



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE INSULINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS, SÍNTESIS DE
DNA Y SÍNTESIS DE RNA EN SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays L.*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ESMERALDA PAZ LEMUS



MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2005

m. 347381



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Esméralda Paz Lemus

FECHA: 11 / Agosto / 2005

FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente ESTELA SANCHEZ QUINTANAR
Vocal LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMAN
Secretario FRANCISCO RUIZ TERAN
1er. Suplente ALFREDO SALAZAR ZAZUETA
2do. Suplente AURORA LARA NUÑEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 103, departamento de bioquímica, edificio E, facultad de Química, UNAM.


Asesora del tema:
Dra. Estela Sánchez Quintanar.


Supervisor Técnico:
M en C. Raúl Aguilar.


Sustentante:
Esmeralda Paz Lemus



El maíz es un cultivo de gran importancia nutricional, económica, ambiental, histórica y social en México. Los mexicanos, su cultura y el campo están ligados intrínsecamente al desarrollo de este cultivo.

Por ser el centro de origen del maíz, mantener y proteger su biodiversidad es importante tanto para México como para el resto del mundo.

Memorias del Taller organizado por la iniciativa Pew sobre Alimentos y Biotecnología y la Fundación México-Estados Unidos para la Ciencia Septiembre 2003.

Agradecimientos



Gracias a Diosito por todo lo que me ha dado y por permitirme realizar uno de mis sueños.

Gracias a mis papis por darme la vida y todo su apoyo para cumplir todas y cada una de las metas que me he fijado y sobre todo por su amor incondicional. Los amo.

A mis hermanos Coral y Pepe, que siempre han estado ahí en las buenas y en las malas, han sido un aliciente para seguir adelante y han compartido conmigo los momentos más felices de mi vida.

A ti Marcovich por quererme tanto y darme la oportunidad de compartir extraordinarios momentos a tu lado, y ser parte importante de mi formación profesional, esta también va por ti amorcito.

A mis abuelitos que con sus consejos han contribuido a mi formación y que siempre llevo en mi corazón.

A mis tías y tíos Oli, Mine, Concha, Chuy, Vicky, Martha, Belén y Trinidad David, Lalo, Rica, Miguel, Juan, Marcos, Rutilio, Rubén y Raúl, por todos los bellos momentos que hemos compartido.

A mis primos por edades: Ana, David, Neto, Angélica, Rica, Liz, Triny, Pichorro, Diana, Rita, Edith, Santiago, Oscar, Gerardo, Ulises, Sabulin, Cinthya, Eduardo y Daniela, por compartir momentos maravillosos conmigo.

A mis padrinos, porque siempre han estado dispuestos a apoyarme y sobre todo porque han confiado en mí.

A todos mis amigos Iraís, Norma, Lorena, Blondie, Jazmín, Joca, Ana, Wendy, Javier, Pancho, Emilio, Toro, Cesar, Atahualpa, Seco, Nacho, Edgar, Víctor Hugo, Edgar, Joe, Chuy, Ruy, Ali, Cris, Claus y demás gracias por hacer de mi vida algo emocionante y confirmar que una amistad vale más que todo el oro del mundo.

A mis compañeros de Laboratorio: Eriquita, Normita, Rebe, Lourdes, Hilda, Augusto, Cesar, Ricardo, Homero, Pilo, Dairo, Luzma y Martín por hacer mi estancia maravillosa e inolvidable.

A el departamento de alimentos por permitirme participar con ellos en actividades extracurriculares, especialmente gracias a Lucy, Lulu Gómez, Lulu Osnaya, Lety, Marcela y Reyó.

A LEFIX y Asociados, por todo su apoyo en la realización de este trabajo y por contribuir en mi formación profesional.

A la Dra. Estela Sánchez, por compartir sus conocimientos conmigo y enseñarme a dar lo mejor de mí siempre.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones.

A Raúl Aguilar, por ayudarme en el diseño experimental junto con Pilo y Martín.

Al apoyo de DGAPA IN207903

Al Subprograma 127 formación básica en investigación periodo 2003-2004 Facultad de Química UNAM.



De maíz amarillo y de maíz blanco se hizo su carne;

De masa de maíz se hicieron los brazos y

las piernas del hombre.

Únicamente masa de maíz

Entró en la carne de nuestros padres...

Popol Vuh

*Radiante y Perenne es la sabiduría; se deja ver sin dificultad por los que la aman
y hallar por los que la buscan;*

Se adelanta para manifestarse a los que la anhelan;

quien madruque para buscarla no se agotará,

pues la encontrará sentada a sus puertas.

Sabiduría 6,12-14

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU



GOYA, GOYA, CACHUN ,CACHUN, RA, RA, CACHUN, CACHUN, RA, RA, GOOYA

UNIVERSIDAD

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	4
▪ Hormonas de crecimiento en plantas	4
▪ Composición de la semilla de maíz	5
▪ Importancia evolutiva y alimentaria de las semillas	5
▪ Germinación de las semillas	6
▪ Eventos Moleculares durante la germinación	7
▪ Mecanismo de síntesis de proteínas en eucariotes	8
▪ Estructura del ribosoma de eucariotes	9
▪ El proceso de síntesis de proteínas	10
▪ La síntesis de proteínas en plantas	11
▪ Control Traduccional	12
▪ Rutas de señalización que inciden en el control traduccional	12
▪ Vías de señalización en plantas	14
▪ Características generales del ciclo celular	16
▪ Fases del ciclo celular	17
▪ Ciclo celular en plantas	19
▪ Regulación del ciclo celular	20
JUSTIFICACION	23
HIPOTESIS	25
Objetivos general	25
Objetivos particulares	25
Metas experimentales	25
Estrategia experimental	26

MATERIALES Y METODOS

- Material Biológico 27
- Germinación de las semillas de maíz 27
- Disección y cuantificación del peso del eje embrionario 27
- Separación de los tejidos del eje embrionario 28
- Incorporación de [³⁵S]- Metionina – Síntesis de proteínas 31
- Incorporación de [³²P]-Ortofosfato - Síntesis de rRNA 31
- Incorporación de [³H]-Timidina - Síntesis de DNA 34

RESULTADOS

- Efecto de insulina en la síntesis de proteínas totales en la radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz 36
- Efecto de insulina en la síntesis de proteínas ribosomales y citoplásmicas en la radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz 37
- Efecto de insulina en la síntesis de rRNA en radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz 42
- Efecto de insulina en la síntesis DNA en radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz 43

DISCUSION DE RESULTADOS

CONCLUSIONES 48

BIBLIOGRAFIA 49

Referencias bibliográficas que no se citan en el texto 61

ANEXO I

- Curva patrón de albúmina (Bradford) 64
- Cálculos para analizar la síntesis de proteínas 65
- Cálculos para el análisis de la síntesis de DNA 70

ANEXO II

- Soluciones para el análisis de proteínas 71
- Soluciones para el análisis de rRNA 73
- Soluciones para el análisis de DNA 74

RESUMEN

Anteriormente se han realizado estudios sobre el efecto de insulina durante la germinación de maíz y se ha demostrado que induce la fosforilación de la proteína ribosomal S6 la cual participa en la regulación de la síntesis de proteínas durante este proceso (Sánchez de Jiménez y col., 1997a y 1997b). Esta respuesta al estímulo con insulina es similar a la descrita en mamíferos (Sánchez de Jiménez y col., 1999) lo cual sugiere la posibilidad de la existencia de una ruta de transducción de señales en maíz semejante a la inducida por insulina en animales.

Por otro lado, también se ha demostrado que insulina incrementa la síntesis de DNA en ejes de maíz (García-Flores C, 2002) por lo cual se piensa que también podría tener efectos en la regulación del ciclo celular de plantas como ocurre en animales.

El objetivo de este trabajo es definir cuales son los efectos que presenta la insulina en la germinación de las semillas de maíz y así sentar las bases para caracterizar, o bien, hacer un símil entre plantas y animales para justificar la presencia de factores de crecimiento semejantes en plantas; utilizando como modelo de estudio el coleoptilo y la raíz del eje embrionario se desarrollaron ensayos in vivo, los cuales consistieron en exponer ejes embrionarios de diferentes tiempos de germinación al estímulo con insulina (200 μ U/ml) (García-Flores y col., 2001), en presencia de marcadores radiactivos:

[³⁵S]- Metionina como indicador de síntesis de proteínas

[³H]-Timidina, como indicador de síntesis de DNA y

[³²P]- Ortofosfato, como indicador de síntesis de RNA.

Para realizar el análisis se llevó a cabo la extracción de cada una de estas biomoléculas mediante el uso de diferentes técnicas de biología molecular que posteriormente serán explicadas y se cuantificó la marca radiactiva incorporada tanto en el lote control como al tratar con insulina y rapamicina (inhibidor de la actividad de la mTOR)

En los resultados obtenidos, encontramos que la insulina induce el incremento preferencial en la síntesis de proteínas ribosomales en la raíz, y en el coleoptilo no se observa un efecto claro y contundente. Esto indica que el efecto insulina es tejido específico. En cuanto a la síntesis de DNA y rRNA, también se observó un incremento únicamente en la raíz y no así en coleoptilo.

Estos resultados ponen en evidencia que la insulina incrementa la síntesis de proteínas, DNA y RNA en ejes de maíz, de manera tejido específico y que la raíz es el tejido blanco en este sistema biológico.

INTRODUCCION

Los reguladores de crecimiento son compuestos endógenos de estructura peptídica que juegan importantes tareas en la regulación de la diferenciación y crecimiento en los organismos animales.

La insulina y los IGF's (Insulina-like growth factors), se han caracterizado como reguladores de procesos biológicos de las células eucariotas durante su crecimiento y sobrevivencia, además de inducir la traducción selectiva de mRNAs (Meyuhas y col., 1996; Martelli et al., 1999). En efecto, estos factores modulan la síntesis de proteínas por la estimulación de una ruta de transducción de señales que ha sido estudiada en animales.

Actualmente se ha descubierto que los efectos reguladores de insulina/IGF son realizados a través de diferentes vías de señalización, con la participación de un receptor tipo tirosina cinasa, la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía dependiente de fosfolípidos y otras (Pertseva y col., 2003). En plantas no hay reportes que indiquen la existencia de factores de crecimiento del tipo IGF-I e IGF-II, ni de las vías de transducción que estos factores pudieran estar regulando. Sin embargo, algunos estudios previos indican la presencia de péptidos semejantes a Insulina/IGFs en diferentes sistemas vegetales, a los cuales, no se les ha relacionado con una función endógena determinada. (Kazuky y Hisashi; 2004, García y col., 2001).

El objeto de este trabajo de investigación, es el de contribuir al conocimiento de los factores que regulan el control traduccional, el crecimiento y la proliferación celular en plantas.

Además se pretende proporcionar evidencia sobre la similitud entre los sistemas animales y los de plantas en cuanto a sus mecanismos de crecimiento y proliferación y la evolución paralela de ambos.

ANTECEDENTES

Hormonas de crecimiento en plantas:

Se sabe que sustancias llamadas hormonas del crecimiento tienen funciones determinantes en el desarrollo y crecimiento de las plantas, es claro que también el ambiente puede modificar este desarrollo (Salisbury y Ross., 1994).

Para entender como puede una hormona afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas es necesario definir lo que es una hormona: es un compuesto orgánico que se sintetiza en alguna parte de la planta y posteriormente es translocada a otra parte de la planta, en donde, a concentraciones muy bajas causa una respuesta fisiológica (Salisbury y Ross., 1994).

Hasta la fecha se han descrito cinco grupos de hormonas vegetales que son:

- Auxinas,
- Giberelinas,
- Citocininas,
- Ácido Abscísico y
- Etileno

Sin embargo en los últimos años ha cobrado relevancia el descubrimiento de ciertos factores de crecimiento denominados IGF's que en animales ya han sido caracterizados y los resultados indican que estos factores de crecimiento, cuya actividad es semejante a la insulina, tienen una importante función en el crecimiento y proliferación celular (Meyuhas y col., 1996; Martelli et al., 1999). En plantas no han sido tan estudiados como en animales pero se tiene evidencia clara de su existencia.

Para comenzar a introducir el tema es necesario definir como está formada la semilla de maíz y posteriormente como transcurre la germinación lo cual permitirá entender los experimentos que se llevaron a cabo durante la realización de esta tesis.

Composición de la semilla de maíz:

La semilla de maíz está constituida por estructuras biológicas sumamente complejas, las cuales están formadas por un tejido de reserva, un embrión y una cubierta protectora (Kigel y Galili., 1995).

El maíz (*Zea mays L.*) es una planta que pertenece a la familia de las gramíneas en el grupo de las monocotiledóneas. En la semilla de maíz existe un único embrión rodeado por un tejido de reserva llamado endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo que lo rodea (Fig. A).

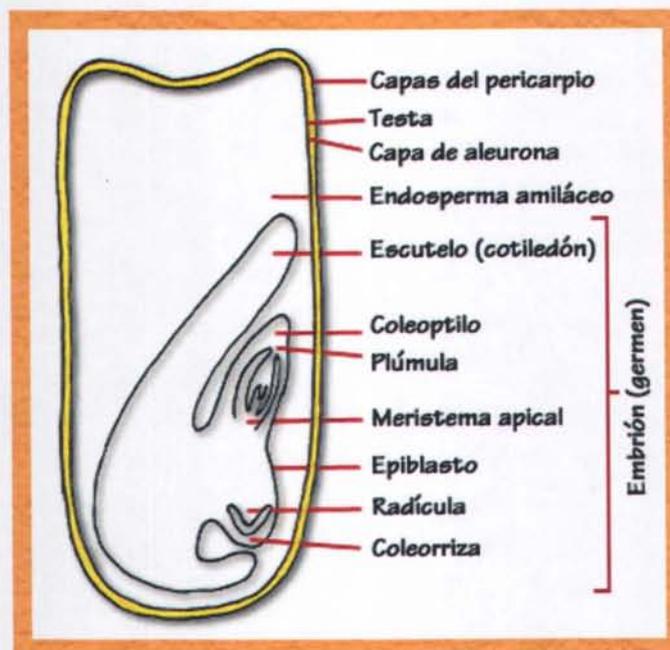


Figura A: estructura de la semilla de maíz

Importancia evolutiva y alimentaria de las semillas

Las semillas han jugado una posición crítica en la evolución de las plantas superiores ya que son la forma de dispersión de estos

organismos. El éxito con el cual una planta superior se establece depende en gran parte de las propiedades fisiológicas y bioquímicas de sus semillas, debido a que en las etapas más tempranas del desarrollo, el establecimiento de la planta depende de la calidad de los nutrientes almacenados en ellas (Bewley y Black., 1994). Por otro lado, la nutrición de las poblaciones humanas depende también, en gran medida de las semillas por sus reservas alimenticias. Las semillas de cereales y leguminosas son la base de la alimentación ya que sus reservas están constituidas por carbohidratos, aceites y proteínas las cuales fueron almacenadas durante el desarrollo y maduración.

