracción de lípidos y análisis de la fase clorofórmica	47
6 2.4-	Cuantificación de la radioactividad incorporada a los ácidos grasos	48

6 2 5- Efecto de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos sobre la acumulación de TAG .....	48
6 2 6- Incorporación de ácido grasos-[ <sup>14</sup> C] exógeno.....	49
6 2 7- Extracción de microsomas de embriones inmaduros de maíz ..	50
6.2 8- Ensayo de la actividad de DAG-AT .....	50
7 Resultados .....	51
7 1- Efecto del ABA y del potencial osmótico sobre la acumulación de ácidos grasos .....	52
7 2- Efecto de la Cerulenina sobre la síntesis de lípidos totales .. ..	53
7 3- Inhibición de la síntesis de ácidos grasos .....	55
7 4- Incorporación de ácidos grasos-[ <sup>14</sup> C] exógenos a los lípidos de reserva .. .	58
7 5- Efecto de la Cerulenina sobre la actividad de DAG-AT en microsomas de embriones inmaduros de maí .. .	60
8 Discusión .....	64
9 Conclusiones .....	69
10 Bibliografía .....	70
Apéndice I Composición de las disoluciones empleadas .....	76

## 1 Abreviaturas

ACCasa	Acetil coA carboxilasa
ABA	Ácido abscísico
ACP	Proteína transportadora de grupos acilos (del inglés <i>acyl carrier protein</i> )
AGL	Ácidos grasos libres
AGs	Ácidos grasos
ATP	Adenosín trifosfato
B	Amortiguador MES (pH 5.5)
BMSA	Medio de recuperación cuya composición es: 10 mM de MES pH 5.5, Manitol 500 mM, Sacarosa 60 mM y ABA 10 $\mu$ M.
CoA	Acetil coenzima A
DAG-AT	Diacilglicerol -aciltransferasa
DAG	Diacilglicéridos
DPM	Desintegraciones por minuto
FAS	Ácido graso sintetasa (del inglés <i>fatty acid synthase</i> )
KAS	3-cetoacil sintetasa (del inglés <i>Ketoacyl synthase</i> )
NADH	Dinucleótido de nicotina y adenina
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotina y adenina
MES	Ácido 2-[N-morfolino]-etano-sulfónico
POP	2,5-Difeniloxazol
POPOP	1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benzeno
RE	Retículo endoplásmico
R P M	Revoluciones por minuto
TAG	Triacilglicéridos

- 10 0      Ácido cáprico (decanoico)
- 12 0      Ácido láurico (dodecanoico)
- 16 0      Ácido palmítico (ácido hexadecanoico)
- 18 0      Ácido estéarico (ácido octadecanoico)
- 18 1      Ácido oleico (ácido octadecenoico)

## 2 Introducción:

Para que una semilla pueda germinar y dar origen a una planta, es necesario que tenga disponibilidad de los nutrimentos de reserva suficientes para soportar el desarrollo inicial de la planta hasta que esta alcance el estado autótrofo. Por lo tanto, el proceso de acumulación reservas representa una etapa clave en la perpetuación de la especie previa a que la semilla sea separada de la planta madre

En el desarrollo de las semillas podemos distinguir tres etapas confluentes que son la histodiferenciación, la expansión o llenado del grano y el secado (Bewley y Black, 1994) La expansión está acompañada por una acelerada síntesis de biomoléculas de reserva que se acumulan en sitios específicos dentro de la semilla. Las biomoléculas que constituyen las reservas más importantes de carbono de una semilla de cereal son carbohidratos y lípidos. Los primeros son en su mayoría almidón, en tanto que los segundos están representados casi en su totalidad por triacilglicéridos (TAG). En el caso de la semilla del maíz (*Zae mays*), la principal reserva energética la constituye el endospermo, constituido en su mayoría por almidón: pero existe una reserva importante de aceites en el embrión. Dichos aceites no sólo son importantes para el desarrollo de la semilla, sino que poseen interés para el hombre, ya que el aceite de maíz es rico en ácidos grasos polinsaturados, lo que le confiere una buena calidad nutricional (Hansen, 1994)

En los procesos de síntesis de los aceites en las semillas podemos distinguir dos grandes etapas: primero, la síntesis de los ácidos grasos (AGs) y segundo, la incorporación de las unidades de ácido graso al esqueleto del glicerol (Bewley y Black, 1994) La síntesis de triacilglicéridos en semillas inmaduras se encuentra regulada por el ácido abscísico (ABA) y el potencial osmótico (Rodríguez-Sotres y Black, 1994)

Ambos procesos ocurren en compartimentos diferentes y se encuentran separados espacialmente. La síntesis de ácidos grasos en las plantas tiene lugar en los plástidos y requiere de una proteína transportadora de grupos acilos (ACP). Se trata de un proceso cíclico que consta de una condensación seguida de dos pasos de reducción, separados por uno de deshidratación, que dan como resultado una cadena saturada dos carbonos más larga en cada vuelta del ciclo. El complejo enzimático encargado de efectuar esta síntesis es conocido como ácido graso sintetasa (FAS) y en las plantas se presenta una FAS tipo II, a semejanza con los sistemas procariontes; que consta de enzimas fácilmente dissociables.

A semejanza de las bacterias y en contraste con lo que ocurre en células animales las plantas presentan, al menos tres isoenzimas capaces de catalizar la etapa inicial de la síntesis, es decir la de condensación. La 3-cetoacil sintetasa (KAS) I condensa malonil-ACP y acil-ACP de 4 a 14 carbonos; la KAS II es similar, pero emplea de acil-ACP 14 a 18 C y ambas son sensibles al antibiótico Cerulenina. Por otro lado, la KAS III es capaz de condensar acetil-CoA y malonil-ACP y es insensible a la Cerulenina (Clough *et al*, 1992, Tai y Jaworski 1993, Schuch *et al* 1994). La reacción catalizada por la KAS III es la que inicia el ciclo de síntesis de un ácido graso. Para que las KAS puedan actuar requiere de un aporte continuo de malonil-ACP; dicho aporte es posible gracias a la acción de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACCase) que condensa Acetil-CoA y CO<sub>2</sub>, en presencia de ATP, para formar malonil-CoA. Los tioesteres de malonato de CoA y ACP pueden ser rápidamente intercambiados por la malonil-CoA:ACP transacilasa.

La regulación de esta ruta metabólica no es aún bien conocida y si bien existen muchas evidencias que sugieren que la ACCase es una enzima clave en la regulación (Ohlrogge y Jaworski, 1997), también se ha propuesto que la KAS III puede ser un punto de regulación importante (Brück *et al* 1996). Lo cierto es que se desconoce cuales son los

pasos que realizan la mayor contribución a la regulación de la ruta metabólica (Ohlrogge y Jaworski, 1997)

En este trabajo se presentan estudios sobre la síntesis de TAG en el retículo endoplásmico de las células embrionarias de las semillas de maíz en desarrollo, los cuales indican que demanda de ácidos grasos para este proceso regulan de alguna manera la velocidad con la que se sintetizan estos precursores

### 3 Antecedentes

#### 3.1 Importancia y aspectos nutricionales de los lípidos

La mayor parte del peso seco de la dieta de los seres humanos suele estar formado por tres grandes grupos de compuestos orgánicos: glúcidos, triacilglicéridos y proteínas. La función de las proteínas en la dieta es ser fuente de aminoácidos, los cuales son usados para fines energéticos, síntesis de las proteínas del organismo y como precursores de muchos compuestos no proteínicos vitales. Los glúcidos o hidratos de carbono son fuente de monosacáridos, en especial de glucosa que es el principal sustrato energético y la principal fuente de carbono para los organismos animales. Por otro lado, los triacilglicéridos (TAG) son fuente de ácidos grasos, sustrato de elevado aporte energético (9 kcal/g)

Como nutrimentos, los ácidos grasos (AGs) son ácidos monoicos de cadena larga, en su mayoría sin ramificaciones e incluyen cadenas tanto saturadas como insaturadas. Los AGs saturados que más abundan en los alimentos son doce, y presentan longitudes de cadena de hasta 24 carbonos; estos realizan un aporte fundamentalmente energético y son dispensables en la dieta del humano puesto que las células animales pueden sintetizarlos a partir de acetyl-CoA.

Los AGs insaturados comprenden moléculas que cuentan con una doble ligadura y otras que pueden tener hasta cinco de ellas; de entre estos los eicosanoides son especialmente importantes para la nutrición humana (derivados de AGs de más de 20 carbonos), que tienen una doble ligadura en posición 6 contando desde el final (familia  $n - 6$  u  $\omega - 6$ ) y los octadecenoicos insaturados en la posición 3 contando también desde el final (familia  $n - 3$  u  $\omega - 3$ ). Esto es debido a que las células humanas sólo poseen desaturasas específicas para las posiciones 9 y 12 de la cadena hidrocarbonada y, por lo

tanto, requieren obtener los ácidos linoléico (familia n-6) y linolénico (familia n-3) a través de la dieta. Cabe mencionar que los alimentos vegetales y los pescados son las principales fuentes de los AGs n-3, reiteremos pues, que en nuestro país, una fuente importante de estos nutrimentos es el aceite de maíz (Hansen, 1994)

El maíz es el cereal de mayor consumo en nuestro país. En general, cada 100 gramos aportan casi 400 kilocalorías, ocho a diez gramos de proteína, 70 a 80 gramos de hidratos de carbono (almidón) y, además, cinco gramos de aceite rico en ácidos grasos polinsaturados (Bourges, 1997). Su demanda supera en México los 15 millones de toneladas anuales (según cifras de 1993 INEGI, 1994) y su valor dentro de la dieta del pueblo mexicano se manifiesta a través de la existencia de cientos de platillos diferentes elaborados a base de maíz. Su valor cultural es pues enorme, al grado de ser objeto de veneración dentro de las tradiciones de los pueblos mesoamericanos prehispánicos, muchas de las cuales han trascendido hasta nuestros días.

### 3.1.1 Producción y consumo de grasas y aceites en México

La OMS realizó un estudio estadístico (Perissé, 1973) en el cual se encontró que la composición de la dieta media de los países se asocia consistentemente con el ingreso *per capita* del país. Conforme la renta *per cápita* aumenta, disminuye la proporción de glúcidos en la dieta, aumenta un poco la de proteínas y se eleva dramáticamente la de TAG, con el consecuente aumento en la densidad energética de la dieta (Tabla 1). Estos estudios revelan que en los países con mayor ingreso los TAG de mayor consumo son los de origen animal y sobre todo los agregados durante la preparación de los alimentos. Mientras que en los países con menor ingreso los TAG consumidos son los contenidos en los alimentos vegetales.

Tabla 1. Proporciones de glúcidos, proteínas y Triacilglicéridos en la dieta media de diferentes países según el ingreso *per cápita*

Países	PROPORCIONES						Densidad energética (kcal/g) de la dieta en base seca
	con respecto al peso seco (g/100g)			con respecto al aporte energético (Kcal/100 kcal)			
	G <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	TAG <sup>c</sup>	G <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>	TAG <sup>c</sup>	
con ingreso menor	83.3	12.5	4.2	80	12	8	4.16
con ingreso medio	73.0	14.0	13.0	63	12	25	4.50
con ingreso mayor	56.0	16.0	27.0	43	12	45	5.40

<sup>a</sup>glúcidos, <sup>b</sup>Proteínas, <sup>c</sup>Triacilglicéridos

Fuente Adaptado de Perissé, 1973.

Debido a que los aceites de origen vegetal poseen niveles apreciables de AGs polinsaturados, su consumo es recomendable como medida para reducir la ingesta de AGs saturados los cuales son señalados con un factor que favorece el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como la arteriosclerosis. Se ha propuesto que lo anterior es debido, al menos en parte, a que la principal fuente de AGs saturados son las grasas de origen animal, en las cuales se encuentra como acompañante el colesterol (Bruce y Tall, 1998). En las tablas 2 y 3 se muestran los datos referentes a la producción y venta de grasas comestibles en México (datos referentes a 1993), en ellas podemos apreciar que la fabricación de aceites y grasas comestibles de origen vegetal representa el 97.3 % del total de toneladas producidas por la industria aceitera. En ese mismo periodo se tiene que sólo el 2.29 % del comercio total de aceites y grasas comestibles corresponde a productos de origen animal.

Tabla 2 Fabricación de aceites y grasas vegetales comestibles. Datos referentes a 1993

Producto elaborado	Producción		Ventas	
	Cantidad(TONS)	Miles de pesos	Cantidad(TONS)	Miles de pesos
total	1 162 170	3 442 433 5	1 167 688	3 519 728 1
<b>Aceites refinados</b>				
Ajonjolí	691	2 324.7	858	2 683 1
Cártamo	72 459	226 001 2	88 466	307 069 8
Girasol	220 962	619 344 5	223 812	639 363.0
<b>Maíz</b>	<b>26 565</b>	<b>63 002.2</b>	<b>24 982</b>	<b>80 627.9</b>
Olivo	1 151	6 388.3	1 036	6 341 8
Algodón	6 716	15 947.1	9 748	21 842 5
Soya	305 640	513 983.7	293 515	526 401.6
Canola	105 159	315 079.6	103 576	318 308.5
Otros	----	591 463.8	----	504 007.2
Coco	23 650	52 290 1	24 681	53 781 2
Otras oleaginosas	----	36 005.9	----	37 450.5
<b>Grasas vegetales (a partir de aceites procesados)</b>				
Grasa o manteca	350 346	780 813.3	343 101	788 495 0
Margarina	48 831	219 789 1	53 913	233 392.0

XIV Censo industrial. Industrias manufactureras, productos y materias primas, Subsector 31, productos alimenticios, bebidas y tabaco, censos económicos. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA (INEGI), 1994.

De las grasas utilizadas por el ser humano para su consumo, el consumo animal y la producción de alimentos procesados, el 75 % está constituido por aceites de origen vegetal siendo las semillas la fuente más importante de estos aceites. De modo que el estudio de la síntesis de lípidos de reserva en las semillas posee una gran importancia para el ser humano. Como se mencionó con anterioridad, los países con ingreso *per cápita* alto consumen cantidades apreciables de TAG añadidos al momento de la preparación de alimentos, así que es posible estimar que el desarrollo económico de nuestro país estará

asociado a una mayor demanda de aceites vegetales. Para satisfacer dicha demanda será necesario incrementar la cantidad de los aceites obtenidos a partir de las semillas, pero sobre todo, será también necesario mejorar su calidad si queremos aspirar a una población mejor alimentada sin atentar contra su estado de salud.

Tabla 3 Fabricación de grasas y aceites animales comestibles. Datos referentes a 1993

Producto elaborado	Producción		Ventas	
	Cantidad(TONS)	Miles de pesos	Cantidad(TONS)	Miles de pesos
total	32 349.7	80 786.6	30 718.1	78 930.8
Grasas animales				
Aves	1 550.8	1 267.1	1 500.2	1 114.4
Bovino	9 761.0	11 503.5	8 924.0	11 196.6
Porcino	20 695.0	41 622.3	19 951.0	41 277.1
Otros	----	26 085.1	----	25 034.1
Aceites animales				
De pescado	342.9	308.6	342.9	308.6

XIV Censo industrial. Industrias manufactureras, productos y materias primas, Subsector 31, productos alimenticios, bebidas y tabaco. censos económicos, INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA, GEOGRAFÍA E INFORMÁTICA (INEGI), 1994

Hoy en día se han desarrollado técnicas que permiten la manipulación genética de tejidos vegetales y que abren la puerta al mejoramiento de la calidad y la cantidad de compuestos de interés para la humanidad. Para que dichas modificaciones tengan el éxito esperado se requiere de un profundo conocimiento de los procesos involucrados en la síntesis y regulación de dichos compuestos. Sin embargo, en el caso de los lípidos se desconocen muchos aspectos de los procesos de regulación involucrados en su metabolismo, por lo que es necesario invertir un mayor esfuerzo en la investigación de los fenómenos bioquímicos involucrados.