Germinación de las semillas

La germinación es un proceso que inicia con la captura de agua por la semilla (imbibición) y termina con la protrusión de la radícula que usualmente coincide con la elongación del eje embrionario.

Este proceso incluye numerosos eventos entre los que destacan la hidratación de membranas y proteínas, cambios en estructuras subcelulares, incremento en la respiración, síntesis de macromoléculas y elongación celular, la mayoría de los cuales no son únicos de este proceso.

Todos ellos combinados transforman el embrión deshidratado y en reposo, con un metabolismo casi indetectable, en un embrión con un metabolismo vigoroso que culmina con su crecimiento y desarrollo. En un sentido estricto la germinación no incluye el crecimiento de la plántula, pero sí del embrión. El momento exacto en el que finaliza la germinación se ha considerado como la profusión de una parte del embrión, que frecuentemente es la radícula (Bewley y Black., 1994). Este evento puede ser el resultado de la elongación celular, la división celular o de ambos.

de las semillas de maíz, aún antes de la síntesis de RNA's mensajeros (Spiegel y Marcus, 1975; Sánchez de Jiménez y Aguilar, 1984; Bewley y Marcus, 1990). Hay sobradas evidencias de que en los embriones quiescentes de cereales existen muchos de los componentes requeridos para el proceso de síntesis de proteínas (Bewley y Black, 1994). Sin embargo en esta etapa del desarrollo no hay polisomas formados, lo cual indica que no hay actividad de síntesis de proteínas (Sánchez de Jiménez y col. 1981). Se ha visto que a partir de la imbibición la cantidad de polisomas activos comienza a incrementarse rápidamente (Dommes y Van de Walle, 1990; Pramanick y col. 1992). En esta etapa temprana la traducción tiene lugar a partir de un conjunto de mRNAs específicos producidos durante la maduración de la semilla y son almacenados en el eje embrionario en estado quiescente. Se ha considerado por numerosos autores que la traducción de estos mensajes ocurre de manera diferencial ya que algunos de ellos son traducidos en etapas muy tempranas de la germinación, otros se traducen de manera más tardía, mientras que algunos no se traducen y son degradados (Sánchez de Jiménez y Aguilar 1984; Sánchez-Martínez y col. 1986; Bewley y Marcus, 1990). Este fenómeno se debe a la existencia de un control transcripcional de los mensajes sintetizados y almacenados durante la maduración de la semilla los cuales codifican para proteínas que serán requeridas durante la germinación. Se ha demostrado además que la síntesis de proteína se realiza en tejidos específicos. En maíz se ha reportado que la síntesis de proteínas ocurre principalmente en el eje embrionario, el cual tiene altos niveles de mRNA (Sánchez de Jiménez y col. 1981).

Mecanismo de síntesis de Proteínas en eucariotes

La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares de mayor consumo de energía, por lo que su regulación está finamente acoplada al estado metabólico de las células (Warner, 1999; Pestova y Hellen, 2000; Rutter y col., 2002). La proliferación celular normalmente requiere que la célula en crecimiento ajuste su capacidad de biosíntesis de proteínas en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, así como a la presencia de factores de crecimiento y otras señales químicas. Esa respuesta involucra cambios coordinados, ya sea en la velocidad de traducción, así como en la abundancia de la maquinaria de síntesis en sí, específicamente en el contenido de ribosomas. El acoplamiento estrecho entre número de ribosomas y velocidad de crecimiento es entendible desde dos puntos de vista. Primero, cuando las células están en sus velocidades máximas de crecimiento, bajo las condiciones óptimas, es necesaria una alta concentración de ribosomas para sustentar las demandas de síntesis de proteínas. Segundo, como la síntesis de ribosomas es energéticamente muy costosa, para conservar sus recursos, las células deben limitar la producción de nuevos ribosomas bajo condiciones en las cuales la demanda de síntesis de proteínas es baja, tal como ocurre cuando los nutrientes están en condiciones limitantes (Proude, 2002; Bougnet y col., 2003). La síntesis de proteínas es también uno de los procesos celulares más complejos, que involucra la acción concertada de muchas moléculas de RNA y proteínas, en múltiples pasos secuenciales (Pestova y Hellen, 2000).

Estructura del ribosoma de eucariotes

Los ribosomas de eucariotes son complejos ribonucleoproteicos con un coeficiente de sedimentación 80S. Este complejo está formado por dos subunidades distintas con coeficientes de sedimentación de 60S (subunidad grande) y 40S (subunidad pequeña). La subunidad grande

contiene cerca de 50 proteínas diferentes y 3 moléculas de rRNA de 5S, 5.8S y 28S respectivamente. Por otro lado la subunidad pequeña consta de una molécula de rRNA 18S y aproximadamente 30 proteínas diferentes (Lewin, 1997).

El proceso de síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas es parte integral de la expresión genética y contribuye en la modulación de la expresión de genes específicos y se divide en tres fases principales:

- **Iniciación:** donde ocurre el reconocimiento del RNA mensajero por parte del complejo de traducción. Como primer paso se produce la interacción entre la subunidad ribosomal 40S y los factores eIF-3 y eIF1A; el RNA de transferencia que porta el primer aminoácido (tRNA-Met) y el factor eIF-2 se unen para formar un complejo, el cual interactúa con el extremo 5' del mRNA previamente reconocido por los factores eIF-4 (4F, 4G, 4A y 4B) (Kosak, 1991); posteriormente se posiciona el tRNA-Met en la tripleta de iniciación AUG, se liberan los factores de iniciación y se une la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S (Pain, 1996).
- **Elongación:** Ha sido poco estudiada en eucariotes pero se considera que ocurre de manera similar a los procariotes, con la participación de los factores de elongación eucarióticos eEF1A y 1B y el eEF2 (Merrick, 1992). Esta fase de elongación involucra la adición secuencial de aminoácidos con la formación de enlaces peptídicos, mediante la actividad peptidil transferasa, de una ribozima y un grupo de fosfoproteínas ácidas de la subunidad 60S que coadyuvan a la progresión de la elongación (Möller, 1990; Remacha y col., 1995)
- **Terminación:** La fase de terminación ocurre cuando aparece el codón de terminación (UAA, UAG, UGA) que no puede ser reconocido por ningún tRNA, estos codones son reconocidos por

los factores de terminación y posteriormente el factor de liberación eRF promueve la ruptura del peptidil-tRNA, liberándose así la proteína. El GTP enlazado al factor eRF reconoce al codón de terminación e induce la hidrólisis del aminoacil enlazado, conjuntamente con la hidrólisis del GTP. Finalmente se liberan el péptido, el factor eRF y GDP (Browning y col., 1990).

En organismos eucariotes se han encontrado solo dos factores de terminación denominados eRF1 y eRF3 de los cuales eRF1 es capaz de reconocer los tres codones de terminación y eRF3 tiene actividad de GTPasa dependiente de la formación del complejo eRF1/eRF3 (Merkulova y col. 1999).

La síntesis de proteínas en plantas

En el caso específico de las plantas, el mecanismo de síntesis de proteínas y los factores que lo regulan son temas cuya investigación se ha incrementado en los últimos años (Browning, 1996; Gallie, 1996; Bailey-Serres, 1999; Dinkova y col., 2000). Se han realizado múltiples estudios sobre la actividad de los factores eIF-4F, 4A, 4G, 2 α , y algunos relacionados con su modificación por fosforilación (Browning, 1990; Webster y col., 1991; Le y col., 1997). Una de las características más importantes en plantas, con respecto a los mamíferos, es el descubrimiento de dos isoformas antigénicamente distintas, pero funcionalmente similares para el complejo eIF4F denominadas eIFiso4F y eIF4F (Browning y col., 1992). Cada uno de estos complejos tiene componentes eIF4e y eIF4G diferentes por lo cual en plantas hay dos isoformas eIF4E/eIFiso4E y dos isoformas eIF4G/eIFiso4G (Browning y col., 1998).

A pesar de que no existen homólogos de las proteínas de unión al factor eIF4E en plantas, recientemente se reportó que la lipooxigenasa tipo 2 de *Arabidopsis thaliana* puede hacer interacciones con eIF4E /eIFiso4E

a través de una región similar al motivo conservado de unión del eIF4E (Freire y col., 2000).

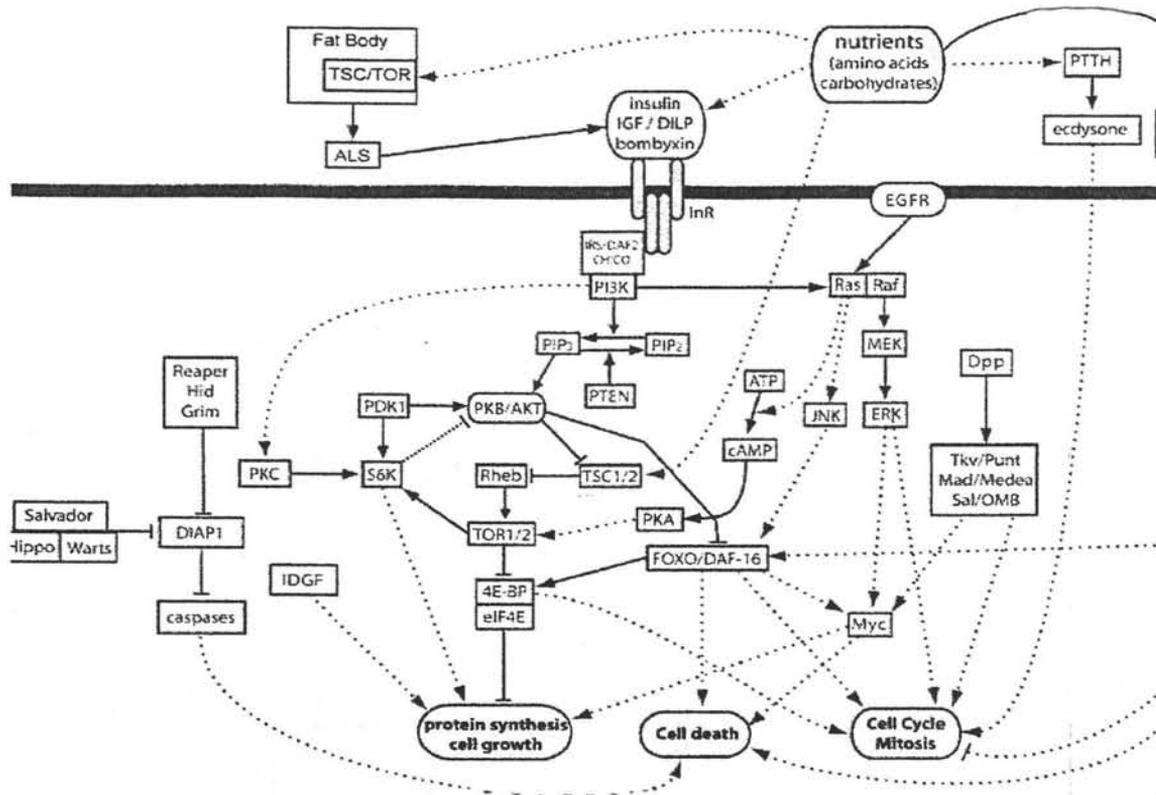
Control Traduccional

La expresión de la mayoría de los genes es regulada temporal y espacialmente. Esta regulación ocurre en múltiples pasos y a diferentes niveles: en la síntesis y degradación del RNA, incluyendo la transcripción, el procesamiento, transporte y estabilidad del mRNA; en alguno de los pasos de la traducción, así como en la estabilidad de la proteína y sus modificaciones postraduccionales (Clemens y Bommer, 1999; Gringas y col., 2001).

Rutas de señalización que inciden en el control traduccional

La insulina y los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) son los efectores mejor caracterizados de la vía de transducción que regula la síntesis de proteínas. Estudios extensivos de la biología de la insulina y de los IGFs, han mostrado que el sistema insulina/IGF está compuesto de dos subsistemas complementarios e interactuantes que gobiernan el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la longevidad de las células, (Saltiel y Kahn, 2001; Oldham y Hafen, 2003). Por un lado, la insulina, secretada por las células β del páncreas en respuesta a altas concentraciones de glucosa sanguínea, regula principalmente el metabolismo anabólico en tejidos clásicos sensibles a insulina como el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Saltiel y Kahn, 2001). Por otro lado encontramos a los denominados IGFs que al ser regulados por la hormona de crecimiento, son esenciales para regular el crecimiento y el tamaño corporal tanto de manera prenatal (IGF-I e IGF-II) como de manera postnatal (IGF-I) (Efstratiadis, 1998).

Los receptores de insulina e IGFs son miembros de una familia de receptores para factores de crecimiento tipo cinasa de residuos de tirosina (Ulrich y Schlessinger, 1990), ubicados en la membrana plasmática de las células blanco. Estos receptores se activan con la unión de insulina o IGFs provocando su actividad intrínseca de tirosina cinasa que inicia una cascada de reacciones, que involucra múltiples rutas de señalización, tales como las vías de fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), responsables de los diversos efectos de estos factores de crecimiento, tales como los incrementos en el tamaño celular, en la síntesis de proteínas, la división celular, en la migración celular y la inhibición de la apoptosis (Butler y col., 1998; Peruzzi y col., 1999; Imani y Clemons, 1999). Los estudios sobre el control de crecimiento en levaduras han mostrado que es necesario llegar a un tamaño para iniciar la división celular (Kozma y Thomas, 2002). En este sistema se ha demostrado que en condiciones que impiden el crecimiento celular; tales como falta de nutrientes, la división celular se arresta, mientras que mutaciones que arrestan el ciclo celular no inhiben el crecimiento celular (Kozma y Thomas, 2002). Otros estudios indican también que el crecimiento y proliferación, aunque son procesos distintos, están asociados, ya que la proliferación requiere previamente del crecimiento (Johnson y col., 1997; Kozma y Thomas, 2002). Estos estudios, han ayudado a volcar la atención sobre la maquinaria del ciclo celular que dirige la proliferación en respuesta a mitógenos, a las rutas de señalización que controlan el crecimiento celular a través de la regulación de los eventos anabólicos requeridos para que la célula se duplique a sí misma exactamente. En la siguiente figura se muestra la vía propuesta de transducción de señales inducida por insulina/IGFs. (Nijhout H., 2003)



Compilación de algunas de las principales vías e interacciones discutidas en el Arolla Workshop 2003. Las interacciones representadas aquí sin duda alguna no ocurren simultáneamente, no están todas ellas presentes en todos los tipos celulares o en todas las especies. Muchas de las proteínas representadas están codificadas por múltiples familias de genes, y diferentes homólogos pueden expresarse en diferentes contextos y pueden tener diferentes efectos. Asociaciones en membrana y localizaciones en citoplasma/núcleo no están indicadas. Las flechas punteadas indican multi-etapas indirectas o vías hipotéticas.