### 3.2 Estructuras de la semilla y del embrión de maíz

Los productos agrícolas conocidos como cereales pertenecen a la familia de las gramíneas. Son frutos secos con una sola semilla, este tipo de fruto es una cariósida que se denomina grano. La cariósida del maíz se desarrolla a partir de un óvulo y, en la madurez consta de las siguientes partes (Fig. 3.1): el esporófito joven y parcialmente desarrollado llamado embrión o germen, un compartimento que rodea casi por completo al embrión llamado endospermo y las capas protectoras, cubiertas de la semilla o testa, que derivan de los tegumentos y junto con la epidermis nucelar constituyen el pericarpio. Debido a que contienen las reservas nutritivas y la maquinaria metabólica necesaria para dar origen a una nueva planta, las semillas constituyen el medio de dispersión y perpetuación de la mayoría de los vegetales superiores.

El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo. De manera general el eje embrionario está constituido por el hipocotilo, la radícula y la plúmula o epicotilo. El endospermo está formado por dos tipos de células: las que contienen almidón (endospermo almidonoso) y la capa de células de la aleurona, que envuelve a las primeras (Hoseney, 1991).

Las diferentes estructuras de la semilla cumplen funciones específicas, la cubierta de la semilla ayuda a proteger la integridad física del grano, así como también representa una barrera de protección contra organismos patógenos. La función del endospermo es suministrar de nutrimentos al embrión durante el proceso de germinación y se compone principalmente de almidón (aproximadamente 90%), proteínas de reserva (7%) y una pequeña cantidad de lípidos y minerales.

Por su parte, el escutelo de maíz es un tejido que almacena proteínas (9 %) y lípidos (31 %) (Bewley y Black, 1994) durante la maduración de la semilla, es la fuente inicial de las enzimas que hidrolizan las reservas del endospermo al comenzar la germinación y constituye una región que conecta al endospermo con el eje embrionario. Finalmente, el eje embrionario está constituido por los tejidos que darán origen a una planta completa

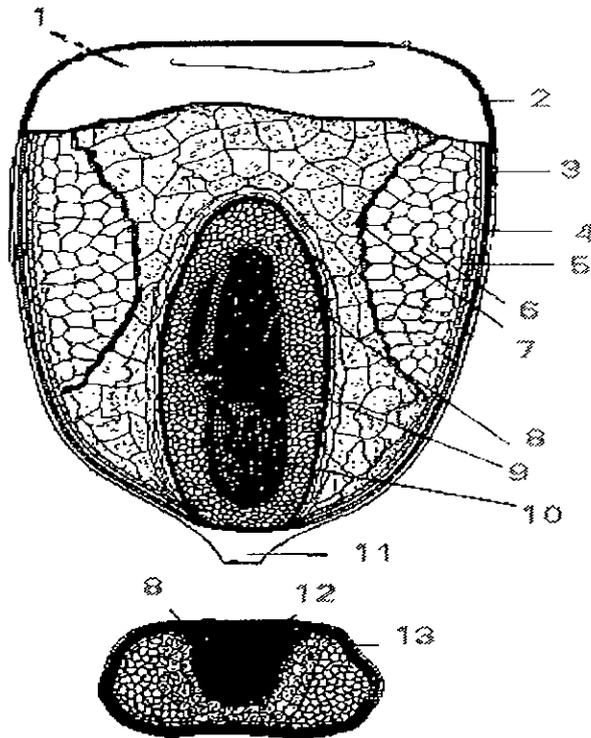


Figura 3 1: Cortes longitudinal y transversal de un grano de maíz. las estructuras indicadas son 1) Cubierta externa; 2) Epidermis; 3) mesocarpio; 4) Testa; 5) Aleurona; 6) Endospermo córneo; 7) Endospermo farináceo; 8) Escutelo, 9) Plúmula; 10) Radícula; 11) Pedicelo, 12) Eje embrionario; 13) pericarpio (Tomado de Hoseney, 1991)

### 3.3 Desarrollo de las semillas

En términos generales, el desarrollo de las semillas ortodoxas, como los cereales, se puede dividir en tres etapas confluentes: histodiferenciación, expansión celular o fase de llenado del grano y desecación. Durante la primera etapa el cigoto experimenta una serie de divisiones mitóticas y una diferenciación celular para formar los diferentes tejidos que constituirán al embrión y a los tejidos accesorios (Bewley y Black, 1994, Sheridan y Clark, 1994). Al mismo tiempo, el tejido que formará al endospermo inicia la acumulación de almidón y da origen a la capa de aleurona. La segunda fase se caracteriza por un aumento en el tamaño de las células y por una intensa actividad metabólica de acumulación de compuestos de reserva en los tejidos de almacenamiento. La última etapa es la desecación de la semilla, la cuál está acoplada a la acumulación de proteínas especializadas y carbohidratos que confieren estabilidad a las estructuras celulares, preparándolas para sobrevivir a un largo periodo de quiescencia o de latencia. Esta última fase se induce al disminuir paulatinamente el suministro de agua y nutrientes a través del funículo, que es el tejido que conecta a la semilla con la planta madre.

#### 3.3.1 Fase de histodiferenciación

En el maíz, la histodiferenciación se inicia a partir de la fertilización de la ovocélula, lo cual da origen al cigoto y a una célula triploide de la cuál se desarrollará el tejido del endospermo. Después de la formación del cigoto, se da la primera división del cigoto, la cuál es asimétrica y transversal, lo que produce una célula apical pequeña y una célula basal grande. El embrión se forma a partir de la célula apical, la cual experimenta una serie de divisiones asimétricas que preceden a una división longitudinal. Aproximadamente a los

siete días después de la fertilización se forma el protodermo, el cual rodea al embrión en forma discontinua. Dos días después se observan los primeros signos de diferenciación del embrión (una zona de células con citoplasma denso en uno de sus extremos). Esta región se diferencia posteriormente en un grupo de células que representan la localización futura de los ápices del tallo y raíz.

El endospermo se origina por las divisiones mitóticas del núcleo endospermico, creado por la fusión de un núcleo espermático y los dos núcleos polares, durante la primera etapa del desarrollo del endospermo se produce un sincitio mediante una serie de divisiones nucleares rápidas en la ausencia de citocinesis. En una segunda etapa, se forman las paredes celulares que separan los núcleos individuales, para que posteriormente las células experimenten una serie de divisiones mitóticas, mismas que cesan al tiempo que se inicia la acumulación de reservas.

La sacarosa es la fuente de carbono empleada por las células de las semillas en desarrollo para sintetizar los compuestos de reserva. Esta proviene de los tejidos fotosintéticamente activos y es transportada desde los tejidos vegetativos hacia la semilla por el floema. Los nutrientes que se transfieren a la semilla son descargados en las terminales del floema localizadas en la base del grano (pedicelo). En el apoplasto del pedicelo de la base del grano de maíz, se localiza la enzima invertasa, que hidroliza la sacarosa a glucosa y fructuosa, las cuales son captadas activamente por las células externas del endospermo y reconvertidas en sacarosa antes de ser utilizadas en la generación de energía, en la síntesis de almidón, en otras vías anabólicas y para exportar nutrientes a las células más interiores de la semilla.

### 3.4 Acumulación de reservas.

Este proceso se presenta durante la fase intermedia del desarrollo de la semilla en la cual se presenta una actividad anabólica muy intensa, que tiene por finalidad proveer los diferentes tipos de reservas, que serán degradadas durante las etapas tempranas de la germinación para proporcionar las fuentes de carbono, nitrógeno y energía a la plántula antes de que esta inicie su crecimiento autotrófico (Black, 1991).

El almidón se sintetiza en el interior del organelo llamado amiloplasto (organelo similar al cloroplasto, pero no fotosintético) y, en el caso de los cereales, esto ocurre principalmente en las células del endospermo, mismo que representa del 65 al 75% del peso seco de la semilla madura

En casi todos los cereales la mayor parte de la sacarosa importada es convertida en almidón. sólo una cantidad muy reducida se transforma en lípidos y proteínas. Además de acumular almidón, la semilla de maíz, contiene cantidades importantes de triglicéridos (5%) y proteínas de reserva (Murphy, *et al*, 1993).

Las principales proteínas de reserva que se depositan en la semilla de maíz son las prolaminas (zeinas) en el endospermo y las globulinas en el embrión. Las globulinas se almacenan principalmente en cuerpos proteicos que se originan a partir de la vacuola y son transportados hasta este destino en vesículas osmodensas lisas o de vesículas cubiertas de clatrina. Las prolaminas, en cambio, se almacenan en cuerpos proteicos cuya cubierta tiene su origen en el retículo endoplásmico. La síntesis de proteínas de reserva está fuertemente regulada en términos de la especificidad del tejido, del desarrollo de la semilla y de la disponibilidad de nitrógeno, azufre y fosfatos (Shewry, 1995)

Por otro lado, los principales lípidos que se almacenan en las semillas son los triglicéridos (TAG), los cuales están constituidos de un esqueleto de glicerol con ácidos grasos esterificando sus tres posiciones (figura 3.2). Los TAG y las ceras son completamente hidrofóbicos y pueden ser almacenados en grandes cantidades como cuerpos lipídicos libres de agua dentro de la célula.

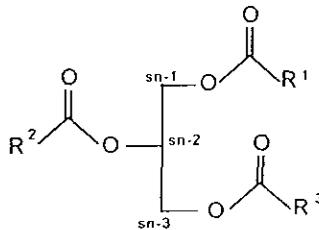


Figura 3.2 . Estructura del triacilglicerol. R es la cadena carbonada del ácido graso en donde "R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>" pueden ser idénticas o diferentes (Tomado de Stryer, 1990) .

Los lípidos se acumulan en tejidos como los cotiledones (lino colza, girasol), el endospermo (ricino) y en el escutelo (maíz, trigo y cebada). En el caso de la semilla de maíz se encuentra también una pequeña proporción de lípidos en el eje embrionario y en la *capa de aleurona*, que rodea al endospermo. A diferencia de los glicerolípidos de membrana, los TAG no tienen una función estructural, sino que son una forma de reserva de carbono y energía

### 3.4.1 Papel del ácido abscísico y del potencial osmótico en la acumulación de reservas

El ABA (ácido [R-(Z,E)]-(+)-5-(1-hidroxi-2,6,6-trimetil-4-oxo-2-ciclohexen-1-il)-3-metil-2,4-pentadienoico) es una molécula con una estructura semejante a la porción terminal de los carotenos (figura 3.3), se encuentra en la naturaleza como la forma (+)-*cis,trans*-ABA, también llamado (*S*)-ABA y fue identificado inicialmente como un factor relacionado con la abscisión de las hojas. Actualmente, se ha encontrado que regula una amplia variedad de procesos fisiológicos que afectan el desarrollo de las plantas. Estos procesos incluyen la maduración de las semillas, la germinación y la respuesta de los tejidos vegetales al estrés osmótico (Zeevart y Creelman, 1988). En las semillas inmaduras, el ABA se encuentra en cantidades apreciables en los tejidos de almacenamiento, tales como el embrión y endospermo del maíz (Jones, *et al*, 1987).

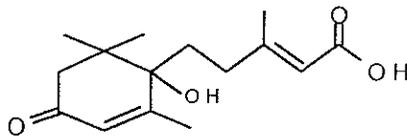


Figura 3.3. Estructura química del fitoregulator ácido abscísico

Paralelamente, la acumulación de solutos en el interior de las células provoca diferencias de potencial químico entre los tejidos, ya que los solutos se difunden en respuesta a diferencias en el potencial químico del soluto, en tanto que el agua se difunde en respuesta a diferencias en el potencial hídrico. El proceso es espontáneo, se libera energía libre hacia los alrededores del sistema y la energía libre del sistema disminuye

Esta energía liberada tiene la capacidad de producir trabajo, como causar el ascenso osmótico del agua en los tallos, fenómeno conocido como presión radical

El potencial hídrico ( $\psi$ ) es el potencial químico del agua en un sistema o parte de un sistema comparado con el potencial químico del agua pura a la presión atmosférica y a las mismas temperatura y altura, expresado en unidades de presión. Al potencial hídrico del agua pura por convención se le ha asignado el valor de cero, de modo que el potencial hídrico de cualquier disolución será negativo y será más negativo, a medida que aumente la concentración de solutos. Esta definición puede expresarse mediante la relación:

$$\psi = (\mu_w - \mu_w^*) / V_w$$

donde .

$\psi$  = potencial hídrico

$\mu_w$  = potencial químico del agua en el sistema considerado

$\mu_w^*$  = potencial químico del agua pura a la presión atmosférica y a la misma temperatura que el sistema considerado.

$V_w$  = Volumen molar parcial del agua (18 cm<sup>3</sup>/mol)

El potencial hídrico puede descomponerse en: uno, el potencial de presión, causado por el incremento en la presión y que es igual a la presión hidrostática real en la parte del sistema que se considera y dos, el potencial osmótico (también llamado potencial de soluto) causado por la presencia de moléculas de soluto (Salisbury y Ross, 1992) .

Así, un componente importante del ambiente que rodea al embrión durante su desarrollo es la disponibilidad de agua, se sabe que el endospermo líquido en el cual se

encuentran los embriones tiene potenciales osmóticos muy negativos (Finkelstein y Somerville, 1989) .

El ambiente del óvulo restringe la germinación y promueve la acumulación de compuestos de reserva en el embrión en desarrollo, ya que contiene una serie de factores o señales que regulan el desarrollo, teniendo efecto sobre la embriogénesis de manera conjunta. Se cuenta con suficiente evidencia que señala que el ácido abscísico (ABA) y el potencial osmótico negativo regulan un importante número de procesos vinculados al desarrollo de los embriones. Entre los fenómenos que se han reportado como regulados por estos factores está la expresión de las proteínas de reserva de diversas semillas y en varios casos sabe que estos factores regulan estos fenómenos a nivel de la expresión de los genes correspondientes. Cuando los embriones inmaduros son aislados e incubados en medios artificiales, su maduración sólo prosigue si están presentes el ABA o un soluto no metabolizable que genere un potencial osmótico muy negativo (Finkelstein y Somerville, 1989; Rodríguez-Sotres y Black, 1994; Pacheco-Moises, *et al*, 1997)

### 3.5 Metabolismo de lípidos de reserva durante el llenado del grano.

El proceso de acumulación de lípidos de reserva en las semillas en desarrollo se puede dividir en dos grandes etapas: 1) la síntesis de ácidos grasos y 2) la esterificación del esqueleto de glicerol-3-fosfato (glicerol-3-P) con los ácidos grasos de los acil-CoA para producir finalmente el triacilglicerol (Andrews y Ohlrogge, 1990; Bewley y Black, 1994)

La biosíntesis de los ácidos grasos ocurre en los plástidos a partir de acetil-CoA, el cual proviene a su vez de la degradación glucolítica de la sacarosa importada hasta la semilla desde los tejidos fotosintéticos. Después, la esterificación del glicerol-3-P con ácidos grasos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (RE); un componente esencial de

esta vía es el glicerol-3-P, el cuál puede provenir de la oxidoreducción de la dihidroxiacetona fosfato por una NAD<sup>+</sup>:glicerol-3 fosfato deshidrogenasa, o bien de la dihidroxiacetona a partir de la acción de las siguientes enzimas: triosa-fosfato isomerasa, gliceraldehido fosfato-fosfatasa, gliceraldehido reductasa y glicerol cinasa. Pero no se tienen evidencia de cual es la vía que tiene lugar *in vivo* o si ambas participan en la producción de este precursor (Miquel y Browsed, 1995).

### 3.5.1 Biosíntesis de ácidos grasos.

Los componentes esenciales de la síntesis *de novo* de AGs son la enzima acetil-CoA carboxilasa ACCasa (que cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA), las transacilasas, la ácido graso sintetasa (*fatty acid synthase*, FAS) y las tioesterasas. Existen dos formas de ACCasa, una homodimérica >200 kDa (probablemente localizada en el citosol) y una heteromérica del plástido (Konishi, *et al*, 1996); ésta última es la que proporciona malonil-CoA para la FAS ya que algunas semillas en desarrollo no expresan la isoenzima ACCasa citoplásmica, a pesar de poseer una síntesis de lípidos muy activa. La estructura de ACCasa en la gramíneas es diferente; en estas especies no se presenta la forma heteromérica de ACCasa y en su lugar tienen dos tipos de la enzima homodimérica, una forma sensible a los herbicidas fluazifop y sethoxydim, localizada en plástidos y una forma resistente extraplástidial (Sasaki, *et al*, 1995).

En las plantas el complejo enzimático de la FAS que se presenta es la FAS tipo II, esta constituida por varias subunidades polipeptídicas disociables, es responsable de la síntesis de ácidos grasos saturados de hasta 18 carbonos y está localizada en los plástidos y leucoplastos. El proceso de biosíntesis de ácidos grasos (AGs) se efectúa mediante la

elongación de un tioéster entre el acilo a ser elongado (inicialmente acetato) y una proteína transportadora de grupos acilos (*acyl carrier protein*, ACP) La formación del tioéster ocurre en las etapas iniciales y es esencial para que la elongación pueda ocurrir; de hecho, la hidrólisis del tioéster por las tioesterasas marca el final del proceso de elongación

La elongación es un proceso cíclico (fig 3.4) que consta de un condensación seguida de una reducción, una de deshidratación y una segunda reducción que dan como resultado una cadena de  $n + 2$  carbonos, en donde  $n$  es siempre un número par.

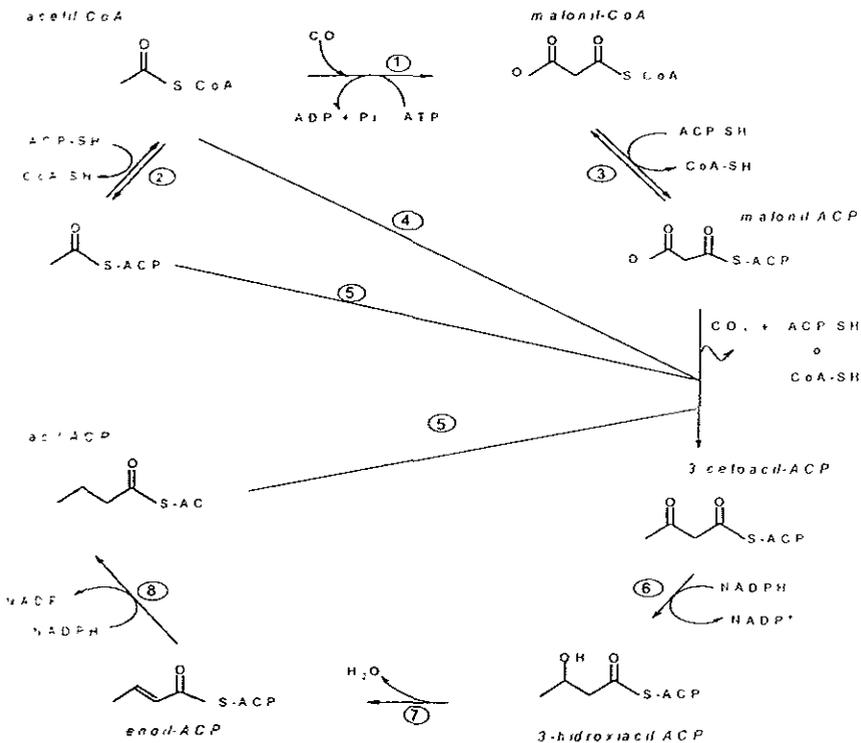


Figura 3.4. Ruta de la biosíntesis de ácidos grasos en plantas. Los nombres de las enzimas que catalizan las reacciones indicadas son: 1. acetil-CoA carboxilasa; 2. Acetil-CoA:ACP transacilasa; 3. malonil-CoA:ACP transacilasa; 4. 3-cetoacil-ACP sintetasa III; 5. 3-cetoacil-ACP sintetasa Y; 6. 3-cetoacil-ACP reductasa; 7. 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa; 8. Enoil-ACP reductasa ( Tomado de Jaworski, *et al* , 1993).

El proceso se inicia con la condensación de malonil-ACP y acetil-CoA (fig 3.4, reacción 4) catalizada por la enzima 3-cetoacil-ACP sintasa III (KAS III) (Jaworski, *et al*, 1993) que es virtualmente insensible al antibiótico Cerulenina (*2S,3R*)-2,3-epoxi-4-oxo-7,10-dodecadienonamida; (Clough *et al*, 1992; Tai y Jaworski 1993, Schuch, *et al* 1994) La Cerulenina (fig. 3.6) es una micotoxina producida por el hongo *Cephalosporium caerulescens* y es un potente inhibidor de la síntesis de AGs (Omura, 1981; Golz *et al*, 1994) ya que modifica irreversiblemente el residuo de cisteína del sitio activo de las KAS I y II (véase más adelante) (Child y Shoolingin, 1998).

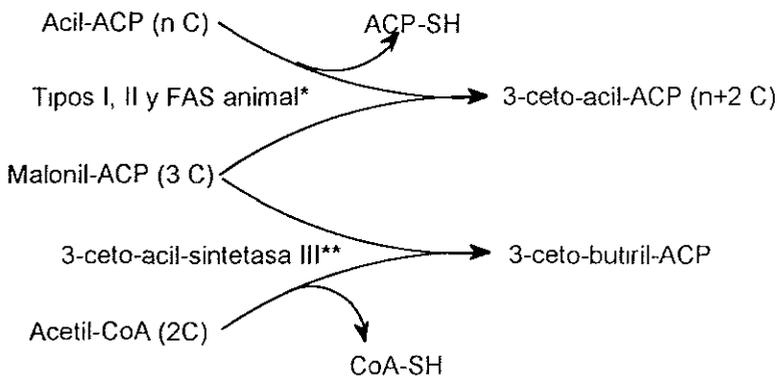


Figura 3.5 Reacciones catalizadas por las 3-cetoacil sintetizas (KAS). ACP, proteína acarreadora de grupos acilo; CoA, coenzima A. \* La KAS tipo I puede elongar acilos de 4 a 14 carbonos, la KAS II puede elongar acilos de 14 a 18 carbonos y la KAS del polipeptido multifuncional ácido graso sintetasa animal puede elongar acilos de 2 a 16 carbonos. \*\*La KAS III cataliza esencialmente la condensación inicial de acetato con malonato (Tai y Jaworski, 1993).

El paso de condensación inicial catalizado por la KAS III es esencial en las plantas, ya que estos organismos poseen una actividad muy baja de la enzima acetil-CoA ACP transacilasa (Clough, *et al*. 1992; Schuch, *et al* 1994) y se ha demostrado que el cebador de la ACP con acetato no es el principal intermediario en la reacción de FAS (Jaworski, *et al*

1993) de modo que empleando acetil-CoA como donador, la condensación inicial resultaría limitante en ausencia de la KAS III

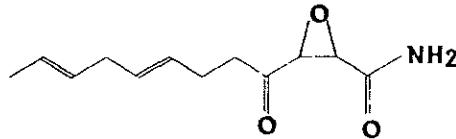


Figura 3.6 Estructura química la Cerulenina. Inhibidor de las enzimas condensantes tipo I y II (tomado de Omura 1981)

También, se ha reportado la existencia de otras dos isoformas de 3-cetoacil-ACP sintetasa (Shimakata y Stumpf, 1982), la KAS I y la KAS II que condensan malonil-ACP y acil-ACP de 4 a 14 carbonos y de 14 a 18 carbonos respectivamente. Dichas isoformas son sensibles a la Cerulenina con una  $I_{50}$  del orden de  $2 \mu\text{M}$  para KAS I y  $50 \mu\text{M}$  para KAS II. La KAS III se distingue de estas dos últimas formas por poseer la habilidad de usar como sustrato acetil-CoA en lugar de acetil-ACP, por tener actividad de transacilasa (fig. 3.4, reacción 2) y por ser insensible a la Cerulenina, como ya se mencionó. El producto inicial de cada reacción de condensación es un 3-cetoacil-ACP y en seguida ocurren tres reacciones (fig. 3.4) para formar una cadena saturada.

a) el 3-cetoacil-ACP es reducido en el grupo carbonilo por la 3-cetoacil-ACP reductasa (fig. 3.4 reacción 6), la cual usa NADPH como donador de electrones, b) la deshidratación del 3-hidroxiacil-ACP por la 3-hidroxiacil deshidratasa (fig. 3.4, reacción 7) c) cada ciclo es completado por la Enoil-ACP (fig. 3.4, reacción 8) reductasa que usa NADH o NADPH (Andrews y Ohlrogge, 1990) para reducir el doble enlace *trans*-2 y formar la cadena carbonada saturada.

El producto final de la FAS son usualmente 16:0 y 18:0-ACP y la reacción de FAS es terminada por hidrólisis o por transferencia de las cadenas acil del ACP. Así, la composición final de los ácidos grasos presentes en los lípidos de una célula está determinada por la actividad de las tioesterasas y de otras varias enzimas que emplean a estos acil-ACP en la fase terminal de la síntesis (fig. 3.7)

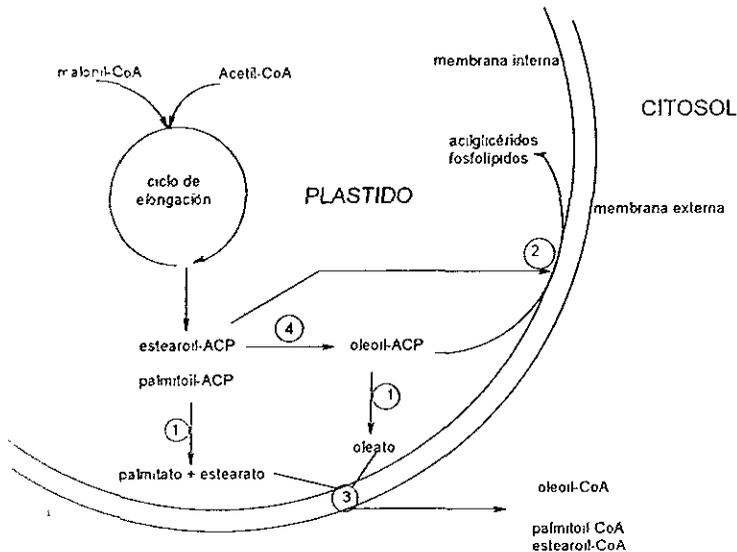


Figura 3.7 Reacciones que consumen acil-ACP en el interior del plástido. Las actividades enzimáticas que se indican con los números son: 1) acil-ACP tioesterasas, 2) acil-ACP transferasas plastidiales, 3) acil-CoA sintetasa, 4) estearoil-ACP desaturasa. ACP: proteína transportadora de grupos acilos; CoA: coenzima A (Elaborado a partir de la información obtenida de Roughan y Slack, 1982; Andrews y Ohlrogge, 1990; Bewley y Black, 1994)

Las tioesterasas son enzimas que generan ácidos grasos libres (fig. 3.7) a partir de los acil-ACP y poseen una marcada especificidad. La generación de estos ácidos grasos libres es un prerrequisito indispensable para que los ácidos grasos puedan ser exportados fuera del plástido y sean entonces empleados para la síntesis de diversos lípidos en otros

compartimentos intracelulares y extracelulares (Roughan y Slack, 1982) En algunas especies las ,tioesterasas específicas para acil-ACPs de cadena corta terminan prematuramente la síntesis y regulan así la longitud de las cadenas incorporadas a los lípidos (Dörmann, *et al* 1993; Dörmann, *et al* 1995). Esto se propone, ya que se ha demostrado que es posible alterar la composición de los productos de la síntesis de los ácidos grasos cuando se transforma genéticamente un organismo vegetal con un gene para una tioesterasa que posea una especificidad distinta de aquellas presentes en la planta silvestre (Eccleston y Ohlrogge, 1998). Por otra parte, en los plástidos vegetales se encuentra una estearoil-ACP desaturasa que modifica los acil-ACP por inserción de un doble enlace *cis* en la posición 9 del 18:0-ACP. Los diferentes acil-ACP generados pueden ser empleados por la aciltransferasas de la membrana interna del plástido, para la síntesis de diversos acilglicéridos y fosfolípidos requeridos por este organelo. De manera que la proporción de cada especie de acilo disponible para la exportación está determina por la competencia entre todas estas enzimas.

### 3.5 2 Biosíntesis de triacilglicéridos

Los ácidos grasos liberados por el proceso que se describió anteriormente salen del plástido probablemente en forma de acil-CoA. Se ha demostrado que la membrana externa del cloroplasto posee una actividad de acil-CoA sintetasa. Los acil-CoA pueden entonces ser empleados por la llamada ruta eucariótica de síntesis de acilglicéridos o vía de Kennedy (fig 3 8).

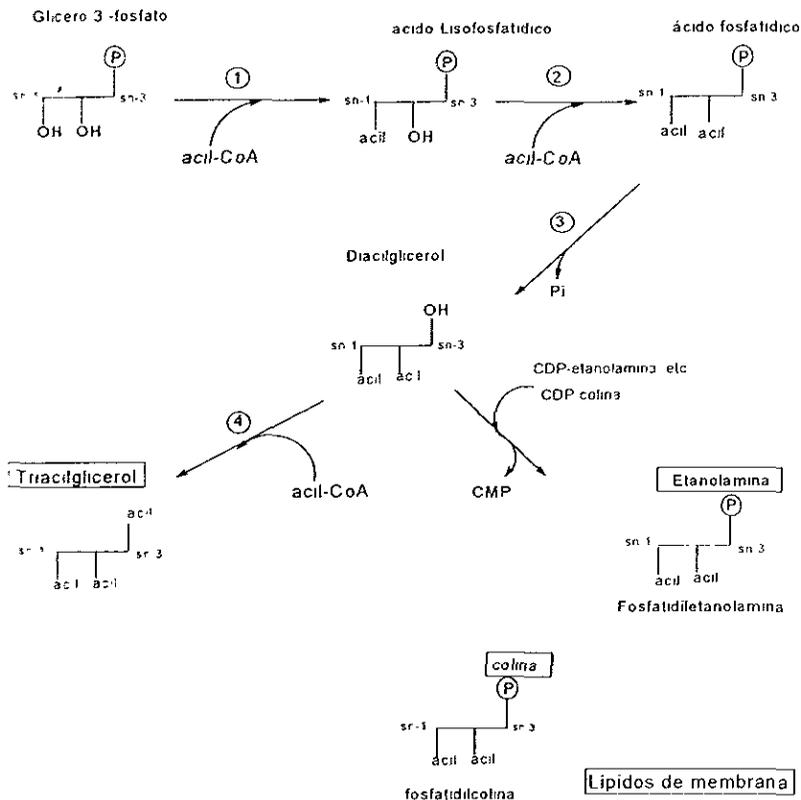


Figura 3.8. Ruta de la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos. Los nombres de las enzimas que catalizan las reacciones indicadas son 1. Glicerol 3-fosfato aciltransferasa; 2. Lisofosfatidato aciltransferasa; 3. Fosfatidato fosfatasa, 4. Diacilglicerol aciltransferasa (Tomado de Stymne, 1993)

La síntesis de triacilglicéridos (TAG) que se realiza enteramente en el retículo endoplásmico, se inicia con la incorporación secuencial de los AGs de los acil-CoA a las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol-3-fosfato para formar ácido fosfatídico. Estas reacciones son catalizadas por la glicerol-3 fosfato aciltransferasa (G3P-AT) y la lisofosfatidato aciltransferasa (LPA-AT) que dan lugar a la formación de ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA), respectivamente. El PA es convertido a diacilglicérido por una fosfatidato

fosfatasa y un tercer ácido graso es transferido a la posición *sn*-3 por la enzima diacilglicerol-açiltransferasa (DAG-AT) para formar el TAG. En las semillas, los TAG que se han sintetizado se acumulan en organelos subcelulares denominados cuerpos lipídicos (fig 3.9) los cuales están formados por una matriz de TAG rodeada por una monocapa de fosfolípidos en la que se encuentran embebidas las proteínas típicas de estos organelos, llamadas oleosinas.