Vías de señalización en plantas

En plantas no hay reportes que indiquen la existencia de factores de crecimiento del tipo IGF-I e IGF-II, ni de las vías de transducción que estos factores pudieran estar regulando. Sin embargo, algunos estudios previos indican la presencia de péptidos semejantes a Insulina/IGFs en diferentes sistemas vegetales, a los cuales, no se les ha relacionado con una función endógena determinada, (Kazuky y Hisashi; 2004, García y col., 2001)

Al respecto se reportó en espinaca y *Lemna gibba*, la existencia de un péptido que es reconocido por anticuerpos contra insulina (Collier y col., 1987). Se reportó también una proteína de reserva en soya de 4

kDa, capaz de unirse a los receptores de insulina de bovino (Hirano y col. 1992).

Posteriormente se reportó la existencia de una proteína leg-insulina en hojas de Lupino (Ilgoutz y col., 1997) y recientemente se aisló un péptido de la fracción proteica de semillas de frijol de soya con una secuencia de aminoácidos semejante a un segmento de la cadena B de insulina de bovino (Olivera y col. 1999). Experimentos con algunos de estos péptidos han demostrado que son responsables de estimular la toma de glucosa en tejidos animales (Collier y col., 1987; Oliveira y col., 1999). Sin embargo no se ha estudiado el efecto regulatorio de estos péptidos endógenos en las plantas de origen. Por otra parte un reporte señala el efecto estimulador de insulina en la germinación de semillas de sandía y pepino, indicando que estos péptidos provocan un incremento en la actividad enzimática, que favorece considerablemente al desarrollo de la plántula (Goodman y Davis, 1993).

Se ha demostrado además, la existencia de receptores membranales similares a los receptores de factores de crecimiento en animales (Walter, 1994; Braun y Walker, 1996; Becraft, 1998). Los cuales son capaces de autofosforilarse en residuos de serina y treonina (Becraft y col., 1996; Jin y col., 2000). Esto apoya la idea de que en plantas, las vías de transducción de señales pudieran ser similares a algunas de animales, mediadas por fosforilación de varios sustratos (Watanabe y col., 1994; Tojanek y col., 1996; Hirt, 2000).

En trabajos recientes desarrollados en el laboratorio se ha identificado, en extractos de ejes embrionarios de maíz, un péptido que reacciona positivamente a los anticuerpos contra insulina bovina (Zm-IGF); el cual mostró un efecto similar a insulina en el proceso de germinación de maíz, y que son característicos de la vía de transducción de señales regulada por insulina y los IGFs (García-Flores y col., 2001). Además se ha demostrado la presencia de una vía de transducción de señales que es estimulada por Zm-IGF o insulina y que involucra a la enzima ortóloga en

maíz de la p70^{S6k} de mamíferos (Reyes de la Cruz y col. 2004) ya que estos factores inducen un incremento en la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Se ha visto también; que al tratar los ejes con insulina o Zm-IGF se induce un incremento marcado en el reclutamiento de mensajeros tipo 5'TOP (Stewart y Thomas, 1994; Meyuhas y col., 1996) hacia polisomas, como son los de las proteínas ribosomales y del factor de traducción eIF4E (Dinkova y col. 2000).

Características generales del ciclo celular

El ciclo de división celular en eucariotes ocurre a través de una serie de procesos interrelacionados que se han desarrollado para crear dos células hijas genéticamente idénticas de una célula madre. La función principal de este ciclo es la replicación fiel del genoma y su empaquetamiento en los cromosomas (García-Flores, 2002).

El desarrollo de un organismo multicelular requiere de la ejecución precisa de procesos entre los que se incluyen crecimiento, proliferación y diferenciación. El ciclo celular es una secuencia coordinada de replicación de DNA y mitosis y es coordinado por vías de señalización, por lo que la regulación de este y sus efectos en el desarrollo celular es sumamente complejo (Levine E., 2004).

Los procesos involucrados en el ciclo celular pueden distinguirse estructural y bioquímicamente en fases de actividad reconocidas como periodos del ciclo celular. El ciclo celular está formado por 4 fases diferentes: la fase **G1**, que es un periodo de crecimiento celular, la fase **S** donde ocurre la síntesis de DNA, la fase **G2** que es una segunda fase de crecimiento celular y finalmente, la fase **M** (mitosis) donde tiene lugar la división de la célula (Coleman, Marshall y Olson 2004).

La duración promedio del ciclo celular varía de un tipo celular a otro, y aún dentro del mismo tipo celular, esto se debe a que las células se dividen a diferentes velocidades. (Curtis H., Flores,G. , 2000). La diferencia principal entre las células que se dividen lenta o rápidamente, está dada por la duración o el tiempo en que la célula permanezca en la fase G₁ (Cheatham et al. 1995).

Fases del ciclo celular

Fase G₀

Es un estado celular discreto y separado con un patrón metabólico único (Baiza et al., 1989), se le ha definido como un estado en el que las células se encuentran quiescentes o durmientes. Antes de alcanzar el punto R las células pasan de G₁ a este estado de reposo en el cual pueden permanecer días, semanas ó incluso años (Curtis H., Flores,G. , 2000).

Fase G₁

La duración de esta etapa es muy variable y la diferencia principal entre las células que se dividen lenta y rápidamente es el tiempo que la célula permanezca en esta fase. (Cheatham et al., 1995)

Dentro de esta fase se encuentra una etapa temprana en la que se revisa el estado metabólico general de la célula, antes de avanzar hacia una etapa tardía en la cual se presentan mecanismos reguladores hacia el inicio de la duplicación del DNA. Esta etapa se denomina punto de restricción **R** (Curtis H., Flores,G. , 2000)

Antes del punto de restricción **R** de esta fase, la célula puede emprender el camino hacia diferentes estados celulares como la quiescencia, la diferenciación o la meiosis, mientras que al concluirla la célula está comprometida para dividirse.

Esta es la fase en la que la célula en división puede abandonar el ciclo celular hacia un estado de desarrollo vegetativo o de diferenciación, la

determinación del camino que una célula debe seguir esta regulado en parte por factores externos como:

- hormonas,
- circunstancias nutricionales,
- estrés,
- Factores ambientales (luz, temperatura, humedad, etc.)

Estos factores afectan la fase G1 antes del punto R.

Durante la fase G1 se inicia el crecimiento de la célula, lo cual se caracteriza por un aumento en la masa celular, el tamaño del núcleo, el número de ribosomas, el metabolismo del rRNA, la síntesis de otros tipos de RNAs y el cambio en los niveles de las diferentes polimerasas.

También se incrementa la síntesis de proteínas como:

- calmodulina
- ornitina descarboxilasa
- p53
- proteínas citoplásmicas
- enzimas que interviene en el proceso de duplicación de DNA
- histonas.

Durante G1 hay cambios muy evidentes en la morfología de la célula los cuales continúan durante todo el ciclo celular.

Fase S

En esta fase se realiza la duplicación del genoma y su duración parece estar determinada por el número de sitios de iniciación que operan. Existe un orden temporal de duplicación dentro de los diferentes segmentos de un solo cromosoma, el cual se conserva a través de las divisiones sucesivas.

Por otra parte la síntesis de histonas (con algunas excepciones) está restringida a la fase **S** y sólo durante esta etapa las secuencias del mRNA para las histonas se encuentran en cantidades significativas en el

núcleo y en el citoplasma; lo cual implica que hay síntesis activa de dichos mRNA. (Curtis H., Flores, G., 2000)

Fase G2

Esta fase representa el tiempo que la célula necesita para sintetizar los elementos necesarios para la condensación cromosómica y la formación del aparato mitótico a los cuales se ha denominado "factores mitóticos" y se caracterizan por tener afinidad con la cromatina y son del tipo de las histonas (Navarrete y col., 1983; Cuadrado y col., 1985)

Mitosis

Una vez terminada la fase G2, las células entran en la fase de mitosis en la cual surgen grandes cambios estructurales. En esta fase el aparato mitótico asegura la separación equitativa de los cromosomas, también se requiere de factores relacionados con la condensación y descondensación de la cromatina y con la retracción y reestructuración de la envoltura nuclear.

La tasa de síntesis de proteínas se reduce a un 20% durante la mitosis con respecto a la tasa que se detecta en células en interfase. Aparentemente la disminución se debe a una inhibición en la iniciación de la traducción, de tal manera que los ribosomas no pueden unirse al mRNA.

Ciclo celular en plantas

El análisis del ciclo celular y su regulación en plantas superiores no está tan avanzado como en animales y microorganismos.

Se sabe que en semillas de maíz la mayor parte de células embrionarias están bloqueadas en la fase G1 del ciclo celular (Deltour y Jacquard, 1974), y aún después de las 12 horas del inicio de la imbibición, la

mayoría de las células (75%) permanecen en fase G1. Aún cuando un porcentaje importante de las células se empieza a mover hacia la fase S a este nivel no se detectan células en mitosis (Baiza y col., 1989; Georgieva y col., 1994a).

Esto implica que en los ejes embrionarios de las semillas de maíz, el alargamiento precede a la división celular. Sin embargo en otras semillas, la diferencia en tiempo entre la división y el alargamiento es cercana, pero no existen evidencias fuertes que confirmen que la división anteceda al alargamiento (Vázquez-Ramos, 2000).

Por otra parte se sabe que los reguladores de crecimiento vegetal como auxinas y citocininas intervienen en el ciclo celular, por lo que tienen una función importante en la regulación del desarrollo y crecimiento vegetal (Salisbury y Ross., 1994).

En maíz se han hecho estudios del ciclo celular durante la germinación, utilizando marcadores proteicos, fitoreguladores como citocininas y ácido abscísico (ABA), lo cual ha permitido determinar que la semilla seca cuenta con niveles basales de proteínas tales como: DNA polimerasas, la cinasa p34^{cdc2}, ciclina B, ciclina C, cinasa cdk, proteína p53 y E2F, y los niveles de estas proteínas varía durante la germinación (Vázquez-Ramos, 2000).

Aunque ya existen avances relevantes, todavía no se sabe con claridad cuales son las vías que están involucradas en la regulación por factores de crecimiento, del ciclo celular en plantas.

Regulación del ciclo celular:

Las células en división de diferentes especies muestran variaciones características en la duración y el patrón del ciclo celular pero en general en todos los organismos es importante que las células se dividan sólo cuando hayan alcanzado el tamaño suficiente para asegurar que

las células hijas resultantes contengan toda la maquinaria metabólica necesaria para la supervivencia (Curtis H., Flores, G., 2000). Esto implica que el crecimiento celular es un prerequisite para que las células puedan dividirse.

Un aspecto fundamental de este crecimiento lo constituye la biogénesis de ribosomas, la cual constituye la maquinaria para sintetizar nuevas proteínas y asegurar el contenido biológico de las células hijas.

En ciertas condiciones, las células no son estimulables y permanecen en un estado de reposo o G_0 . Para salir de este estado se requiere que sean estimuladas por factores de crecimiento.

Por otra parte la síntesis de macromoléculas como DNA, RNA y proteínas, está regulada de un modo característico durante el ciclo celular. El DNA y las histonas, componentes de la cromatina se sintetizan solamente durante la fase S. El RNA y las proteínas citoplásmicas se sintetizan continuamente durante toda la interfase. Sin embargo, durante la mitosis disminuye dicha síntesis.

La regulación de la proliferación celular se ha atribuido a la etapa G_1 del ciclo celular (Jones y col., 1999). Se ha estudiado también la importancia de $p70^{S6k}$ durante la mitosis. Al respecto se determinó que $p70^{S6k}$ tiene una función esencial durante G_1 fosforilando a la proteína S6 de la subunidad ribosomal 40S con lo cual se promueve la síntesis de proteínas durante esta fase, este es uno de los requisitos determinantes para que la célula pase a la fase S, por tanto, $p70^{S6k}$ además de formar parte de una vía de transducción de señales, también es un factor que interviene en la regulación de la progresión del ciclo celular (Lane y col., 1993).

Se ha demostrado que la rapamicina inhibe la actividad de $p70^{S6k}$ y las regiones amino y carboxilo también participan en su regulación celular (Cheatham y col. 1995). La actividad de $p70^{S6k}$ se incrementa cuando se adicionan factores de crecimiento mediante un mecanismo en el

cual participan las proteínas G (Chou y Blenis., 1996; Takuwa y col., 1999; Jones y col., 1999).

La progresión de las fases del ciclo celular requiere de la acción de diversos factores. Las investigaciones en los últimos años se han concentrado en eventos postraduccionales como fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas como ciclinas (Evans y col., 1983), cinasas dependientes de ciclinas (cdk) y los complejos ciclina/ cdk (Pines, 1993; Hutchison y Glover, 1995), debido a que son los mecanismos principales que controlan eventos importantes en la interfase y mitosis.

Se ha comprobado que los controles regulatorios básicos de la división celular están evolutivamente conservados en plantas y dada la facilidad de generar plantas transgénicas en comparación con la posibilidad de obtener animales transgénicos, las plantas ofrecen un sistema experimental excelente para el control de la división celular durante el desarrollo de un organismo multicelular.

Como resumen podemos decir que existen factores que controlan la proliferación celular, tales como: ATP, AMPc, GMPc, tamaño nuclear y celular, síntesis y cantidad de rRNA, síntesis de proteínas ribosomales, fosforilación y desfosforilación de histonas, síntesis ó fosforilación de no histonas y la presencia de proteínas catalogadas como factores de crecimiento (IGF-I e IGF-II). Aunque estas investigaciones se han desarrollado en animales y la información en plantas aún es escasa para definir del todo la regulación del ciclo celular, se sabe que las bases generales del ciclo celular en plantas es semejante al de animales (Meyuhas y col., 1996)

JUSTIFICACIÓN

La investigación en animales sobre la regulación de la expresión genética durante los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular ha presentado avances importantes, tal es el caso del proceso de traducción y los mecanismos que la regulan (Meyuhas et al., 1996; Bushell et al., 2000; Raughth et al 2000). A este respecto existen reportes que indican que la insulina y los factores de crecimiento "insulin -like" (IGF's) regulan tanto el crecimiento como la proliferación celular en animales (White and Kahn., 1994; Brzozowsky y col., 2002; Thomas G y col., 2004).

Estos factores de crecimiento regulan la síntesis de proteínas en los tejidos blanco a través de la estimulación de una ruta de transducción de señales que involucra la fosforilación de la proteína ribosomal S6. El estímulo de estos factores provoca la traducción selectiva de mRNAs que contienen una secuencia rica en pirimidinas en su extremo 5' no traducible (UTR), denominados 5'TOP mRNAs (Meyuhas y col., 1996; Martelli et al., 1999), entre los que predominan los mRNAs que codifican para la síntesis de proteínas ribosomales.

Estudios realizados en maíz sobre el efecto de insulina durante la germinación, han descrito que la insulina induce mecanismos de control de la traducción (Sánchez de Jiménez et al., 1999). Se ha demostrado que la fosforilación de la proteína ribosomal S6 participa en la regulación de la síntesis de proteínas durante la germinación de maíz (Sánchez de Jiménez et al., 1997a y 1997b) y responde a estímulos con insulina en forma similar a la descrita en mamíferos (Sánchez de Jiménez et al., 1999); resultados que sugieren fuertemente la existencia de una ruta de transducción de señales en maíz semejante a la inducida por insulina en animales. Aunado a estos resultados se ha identificado en maíz un péptido de 20 kDa que es reconocido por

anticuerpos contra insulina bovina y que estimula la síntesis de proteínas ribosomales, a través de una ruta de transducción de señales que involucra la proteína ribosomal S6 (García Flores et al, 2001). En leguminosas también se ha descrito un péptido de 4 kDa que activa una vía de transducción de señales tipo tirosina (semejante a la vía de insulina en mamíferos) cinasa unido a un péptido de 43 kDa dando como resultado efectos biológicos importantes en el crecimiento de cultivos de células de zanahoria (Kasuki and Hishashi, 2004).

Conociendo estos antecedentes, consideramos que es muy probable que en plantas exista una ruta de transducción de señales inducido por un factor de crecimiento similar a los que se conocen en animales, que regule el crecimiento y la proliferación celular.

HIPÓTESIS

Si la insulina actúa como un factor de crecimiento tejido específico en maíz, entonces su efecto se verá reflejado tanto fisiológica como bioquímicamente en el crecimiento, la síntesis de proteínas, la síntesis de DNA y de rRNA en los ejes embrionarios de Maíz.

Objetivo general:

Analizar el efecto de la insulina en la síntesis de proteínas ribosomales, rRNA y la de DNA en ejes embrionarios de maíz e identificar si este efecto es tejido específico.

Objetivos particulares:

- Identificar el efecto de la insulina en tejidos específicos como el coleoptilo y la raíz del eje embrionario de maíz.
- Diferenciar el efecto específico de insulina en la síntesis de proteínas, rRNA y DNA en raíz y coleoptilo.

Metas experimentales:

- Establecer la metodología para obtener proteínas ribosomales y citoplásmicas de la raíz y el coleoptilo del eje embrionario de maíz.
- Establecer el procedimiento para la extracción de DNA y rRNA del coleoptilo y la raíz del eje embrionario de maíz para su posterior análisis.
- Usar [³H]-Timidina, [³⁵S]-metionina y [³²P]-ortofosfato como rastreadores biológicos en la síntesis de DNA, síntesis de proteínas y síntesis de rRNA, respectivamente, en los tejidos embrionarios.

Estrategia experimental

Para cubrir los objetivos y comprobar la hipótesis planteada se diseñó la siguiente estrategia experimental:

- 1) Semillas de maíz fueron germinadas durante diferentes periodos de tiempo y los ejes embrionarios se disecaron.
- 2) Se implementó un sistema de incubación para el eje embrionario completo con insulina, sin insulina y con el precursor radiactivo.
- 3) Posteriormente se separaron la radícula del coleoptilo para ser analizados por separado.
- 4) Se evaluó el efecto de la insulina en la síntesis de proteínas mediante la incorporación de [³⁵S]-metionina.
- 5) Se analizó el efecto de la insulina en la síntesis de rRNA mediante la incorporación de [³²P]-ortofosfato.
- 6) Se analizó el efecto de la insulina en la síntesis de DNA mediante la incorporación de [³H]-Timidina.

Con el uso de estas estrategias experimentales probar la hipótesis planteada para dilucidar el efecto de insulina sobre el crecimiento y proliferación de cada uno de los tejidos del eje embrionario (radícula y coleoptilo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico:

En todos los experimentos realizados en este trabajo, se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays L.*) de la variedad Chalqueño, de diferentes tiempos de germinación, los cuales fueron posteriormente disecados con la ayuda de un microscopio de disección en los dos tejidos objeto de esta investigación (radícula y coleoptilo).

Metodologías:

Germinación de las semillas de maíz:

Para evitar el crecimiento de hongos que intervinieran en el proceso de germinación, se llevo a cabo la desinfección previa de las semillas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 5 % por 5 minutos y se enjuagó con abundante agua estéril hasta que el olor a hipoclorito desapareció (5 lavados). Posteriormente se colocaron todas las semillas en charolas de plástico con algodón húmedo y se incubaron durante el tiempo especificado para cada experimento en una incubadora vertical a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Disección y cuantificación del peso del eje embrionario:

Una vez germinadas las semillas se disecaron los ejes embrionarios con la ayuda de una navaja evitando lesionarlos y se colocaron sobre algodón húmedo para conservar su viabilidad, se pesaron y posteriormente se sometieron a los diferentes estímulos en cajas petri con 3 ml de medio MS (cantidad suficiente para mantener su crecimiento y evitar que se ahogaran en la solución). Después del tratamiento al que fue sometido

cada uno de los lotes se enjuagaron 3 veces con 5 ml de agua estéril y nuevamente se pesó cada uno de los lotes.

Separación de los tejidos del eje embrionario:

Los ejes ya enjuagados se colocaron sobre hielo para evitar que siguieran su desarrollo. Con la ayuda del microscopio de disección se llevó a cabo la separación de coleótilos y raíces agrupándolos en lotes dependiendo del tratamiento al que correspondían, se pesaron y se congelaron a -70°C para posteriormente procesarlos.

Incorporación de [^{35}S]- Metionina en los tejidos del eje embrionario de maíz:

Se disecaron los ejes embrionarios de la semilla de maíz a las 24 h de germinación y se incubaron durante 2 h en 3 ml de medio MS (aproximadamente 2,0 g de embriones por tratamiento) en oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en presencia de 200 μCi de [^{35}S]- Metionina (para medir la incorporación de la misma a las proteínas sintetizadas de novo) y los siguientes tratamientos:

- Control (no estimulados)
- Insulina (200 $\mu\text{U}/\text{ml}$)
- Insulina (200 $\mu\text{U}/\text{ml}$) + Rapamicina (0.1 μM) agregada 15 min. antes que la insulina.

Al final se enjuagaron, separaron y congelaron como se mencionó anteriormente.

AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES Y CITOPLÁSMICAS.

Extracción de proteínas ribosomales.

- 1) Se molió el tejido en presencia de nitrógeno líquido y se adicionaron 4 volúmenes de buffer de extracción.
- 2) Se centrifugó a 15,000 rpm (30 min. / 2-4°C) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 3) Se colocó el sobrenadante sobre un colchón de sacarosa 0.5M y KCl 0.5M en buffer de extracción (2.0 ml de colchón por cada 7- 8 ml de muestra).
- 4) Se ultracentrifugó a 50,000 rpm (3 h/2-4°C) en la ultracentrífuga Sorvall con rotor tipo 75 TI, serie # 582.
- 5) El pellet se resuspendió en un volumen mínimo de A₃ (su composición esta en la parte de reactivos), se añadió acetato de Mg 1M (décima parte) y 2 volúmenes de ácido acético glacial (en agitación manual ocasional) manteniendo en hielo mínimo 1h.
- 6) Se centrifugó a 3000 rpm (1 min. /2-4°C)) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 7) Las proteínas se precipitaron del sobrenadante con 5 volúmenes de acetona fría y se dejó a -20°C durante toda la noche.
- 8) Se centrifugó a 8,000 rpm (15 min. /2-4°C) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 9) Se evaporó la acetona totalmente.
- 10) Se resuspendieron las proteínas en un mínimo volumen de agua desionizada.

Extracción de proteínas citoplásmicas.

Al sobrenadante del punto 4

- 1) Se le añadió TCA a una concentración final de 10% para precipitar las proteínas
- 2) Se centrifugó a 5,000 rpm. (5 min. / 2-4°C)) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 3) Del sobrenadante se tomó una alícuota para medir la poza y el pellet de proteínas fue resuspendido en un mínimo volumen de agua desionizada y se neutralizó con KOH 1M.

Cuantificación de la marca radiactiva por centelleo líquido.

De las proteínas obtenidas tanto citoplásmicas como ribosomales y del sobrenadante del punto 3 de extracción de proteínas citoplásmicas se tomó una alícuota de 20 μ l, la cual se puso en viales de centelleo conteniendo 5mL de líquido de Bray (composición en la parte de reactivos) y se cuantificó la radiactividad incorporada utilizando un contador de centelleo líquido Beckman Ls 6000 1c.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

- 1) Se tomó una alícuota de muestra (0.5-20 μ l)
- 2) Se llevó a 800 μ l con agua.
- 3) Se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford.
- 4) Se mezcló la reacción y se cuantificó absorbencia en el espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU-650) a 595nm.
- 5) Se extrapoló la absorbencia en la curva patrón de albúmina que se encuentra en el anexo.

INCORPORACIÓN DE [³²P]-ORTOFOSFATO - SÍNTESIS DE rRNA.

Lotes de 2.5 g de ejes embrionarios de 24 ± 2 horas de germinación los cuales se incubaron en 3 ml de medio MS durante 1.5 horas en presencia de 300 $\mu\text{Ci/ml}$ de [³²P]-Ortofosfato (para medir su incorporación a el rRNA sintetizado de novo) de acuerdo a los siguientes tratamientos.

LOTE 1: control

LOTE 2: Insulina 200 $\mu\text{U/ml}$

LOTE 3: Insulina 200 $\mu\text{U/ml}$ + Rapamicina 0,1 μM

Pasado el tiempo los ejes se enjuagaron, separaron y congelaron como se mencionó anteriormente para posteriormente llevar a cabo la extracción de RNA total.

Extracción de RNA total por el método de TRIZOL

(Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987)

- 1) Se homogenizó el tejido en nitrógeno líquido.
- 2) Se colocó en un tubo de microfuga de 1.5ml y se añadió 1 ml de trizol.
- 3) Se mezcló un par de veces con la ayuda del vortex.
- 4) Se mantuvo el tubo 5 min. a temperatura ambiente
- 5) Con ayuda del vortex se agitó un par de segundos
- 6) Se centrifugó a 10,000rpm, 10 min., 4°C en la centrifuga (GS-15R Beckman)
- 7) Separamos el sobrenadante y se adicionaron 200 μl de cloroformo
- 8) Se agitó nuevamente con la ayuda de vortex y se mantuvo a temperatura ambiente 1 minuto.
- 9) Centrifugamos a 12,000 rpm, 15 min 4°C.
- 10) Separamos la fase acuosa y adicionamos 750 μl de isopropanol.
- 11) Incubamos a -20°C durante 1.5 horas.
- 12) Centrifugamos a 6,000 rpm, 20 min, 4°C.
- 13) Lavamos el pellet con 1ml de etanol frío al 70%.
- 14) Se centrifugó a 6,000 rpm, 2 min, 4°C
- 15) Se quitó el etanol y se resuspendió el pellet en 200 μl de agua DEPC.
- 16) Agregamos 50 μl de LiCl y se dejó a -4°C toda la noche (12 h).

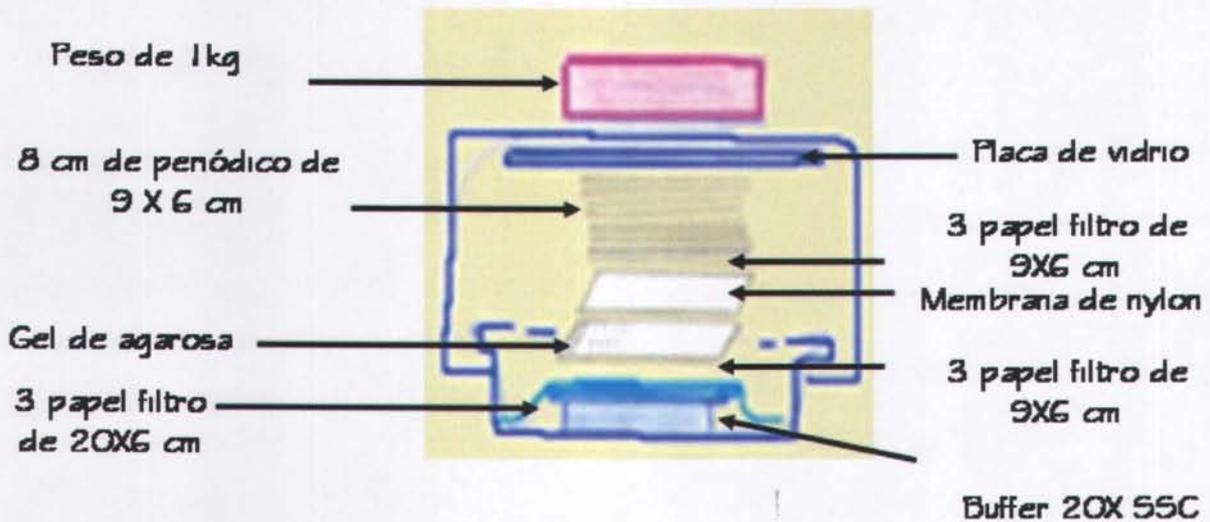
- 17) Centrifugamos a 10,000 rpm, 10 min., 4°C.
- 18) Se lavó el pellet 2 veces con 1 ml de etanol frío al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min., 4°C en cada ocasión.
- 19) El pellet se resuspendió en buffer TEN (composición en la parte de reactivos) y se añadió 1 ml de etanol absoluto.
- 20) Incubamos a -20°C por 15 min.
- 21) Se centrifugó a 12,000 rpm, 10 min., 4°C
- 22) Se lavó el pellet con 1 ml etanol frío al 70% 2 veces centrifugando en cada ocasión 12,000 rpm, 1 min., 4°C.
- 23) El pellet obtenido se resuspendió con 50-100 µl de agua DEPC y se cuantificó la absorbencia en el espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU-650) a 260-280 nm.
- 24) Se prepararon los geles de agarosa (2%) para RNA.

Elaboración de geles de agarosa (2%) para el análisis de rRNA.