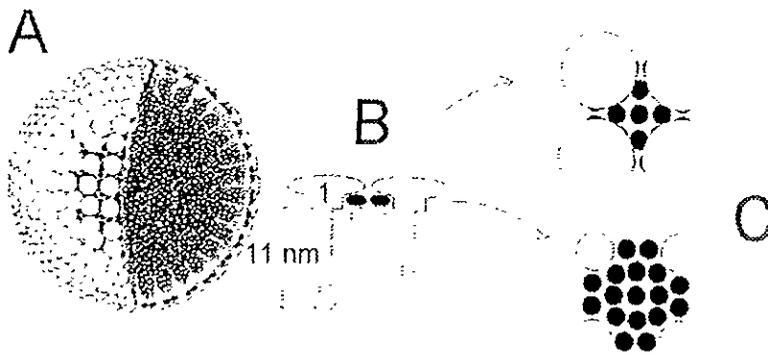


Figura 3.9 A) Modelo del cuerpo lipídico del maíz. Este dibujo muestra un corte en el que se observa la matriz de triacilglicerol rodeada por una monocapa de fosfolípidos. Las oleosinas se encuentran en contacto con los fosfolípidos y se insertan en la matriz de triacilglicerol B) corte superficial en el que se muestran dos moléculas de oleosinas y dos moléculas de fosfolípidos. Las oleosinas (1) están representadas como un tallo de 11 nm que corresponde al dominio hidrofóbico central, unido a una estructura globular anfipática, que corresponde a los segmentos amino y carboxilo terminal de la proteína. Los fosfolípidos están representados como óvalos unidos a dos líneas, C) vista superficial de una unidad estructural constituida por 13 moléculas de fosfolípidos y una de oleosina. Para indicar claramente la unidad estructural, se muestran 3 moléculas de oleosinas adyacentes y 4 de fosfolípidos. La figura superior es la vista superficial arriba del glóbulo de oleosina y la figura inferior es la vista desde el nivel del grupo polar de los fosfolípidos (Modificado de Huang, 1993)

### 3 5 3 Regulación del proceso de acumulación de lípidos.

Todas las células de las plantas poseen la capacidad de sintetizar ácidos grasos a partir de acetil-CoA por medio de una ruta común localizada en las plástidos. La bioquímica de esta ruta es poco conocida y se ignora el como se controla el nivel de los diferentes tipos de lípidos producidos en los diferentes tejidos (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Además, no es claro cuales son las reacciones responsables de proporcionar acetil-CoA a la ACCasa, aunque se ha propuesto que el acetato libre puede ser la principal fuente de carbono (Rougham. *et al* 1979), que puede provenir del piruvato metabolizado por la piruvato deshidrogenasa (Lermark y Gardestrom, 1994), o ser generado por la actividad de la citrato liasa (Nelson y Rinne, 1975). Lo que si es claro es que el acetil-coA es un metabolito central para la síntesis de diversas moléculas y es muy probable que las rutas que proporcionan acetil-CoA, así como el origen del mismo, dependen del tejido y del estado de desarrollo. La imposibilidad de las plantas para escapar a los cambios ambientales provocan que estos organismos presenten un metabolismo de gran plasticidad y que responde de acuerdo a las variaciones en su ambiente, pero en función de su estado de desarrollo, de la hora del día y sus posibilidades de crecimiento (Ohlrogge y Jaworski, 1997)

Debido a que la acumulación de reservas sólo se da en la fase intermedia del desarrollo de la semilla, es necesario estudiar el control metabólico que se ejerce en la semilla y que permite en un momento dado disparar o cesar la deposición de biomoléculas. El análisis *in vitro* de las propiedades cinéticas de las enzimas de la vía metabólica, estudios sobre la actividad de una enzima durante el desarrollo y el análisis de la influencia sobre la enzima de los intermediarios de la ruta pueden proporcionar evidencias

adicionales hacia la identificación de puntos de control. Sin embargo, estas estrategias son limitadas porque muestran las propiedades de la proteína y controles a los que la enzima responde *in vitro*, pero no, cual es su participación real en el control del metabolismo *in vivo* (Fersht, 1998) Por otro lado, los sitios de regulación metabólica pueden ser confiablemente identificados por análisis de las propiedades *in vivo* de las enzimas y la determinación de las concentraciones de las pozas. Así, La concentración de sustratos y de productos de cada reacción dan información acerca de las reacciones que están cerca del equilibrio y cuales están alejadas de éste. Un rasgo distintivo de casi todas las enzimas reguladoras es que la reacción que catalizan esta desplazada con respecto al equilibrio termodinámico (Ohlogge y Jaworski, 1997).

Debido a que los niveles *in vivo* de los intermediarios 3-cetoacil-ACPs, enoil-ACPs o 3-hidroxiacil-ACPs no son detectables, se ha sugerido que estas reacciones se aproximan a un estado de equilibrio químico y que *in vivo* las actividades de estas enzimas están en exceso. por lo que no es probable que estas enzimas sean reguladoras. En contraste, las concentración de acetil-ACP es considerablemente más alta que la de malonil-ACP, este resultado sugiere que la reacción de ACCasa, que tiene un equilibrio constante ligeramente favoreciendo la formación de malonil-CoA, está significativamente desplazado del equilibrio y es un candidato para explicar la regulación (Jaworski, *et al* 1993).

A pesar de que la mayor evidencia disponible implica a la ACCasa como el determinante primario de los niveles de la síntesis de ácidos grasos (Eastwell y Stumpf, 1993. Roesler, *et al* 1996; Turnham y Northcote, 1983), varias evidencias sugieren que el control sobre la ruta es ejercido por más de una enzima en la vía y que la contribución relativa de la ACCasa en el control es variable. En cloroplastos incubados en presencia de luz se tienen evidencias de que bajo condiciones de flujo fotónico intenso, la reducción de

la actividad de la ACCasa puede ser más efectiva en limitar la actividad de la FAS, pero un gran incremento en la actividad ACCasa sólo resulta en un pequeño incremento en el flujo global a través de la ruta (Post-Beittenmiller, *et al* 1992; Roesler, *et al* , 1997) Esto sugiere que bajo condiciones de elevada actividad de la ACCasa, las enzimas condensantes (KAS) pueden ser un paso limitante en la actividad de FAS; de hecho, la KAS III ha sido propuesta como sitio de regulación de la síntesis de AGs (Bruck, *et al* 1996), si bien, la transformación de semillas de *Brassica napus* con copias extras de los genes de KAS III de *Escherichia coli* no resultó en una mayor acumulación de triglicéridos en las semillas de estas plantas (Verwoert *et al* 1995) La actividad de las tres isoformas de KAS son aproximadamente iguales lo que sugiere que al incrementarse la actividad de una de ellas, el efecto sería pequeño, debido a que las otras isoformas de KAS serían limitantes

### 3 5 3 1 Regulación por retroalimentación.

La regulación por retroalimentación negativa se caracteriza por que el producto final de la vía metabólica inhibe la actividad de una de las enzimas involucradas en su biosíntesis. En muchos casos, la inhibición ocurre en la enzima que cataliza el primer paso de la vía, ocasionando que la actividad de las enzimas involucradas en las reacciones subsecuentes se vean reducidas porque los sustratos se vuelven limitantes. Por ello, la inhibición por retroalimentación negativa proporciona un mecanismo sencillo de alta velocidad de respuesta para controlar el flujo a través de una ruta metabólica. En levaduras y animales, se considera que el proceso de síntesis de lípidos está debidamente controlada mediante la retroalimentación negativa de los acil-CoAs de cadena larga sobre la ACCasa (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Por ejemplo, en ensayos realizados por Shintaini y Ohlrogge

(1995), la adición de lípidos exógenos a células de tabaco en suspensión resulta en una rápida disminución en la incorporación de [ $^{14}$ C]-acetato en ácidos grasos. Lo que sugiere que las células poseen un mecanismo que les permite percibir la disponibilidad de ácidos grasos y responden con una disminución en la producción de *ново* de estos metabolitos. Además, el análisis de la poza de intermediarios de acil-ACP indica que disminuyen acil-ACPs de cadena larga y no cambian los acil-ACPs de cadena media. Por lo tanto, la regulación parece extenderse, directa o indirectamente a la enzima condensante tipo II, en este sistema.

Considerando que el producto final de la síntesis de ácidos grasos en los plástidos son los acil-ACPs de cadena larga, estos serían los candidatos lógicos para ser los reguladores de la FAS. Pero, en contraposición con las evidencias anteriores, cuando la síntesis es lenta, la poza de acil-ACPs de cadena larga baja significativamente, ésta respuesta es contraria a lo que se esperaría si existiese exclusivamente una regulación por retroalimentación negativa (Roesler, *et al* 1996). Adicionalmente, estudios recientes realizados en bacterias demuestran que estos organismos podría mantener un ciclo continuo de síntesis y degradación de malonil-ACP que se establece entre la ACCasa y la KAS III cuando los intermediarios de la síntesis se acumulan (Heath y Rock, 1995).

Los acil-ACPs pueden jugar un papel muy importante en la regulación de KAS III; por ejemplo, cuando la actividad de KAS III de semillas de *Cuphea* es ensayada con 0.5  $\mu$ M de 10:0-ACP se obtiene un 50% de la inhibición (Bruck, *et al* 1996) y se obtienen resultados similares al ensayar la actividad de esta enzima en homogeneizados de semillas de colza y hojas de espinacas en presencia de 1  $\mu$ M de 10:0-ACP. En todos los casos el máximo de inhibición fue observado con 10:0-ACP. Pero también existen ensayos que sugieren que la

inhibición observada sobre KAS III en los homogeneizados de las plantas es indirecta (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

### 3.5.3.2 Control de abastecimiento de sustrato y cofactores

Otro camino para el control del flujo a través de una ruta metabólica es la regulación en la disponibilidad de sustratos y cofactores. En animales (Goodridge, 1985) y algunas levaduras oleosas (Botham y Ratledge, 1979), es evidente que la acumulación de acetil-coA vía la reacción de la ATP:citrato liasa determina los niveles de FAS y hay sugerencias de que el acetil-CoA disponible no es usualmente limitante de la producción de AGs, si bien no se han obtenido evidencias conclusivas en plantas. Si los niveles de acetil-CoA fueran limitantes en la síntesis, un descenso en los niveles de acetil-CoA sería una consecuencia lógica durante condiciones de intensa producción de AGs lo cual no sucede (Post-Beittenmiller. *et al* 1992). Además, en semillas en desarrollo los niveles de acetil-ACP son tan altos como en las hojas desarrolladas en presencia de luz, estos niveles de acetil-ACP permanecen sin cambios substanciales durante el desarrollo de la semilla a pesar de grandes cambios en los índices de FAS (Post-Beittenmiller. *et al* 1993).

Tentativamente, se concluye que el abastecimiento de carbono no es un límite para la producción de AGs en hojas y semillas de plantas normales. Las evidencias que se tienen sobre el consumo de acetil-CoA en la poza plastidial (Nawrath, *et al* 1994) indican que debe de existir un mecanismo que permita al plástido obtener el acetil-CoA necesario en respuesta a una demanda metabólica adicional.

Como en el caso del sustrato, se consideraría que la disponibilidad de cofactores o de energía bajo ciertas condiciones podrían representar una limitante para la síntesis. La

síntesis de ácidos grasos es una vía metabólica que demanda energía, se requieren 7 moléculas de ATP y 14 de NAD(P)H para ensamblar un ácido graso de 18 carbonos (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Sin embargo la energía usualmente no es limitante en el desarrollo global de la planta. En los cloroplastos, el ATP y el NADPH pueden derivar de la fosforilación y el transporte de electrones; pero, en la obscuridad o en tejidos no verdes, la glucólisis y el ciclo oxidativo de las pentosas-fosfatos puede proporcionar el ATP y energía reductora (Agrawal y Carvin, 1971; Dennis y Miernyk, 1982)

### 3 5 3 3 Control de la cantidad de aceite producido por una semilla

La enzima encargada de sintetizar TAG a partir de DAG y acil-CoAs es la diacilglicerol acil transferasa (DAGAT). Tanto las hojas como las semillas tienen capacidad de sintetizar TAG (Cao y Huang, 1986, Martín y Wilson, 1983), por lo tanto la expresión específica de DAGAT es insuficiente para explicar la diferencia en la acumulación de TAG que existe entre las hojas y las semillas. Esto da pauta a considerar que la síntesis de aceites es controlada por el abastecimiento de ácidos grasos o precursores de ácidos grasos.

Estas evidencias anteriores se contraponen a lo mencionado en el apartado 3 5 3 1 que sugería un control a través de la demanda. Por otro lado, experimentos de expresión de la 12:0-ACP tioesterasa de la baya californiana en semillas de colza (*B. napus*) transgénica indican que cuando se ha producido más cantidad de 12:0 del que puede ser metabolizado a TAG por las aciltransferasas u otras enzimas, el exceso de 12:0 se "corrige" mediante la inducción del catabolismo de AGs. ya que se expresan las enzimas de la  $\beta$ -oxidación y las del ciclo del glioxilato (Ohlrogge y Eccleston, 1996) Este resultado supondría que las tioesterasas son limitantes en el proceso de exportación de los AGs y

supondría que la síntesis de TAG estaría limitada por la disponibilidad de precursores. Sin embargo, las plantas transformantes no acumulan más TAG (Ohlrogge y Eccleston, 1996). Nuestra incapacidad para explicar completamente este resultado enfatiza lo mucho que nos falta por entender en relación a la regulación de los niveles de TAG que se acumulan en las semillas

Otras evidencias de que la utilización de ácidos grasos incrementa sus índices de síntesis han sido obtenidas de experimentos con *E. coli* (Ohlrogge, *et al* 1995) Por lo tanto, los índices de síntesis de AGs aparentemente puede ser regulada por la demanda.

Extrapolando este concepto de bacterias a semillas: quizá en respuesta a una demanda intensa de cadenas aciladas se producen cambios en un intermediario metabólico clave lo que a su vez se traduce en un aumento en la velocidad de biosíntesis de AGs. Para ilustrar esta posibilidad supóngase que la actividad elevada de la DAGAT (y de otras aciltransferasa) produce un agotamiento de acil-CoAs que eventualmente resulta en una liberación de la inhibición por retroalimentación negativa (directa o indirecta) de la ACCasa y/o de las KAS por acil-CoAs. Así el resultado final sería una estimulación de la producción de AGs

## 4 Hipótesis

La síntesis de ácidos grasos no se encuentra regulada en forma directa por el ABA y el potencial osmótico bajo, sino que es el consumo acelerado de los ácidos grasos lo que estimula la síntesis activa de los mismos.

## 5 Objetivos

Objetivo general:

- Obtener evidencias que indiquen la contribución del proceso de síntesis de ácidos grasos a la regulación de la acumulación de lípidos de reserva en semillas en desarrollo

Objetivos particulares

- Determinar si el ABA y un potencial osmótico bajo modifican la síntesis de ácidos grasos en semillas en desarrollo
- Determinar si la Cerulenina es capaz de inhibir la síntesis de ácidos grasos *in vivo*
- Determinar el momento correcto en el que debe aplicarse la Cerulenina durante la incubación para observar claramente su efecto.
- Determinar la relación dosis-respuesta del efecto observado de la Cerulenina sobre la síntesis de ácidos grasos
- Determinar si la inhibición moderada de la síntesis de ácidos grasos afecta significativamente la velocidad de síntesis y acumulación de triglicéridos en los embriones tratados *in vitro*
- Determinar si la adición de ácidos grasos exógenos al medio de incubación resulta en la incorporación de los mismos a los lípidos de reserva de los embriones tratados.

- Determinar si la aplicación de ácidos grasos en forma exógena altera en alguna medida a la síntesis endógena de los ácidos grasos y si esta adición puede revertir los efectos negativos que pueda tener la Cerulenina
- Estudiar el efecto de la Cerulenina sobre la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa en la síntesis de triacilglicéridos.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Materiales

#### 6.1.1 Sustancias químicas

Las diversas sustancias químicas empleadas fueron

Sacarosa y Sulfato de Zinc, de Merck

Ácido abscísico, MES, Tris, Cerulenina, Tripalmitina, 1,2-*sn*-dipalmitoil-glicerol, 1,3-*sn*-dipalmitoil-glicerol, 1-monopalmitoil-*rac*-glicerol, Ácido palmítico, Polioxietileno sorbitano monolaurato (Tween 20), Oleoil-CoA, 2,5-difeniloxazol (PPO) y 1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benzeno (POPOP) de Sigma Chemical Co

Cloruro de sodio, Cloroformo y Tolueno, J.T. Baker

Manitol, Acetato de sodio, Metanol, Ácido acético, Hexanos, Éter etílico y Ácido sulfúrico de Mallinckrodt

2-pentanol, Hidróxido de tetraetilamonio, PEG, Hipoclorito de sodio de Aldrich Chemical Co y

[<sup>14</sup>C]-Acetato de sodio, [<sup>3</sup>H]-Acetato de sodio, 1-[<sup>14</sup>C]-oleoil-CoA de NEN-Dupont.

#### 6.1.2 Material biológico

Los experimentos descritos en este trabajo se realizaron con embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*). Debido a la necesidad de contar con material fresco de manera continua, las mazorcas fueron adquiridas en el mercado de Xochimilco, en este mercado, como el sitio de venta es próximo al sitio de cosecha, se presenta la ventaja de que las

mazorcas están frescas y no han sido refrigeradas, por lo que las semillas se encuentran menos estresadas. En la adquisición de las mazorcas se tomaron como criterios de selección el color del pelo del elote, tamaño y consistencia de grano del elote. Las características antes mencionadas están íntimamente relacionadas con el grado de desarrollo que presentan los granos, lo que permitió que de alguna manera se pudiera estandarizar el estado fisiológico de los embriones que fueron empleados en cada tratamiento. Las semillas seleccionadas para estos estudios se encontraban entre los 25 y 33 días después de la floración, lo que corresponde al periodo intermedio de la fase de expansión (véase apartado 3.4)

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Aislamiento de los embriones de la mazorca.

Los elotes libres de hojas, pelo y materia extraña fueron sumergidos en una disolución de polietilenglicol (PEG) al 16% con 1.2% de Hipoclorito de sodio por 25 min, a fin de que la superficie de los elotes se encontrara en condiciones asépticas para poder aislar a los embriones. Para aislar los embriones se trabajó bajo condiciones estériles y en la campana de flujo laminar, una vez concluidos los 25 min., los elotes se enjuagaron con una disolución estéril de PEG al 16%, se realizó una incisión sobre la parte superior del grano y los embriones fueron extraídos con ayuda de una espátula. Como este proceso impone un cierto estrés sobre los embriones, estos fueron sometidos a un tratamiento de recuperación, para ello se incubaron en lotes de 15 por 24 h a 25°C en 2.5 mL de un medio con 10 mM de MES pH 5.5, Manitol 500 mM (bajo potencial osmótico), Sacarosa 60 mM y ABA 10 $\mu$ M (medio BMSA) en matraces Erlenmeyer de 50 mL con agitación orbital a 60

RPM. en forma previa a la realización de los tratamientos que se describen en los siguientes apartados. Los tratamientos indicados como de tiempo cero son los correspondientes a los embriones al final de estas primeras 24 h.

#### 6.2.2 Efecto del ABA y del potencial osmótico sobre la acumulación de ácidos grasos.

Cada lote de 15 embriones, aislados y tratados como se ha mencionado, fueron recuperados y transferidos a una caja petri de 5 cm de diámetro que contiene 1 mL del medio correspondiente a cada tratamiento. El total de lotes se dividieron en tres grupos, a fin de estudiar el efecto del ABA (fitorregulador) y del potencial osmótico, quedando un grupo como testigo. Para estudiar el efecto del ABA se empleó una concentración de  $10\mu\text{M}$  ABA y para el potencial osmótico (PO) se adicionó al medio Manitol (solute no metabolizable por los embriones, que no penetra la membrana plasmática de las células (Finkelstein y Somerville, 1989)) a una concentración 500 mM. El pH del medio fue 5.5 y los embriones fueron incubados por 24 h a  $25^{\circ}\text{C}$ . Concluida esta segunda incubación, el medio de tratamiento se renovó y se adicionó la marca radioactiva, la cuál consistió en  $2.5\mu\text{Ci}$  de Acetato- $^{14}\text{C}$  de Sodio (1.25 mM de Acetato de Sodio); después de lo cual se incubó por 4 h según procedimiento reportado por Pacheco-Moisés y colaboradores (1997). Posteriormente, los embriones fueron enjuagados con una disolución de Acetato de sodio 0.2M a pH 5.5 y se colocaron en 1 mL de metanol 100% para proceder a la extracción de los lípidos y el análisis correspondiente. Debido a las repeticiones de cada tratamiento, cuando no es posible extraer los lípidos de todos los embriones en el mismo día, los embriones fueron guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en 1 mL de 100% metanol para la posterior extracción de los lípidos.

### 6.2.3 Extracción de lípidos y análisis de la fase clorofórmica.

La extracción de lípidos se realizó moliendo los embriones de cada tratamiento en un mortero con una mezcla de metanol-cloroformo 1:1. En el caso de los embriones que fueron guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a temperatura ambiente antes de ser molidos. Se transfirió cuantitativamente el contenido del mortero a un tubo de centrifuga, al cual se le adicionaron 4 mL de una disolución acuosa de NaCl al 1% con  $\text{ZnSO}_4$  al 0.15%; se centrifugó a 2500 R.P.M durante 15 min. Después la fase acuosa se eliminó y la fase clorofórmica se recuperó para guardarla en un tubo Eppendorf, para su análisis posterior. La separación del contenido de la fase clorofórmica se realizó por medio de una cromatografía en capa fina (CCF), usando como eluyente una mezcla de hexano:éter etílico:ácido acético en las proporciones de 75:25:1.

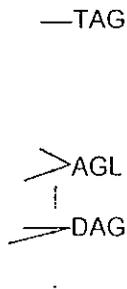


Fig. 6.1. CCF del aceite de oliva, usando como eluyente una mezcla de hexano:éter etílico:ácido acético en las proporciones de 75:25:1, las manchas fueron reveladas por tinción con vapores de Yodo.

Las manchas se identificaron por tinción con vapores de Yodo y por comparación con el aceite de oliva, el cual fue caracterizado empleando los siguientes estándares: Ácido palmítico (16:0); 1-monopalmitoil-rac-glicerol, sn 1,2-dipalmitoil-glicerol; sn 1,3 dipalmitoil-

glicerol y Tripalmitina la figura 6.1 muestra una CCF del aceite de oliva, realizada en las condiciones señaladas con anterioridad.

#### 6.2.4 Cuantificación de la radioactividad incorporada a los ácidos grasos

Se realizó raspando las manchas de la CCF y colocando la sílica gel en un vial con 3 mL de líquido de centelleo, luego de lo cual, se tomó la lectura de la desintegraciones por minuto (DPM) en el contador de centelleo líquido. Para determinar el porcentaje de incorporación en los ácidos grasos totales se realizó una hidrólisis de la fracción soluble en Cloroformo previa a la separación de los AGs siguiendo el método descrito por Rodríguez-sotres y Black (1993): 0.5 mL de hidróxido de tetraetilamonio 1 M acuoso se llevo a 100 mL con 2-pentanol se mezcló vigorosamente y se agregó a la muestra de lípidos, la reacción se efectuó durante 30 min a 55-66 °C. Concluido el tiempo se detuvo la reacción con 90 µL de solución acuosa de HCl 0.1 M y trietilamina-HCl 0.017 M, se mezcló vigorosamente y se dejó enfriar por 3 min. La fase orgánica superior (ácidos grasos y 2-pentanol) se recuperó y se eliminó el exceso de 2-pentanol para realizar la CCF.

#### 6.2.5 Efecto de la inhibición de la síntesis de AGs sobre la acumulación de TAG

Para estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos sobre el proceso global se empleó la adición de Cerulenina. En estos experimentos los embriones fueron tratados de la manera descrita con anterioridad para ser aislados e incubados bajo las mismas condiciones empleando el mismo medio (BMSA). En el primer tratamiento, con el objetivo de determinar el valor de pH más adecuado para la acción inhibitoria de la

Cerulenina los embriones fueron transferidos a un vial que contenía 1 mL del medio BMSA a pH 5.5 y 4.1 y fueron incubados en presencia de 100 µg/mL de Cerulenina adicionada 6 h antes de la marca radioactiva, en forma semejante a lo ya descrito. Después de esta incubación los embriones fueron tratados de la forma descrita con anterioridad para la extracción de lípidos y la cuantificación de la incorporación de marca. Con este tratamiento se determinó el efecto del inhibidor sobre la acumulación de lípidos totales. En un tratamiento posterior a pH 5.5, los embriones tratados de la forma descrita en un principio, fueron trasladados a un vial que contenía 1 mL del medio, BMSA y se les adicionaron 0, 25, 50, 100 ó 200 µg/mL de Cerulenina seis horas antes del marcaje radioactivo, después de esto los embriones son tratados de la manera ya descrita y las fracciones lipídicas se recobraron conforme a lo descrito en el apartado 6.2.3.

#### 6.2.6 Incorporación de ácidos grasos-[<sup>14</sup>C] exógenos

Los embriones fueron aislados e incubados de la manera descrita con anterioridad bajo las mismas condiciones empleando el medio (BMSA). Concluido el periodo de incubación se renovó el medio y se dividieron los embriones en dos lotes para su tratamiento. a los dos lotes se les adicionaron 7000 D.P.M de [<sup>14</sup>C]-ácidos grasos exógenos, provenientes de las fases clorofórmicas sobrantes de los experimentos anteriores las cuales fueron hidrolizadas siguiendo el método descrito por Rodríguez-sotres y Black (1993) y sólo a un lote se le agregó Cerulenina a una concentración de 38 µg/ mL. Estas adiciones se realizaron a fin de saber si los ácidos añadidos de forma exógena son incorporados a los TAG de los embriones, y para conocer que efecto tiene el abastecer de ácidos grasos a la vía de síntesis de TAG cuando se encuentra inhibida la síntesis de ácidos grasos por la Cerulenina. Ambos lotes fueron incubados por seis horas,

al cabo de las cuales se le adicionó [ $^3\text{H}$ ]-acetato de sodio con el objeto de saber si de alguna manera la síntesis de *ново* de ácidos grasos, a partir de [ $^3\text{H}$ ]-acetato, es modificada por la presencia de [ $^{14}\text{C}$ ]-ácidos grasos exógenos la incubación después de la segunda administración de marca radioactiva duró cuatro horas. Concluido el periodo de incubación, los embriones fueron enjuagados y los lípidos totales extraídos y almacenados para su posterior análisis, conforme a lo descrito en el apartado 6.2.3.

#### 6.2.7 Extracción de microsomas de embriones inmaduros de maíz

En un baño de hielo se colocó una caja petri que contenía glicerol al 16%, en la cuál fueron depositados los embriones extraídos de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 6.2.1. Los embriones extraídos fueron enjuagados con agua destilada y transferidos a un mortero en donde se molieron con una disolución amortiguadora de Tris pH 7.4 en la proporción gramos de embrión-mL se buffer de 1:1. Se transfirió el contenido del mortero a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 4000 R.P.M durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante, el cuál fue centrifugado a 38 000 - 40 000 R.P.M durante una hora. Al termino de la segunda centrifugación se recuperó el pelet y se re suspendió en Tris pH 7.4 con glicerol al 20 %. Se congeló a -70 C para su posterior análisis.

#### 6.2.8 Ensayo de la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT).

La actividad de DAG-AT fue medida por incorporación de la marca con 1-[ $^{14}\text{C}$ ]-Oleoil-CoA en DAG (Cao y Huang, 1986; Pacheco-Moisés, *et al*, 1997). La mezcla de reacción contenía 0.1 M del buffer Tris, pH 7.4, 84 mM de Sacarosa, 8.8  $\mu\text{M}$  de 1-[ $^{14}\text{C}$ ]-Oleoil-CoA, 2mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.33 mM de dipalmitoil diacilglicerol previamente emulsificado con

Tween 20 (la concentración final de Tween en el ensayo fue de 0.02%) y 50 µg de proteína microsomal en un volumen final de 0.15 mL. El ensayo se realizó a 30°C durante 10 minutos. La reacción fue detenida por adición de 600 µL de la mezcla cloroformo-metanol 1:1. Los productos fueron separados por cromatografía en capa fina empleando como eluyente hexano dietileter ácido acético (75:25:1 v/v). Las manchas de TAG fueron detectadas con Yodo, raspadas de las placas y contadas por centelleo líquido.

## 7 Resultados

### 7.1 Efecto del ABA y del potencial osmótico sobre la acumulación de ácidos grasos

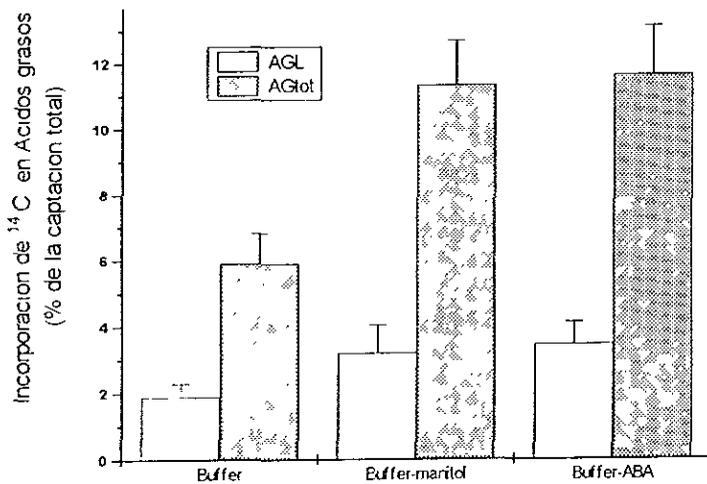


Figura 7.1 Síntesis de ácidos grasos libres (AGL) y de ácidos grasos totales (AGtot) a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato por embriones de maíz aislados e incubados durante 24 h en un medio con 10mM MES (Buffer) y sin adiciones o suplementado con 500 mM Manitol y/o 10  $\mu\text{M}$  ácido abscísico (ABA), según se indica. La marca radioactiva se aplicó por 4 h al final del periodo de incubación. El 100%, en esta figura y en las demás, corresponde a la toma total de  $^{14}\text{C}$  por el embrión.

Los embriones inmaduros de maíz aislados de las semillas son capaces de sintetizar *in vivo* ácidos grasos a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato cuando son incubados en presencia de ácido Abscísico (10 $\mu\text{M}$ ), o en presencia de Manitol (500mM) el cual produce un potencial

osmótico negativo. En contraste, cuando son incubados en un medio con un amortiguador sin suplementos (MES 10mM, pH 5.5), la síntesis de ácidos grasos se reduce gradualmente dentro de las primeras 24 hrs, lo cual se refleja en un menor porcentaje de incorporación de  $^{14}\text{C}$ , tanto en los ácidos grasos libres como en los ácidos grasos totales (fig 7.1), siendo el efecto más notorio en los niveles ácidos grasos totales.