- 1) Se pesaron 0.6 g de agarosa
- 2) Se disolvieron calentando en 30 ml de buffer TBE 1X (composición en la parte de reactivos).
- 3) Se agregó 1 µl de Bromuro de etidio al 1%.
- 4) Se enfrió a 45°C aproximadamente y se vertió en el molde.
- 5) Se dejó solidificar el gel y en el momento que estuvo listo se colocó buffer TBE 1X en la cámara y se llenaron los pozos con la misma cantidad de RNA de cada una de las muestras.
- 6) Se corrieron los geles a 85 mA por 1.5 horas.
- 7) Se observaron las bandas en el transiluminador de luz UV y se fotografiaron los geles para posteriormente transferirlos por capilaridad a una membrana de nylon.

Transferencia de RNA por capilaridad.

- 1) Se usó el Buffer 20X SSC (3M NaCl y 0.3 M de citrato de sodio) para hacer la transferencia
- 2) Se hidrató la membrana Hybond™ N+ de Amersham con agua desionizada estéril.
- 3) Se armó el siguiente sistema.



- 4) Se dejó el sistema transfiriendo por 17 horas a temperatura ambiente.
- 5) Se retiró la membrana y se fijo con luz ultravioleta por unos segundos después de secarse.
- 6) Se colocó la membrana en un cassette para revelarla posteriormente en el FLUOR-S.
- 7) Se expuso por 3 semanas a -70°C .
- 8) Se reveló la placa en el FLUOR-S y se hizo el análisis correspondiente.

INCORPORACIÓN DE [³H]-TIMIDINA - SÍNTESIS DE DNA

Se hicieron lotes de 2.5 g de ejes embrionarios de 36 horas de germinación los cuales se incubaron en 3 ml de medio MS durante 12 horas en presencia de 15 μ Ci/ml de [³H]-Timidina (para cuantificar su incorporación al DNA sintetizado de novo) y pasado este tiempo se colocaron por 12 horas los tratamientos respectivos.

LOTE 1: control

LOTE 2: Insulina 200 μ U/ml

LOTE 3: Rapamicina 0,1 μ M

LOTE 4: Insulina 200 μ U/ml + Rapamicina 0,1 μ M

Pasado el tiempo de tratamiento se procedió al enjuague, separación y congelación para posteriormente llevar a cabo la extracción de DNA.

Método para extracción de DNA usando CTAB (Murray and Tompson, 1980),

- 1) Se homogeneizó con nitrógeno líquido el tejido y se pasó a un tubo para centrifuga resistente a solventes.
- 2) Se añadió la solución de extracción de DNA (CTAB 10%, Tris 100mM, pH 8, EDTA 20mM, NaCl 0.7M) Ambas a 65 °C.
- 3) Se incubó a 65°C durante 60 min.
- 4) Se extrajo con un volumen igual de la mezcla Cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1) y se centrifugó a (7,500 g, 5 min., 4°C) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 5) Se añadió 1/10 de CTAB/NaCl (CTAB 10%, NaCl 0.7M) a la fase acuosa y se mezcló por inversión para volver a extraer y centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones del punto 4.

- 6) Se añadió a la fase acuosa la solución de precipitación (CTAB 1%, Tris 50mM, EDTA 10mM) y se incubó a 37°C toda la noche (12 ± 1h.)
- 7) Se centrifugó a (500g, 5 min., 4°C) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 8) Se separó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer TE (composición en la parte de reactivos).
- 9) Se precipitó el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol toda la noche (12 horas) a -20°C.
- 10) Se centrifugó a (7,500g, 15 min., 4°C) en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 11) Se lavó el pellet con etanol al 70% y se centrifugó a 7,500g, 15 min., 4°C en la centrifuga Sorvall RC 5C Plus con rotor tipo SS-34.
- 12) Se evaporó el etanol.
- 13) Se resuspendió el pellet en buffer TE y se cuantificó la absorbencia en el espectrofotómetro UV-Vis (Beckman DU-650) a 260nm.
- 14) De la resuspensión de DNA se contaron 50 µl de muestra en el contador de centelleo con 5 ml de líquido de Bray.
- 15) Se realizaron los cálculos correspondientes para hacer los análisis.

RESULTADOS

Efecto de insulina en la síntesis de proteínas totales en la radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de semillas de maíz.

Ejes embrionarios de semillas de maíz germinadas durante 72 horas, en presencia y ausencia de insulina fueron disecados y se separó el coleoptilo de la radícula, posteriormente se extrajeron las proteínas totales y se cuantificaron espectrofotométricamente por el método de Bradford, posteriormente se hicieron los cálculos para reportar los resultados en % de incremento en síntesis considerando 100% al control obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Experimento 1	Experimento 2	Promedio	Desviación
coleoptilo control	100	100	100	0
coleoptilo insulina	137	83	110	38.1837662
radícula control	100	100	100	0
radícula insulina	121	125	123	2.82842712

Tabla 1: Resultados de síntesis de proteínas expresado en % de aumento en relación al control.

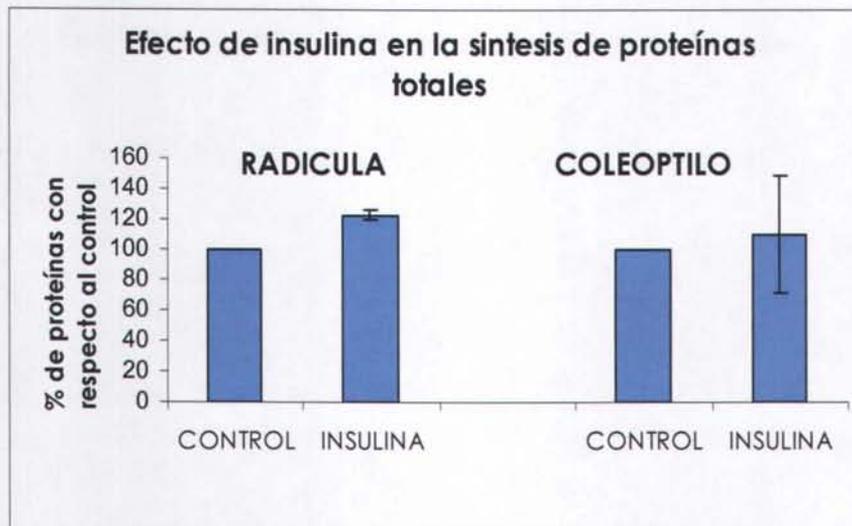


Figura 1: Efecto de insulina en la síntesis de proteínas totales en cada uno de los tejidos por separado en ejes embrionarios de 72 horas de germinación.

NOTA: Figura tomada de "efecto de ZmIGF/Insulina en la síntesis de DNA y la división celular en tejidos de Maíz (*Zea Mays* L.) Sotelo Martínez R., Aguilar, R., Paz Lemus, E., García Flores, C., Sánchez de Jiménez E. XXV congreso Nacional de Bioquímica, diciembre 2004.

Como podemos observar en la gráfica al tratar las semillas con insulina se observa un incremento considerable en la cantidad de proteínas totales en radícula con respecto al control, lo cual no se obtuvo en el caso del coleoptilo ya que la desviación estándar es muy amplia; lo anterior indica que la insulina tiene un efecto específico en radícula el cual se ve reflejado en el incremento de proteínas totales.

Efecto de insulina en la síntesis de proteínas ribosomales y citoplásmicas en la radícula y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz.

Posteriormente se llevaron a cabo experimentos para evidenciar si este incremento en proteínas se debe a que estas se sintetizan de novo. Para demostrarlo semillas de maíz fueron germinadas por 24 horas en presencia y ausencia de insulina y además con el uso de un inhibidor de la síntesis de proteínas ribosomales (rapamicina). Todos los tratamientos

se desarrollaron en presencia del precursor radiactivo [³⁵S]-metionina para posteriormente llevar a cabo la extracción de proteínas ribosomales y citoplásmicas tanto en radícula como en coleoptilo, y se cuantificaron la cantidad de proteínas por el método de Bradford y la marca radiactiva incorporada por centelleo líquido, obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra	Ribosomales cpm/ μ g proteínas
Radícula Control	306
Radícula Insulina	960
Radícula Insulina+Rapamicina	347
Coleoptilo Control	105
Coleoptilo Insulina	69
Coleoptilo Insulina+Rapamicina	141

Tabla 2: Efecto de insulina en la síntesis de proteínas ribosomales en ejes embrionarios de maíz de 24 horas de germinación.

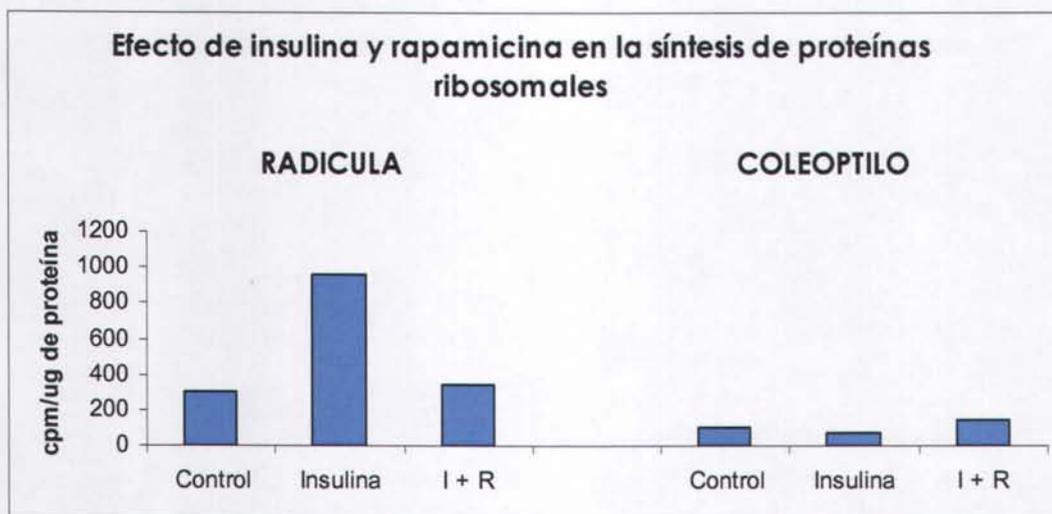


Figura 2: Efecto de Insulina y rapamicina en la síntesis de proteínas ribosomales en el coleoptilo y raíz de ejes embrionarios de 24 horas de germinación incubados en oscuridad a 25 ± 2 °C durante 2 horas en presencia de 200 μ U/ml de insulina, ambos (insulina + 0.1 μ M rapamicina) y el control marcadas con [³⁵S]-Metionina).

Podemos observar en la gráfica, que hay un incremento importante en la síntesis de proteínas ribosomales en el caso de la radícula y además, observamos el efecto de rapamicina (que es un inhibidor de la actividad de mTOR), el cual baja la síntesis de proteínas ribosomales aunque no a un nivel por debajo del control.

En el caso del coleoptilo no se observa ningún efecto sobre la síntesis de proteínas ribosomales en relación al control.

Muestra	Citoplásmicas cpm/ μ g proteína
Radícula Control	442
Radícula Insulina	401
Radícula Insulina+Rapamicina	233
Coleoptilo Control	255
Coleoptilo Insulina	65
Coleoptilo Insulina+Rapamicina	149

Tabla 3: Efecto de insulina en la síntesis de proteínas citoplásmicas en ejes embrionarios de maíz de 24 horas de germinación.

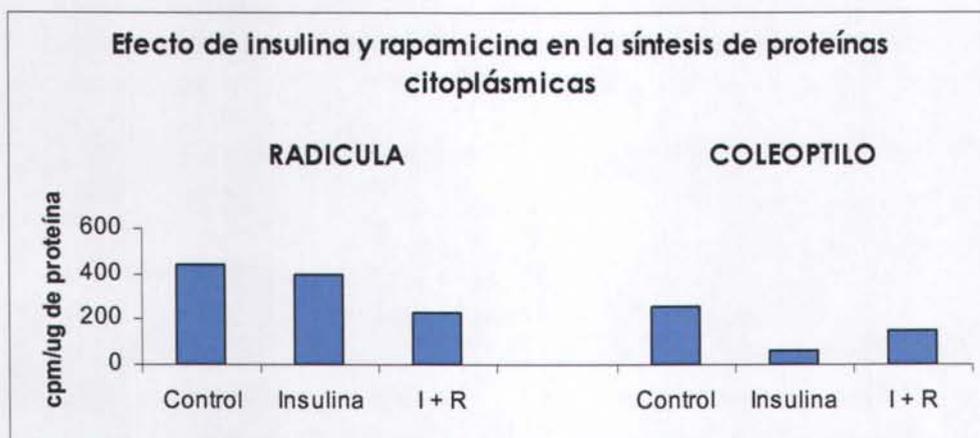


Figura 3: Efecto de Insulina y rapamicina en la síntesis de proteínas citoplásmicas en el coleoptilo y raíz del ejes embrionarios de 24 horas de germinación incubados en oscuridad a 25 ± 2 °C durante 2 horas en presencia de 200μ U/ml de insulina, ambos (insulina + 0.1μ M rapamicina) y el control con marca radiactiva ($[^{35}\text{S}]$ -Metionina).

Para las proteínas citoplásmicas que se cuantificaron de igual manera, no observamos un efecto claro en ninguno de los tejidos analizados al tratarlos con insulina y con rapamicina.

Con los resultados anteriores podemos decir que la síntesis de proteínas ribosomales y citoplásmicas se ve afectada de manera diferencial en ambos tejidos, en el caso de ribosomales estas se incrementan en radícula y en el caso de las citoplásmicas no se observa efecto diferencial.

Los resultados obtenidos se pueden analizar de manera más clara al obtener la relación ribosomales/citoplásmicas, en la cual observamos que el efecto de insulina es más evidente en la radícula que en el coleoptilo y la rapamicina presenta su efecto inhibitorio en ambos tejidos.