## 7.2 Efecto de la Cerulenina sobre la síntesis de lípidos totales

Se ha demostrado que la Cerulenina inhibe la síntesis de AG *in vitro* y en un cierto número de sistemas *in vivo* (Omura, 1981). A fin de extender estas observaciones al caso de los embriones inmaduros de maíz aislados de la semilla, se procedió a incubar a los embriones inmaduros de maíz en la presencia de la Cerulenina. Debido a que la Cerulenina en disolución acuosa es estable a un pH de 4.0 (Omura, 1981) es necesario saber si al pH de estudio la Cerulenina está activa. El pH del medio de incubación empleado en experimentos anteriores con embriones de maíz aislados es de 5.5, por lo que, en este ensayo se incubó a dos diferentes pH, 5.5 y 4.1, la Cerulenina fue adicionada 6 h antes de la marca radioactiva siendo la concentración de Cerulenina empleada igual a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La fig. 7.2 muestra el efecto de la Cerulenina sobre la síntesis total de lípidos a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato, realizada por los embriones inmaduros de maíz. La figura revela que la adición de Cerulenina produce una reducción importante en los niveles totales de lípidos radioactivos presentes en los embriones de cada tratamiento, con respecto al control correspondiente. A pesar de que la inhibición observada fue similar en ambos casos (63.80% a pH 5.5 *versus* 62.37% a pH 4.1), se observa en la misma figura que a pH 5.5 se

tiene mayor incorporación de  $^{14}\text{C}$  por ello este fue el pH de trabajo en los experimentos posteriores

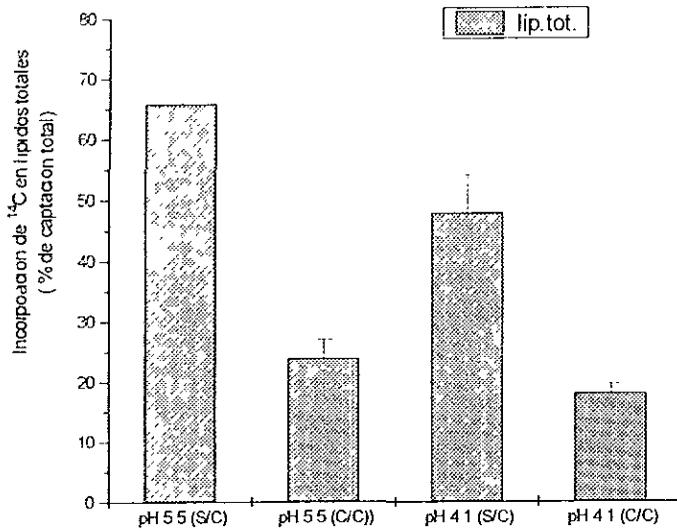


Figura 7.2 Efecto de la Cerulenina sobre la síntesis de lípidos totales a partir de  $[^{14}\text{C}]$ -acetato por embriones inmaduros de maíz aislados e incubados durante 24 h en un medio con 10  $\mu\text{M}$  ABA, 10 mM MES 60 mM Sacarosa 500 mM Manitol (medio BMSA) y a pH 5.5 o 4.1, con (C/C) o sin Cerulenina (S/C) la concentración de Cerulenina empleada fue de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se adicionó al final del periodo de incubación 6 h antes de la marca radioactiva. Los embriones fueron incubados por 4 h subsecuentes a los tratamientos en presencia de la marca radioactiva

### 7.3 Inhibición de la síntesis de ácidos grasos

Para saber cual es el tiempo más adecuado para obtener un efecto pronunciado de la Cerulenina sobre la acumulación de los lípidos neutros, se procedió a incubar a los embriones en presencia de 50  $\mu\text{g/mL}$  de Cerulenina durante 0, 3, 6, 10 y 24 h, previas a la adición de la marca radioactiva. Entonces se determinó la síntesis de ácidos grasos libres (AGL) y de triacilglicéridos (TAG) a partir [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato.

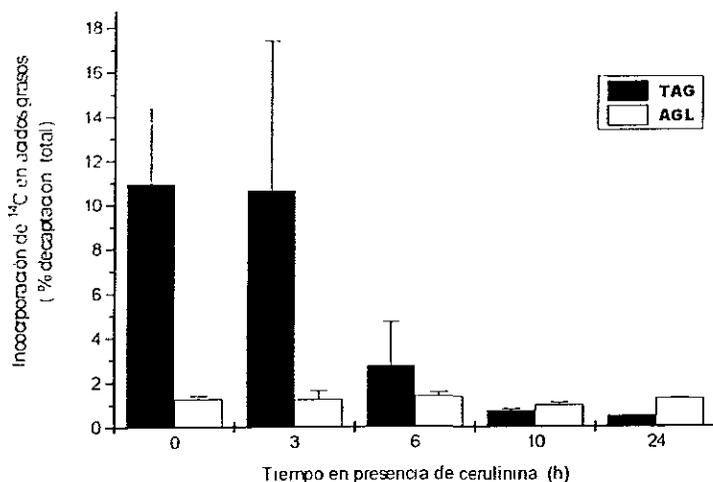


Figura 7.3 Efecto de la Cerulenina sobre la síntesis de ácidos grasos libres (AGL) y triacilglicéridos (TAG) a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-acetato por embriones de maíz aislados e incubados en el medio BMSA a pH 5.5. Al cabo de 24 h., se adicionaron 50  $\mu\text{g/mL}$  de Cerulenina al medio de incubación y ésta se prolongo por 0, 3, 6, 10 y 24 h., al final de las cuales se añadió la marca radioactiva durante las 4 h. subsiguientes a los tratamientos.

Los resultados se muestran en la fig 7.3, en ella se aprecia que cuando la exposición a la Cerulenina es apenas de unas tres horas antes de la marca no se observan

diferencias en los niveles de TAG y AGL. En contraste, cuando la exposición se incrementa a seis o más horas antes de la marca, se observa un fuerte descenso en los niveles de TAG mientras que los niveles de AGL se mantienen prácticamente constantes. Este resultado demuestra que la adición de Cerulenina, a la concentración empleada, debe preceder a la aplicación de la marca, por lo menos seis horas, para que se observe un efecto claro

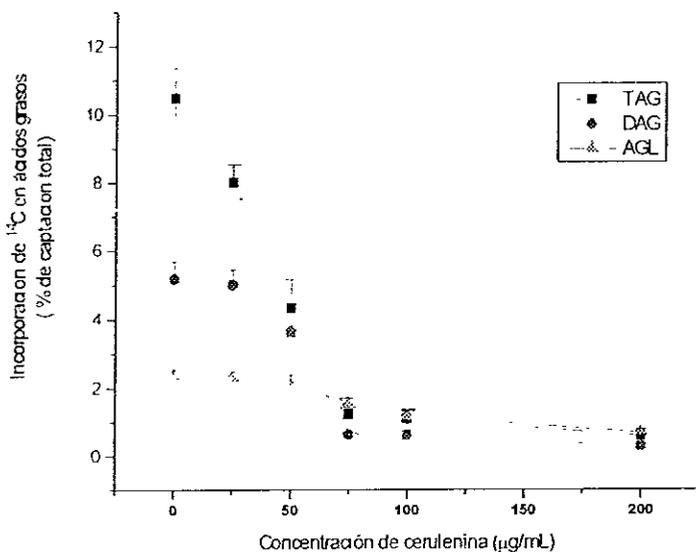


Figura 7.4 Síntesis de ácidos grasos libres (AGL), diacilglicéridos (DAG) y triacilglicéridos (TAG) a partir de  $[^{14}\text{C}]$ -acetato por embriones de maíz aislados e incubados durante 24 h en el medio BMSA a pH 5.5. Al final del periodo de incubación se adicionaron 0, 25, 50, 75, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de Cerulenina por 6 h antes de añadir la marca radioactiva, la cuál se aplicó por 4 h

Con la finalidad de analizar mejor este resultado, se construyo la fig.7 5, en ella se observa que la diferencia en el descenso de TAG con respecto a DAG se presenta en el intervalo de 0 a 75  $\mu\text{g/mL}$ : en la fase inicial los TAG sufren un descenso muy pronunciado, mientras que los DAG y los AGL tienden a mantenerse constantes en un inicio (entre 0 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) y sólo al aumentar más la concentración de Cerulenina las dos especies caen. En adición a lo anterior los AGL son menos sensibles a la presencia de Cerulenina y descienden en forma menos pronunciada que los DAG y los TAG.

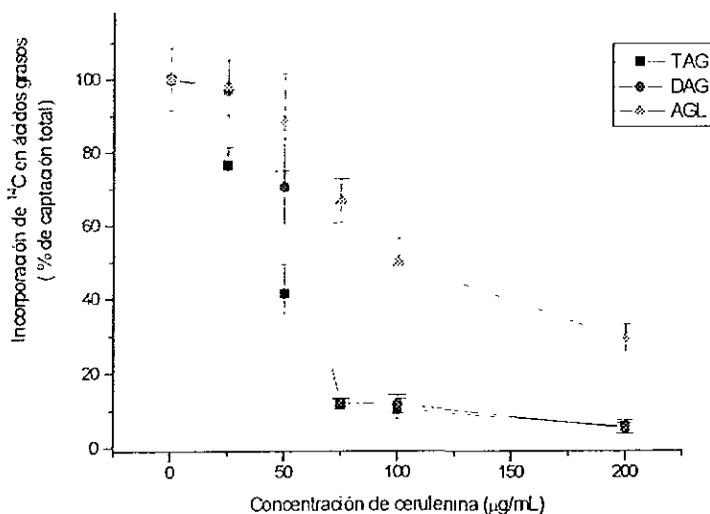


Figura 7 5. Los datos de la figura 7.4 se expresan como porcentaje respecto de la incorporación de marca determinada en ausencia de Cerulenina.

#### 7.4 Incorporación de ácidos grasos exógenos a los lípidos de reserva

La adición de los ácidos grasos exógenos al medio de incubación resulta en la incorporación de los mismos a los lípidos de reserva de los embriones tratados, esto se observa en el resultado que se muestra en la fig. 7.6.

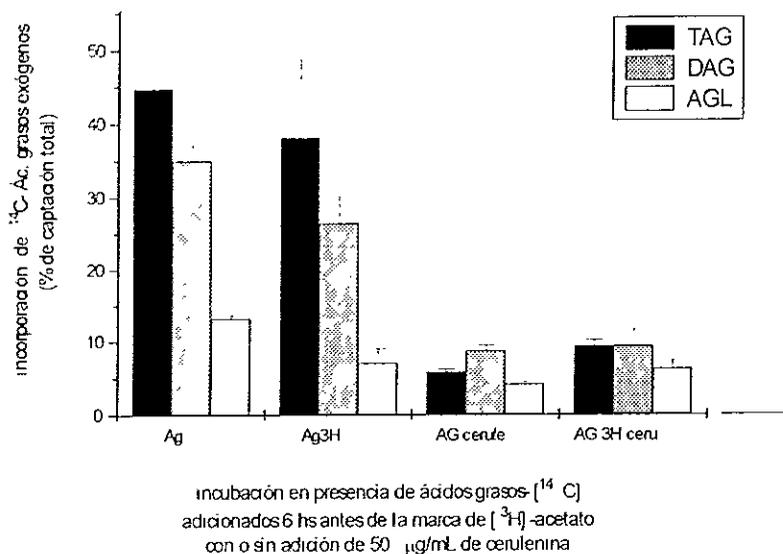


Figura 7.6 Incorporación de ácidos grasos- $^{14}\text{C}$  exógenos en ácidos grasos libres (AGL), diacilglicéridos (DAG) y triacilglicéridos (TAG) por embriones de maíz aislados e incubados durante 24 h en el medio BMSA a pH 5.5. Al final del periodo de incubación se adicionaron a todos los tratamientos: 100  $\mu\text{L}$  de ácidos grasos- $^{14}\text{C}$  exógenos y se incubó por 6h, en los tratamientos Ag-ceru y Ag 3H ceru se adicionaron 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cerulenina, simultáneamente a los ácidos grasos marcados. Concluida esta segunda incubación se agregó  $^3\text{H}$ -acetato a los tratamientos Ag3H y Ag 3H ceru y se incubó por 4h. adicionales.

En ella se aprecia que cuando están presentes los ácidos grasos en el medio de cultivo estos son absorbidos por el embrión e incorporados en los lípidos de reserva. Pero la Cerulenina reduce significativamente la acumulación de los ácidos grasos exógenos en los lípidos neutros analizados (TAG, DAG, AGL). Este resultado es totalmente contrario a lo que se esperaría, dado que la Cerulenina inhibe la síntesis de ácidos grasos, pero no su incorporación a los acilglicéridos (véase apartado 3.5.1), por lo que se esperaría que este inhibidor no afectase sensiblemente la incorporación de los AGs exógenos, lo cuál no ocurre.

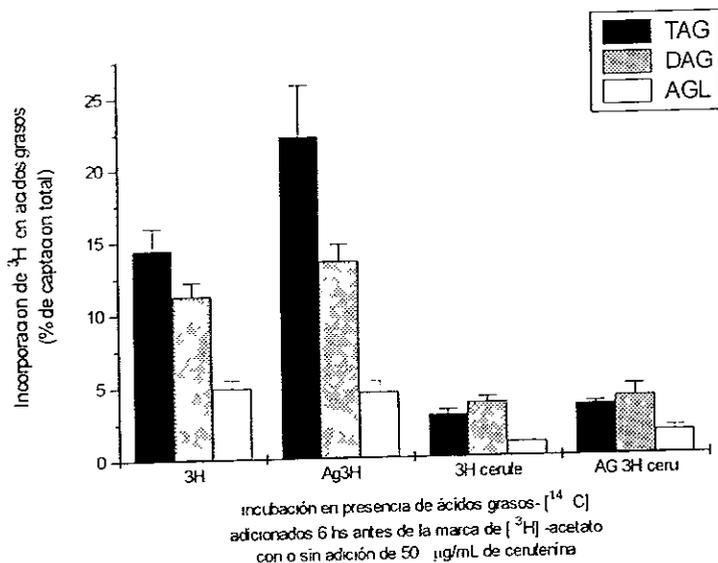


Figura 7.7 Síntesis de lípidos (ácidos grasos libres AGL, diacilglicéridos DAG y triacilglicéridos TAG a partir de  $[^3\text{H}]$ -acetato por embriones de maíz aislados e incubados durante 24 h en el medio BMSA a pH 5.5. Al final del periodo de incubación se adicionaron a 100  $\mu\text{L}$  de ácidos grasos- $[^{14}\text{C}]$  exógenos (Ag) y 50  $\mu\text{g/mL}$  de Cerulenina (ceru), según se indica; estas adiciones fueron simultáneas y se incubaron por 6h adicionales. Concluida esta segunda incubación se adicionó la marca de tritio, como se describió en la figura 7.6.

También contrariamente a lo que esperábamos, la adición de ácidos grasos exógenos al medio de cultivo parece estimular la síntesis de ácidos grasos (fig. 7.7), pues las fracciones de TAG DAG y AGL presentan mayor incorporación de [<sup>3</sup>H]-acetato cuando se suplementa el medio de incubación con ácidos grasos exógenos. Se aprecia nuevamente que sin importar la presencia de ácidos grasos exógenos, la Cerulenina produce una importante reducción de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-acetato en los lípidos analizados (fig 7.7) Con estos resultados surge una interrogante entorno a la diacilglicerol-aciltransferasa (DAG-AT), por ello el siguiente paso fue realizar un estudio de la actividad de la DAG-AT en las condiciones de cada experimento antes realizado.

#### 7.5 Efecto de la Cerulenina sobre la actividad de DAG-AT en microsomas de embriones inmaduros de maíz

En los ensayos de inhibición de la síntesis de ácidos grasos (fig. 7.4 y 7.5 ) y en los de incorporación de marca radioactiva en presencia de Cerulenina y de ácido grasos exógenos (fig. 7.7). se observa que siempre es la acumulación de TAG la que se manifiesta como la más sensible a la reducción en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Como ya se ha indicado, es la actividad de diacilglicerol-aciltransferasa la encargada de sintetizar TAG a partir de DAG y de acil-CoA. Por lo que una explicación a los resultados obtenidos en los apartados 7.3 y 7.4 sería que la Cerulenina ejerciera algún efecto sobre la actividad de la DAG-AT, por lo que se procedió a investigar esta posibilidad

Primero se determinó *in vitro* el efecto de la Cerulenina sobre la actividad de DAG-AT empleando microsomas de embriones inmaduros de maíz. El resultado se muestra en la fig 7.8 en ella se observa que la actividad de DAG-AT permanece prácticamente constante en todas las concentraciones de Cerulenina empleadas.

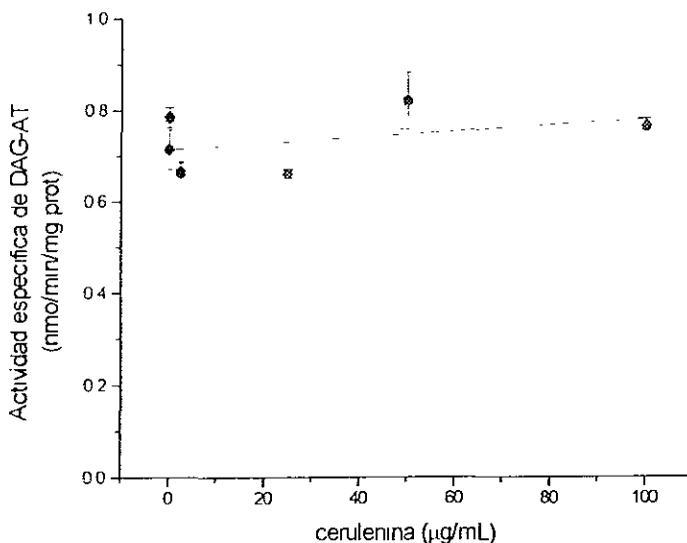


Figura 7.8 Ensayo de la actividad de diacilglicerol acil-transferasa (DAG-AT) en microsomas de embriones inmaduros de maíz; a partir de dipalmitina y 1-[<sup>14</sup>C]-Oleoil-CoA en presencia de 0, 0.5, 5, 25, 50 y 100 µg/mL de Cerulenina. La composición de la mezcla de reacción es 0.1 M del buffer Tris pH 7.4, 84 mM de Sacarosa, 8.8 µM de 1-[<sup>14</sup>C]-Oleoil-CoA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM de dipalmitoil diacilglicerol 0.02% Tween 20 y 51 µg de proteína microsomal en un volumen final de 0.15 mL. El ensayo se realizó a 30°C durante 10 minutos.

Sin embargo, existía la posibilidad de que la presencia de Cerulenina afectase a la actividad de la DAG-AT, no a nivel de la catálisis, sino a nivel del estado de activación de la proteína. Dado que los mecanismos que pudieran existir para regular a esta proteína son

aún desconocidos (Valencia-Turcote y Rodríguez-Sotres, 1999), se procedió a determinar la actividad de DAG-AT en microsomas de embriones inmaduros de maíz que han sido sometidos a los tratamientos señalados en las figuras 7.6 y 7.7.

Los embriones incubados con o sin Cerulenina, con [<sup>3</sup>H]-acetato y en presencia o ausencia de ácidos grasos exógenos, se dividieron en dos lotes, uno de los cuales se empleó para el análisis de la actividad máxima extraíble de la DAG-AT. Los resultados obtenidos para la actividad de DAG-AT se muestran en la figura 7.9.

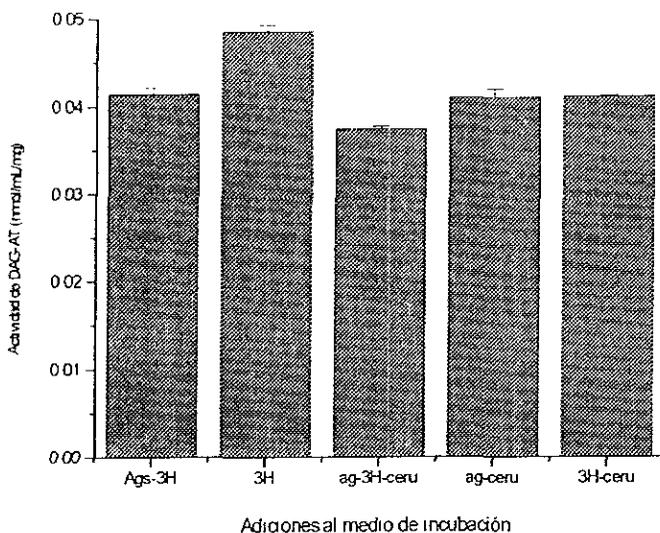


figura 7.9 Ensayo de la actividad de diacilglicerol acil-transferasa (DAG-AT) en microsomas de embriones inmaduros de maíz incubados en el medio BMSA durante 24 h, concluido este tiempo se realizaron adiciones al medio de incubación: [<sup>14</sup>C]-ácidos grasos (Ags), 50 µg/mL de Cerulenina, según se indica, las adiciones fueron simultáneas y precedieron por 6 h a la marca con [<sup>3</sup>H]-acetato. La actividad se ensayó a partir de dipalmitina y 1-<sup>14</sup>C-Oleoil-CoA. La composición de la mezcla de reacción es 0.1 M del buffer Tris, pH 7.4, 84 mM de Sacarosa, 8.8 µM de 1-<sup>14</sup>C-Oleoil-CoA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM de dipalmitoil diacilglicerol 0.02% Tween 20 y 51 µg de proteína microsomal en un volumen final de 0.15 mL. El ensayo se realizó a 30°C durante 10 minutos

En la fig 7 9 se observa que la actividad de DAG-AT es muy similar en todos los tratamientos y estos datos no permiten explicar los niveles de reducción en la incorporación, tanto de [14C] como de [3H], que resultan de la adición de Cerulenina en los experimentos de las figuras 6 y 7. Por lo tanto, la presencia de Cerulenina no afecta a la actividad de la DAG-AT y la marcada diferencia en la acumulación de TAG que se observa en las fig 6 y 7 debe ser adscrita a la falta de sustrato para esta enzima o a otras causas. Las distintas posibilidades que pueden explicar todos estos resultados se exponen a continuación

## 8 DISCUSIÓN

La figura 7 1 muestra que la síntesis de ácidos grasos en las semillas de maíz en desarrollo responde a la presencia de los mismos factores que se ha demostrado que regulan la síntesis de lípidos de reserva en este sistema, es decir, la presencia de ABA y un bajo potencial osmótico (Pacheco-Moisés, *et al*, 1997) Estos autores demuestran que la reducción en la síntesis de TAG en ausencia de ABA y en un medio diluido, está acompañada de una marcada reducción de los niveles de las aciltransferasas responsables de incorporar los ácidos grasos al esqueleto de glicerol Sin embargo, no aclaran si esta reducción está acompañada de una reducción en la síntesis de ácidos grasos, o más bien, la síntesis de ácidos grasos se reduce al disminuir la demanda de ácidos grasos por las vías de síntesis de acilglicéridos. En otras palabras, la síntesis de TAG se regula a nivel de la fuente de ácidos grasos o a través de la demanda de los mismos (Ohlrogge y Jaworski, 1997)

Como una estrategia para contestar algunas de las interrogantes planteadas en el párrafo anterior, se empleó la Cerulenina para reducir la disponibilidad de ácidos grasos *in vivo* en forma artificial y, a través de esta reducción, determinar si la capacidad del tejido para producir ácidos grasos es limitante a la síntesis de triglicéridos o no.

Un primer aspecto que debe explorarse es la efectividad de la aplicación de este antibiótico en los embriones enteros, ya que para ejercer su efecto este antibiótico debe *difundir al interior del tejido*, penetrar la membrana celular y la doble membrana de los leucoplastos y llegar sin ser metabolizada al microambiente en el que se encuentran sus blancos de acción, las KAS I y II Así, los experimentos presentados en las figuras 7 2 y 7 3 establecen que la Cerulenina es efectiva en un medio a pH de 5 5 si se aplica al menos 6

horas antes de que se mida la velocidad de síntesis de los ácidos grasos. Las figuras 4 y 5 permiten además decir que los niveles de Cerulenina que se deben aplicar para obtener una inhibición substancial de la acumulación de TAG, son inferiores a los requeridos para que se reduzcan los niveles de AGL y los niveles de DAG. Este resultado, indica claramente que la síntesis de triglicéridos es muy sensible a la disponibilidad de ácidos grasos y plantea la pregunta - ¿por qué la síntesis de diglicéridos, que requieren de la transacilación de 2 ácidos grasos no se ve afectada de la misma manera?

La DAG-AT ha sido reportada como la enzima limitante del proceso de síntesis de ácidos grasos, ya que su actividad es la más baja de la ruta (Cao y Huang, 1986), porque el DAG es el intermediario más abundantes de la vía (Perry Y Harwood, 1993) y por que su actividad cambia en paralelo a los cambios en las cambios en la capacidad de los embriones de maíz para sintetizar TAG (Cao y Huang, 1986 y Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997) Sin embargo, si la actividad de esta enzima es limitante, una reducción en los niveles de ácidos grasos no debería afectar a esta actividad más que a otras, dado que esta enzima es la que seguramente consume menores cantidades de ácidos grasos. Antes bien se esperaría una reducción en los niveles de los intermediarios, que permitieran explicar un menor acceso de esta enzima al sustrato aceptor, es decir el DAG. Contrariamente a esta propuesta, los datos de la figura 7.3 demuestran un estrecho acoplamiento entre la actividad de la DAG-AT y la disponibilidad de ácidos grasos y sugieren que los niveles de otros intermediarios (anteriores a la aparición del DAG) tampoco son afectados por bajos niveles de Cerulenina (menores a 25  $\mu\text{g/mL}$ ) Estos resultados pueden explicarse mediante la propuesta de Stymne (1993) que sugiere que los ácidos grasos producidos se particionan en dos posas separadas, una de la cuales podría

alimentar en forma casi exclusiva a la DAG-AT. De este modo, la reducción en los niveles de ácidos grasos podría manifestarse en forma diferente en cada una de las posas y sería la propia de la DAG-AT la más afectada. La hipótesis de las dos posas está también apoyada por el hecho de que la presencia de ácidos grasos "no membranales" en los acilglicéridos de las plantas transformadas con genes foráneos, enciende la  $\beta$ -oxidación y no se traduce en una deposición completa de los ácidos grasos "no membranales" en los lípidos de reserva: en efecto, ni siquiera se observa un ligero aumento en la síntesis de lípidos totales en estas plantas (Eccleston *et al.* 1996 ; 1997; 1998). En cambio en aquellas plantas que los producen, los lípidos de reserva son el destino final de estos lípidos "no membranales" y no se ha reportado que la  $\beta$ -oxidación se active (Bewley y Black, 1994)

Si la reducción en los niveles de ácidos grasos resulta en una reducción en el aprovechamiento del DAG para la síntesis de lípidos de reserva, quizá la adición de ácidos grasos exógenos pueda restituir esta actividad. Los experimentos de las figuras 7.6 y 7.7 demuestran que esta hipótesis es incorrecta y que si bien los embriones pueden aprovechar los ácidos grasos añadidos exógenamente e incorporarlos a los TAG, su presencia no obstaculiza la incorporación de [ $^3$ H]-acetato a estas reservas. Lo que indica que los ácidos grasos como quiera que sean aprovechados, no resultan en una reducción de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos. En otras palabras, el tejido parece ignorar la presencia de estos precursores exógenos y continúa sintetizando nuevos ácidos grasos, tan rápidamente como cuando estos precursores no estaban disponibles. Sin embargo e indudablemente, estos precursores exógenos llegan finalmente a los triglicéridos - ¿qué pasa pues con el carbono extra que ingresa? Es claro en las figuras 7.6 y 7.7 que este exceso de carbono no se aprovecha para producir un nivel mayor de TAG

El resultado más intrigante de las figuras 7.6 y 7.7 es el efecto inhibitorio de la Cerulenina sobre la incorporación de ácidos grasos exógenos al TAG. Este resultado no puede explicarse por un efecto directo o indirecto de la Cerulenina sobre la actividad de la DAG-AT ya que las figuras 7.8 y 7.9 demuestran que este no es el caso. Tampoco puede explicarse por una reducción de la disponibilidad del DAG aceptor para la DAG-AT, ya que la figura 7.5 indica que los niveles de TAG son afectados por la presencia de Cerulenina, a niveles en los que el DAG sintetizado permanece constante. Finalmente, la inhibición de la síntesis de ácidos grasos no debería afectar a la incorporación de los ácidos grasos exógenos, dado que estos precursores no requieren de las KAS para ser activados, ni para ser tansacilados.

Por lo tanto, la explicación más sencilla que puede proponerse es que los ácidos grasos marcados que se añaden al medio sean degradados parcial o totalmente, antes de ser reaprovechados para la síntesis de nuevos ácidos grasos, que entonces serían incorporados.

¿Cómo encaja esta última propuesta con nuestros datos y con otros resultados descritos en la literatura?

Ciertamente, Eccleston, et al. (1996 y 1998) han demostrado que ciertos ácidos grasos parecen ser utilizados para la síntesis de TAG sólo parcialmente, una fracción de los mismos es degradada y el carbono reutilizado. Nuestros datos pueden explicarse si los ácidos grasos que se añaden exógenamente llegan a todas las membranas, pero no pueden ser aprovechados ahí, entonces se dispara la  $\beta$ -oxidación y el carbono es reutilizado. Lo mismo podría estar pasando en el caso de las plantas transformadas de Eccleston et al. (1996), puesto que los ácidos grasos que se producen en estas plantas son

compuestos anormales en el metabolismo de esta plantas. A pesar de ello, una parte de los ácidos grasos "anormales" se incorporan en TAG en estas plantas, esto significa, que no todos los ácidos grasos son enviados a los mismos reservorios y algunos, los que caen al reservorio apropiado. pueden ser aprovechados por las aciltransferasas, incluyendo la DAG-AT. En nuestro caso, es obvio que si los ácidos grasos vienen del espacio extracelular y realmente hay una estricta compartimentalización de los ácidos grasos, la mayoría de los que se añaden quedará en la membrana plasmática y tendrá poca oportunidad de ser activado y empleado directamente por las aciltransferasas. Por lo tanto, para que este carbono pueda ser aprovechado, los ácidos grasos deben degradarse y resintetizarse. lo que explicaría el efecto de la Cerulenina sobre su incorporación.

Así la hipótesis de los reservorios múltiples, propuesta originalmente como de 2 reservorios por Stymne (1993). Explicaría nuestros datos y los de Eccleson et al. (1996, y 1998)

## CONCLUSIONES.

- La síntesis de ácidos grasos en embriones inmaduros de maíz responde a la presencia de factores (ABA y potencial osmótico bajo) que regulan la síntesis de lípidos de reserva en este sistema.
- La Cerulenina es capaz de inhibir la síntesis de ácidos grasos en embriones inmaduros de maíz
- La inhibición moderada de la síntesis de ácidos grasos afecta significativamente la velocidad de síntesis y acumulación de triglicéridos en los embriones tratados *in vitro*.
- La síntesis de TAG es muy sensible a la disponibilidad de ácidos grasos parece ser un factor limitante para la síntesis de triacilglicéridos, pero no de DAG, lo que sugiere un estrecho acoplamiento entre la diacilglicerol-aciltransferasa y la disponibilidad de ácidos grasos
- La incorporación de ácidos grasos adicionados exógenamente a triacilglicéridos parece requerir de su degradación y resíntesis, como lo demuestra el efecto negativo de la Cerulenina sobre dicha incorporación.
- Los resultados obtenidos por nosotros, junto con datos adicionales presentes en la literatura (Stymne. 1993; Eccleson et al., 1996, Eccleston y Ohlrogge, 1998) apoyan la propuesta de Stymne (1993) de la existencia de más de un reservorio de ácidos grasos, asociados a destinos metabólicos distintos.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## 9 Bibliografía:

- Agrawal P and Carvin, D (1971) The penthose phosphate pathway in relation to fat synthesis in developing castor oil seed *Plant Physiol.* **47**:672-675.
- Andrews, J and Ohlrogge, J. (1990) Fatty acid and lipids biosynthesis and degradation. *Plant-Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Cap. 23 eds. D.T Dennis and D H Turpin Department of Biology, Queen's University, Kingston Canada 341-352.
- Batley, J F and Ohlrogge, J.B. (1989) A comparison of the Metabolic Fate of Fatty Acids of Different Chain Lengths in Developing oilseeds. *Plant Physiol.* **90** 835-840
- Bruce, C. Chouinard, R A and Tall A R (1998) Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Ann Rev. of Nutrition*, **18**: 297-330.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*, Ed 2 Plenum Press, New York, London.
- Black M (1991) Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seed. En: Abscisic acid, physiology and biochemistry. W. J Davies and H G. Jones, eds Bios Scientific Publisher. Oxford, U.K.
- Botham P A and Rattedge, C. (1979) A biochemical explanation for lipid acumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms *J.Gen.Microbiol.* **114**:361-375
- Bourges, Héctor (1996) Los alimentos y la dieta En: *Nutriología médica*. Editado por Casanueva E, Kanfer M, Pérez Lizaur A B. y Arroyo P. De. médica Panamericana.
- Bruck F M. Schuch, R. and Spener, F.(1994) Malonyl-CoA Acyl Carrier Protein Transacylase from Developing Seeds of *Cuphea lanceolata* *J. Plant. Physiol.* **143**: 550-555
- Bruck, F M., Brummel, M., Schuch, R and Spener, F. (1996) *In-vitro* evidence for feed-back regulation of  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III in medium-chain fatty acid biosynthesis *Planta* **198**:271-278.
- Cao Y -Z and Huang, A H.C (1986) Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seed of maize and other species. *Plant Physiol.* **82**:813-820
- Child, C.J. and Shoolingin-Jordan, P M. (1998) Inactivation of the polyketide synthase, 6-mehylsalicylic acid synthase, by the specific modification of Cys-204 of the  $\beta$ -ketoacyl synthase by the fungal mycotoxin cerulenin *Biochem. J* **330**, 933-937
- Clasificación mexicana de actividades y productos (CMAP), censos económicos, INEGI.
- Clough R C. Matthis, A L., Barnum, S.R. and Jaworski, J.G. (1992) Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. *J.Biol Chem* **267** 20992-20998
- D'Agnolo, G. Rosenfeld, I S. and Vagelos, P.R. (1975)  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase. Characterization of the acyl-enzyme intermediate. *The Journal of Biological Chemistry* **250**. 5283-5288.