Muestra	Relación Ribosomales /citoplásmicas
Radícula Control	0.69
Radícula Insulina	2.39
Radícula Insulina+Rapamicina	1.5
Coleoptilo Control	0.41
Coleoptilo Insulina	1.06
Coleoptilo Insulina+Rapamicina	0.94

Tabla 4: Efecto de insulina en la relación de proteínas ribosomales / proteínas citoplásmicas

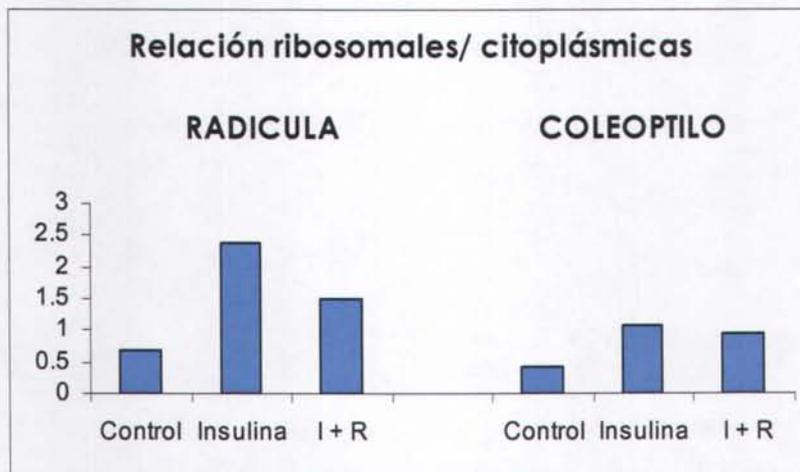


Figura 4: Efecto de Insulina y rapamicina en la relación de proteínas ribosomales y citoplásmicas en el coleoptilo y raíz del ejes embrionarios de 24 horas de germinación incubados en oscuridad a 25 ± 2 °C durante 2 horas en presencia de $200\mu\text{U/ml}$ de insulina, ambos (insulina + $0.1\mu\text{M}$ rapamicina) y el control marcadas con $[(^{35}\text{S})\text{-Metionina}]$.

Con todos los resultados anteriormente expuestos en relación a la síntesis de proteínas podemos decir que la insulina presenta un efecto específico en radícula incrementando notablemente la síntesis de proteínas ribosomales en este tejido.

Efecto de insulina en la síntesis de rRNA en raíz y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz.

Para analizar este efecto se extrajo el RNA total de la radícula y el coleoptilo de ejes embrionarios de 22 horas de germinación tratados con insulina y rapamicina, en este caso el precursor radiactivo usado fue $[^{32}\text{P}]$ -ortofosfato y para identificar las bandas obtenidas se utilizó un extracto de RNA ribosomal obtenido de ribosomas de maíz. El RNA total se analizó en geles de agarosa que fueron cargados con una cantidad similar de RNA para cada muestra y transferidos a una membrana de nylon, de la cual se obtuvo una autoradiografía, al exponer dicha membrana a una placa fotosensible a la radiactividad obteniéndose los siguientes resultados:

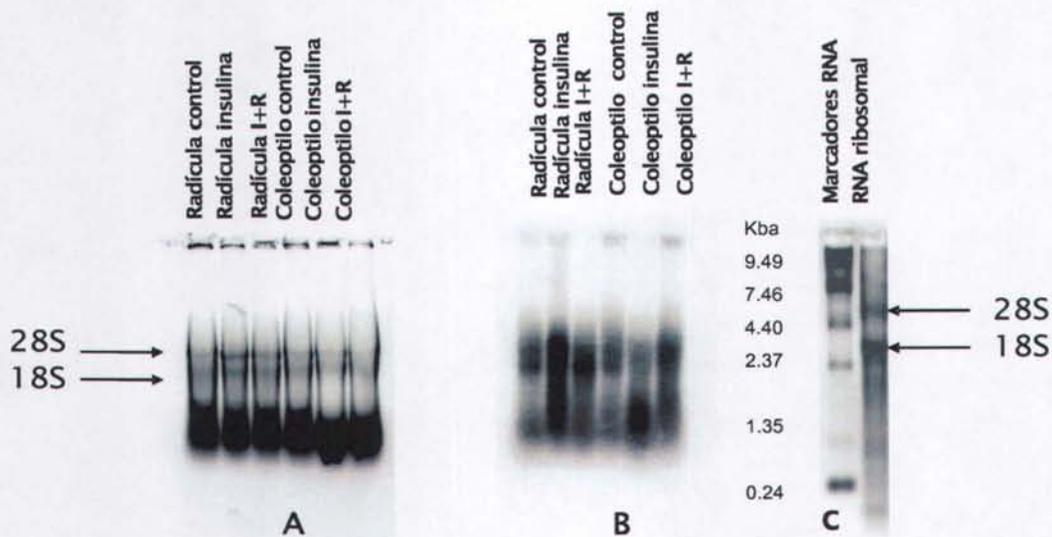


Figura 5: Síntesis de RNA ribosomal de un extracto obtenido de ejes embrionarios de maíz de 22 ± 2 h de germinación con $200 \mu\text{U/ml}$ de insulina y/o $0.1 \mu\text{M}$ de rapamicina) tratados por 1.5 horas con $300 \mu\text{Ci}$ de $[^{32}\text{P}]$ -Ortofosfato, se obtuvo por separado el RNA total del coleoptilo y raíz de los ejes obtenidos con cada uno de los tratamientos.

A) fotografía UV B) Autoradiografía C) RNA ribosomal de ejes embrionarios de maíz completos usados como control.

Como se observa en la figura, logramos identificar las bandas 18S y 28S en el RNA total obtenido y en la autoradiografía las encontramos fosforiladas, lo cual nos revela que insulina puede estar involucrada en la síntesis de ribosomas y como vemos en el caso de radícula nuevamente se observa un efecto más significativo en este tejido que en coleoptilo. Llama la atención el hecho de encontrar bandas de menor peso molecular marcadas, las cuales podrían corresponder a RNA de transferencia o a 5 y 5.8 rRNAs.

Efecto de insulina en la síntesis DNA en raíz y coleoptilo de ejes embrionarios de maíz.

Ejes embrionarios de 36 horas de germinación fueron tratados con Insulina por 12 horas (se realizaron 2 experimentos independientes los cuales posteriormente fueron promediados y obtenida la desviación estándar) en presencia del precursor radiactivo [³H]- timidina. Posteriormente se extrajo el DNA de los tejidos y se cuantificó la marca incorporada al DNA sintetizado de novo, por centelleo líquido y la cantidad de DNA se midió espectrofotométricamente, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Muestra	coleoptilo control	coleoptilo insulina	radícula control	radícula insulina
Experimento 1	292	128	1244	2508
Experimento 2	359	269	1829	2388
Promedio	325.5	198.5	1536.5	2448
Desviación estándar	47.3	99.7	413.6	84.8

Tabla 6: Efecto de Insulina en la síntesis de DNA en ejes embrionarios de maíz.

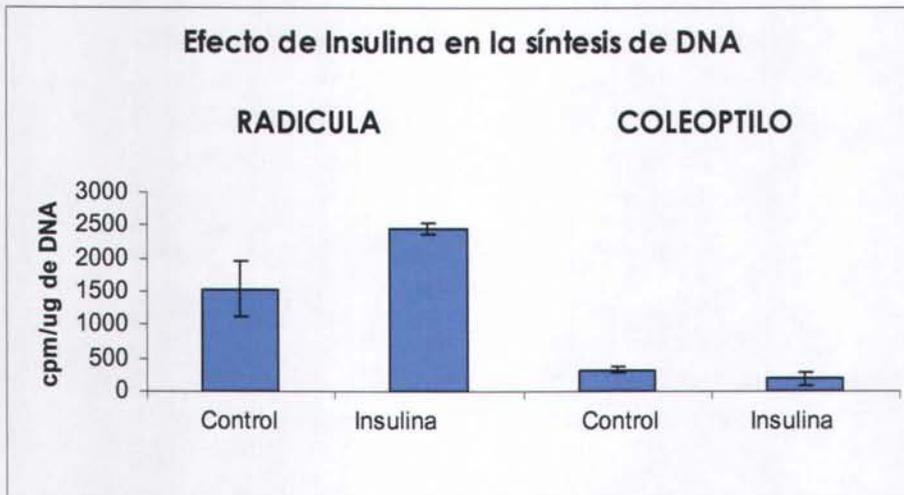


Figura 6: Efecto de Insulina y rapamicina en la síntesis de DNA en coleoptilo y raíz del ejes embrionarios de 36 horas de germinación incubados en oscuridad a 25 ± 2 °C durante 24 horas en presencia de 200 μ U/ml de insulina, 0.1 μ M de rapamicina, ambos (insulina + rapamicina) y el control con marca radiactiva [3 H]-Timidina.

Como vemos en la figura 6 hay un incremento en la síntesis de DNA en la radícula, en el coleoptilo no presenta un efecto significativo con respecto al control; con lo cual nuevamente se muestra el efecto específico que la insulina ejerce sobre la radícula.

DISCUSION DE RESULTADOS

Se sabe que, la insulina y los factores de crecimiento tipo insulina (IGF-I e IGF-II) repercuten directamente en el crecimiento y la proliferación celular en animales al activar rutas de transducción de señales y la expresión de genes que participan en la regulación del metabolismo, crecimiento y diferenciación celular (Fumagalli y Thomas., 2000).

En estudios previos en el laboratorio se ha demostrado que la insulina favorece la germinación y el crecimiento de ejes embrionarios de maíz y también que incrementa la síntesis de proteínas ribosomales y DNA en el eje embrionario completo (García, Flores y col. 2001). Por ello en este trabajo decidimos analizar el efecto de la insulina en los tejidos principales que forman el eje embrionario; la radícula y el coleoptilo por separado.

Encontramos resultados interesantes en cada uno de los fenómenos analizados. Observamos que tanto la síntesis de proteínas ribosomales y rRNA se ve estimulada por la insulina en la radícula, pero no en el coleoptilo y este efecto indica que se está estimulando la biogénesis de ribosomas específicamente en la radícula (figuras 2,3, 4 y 5).

Trabajos previos en el laboratorio han mostrado que la insulina activa en maíz; de forma similar a como ocurre en mamíferos, la síntesis de proteínas ribosomales, a través de la estimulación de la ruta de transducción de señales que lleva a la traducción selectiva de mensajes 5'TOP (García, Flores y col. 2001), que involucra a mTOR (Target of Rapamicina) ya que como vemos en las figuras 2 , 3 y 4 donde se representa la síntesis de proteínas en maíz al tratar con rapamicina (inhibidor de la vía activada por mTOR en mamíferos), existe un efecto inhibitorio en la síntesis de proteínas ribosomales en radícula y coleoptilo y por lo tanto también se observa esta inhibición en la relación ribosomales/ citoplásmicas. Estos resultados aunados a investigaciones

previas, en las cuales se puso en evidencia la presencia de una proteína similar a la S6K de mamíferos en maíz (Reyes de la Cruz y col; 2004) sustentan la posibilidad de que en plantas existe una vía de transducción de señales semejante a la de insulina en mamíferos, que lleva a la activación de los procesos de crecimiento y proliferación celular de manera concertada.

En cuanto a la síntesis de rRNA, observamos un incremento en la síntesis de los rRNAs que forman el ribosoma maduro (28S y 18S) al estimular con insulina. Estos resultados indican que la síntesis de proteínas ribosomales, está coordinada con la de rRNA para la generación de nuevos ribosomas. En las primeras horas de la germinación se traducen los mensajes almacenados los cuales inician el crecimiento y desarrollo del eje embrionario, pero posteriormente se requiere de la generación de nueva maquinaria ribosomal para continuar el proceso de crecimiento y proliferación de la planta (Bewley y Black, 1994).

Estos resultados se observan claramente en la figura 5 en la cual podemos ver que la síntesis de rRNA se incrementa al estimular la radícula con insulina podemos claramente identificar el rRNA 18S y 28S por lo que con ello tenemos evidencia inicial para sugerir que la insulina induce la biogénesis de ribosomas en maíz.

La síntesis de DNA se ve también estimulada, lo cual indica que aparte del crecimiento se está estimulando la proliferación celular.

En el caso de la síntesis de DNA, cuyo resultado se muestra en la figura 6 podemos observar que nuevamente esta respuesta es específica en la raíz mostrando un incremento significativo de la síntesis de DNA y no se observa este efecto en el coleoptilo, este resultado es consistente con los resultados en síntesis de DNA anteriormente citados (García-Flores, 2002) que se obtuvieron en ejes completos; y refuerza la idea de que este efecto está acompañado de división celular, ya que ocurre solo en tejidos con meristemas (la raíz), y que por lo tanto es apto para dividirse. Los datos obtenidos en una tesis doctoral que actualmente se desarrolla

en el laboratorio han demostrado que la insulina induce crecimiento y proliferación celular en callos no embriogénicos de maíz tratados con esta hormona, este efecto se ha evidenciado por el incremento en la síntesis de proteínas totales, síntesis de proteínas ribosomales, síntesis de DNA e incremento en índice mitótico, lo cual refuerza los resultados obtenidos en esta tesis que demuestra que insulina incide de manera concertada en el crecimiento y proliferación celular. Todavía aún más importante es el hecho de que esta vía parece estar específicamente en radícula y por ello es que observamos el efecto de la insulina en este tejido y no así en el coleoptilo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, aparte de confirmar algunos resultados previos en cuanto a la síntesis de proteínas ribosomales y DNA y sentar las bases para nuevas investigaciones en cuanto a la biogénesis de ribosomas, regulación del crecimiento y división celular; aporta el concepto de especificidad de tejido como respuesta a estímulos específicos, dado que solo vemos el efecto de este péptido hormona en la radícula del eje embrionario.

CONCLUSIONES:

- La insulina tiene un efecto tejido específico en la radícula de ejes embrionarios de maíz, el cual se ve reflejado en el incremento de: la síntesis de proteínas ribosomales, rRNA y DNA en este tejido.
- Para el caso de la síntesis de rRNA es necesario llevar a cabo mas experimentos en busca del precursor del rRNA, la molécula de 45S, lo cual permita conocer como se lleva a cabo la síntesis de novo de los dos rRNAs maduros 28S y 18S. Así mismo esta evidencia permitiría conocer acerca del mecanismo de acción de insulina en la biogénesis de ribosomas de manera coordinada con la síntesis de proteínas ribosomales durante el proceso de germinación.

BIBLIOGRAFÍA

- ↓ Baiza A.M., Vázquez-Ramos, J., and Sánchez de Jiménez, E. (1989) DNA synthesis and cell in embryonic maize tissue during germination, *J. Plant Physiol.* 135, 426-431.
- ↓ Bailey-Serres, J. (1999) Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants, *Trends in Plant Science* 4, 142-148.
- ↓ Becraft, P.W. (1998) Receptor kinases in plant development, *Trends Plan Sci.* 3, 384-388.
- ↓ Becraft, P.W., Stinard, P.S. and McCarty, D.R. (1996) CRINKLY4: a TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation, *Science* 273, 1406-1409.
- ↓ Bewley, J.D. and Black, M. (1994) Physiology of development and germination. In seeds. Bewley JD, Black M. Eds. Second Edition Plenum Press, New York and London p.p. 147-148.
- ↓ Bewley, J.D. and Marcus, A. (1990) Gene expression in seed development, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38, 165-193.
- ↓ Bougnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M., and Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling by intracellular amino acid availability. *Biochem. J.* 327: 555-566.
- ↓ Butler, A.A., Blakesley, V.A., Tosokos, M., Wood, T.L., LeRoit, D. and Poulakis, V. (1998) Stimulation of tumor growth by recombinant

human insulin growth factor I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression, *Cancer Res.* 32, 1308,1317.