- D'Agnolo, G., Rosenfeld, I.S. and Vagelos, P.R. (1975) Multiple Forms of  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **250**: 5289-5294
- Dennis, D. and Miernyk, J. (1982) Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**: 27-50.
- Dormann, P., Spener, F. and Ohlrogge, J.B. (1993) Characterization of two acyl-ACP thioesterases from developing *Cuphea* seeds specific for medium chain acyl-ACP and oleoyl-ACP. *Planta* **189**: 425 - 432.
- Dormann, P., Voelker, T.A. and Ohlrogge, J.B. (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long chain acyl-acyl carrier proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**: 612 - 618.
- Eastwell, K.C. and Stumpf, P.K. (1983) Regulation of plant acetyl-CoA carboxylase by adenylate nucleotides. *Plant Physiol.* **72**: 50-55
- Eccleston, V.S., Cranmer, A.M., Voelker, T.A. and Ohlrogge, J.B. (1996) Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauroyl-acyl carrier protein thioesterase. *Planta* **198**: 446-53.
- Eccleston, V.S. and Ohlrogge, J.B. (1998) Expression of Lauroyl-Acyl Carrier Protein Thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation. *Plant Cell* **10**: 613 - 622
- Finkelstein, R. and Somerville, C. (1989) Abscisic acid or high osmoticum promote accumulation of long chain fatty acids in developing embryos of *Brassica napus*. *Plant Sci.* **61**: 213 - 217
- Golz, A., Focke, M. and Lichtenthaler, H.K. (1994) Inhibitors of de novo fatty acid biosynthesis in higher plants. *J. Plant Physiol.* **143**: 426-433
- Goodridge, A.G. (1985) fatty acid synthesis in eucaryotes. In *Biochemistry of lipids and membranes*, ed. DE Vance, JE Vance. pp 143-180.
- Hansen, H. (1994) New biological and clinical roles for the n-6 and n-3 fatty acids. *Nut Rev.* **52**: 126-170.
- Hetah, R.J. and Rock, C.O. (1995) Regulation of Malonyl-CoA Metabolism by Acyl-Acyl Carrier protein and  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier protein Synthases in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry.* **270**: 15531-15538.
- Housek-Radojic, A., Evenson, K.J., Jaworski, J.G. and Post-Beittenmiller, D. (1998) Fatty Acid elongation is independent of Acyl-Coenzyme A Synthetase Activities in Leek and *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **116**: 251-258.
- Hoseney, R. Carl, *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*, Zaragoza, España, 1991, ed. Acibia, pp 321
- Huang, H.C.A. (1993) Oil Bodies in Maize and Other Species. In *Biochemistry and Molecular Biology of membrane and Storage Lipids of Plants*. N. Murata and CR Somerville, eds. The American Society of Plant Physiologists. pp 215- 227.

- Igal R.A., Wang, P. and Coleman, R.A. (1997) Triacsin C blocks *de novo* synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid. evidence for functionally separate pools of acyl-CoA *Biochem. J* **324**, 529-534
- Index-Merck An encyclopedia of chemicals and drugs, 9th edition, Windholz M. editor Published by Merck & Co. Inc. Rahway N.J. USA, 1976.
- Jackowski, S., Murphy, C.M., Cronan, J.E. and Rock, C.O. (1989) Acetoacetyl-acyl carrier Protein Synthase. A target for the antibiotic thiolactomycin. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 7624-7629.
- Jaworski, J.G., Clough, R.C. and Barnum, S.R. (1989) (Communication) A Cerulenin Insensitive Short Chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase in *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Physiol.* **90**: 41-44
- Jaworski, J.G., Clough, R.C. and Barnum, S.R. (1992) A cerulenin insensitive short chain 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-CoA to initiate fatty acid synthesis. *J Biol Chem* **267**, 20992-20998
- Jaworski, J.G., Post-Beittenmiller, D. and Ohlrogge, J.B. (1993) Acetyl-acyl carrier protein is not major intermediate in fatty acid biosynthesis in spinach *Eur. J Biochem.* **213**: 981-987
- Jaworski, J.G., Post-Beittenmiller, D., Ohlrogge, J., Clough, R. and Matthis, A. (1993) Characterization of the Reactions of Fatty Acid Biosynthesis. in *Biochemistry and Molecular Biology of membrane and Storage Lipids of Plants*. N. Murata and C.R. Somerville, eds. The American Society of Plant Physiologists. pp 96 - 101.
- Jones, R.J. and Brenner, M.L. (1987) Distribution of abscisic acid in maize kernel during grain filling *Plant Physiol* **83**: 905-909
- Konishi T., Shinohara K., Yamada K. y Sasaki Y. (1996). Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than *Gramineae* have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme *Plant cell Physiol.* **37**: 117 - 22.
- Lermark, U. and Garddestrom, P. (1994) Distribution of pyruvate dehydrogenase complex activities between chloroplasts and mitochondria from leaves of different species. *Plant Physiol.* **106**: 1633-1638
- Martin, B.A. and Wilson, R.F. (1983) Properties of diacylglycerol acyltransferase from spinach leaves *Lipids.* **18**, 1-6
- Miquel, M. and Browse, J. (1995) Lipid Biosynthesis in developing seeds. In: *Seed Development and Germination* Kigel K. and Galili, G. eds. pp 169-194. Marcel Dekker, Inc.
- Murphy, J.D., Rawsthorne, S. and Hills, J.M. (1993) Storage lipid formation in seeds *Seed Science Research.* **3**: 79-95.
- Navarrete, M. y Cabrera, L. Introducción al estudio de los radioisotopos, 2a. ed. U.N.A.M. 1993 pp. 309

- Nawrath C., Poirier, Y. and Somerville, C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12760-12764
- Nelson D. and Rinne, R. (1975) Citrate cleavage enzyme from developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **55**: 69-72.
- Nishijima, M., Kuge, O and Hanada, K. (1997) Mammalian cell mutants of membrane phospholipid biogenesis *Cell Biology* **7**: 324-329
- Ohlrogge J B , Savage, L , Jaworski, J.G., Voelker, T and Post-BNeittenmiller, D. (1995) Alteration of acyl-ACP pools and acetyl-CoA carboxylase expression in *E. coli* by a plant medium chain acyl-ACP thioesterase *Arch Biochem. Biophys* **317** 185-190
- Ohlrogge, J B and Eccleston, V.S. (1996) Coordinate induction of pathways for both fatty acid biosynthesis and fatty acid oxidation in *Brassica napus* seeds expressing lauroyl-ACP thioesterase. *Presented at Int. Symp Plant lipids 12th, Toronto.*
- Ohlrogge, J B and Jaworski, J.G. (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **48**: 109-136.
- Omura Satoshi. (1981) Cerulenin. *Methods Enzymology* **72**: 520 -532.
- Pacheco-Moisés, F., Valencia-Turcote, L., Altuzar-Martínez, M. and Rodríguez-Sotres, R (1997) Regulation of acyltransferase activity in immature maize embryos by abscisic acid and the osmotic environment *Plant Physiol.* **114**(3) 1195-1101.
- Perissé, J. Sizaret, F. and Francois, P. Citados en FAO/OMS Necesidades de energía y proteína (1973) Serie informes técnicos de la OMS No. 522
- Perry, H J and Harwood, J.L (1993) Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus* *Phytochemistry* **32**: 1411-1415.
- Post-Beittenmiller, D , Jaworski, J.G. and Ohlrogge, J.B (1992) Probing regulation of lipid biosynthesis in oilseed by the analysis of the *in vivo* acyl-ACP pools during seed development. In seed oils for the future, ed SL MacJenzie, DC Taylor pp 44-31
- Post-Beittenmiller, D., Roughan, G. and Ohlrogge, J.B. (1993) Regulation of plant fatty acid biosynthesis: analysis of acyl-CoA and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. *Plant Physiol* **100**; 923-930
- Rodríguez-Sotres, R. and Black, M. (1993) Quantitative determination of triacylglycerols in plant tissues *Phytochemical Anal.* **4**. 68-71
- Rodríguez-Sotres, R. and Black, M. (1994) Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos. *Planta* **192**: 9-15
- Roesler, K R , Savage, L.J , Shintani, D K , Shonosh, B.S. and Ohlrogge, J.B. (1996) Co-purification, co-immunoprecipitation, and coordinate expression of acetyl-Coenzyme A carboxylase activity, biotin carboxylase and biotin carboxylase carrier protein of higher plants. *Planta* **198**: 5117-525
- Roesler, K , Shintani, D , Savage, L., Boddupalli, S. and Ohlrogge, J. (1997) Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds *Plant Physiol* ;**113** (1):75-81

- Roughan, P G , Holland, R. and Slack, C.R. (1995) On the control of long-chain fatty acid synthesis in isolated intact spinach (*Spinacea oleracea*) Chloroplasts. *Biochem J* **184**: 193-202
- Roughan, P.G and Slack, C.R (1982) Cellular organization of glycerolipid metabolism *Ann Rev Plant Physiol* **33** 97-132.
- Salisbury, F B and Ross C.W. Plant Physiology, fourth ed, California, U.S.A. 1992, Wadsworth Publishing, pp 726.
- Sasaki, Y., Konishi, T. and Nagano, Y. (1995) The compartmentation of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Plant Physiol* **108**: 445-449.
- Schuch, R., Brummel, M and Spener, F. (1994)  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III in *Cuphea lanceolata* seeds: identification and analysis of reaction products. *J Plant Physiol* **143** 556-560.
- Schussler, J R , Brenner, M.L , and Brun, W.A (1984) Abscisic Acid Its Relationship to seed Filling in Soybeans. *Plant Physiol* **76**: 301-306.
- Sherindan, W F y Clark (1994) Fertilization and embryogeny in Maize, in The Maize Handbook, M. freeling and V. Walbot eds. Springer-Verlag, New York 3 - 9
- Shewry, R P (1995) Cereal seed storage proteins. In: seed developing and germination Kigel K y Galili G. eds. pp.45-72. Marcel dekker, Inc.
- Shimakata, T and Stumpf, P.K (1982) Isolation and function of spinach leaf  $\beta$ -Ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthases *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **79**: 5808-5812.
- Shintani, D.K and Ohlrogge, J.B. (1995) feedback inhibition of fatty acid synthesis in tobacco suspension cells. *Plant. J.* **7**: 577-587.
- Skriver K and Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress *Plant cell*, **2** : 503-512
- Slocombe, S P., Piffanelli, P., Fairbairn, D , Bowra, S., Hatzopoulos, P., Tsiantis, M. and Murphy, S.J (1994) Temporal and Tissue-Specific regulation of a *Brassica napus* Stearoil-Acyl Carrier Protein Desaturase Gene. *Plant Physiol.* **104**: 1167-1176.
- Stryer Lubert. Bioquímica tomo I, 3 era. ed Barcelona, España 1990. Reverté. pp 549
- Stymme, Sten (1993) Biosynthesis of "Uncommon" Fatty Acid and Their Incorporation into Triacylglycerols. in Biochemistry and Molecular Biology of membrane and Storage Lipids of Plants. N Murata and CR Somerville, eds. The American Society of Plant Physiologists pp 150- 158.
- Tai, H. y Jaworski, J G (1993) 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach (*Spinacea oleracea*) is not similar to other condensing enzymes of fatty acid synthase *Plant Physiol* **103**.13361-1367.
- Tsay, J T , Won, O., Larson, T.J , Jackowski, S. and Rock, C.O. (1992) Isolation and Characterization of the  $\beta$ -Ketoacyl-acyl carrier protein Synthase III Gene (*fabH*) from *Escherichia coli* K-12 *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 6807-66814

- Turnham, E and Northcote, D.H. (1983) Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. *Biochem J.* **212**: 223-229.
- Valencia-Turcote, Lilián, Altuzar-Martínez, Milton and Rodríguez-Sotres, Rogelio (1999) Is diacylglycerol acyltransferase stable on the absence of diacylglycerol?, in VI international Workshop on Seed Biology, Mérida Yucatán, México January, 1999.
- Verwoert, I I G S., van der Linden, K.H., Walsh, M.C , Nijkamp, H.J.J. and Stuitje, A R. (1995) Modification of *Brassica napus* seed oil by expression of the *Escherichia coli* *fab H* gene. encoding 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *Plant Molecular Biology* **27** 875-886
- Winter, E , Brummel, M., Scuch, R. and Spener, F. (1997) Decarboxylation of malonyl-(acyl carrier protein) by 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthases in plant fatty acid biosynthesis. *Biochem J* **321**: 313-318.
- XIV Censo comercial / censos económicos, 1994, INEGI.
- XIV Censo industrial. Industrias manufactureras, productos y materias primas, Subsector 31. productos alimenticios, bebidas y tabaco. censos económicos, 1994. INEGI.
- Zeevart, J A.D y Creelman, R.A.(1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol* **39**:439-473.

## Apéndice I: Composición de las soluciones empleadas.

### Disolución de PEG para asepsia

Poli(etilenglicol) (PEG)	16 % p/v
NaClO (cloro activo)	1.2 % v/v

pesar la cantidad necesaria para lograr una concentración del 20% de PEG, disolverla en un volumen de agua menor al volumen requerido, una vez disuelta trasladar cuantitativamente a un matraz aforado adecuado y llevar a la marca de aforo. Cuando se requiera la disolución agregar un 20% v/v de clorox a fin de que la composición final de la disolución sea la requerida.

### Disolución estéril de PEG

poli(etilenglicol) (PEG)	16 % p/v
--------------------------	----------

pesar la cantidad necesaria para lograr la concentración requerida, disolverla en un volumen de agua menor al volumen requerido, una vez disuelta trasladar cuantitativamente a un matraz aforado adecuado y llevar a la marca de aforo.

### Medio BMSA

Sacarosa	60 mM
Manitol	500 mM
MES - NaOH	10 mM pH 5.5
Ácido abscísico (ABA)	10 $\mu$ M

La disolución stock de ABA se prepara el momento de ser requerida.

## Ceruleina

Pesar la cantidad necesaria para cada tratamiento, disolverla en etanol absoluto burbujeado con nitrógeno, a fin de eliminar el posible oxígeno presente. Almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda preparar la disolución en el momento de ser utilizada

## Acetato de sodio

acetato de sodio	0.2 M
ajustar el pH a 5.5 con HCl	

## Mezcla de extracción de lípidos.

Cloroformo	50% v/v
Metanol	50% v/v

## Disolución de lavado

NaCl	1% p/v
ZnSO <sub>4</sub>	0.15% p/v

## Eluyente para la CCF

Disolvente	partes
Hexano	75
Éter etílico	25
Ácido acético glacial	1

## Estándares para identificación de las manchas en CCF

Se pesan 30mg de cada compuesto, en un tubo ependor y se disuelven en la *minima cantidad de hexano*.

Ácido palmítico (16:0)  
1-monopalmíticoil-rac-glicerol  
sn 1,2-dipalmíticoil-glicerol  
sn 1,3 dipalmíticoil-glicerol  
Tripalmítina

## Disoluciones para la hidrólisis química de los acilglicéridos

### A ) Medio de hidrólisis

Hidróxido de tetraetilamonio	0.005 M
2-pentanol	(disolvente)

Una alícuota de 0.5 mL de una disolución acuosa de hidróxido de tetraetilamonio 1 M se coloca en un matraz volumétrico de 100 mL y se lleva a la marca de aforo con 2-pentanol y se mezcla hasta que la disolución quede traslúcida. Alícuotas de entre 200 y 400  $\mu\text{L}$  se emplearon para hidrolizar 200  $\mu\text{L}$  de la fase cloroformica de la extracción de lípidos.

### B) disolución para detener la hidrólisis

Ácido clorhídrico	0.1 M
Clorhidrato de trietanolamina	0.017 M

La disolución es acuosa

### Líquido de centelleo

2,5-difeniloxazol (PPO)	0.4 %
1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benzeno (POPOP)	0.005 %

Disolver y llevar a la marca de aforo con tolueno, trabajar en la campana de extracción