- ↓ Botha, F.C., Potgieter, G.P., and Botha, A.M. (1992) Respiratory metabolism and expression during seed germination, *Plant Growth Res.* 11, 211-224.
- ↓ Bradford, K.J (1995) Water relations in seed germination. In seed development and germination. Kigel J and Gallie G, Eds. Marcel Dekker, New York, p.p. 351-396.
- ↓ Braun, D.M., and Walker, J.C. (1996) Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle, *Trends Biochem. Sci.*, 21, 70-73.
- ↓ Browning, K.S. (1996) The plant translation apparatus, *Plant Mol. Biol.* 32, 107-144.
- ↓ Browning K.S., Goss, D.J., Roth, D.A. and Gallie, D.R. (1998) The translational machinery of plants. In A look beyond transcription: mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. Bailey –Serres J, Gallie D.R, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland , p.p. 68-87.
- ↓ Browning, K.S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B. and Ravel, J.M. (1990) Determination of the amount of protein syntesis initiation and elongation factors in wheat germ, *J. Biol Chem.* 265, 17967-17973.

- ↓ Browning K.S., Webster, C., Roberts, J.K.M. and Ravel, J.M. (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants, *J. Biol. Chem.* 267, 10096-10100.
- ↓ Cheatham, L., Monfar, M., Chou, M.M. and Blenis, J. (1995) Structural and functional analysis of p70^{S6K}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 11696-11700.
- ↓ Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical Biochemistry*, 162,156.
- ↓ Chou, M.M. and Blenis, J. (1996) The 70 kDa S6 Kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc 42 and Rac 1. *Cell.* 85, 573-583.
- ↓ Clemens, M.J. and Boomer, U.A. (1999) Translational control: The cancer connection, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 1-23.
- ↓ Coleman, M; Marshall, C. and Olson M. (2004) RAS and RHO GTPases in G1- Phase Cell-Cycle regulation, *Molecular Cell Biology.* 5, 355-363.
- ↓ Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F. and Roth, J. (1987) Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3, *J. Biol. Chem.* 262, 6238-6247.
- ↓ Cuadrado, A., Navarrete, M.H. and Cánovas, J.L. (1985) The effect of partial protein synthesis inhibition of cell proliferation in higher plants. *J. Cell Sci.* 76, 97-104.

- ↓ Curtis, H., Barnes, S.N. y Flores G. (2000) *BIOLOGIA*, Editorial médica Panamericana, España.

- ↓ Deltour, R. and Jacquard, A. (1974) Relation between water stress and DNA synthesis during germination of *Zea mays* during germination of *Zea mays* Ann. Bot. 38, 329.

- ↓ Dinkova, T.D., Aguilar, R. and Sánchez de Jiménez, E. (2000) Expression of Maize initiation factor eIFiso4E is regulated at traslation level, Biochem J. 351, 325-331.

- ↓ Dommes, J., and Van de Walle, C. (1990) Polysome formation and incorporation of new rybosomes into polysomes during germination of embryonic axes of maize, Physiol. Plant 79, 289-296.

- ↓ Efstratiadis, A. (1998) Genetics of mouse growth, Int. J. Dev. Biol. 42, 955-976.

- ↓ Evans, T; Rosenthal, E.T; Youngblom, J; Distel, D. and Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at the end cleavage division, Cell 33: 389.

- ↓ Freire, M.A., Tourneur, C., Granier, F., Camonis, J., El Amrani, A., Browning, K.S., and Robaglia , C. (2000) Plant lipoxygenase 2 is a translation initiation factor -4E binding protein, Plant. Mol. Biol. 44, 129-140.

- ↓ Gallie, D.R. (1996) Translational control of cellular and viral mRNAs, Plant Mol. Biol. 32, 145-158.

- ↓ García- Flores, C. (2002) Aislamiento y caracterización de una proteína semejante a insulina y su relevancia en la germinación y el desarrollo; TESIS doctoral, Mayo 2002, Facultad de Ciencias, UNAM.

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

- ↓ Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR, *Genes Dev.* 15, 807-826.

- ↓ Georgieva, E.I., López-Rodas, G., Hittmair, A., Feichteinger, H., Brosh, G. and Loidl, P. (1994) Maize embryo germination: I. Cell Cycle analysis, *Planta* 192, 118-127.

- ↓ Goodman, D.B. and Davis, W.L. (1993) Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 440-446.

- ↓ Guy, P.A., and Black, M. (1998) Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigor, *Seed Sci. Res.* 8, 99-111.

- ↓ Hirano, H., Kagawa, H. and Okubo, K. (1992) Characterization of proteins released from legume seeds in hot water, *Phytochemistry* 31, 731-735.

- ↓ Hirt, H. (2000) Connecting oxidative stress, auxin and cell cycle regulation thought a plant mitogen activated protein kinase pathway, *Proc.Natl.Acad. Sci.*, 97, 2405-2407.
- ↓ Hutchingson, C. and Glover, D.M. (eds.) (1995) *Cell cycle control*, first ed. Oxford University Press, England.
- ↓ Ilgoutz, S.C., Knitel, N., Lin, J.M., Sterle, S. and Gayler, K.R. (1997) Transcription of genes for conglutin gamma and a leginsulin-like protein in narrow-leafed lupin, *Plant. Mol. Biol.* 34, 613-627.
- ↓ Imai, Y. and Clemmons, D.R. (1999) Role of phosphatidylinositol 3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in stimulation of vascular smooth muscle cell migration and desoxiribonucleic acid syntesis by insulin growth factor I , *Endocrinology* 140, 4228-4235.
- ↓ Jin, P., Guo, T. and becraft, P.W. (2000) The maize CR4 receptor-like kinase mediates a growth factor-like differentiation response, *Genesis* 27, 104-116.
- ↓ Johnson, G.C., Pringle, J.R. and Hartwell, L.H. (1997) Coordination of growth with cell division in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*, *Exp. Cell Res.* 105, 79-98.
- ↓ Jones, S.M., Klinghoffer, R., Prestwich, G.D., Toker, A. and Kazlauskas, A. (1999) PDGF induces an early and a late wave of P3-kinase activity and only the late wave is required for progression through C1. *Current Biol.* 9, 512-521.

- ↓ Kazuki, Hanada; Hisashi Hirano (2004); Interaction of a 43-kDa Receptor-like Protein with a 4 -kDa Hormona-like Peptide in Soybean; *Biochemistry*; vol.43 pp. 12105-12112.

- ↓ Kigel, J. and Galili, G. (eds.) (1995) Seed development and germination. MarcelDekker, Inc. New York p.p. 273.

- ↓ Kozak, M., (1991) Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro, *Gene Exp.* 1,117-125.

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

- ↓ Lane, H.A., Fernandez, A., Lamb. N.J. and Thomas, G. (1993) p70S6k Function is essential for G1 progression, *Nature* 363, 170-172.

- ↓ Le, H., Browning, K.S. and Gallie D.R. (1997) The phosphorylation state of wheat translation initiation factors eIF4B, eIF4A and eIF2 is diferentially regulated during seed development and germination, *J. Biol Chem.* 273, 20084-20089.

- ↓ Levine, E. (2004) Cell cycling through development, *Development*, *Development* 131, 2241-2246.

- ↓ Lewin, B. (1997) Protein synthesis. In *Genes VI*. Lewin B. Eds. Oxford University Press, New York p.p. 179-212.

- ↓ Martelli, A.M., Cocoli, Bareggi R., TabelliniG., Rizzoli R., Ghibellini M.D. and Narducci P. (1999) Insulin-like Growth factor-I-dependent

stimulation of nuclear phospholipaseC-B1 activity in Swiss 3T2 cells requires an intact cytoskeleton and is paralleled by increased

- ↓ Merkulova, T.I., Frolova, L.Y., Lazar, M., Camonis, J. and Kisselev, L.L. (1999) C-terminal domains of human translation termination factors meRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS Lett.* 433, 41-47.

- ↓ Merrick, W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis, *Microbiol. Rev.* 56, 291-315.

- ↓ Meyuhas, O., Avni, D. and Shama, S. (1996) Translational control of ribosomal protein mRNAs in eukaryotes. In *Translational control*, Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N. eds. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.p. 363-388.

- ↓ Möller W. (1990) Hypothesis: ribosomal protein L12 drives movement of tRNA. In: *The Ribosome: Structure, function and evolution* (Hill W.E., Dohlberg A., Garret, R.A., Moore, P.B., Schlessiner, D., Warner, J.D. eds.) American Society of Microbiologists, Washington, D.C., p.p. 380-389.

- ↓ Murashige, T. and Skoog, C. (1962) A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.

- ↓ Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nuc. Acids Res.* 8:4321-4325

- ↓ Navarrete, M.H., Cuadrado, A. and Cánovas, J.L. (1983) Partial elimination of G1 and G2 periods in higher plant cells by increasing the S period. *Ex. Cell. Res.* 148, 273-280.

- ↓ Nijhout, H. (2003) The control of Growth, *Development*, 130, 5863-5867.

- ↓ Oldham, S. and Hafen, E. (2003) Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: A TOR de force in growth control, *Trends Cell Biol.* 13, 79-85.

- ↓ Oliveira, A.A.e., Elenir, A.A.O., Machado, T.O.L., Gomes, M.V., Neto, X.J., Rereira, C. A., Vieira, H.J.G., Fernández, S.V.K. and Javier-Filho, J. (1999) Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin , *Protein Peptide Lett.* 6, 15-21.

- ↓ Pain V.M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells, *Eur. J. Biochem.* 236, 747-771.

- ↓ Pertseva, M.N., A.O. Shpakov,S.A., Plesneva and L.A. Kuznetsova. (2003) A novel view on the mechanism of action of insulin and other insulin superfamily peptides, involvement of adenilly cyclase signaling system. *Comp. Biochem. Physiol.* 134:11-36.

- ↓ Peruzzi, F., Prisco, M., Drews, M., Salmoni, P., Grassili, E., Romano, G., Calabretta, B. and Baserga, R. (1999) Multiple pathways on the insulin growth factor 1 receptor in protection for apoptosis, *Mol. Cell. Biol.* 19, 7203-7215.

- ↓ Pestova, T.V. and Hellen, C.U.T. (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein syntesis, *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 651-674.

- ↓ Pines, J. (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases: Take your partner. *Trends Biochem. Sci.* 18, 1995.
- ↓ Pramanick, S.K., Krochko, J.E. and Bewley J.D. (1992) Disruption of cytosolic mRNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos, *Plant. Physiol.* 99,1590-1596.
- ↓ Proud, C.G. (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients, *Eur. J. Biochem.* 269, 5338-5349.
- ↓ Remacha, M., Jiménez-Díaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodríguez-Gabriel, M.A., Guarianos, E. and Ballesta, J.P.G. (1995) Proteins P1, P2 and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem. Cell Biol.* 73, 959-968.
- ↓ Reyes de la Cruz, H. Caracterización y regulación de la cinasa de la S6 de ejes embrionarios de maíz durante la germinación; Tesis, Octubre 2004, Facultad de química UNAM, Doctorado en Ciencias Bioquímicas.
- ↓ Rutter, J., Probst, B.L. and McKnight, S.L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase, *Cell*, 111, 17-28.
- ↓ Salisbury B. Frank; Roos W. Cleon; FISILOGIA VEGETAL; Grupo editorial Iberoamerica S.A. de C.V. 1994. Capítulo 2 y 3.
- ↓ Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* 414, 799-806.

- ↓ Sánchez de Jiménez, E., Aguilar, R. (1984) Protein syntesis patterns: relevance of old and new messenger RNAin germinatin maize embryos, *Plant Physiol.* 75, 231-234.
- ↓ Sanchez de Jiménez, E; Aguilar, R; and Dinkova, T.D., (1997b) S6 ribosomal protein phosphorylation and translation of stored mRNA in maize, *Biochimie* 79, 187-194.
- ↓ Sanchez de Jiménez, E., Aguilar R., and López, S. (1981) Distinctive characteristics of protein syntesis in maize during the early stages of germination, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 445-450.
- ↓ Sánchez de Jiménez, E., Beltrán, E. and Ortíz- López, A. (1997a) Translation of ribosomal protein mRNAs in maize axes. In basic and applied aspects of seed biology (Ellis, R.H., Black, M., Murdoch, A.J. and Hong, T.D., eds.) CABI Publishing, Oxon, p.p. 385-394.
- ↓ Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E. and Ortíz-López, A. (1999) Insulin-stimulated ribosomal protein syntesis in maize embrionyc axes during germination, *Physiol. Plant.* 105, 148-155.
- ↓ Sánchez-Martínez, D., Puigdomenech, P. and Pagés, M. (1986) Regulation of gene expression in developing *Zea Mays* embryos. Protein syntesis during embryogenesis and early germination in maize, *Plant Physiol.* 82, 543-549.
- ↓ Spiegel, S. and Marcus, A. (1975) Polyribosome formation in early wheat embryo germination is independent of either transcription or polyadenilation, *Nature* 256, 228-230.

- ↓ Takuwa, N., Fukui, Y. and Takuwa, Y. (1999) Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70^{S6K} Independent signaling in growth factor stimulated NIH 3T3 fibroblast. *Mol. Cell Biol.* 19(2), 1346-1358.

- ↓ Tin, Su; O'Farrell Patrick (1998); Size Control: Cell proliferation does not equal growth; 8; p.p. R687-R689.

- ↓ Troyanek, J., Ek, P., Scoble, J., Muszynska, G. and Engström, L. (1996) Phosphorylation of plant proteins and identification of protein-tyrosin kinase activity in maize seedlings, *Eur. J. Biochem.* 235, 338-344.

- ↓ Turk, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G. and Nagy, F. (2004) Phytohormones participate in a S6 kinase signal transduction pathway in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 134, 1527-1535.

- ↓ Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal Transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell* 61, 203-212.

- ↓ Vázquez-Ramos, J.M. (2000) Cell Cycle Control during maize germination. In: *Seed biology. Advances and applications* (Black, M., Bradford, K.I. and Vázquez Ramos J. eds.) Proceedings of the sixth international workshop on seeds, Mérida, México, 1999. CABI, Publishing, ISBN 0 851994040. p.p. 261-269.

- ↓ Walker, J.C. (1994) Structure and function of receptor-like protein Kinases of higher plants, *Plant Mol. Biol.* 26, 1599-1609.

- ↓ Warner, J.R. (1999) The economics of ribosomal biosynthesis in yeast, *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-72.

- ↓ Watanabe, Y., Barbashov, S.F., Kamatsu, S., Hemming, A.M., Miyahi, M. Tsunasawa, S. and Hirano, H. (1994) A peptide that simulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein isolation, primary structure and cDNA cloning, *Eur. J. Biochem.* 224, 167-172.

- ↓ Webster, C., Gaut, R.L., Browning, K.S., Ravel, J.M. and Roberts J.K.M. (1991) Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips, *J. Biol. Chem.* 266, 23341-23346.

- ↓ White, M. and Kahn, C. (1994) The insulin signaling system, *J. Biol. Chem.*, 269, 1-4.

Referencias bibliográficas que no se citan en el texto:

- ↓ Baserga, R. (1985) The biology of cell reproduction. Harvard University Press Cambridge. p.p 3-33, 62-65, 81-100, 134-165.
- ↓ Bougnet, A., Tee, A.R., Taylor, P.M. and Proud, C.G. (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian targets of rapamycin) signaling by intracellular amino acid availability, *Biochem J.* 32, 555-566.
- ↓ Chambard, J.C., Franchi, A., Le Cam, A. and Pouyssegur, J. (1983) Growth factor stimulated protein phosphorylation in G0/G1-arrested fibroblast. *J. Biol. Chem.* 258, 1706-1713.
- ↓ Himanen, Kristiina; Vuylsteke, Marnik (2004); Transcript profiling of early lateral root initiation; *PNAS*; vol.101;No.14 p.p. 5146-5155
- ↓ Mercer, W.E., Avignolo, C. and Baserga, R. (1984) The role of the p53 protein in cell proliferation as studied by the microinjection of monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biol.* 4, 276-281.
- ↓ Montesano, L. and Glitz, D.G. (1998) Wheat germ cytoplasmic ribosomes, *J. Biol. Chem.* 263, 4932-4938.
- ↓ Pledger, W.J., Howe, P.H. and Leof, E.B. (1982) The regulation of cell proliferation by serum growth factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 397, 1-10.
- ↓ Stewart MJ, Tomas G (1994) Mitogen and protein synthesis: A role for ribosomal protein S6 phosphorylation; *BioEssays*; vol.16; p.p 809-815.

- ↓ Tomas, George (2000); An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation; *Nature Cell Biology*; vol.2 p.p. E71-E72

- ↓ Toshimasa, Yamazaky; Motoko, Takaoka (2003); A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes; *Eur. J. Biochem.* 270 p.p. 1269-1276.

- ↓ Tschochner, Herbert; Hurt, Ed (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleus to the cytoplasm; *Trends in Cell Biology*; vol. 13; No. 5 p.p. 255-263.

- ↓ White, M.F. and Kahn, C.R. (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269: 1-4.

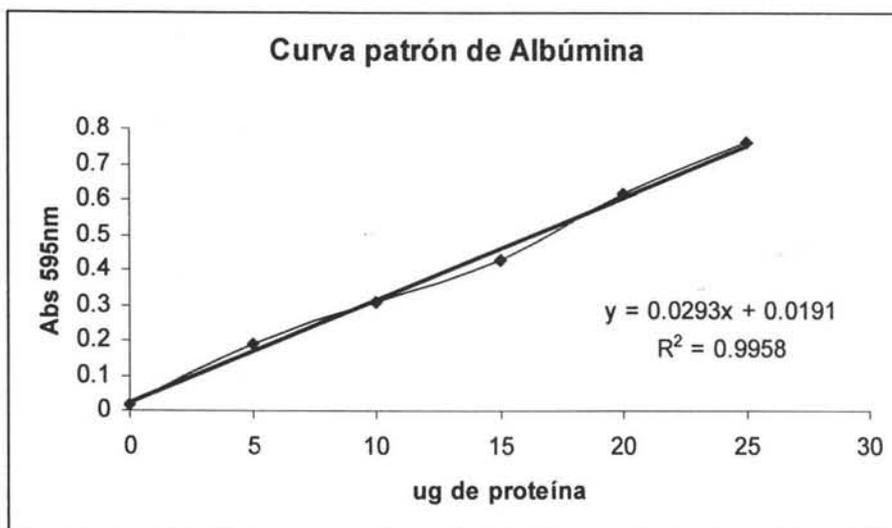
- ↓ Wu, R.S., Tsai, S. and Bonner, W.N. (1982) Patterns of histone variant synthesis can distinguish G₀ from G₁ cells. *Cell* 31, 367-374.

- ↓ Xiao Tu; Priti Batta (2002); Nuclear Translocation of insulin receptor substrate-1 by Oncogenes and IGF-1 EFFECT ON RIBOSOMAL SYNTHESIS; *The journal of biological Chemistry*; vol. 27, No. 46, p.p. 44357-44365.

ANEXO I

1) Curva patrón de albúmina (Bradford)

μg de proteína	Abs a 595 nm
0	0.014
5	0.1867
10	0.3105
15	0.428
20	0.6165
25	0.7595



2) Cálculos para analizar la síntesis de proteínas ribosomales

2.1) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford en 20 µl de muestra.

Muestra	Abs 595 nm
Radícula control	0.4248
Radícula Insulina	0.1284
Radícula Insulina + Rapamicina	0.3085
Coleoptilo control	0.5784
Coleoptilo Insulina	0.7126
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	0.3593

2.2) Calculo para obtener la concentración de proteína por µl de muestra.

Ejemplo: Radícula control.

Tomando como base la ecuación de la curva patrón de albúmina.

$$\mu\text{g de proteína} = [\text{Abs} - 0.0194] / 0.0293$$

$$\mu\text{g de proteína} = [0.4248 - 0.0194] / 0.0293 = 13.83$$

$$13.83 \mu\text{g de proteína} / 20 \mu\text{l de muestra} = \mathbf{0.6915 \mu\text{g} / \mu\text{l}}$$

Muestra	µg de proteína/µl	µg de proteína en 50 µl
Radícula control	0.69	35
Radícula Insulina	0.18	9
Radícula Insulina + Rapamicina	0.49	25
Coleoptilo control	0.95	48
Coleoptilo Insulina	1.18	59
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	0.58	29

2.3) Resultados de incorporación de marca radiactiva [³⁵S]- metionina

Muestra	cpm en 50µl	POZA
Radícula control	10716	188705
Radícula Insulina	5268	114974
Radícula Insulina + Rapamicina	9973	216753
Coleoptilo control	5029	41047
Coleoptilo Insulina	7816	78385
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	3358	33676

2.4) Cálculos de corrección por poza

Ejemplo:

Para la muestra control de radícula tenemos 10716 cpm y la poza es de 188705 por lo tanto la corrección por poza para raíz tratada con insulina es:

$$5268 \text{ cpm} \times \frac{188705 \text{ poza}}{114974 \text{ poza}} = X = 8646 \text{ cpm}$$

Muestra	cpm corregidas	cpm/µg de proteína
Radícula control	10716	306
Radícula Insulina	8646	960
Radícula Insulina + Rapamicina	8682	347
Coleoptilo control	5029	105
Coleoptilo Insulina	4092	69
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	4092	141

3) Cálculos para analizar la síntesis de proteínas citoplásmicas

3.1) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford en 2 µl de muestra.

Muestra	Abs 595 nm
Radícula control	0.4051
Radícula Insulina	0.5092
Radícula Insulina + Rapamicina	0.5612
Coleoptilo control	0.3673
Coleoptilo Insulina	0.5077
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	0.4516

3.2) Calculo para obtener la concentración de proteína por μl de muestra.

Ejemplo: Radícula control.

Tomando como base la ecuación de la curva patrón de albúmina.

$$\mu\text{g de proteína} = [\text{Abs} - 0.0194] / 0.0293$$

$$\mu\text{g de proteína} = [0.4051 - 0.0194] / 0.0293 = 13.16$$

$$13.16 \mu\text{g de proteína} / 2 \mu\text{l de muestra} = \mathbf{6.58 \mu\text{g} / \mu\text{l}}$$

Muestra	$\mu\text{g de proteína}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g de proteína en } 50 \mu\text{l}$
Radícula control	6.58	329
Radícula Insulina	8.4	420
Raíz Insulina + Rapamicina	9.2	460
Coleoptilo control	5.93	265
Coleoptilo insulina	8.3	415
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	7.4	370

3.3) Resultados de incorporación de marca radiactiva [^{35}S]- metionina

Muestra	cpm en $50\mu\text{l}$	POZA
Radícula control	145466	188705
Radícula Insulina	102666	114974
Radícula Insulina + Rapamicina	123368	216753
Coleoptilo control	67552	41047
Coleoptilo Insulina	51549	78385
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	45411	33676

3.4) Cálculos de corrección por poza

Ejemplo:

Para la muestra control de radícula tenemos 145466 cpm y la poza es de 188705 por lo tanto la corrección por poza para raíz tratada con insulina es:

$$\begin{array}{r} 102666 \text{ cpm} \text{ ----- } 114974 \text{ poza} \\ X \quad \quad \quad \text{----- } 188705 \text{ poza} \end{array} \quad X = 168504 \text{ cpm}$$

Muestra	cpm corregidas	cpm/ μ g de proteína
Radícula control	145466	442
Radícula Insulina	168504	401
Radícula Insulina + Rapamicina	107404	233
Coleoptilo control	67552	255
Coleoptilo Insulina	26994	65
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	55350	149

4) Cálculos para el análisis de la relación de Proteínas ribosomales / proteínas citoplásmicas

4.1) Proteínas ribosomales sin corrección por poza

Muestra	cpm en 50 μ l	μ g de proteína en 50 μ l	cpm/ μ g de proteína
Radícula control	10716	35	306
Radícula Insulina	5268	9	585
Radícula Insulina + Rapamicina	9973	25	399
Coleoptilo control	5029	48	105
Coleoptilo Insulina	7816	59	132
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	3358	29	116

4.2) Proteínas citoplásmicas sin corrección por poza

Muestra	cpm en 50µl	µg de proteína en 50 µl	cpm/µg de proteína
Radícula control	145466	329	442
Radícula Insulina	102666	420	244
Radícula Insulina + Rapamicina	123368	460	268
Coleoptilo control	67552	265	255
Coleoptilo Insulina	51549	415	124
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	45411	370	123

4.3) Relación ribosomales/citoplásmicas

Muestra	ribosomales	citoplásmicas	relación
Radícula control	306	442	0.69
Radícula Insulina	585	244	2.39
Radícula Insulina + Rapamicina	399	268	1.5
Coleoptilo control	105	255	0.41
Coleoptilo Insulina	132	124	1.06
Coleoptilo Insulina + Rapamicina	116	123	0.94

ESTA TESIS NO SALL
DE LA BIBLIOTECA

5) Cálculos para el análisis de la síntesis de DNA

Ejemplo para radícula tratada con insulina

Cálculos para obtener la cantidad de DNA

$$RI = [\text{Abs } 260\text{nm} (50\mu\text{g DNA/ml}) (100\mu\text{l})] / 10\mu\text{l}$$

$$RI = 1.1796(50\mu\text{g/ml})(100\mu\text{l})/10\mu\text{l} = 0.589\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Cantidad de DNA en 50 μl

$$RI = 0.589\mu\text{g}/\mu\text{l} (50\mu\text{l}) = 29.5\mu\text{g de DNA}$$

cpm 73988

$$73988/29.5 = 2508\text{cpm}/\mu\text{g de DNA}$$

5.1) Resultados de DNA.

Muestra	cpm/μg de DNA
Radícula control 1	1244
Radícula control 2	1829
Radícula Insulina 1	2508
Radícula Insulina 2	2388
Coleoptilo control 1	292
Coleoptilo control 2	359
Coleoptilo Insulina 1	128
Coleoptilo Insulina 2	269

ANEXO II

Soluciones para el análisis de proteínas ribosomales y citoplásmicas.

Buffer de extracción pH = 8.2

- 1) 50 mM Tris-ácido acético
- 2) 50 mM KCl
- 3) 5 mM acetato de Magnesio
- 4) 5 mM 2-mercaptoetanol
- 5) 250 mM sacarosa

Buffer de disociación pH = 7.6

- 1) 20 mM Tris-HCl
- 2) 400 mM KCl
- 3) 3 mM MgCl₂
- 4) 5 mM 2-mercaptoetanol
- 5) 5%(m/v) sacarosa

Buffer A₃ de resuspensión pH = 7.6

- 1) 20 mM Hepes
- 2) 20 mM KOH
- 3) 5 mM Acetato de Magnesio
- 4) 125 mM Acetato de Potasio
- 5) 6 mM 2-mercaptoetanol
- 6) 1M Acetato de Magnesio

Colchón de sacarosa en Buffer de extracción pH= 8.2

1) KCl 0.3355g

2) Sacarosa 0.85g

* Disolver en 10 ml de buffer de extracción.

Líquido de Bray (Centelleo) para cuantificación de marca radiactiva.

1) PPO 2g

2) POPOP 0.1g

3) Naftaleno 30g

4) Etilenglicol 10 ml

5) Metanol 50 ml

* Aforar a 500 ml con dioxano

Marca radiactiva para síntesis de proteínas

[³⁵S]- Metionina

Amersham Biosciences

En solución acuosa

Cat: AG 1594

Reactivo de Bradford

Bio-Rad Protein Assay

Cat. 500-0006

Soluciones para el análisis de rRNA

Trizol®, No. de catálogo 15596-026, INVITROGEN

LiCl 10M

Agua DEPC (1ml de DEPC / litro de agua)

Buffer TBE 10X

- 1) Tris 108 g/l
- 2) Àcido bórico 55g/l
- 3) EDTA 0.5M, pH = 8 40ml/l

Bromuro de etidio 1%

Buffer de Transferencia 20X SSC

- 1) 3M NaCl
- 2) 0.3M citrato de sodio

Marca radiactiva para síntesis de rRNA

[³²P]-Ortofosfato

Amersham Pharmacia biotech

En ácido clorhídrico diluido pH 2-3

Cat. PBS11

Soluciones para el análisis de DNA

Solución de extracción CTAB

- 1) 2% (m/v) CTAB
- 2) 100 mM Tris-HCl, pH = 8.0
- 3) 20 mM EDTA, pH = 8.0
- 4) 1.4 M NaCl

Solución de precipitación CTAB

- 1) 1% (m/v) CTAB
- 2) 50 mM Tris-HCl, pH = 8.0
- 3) 10 mM EDTA, pH = 8.0

Buffer TE

- 1) 10 mM Tris-HCl, pH = 8.0
- 2) 0.1 mM EDTA, pH = 8.0
- 3) 1 M NaCl

Solución CTAB/NaCl

- 1) 10% (m/v) CTAB
- 2) 0.7M NaCl

Marca radiactiva para síntesis de DNA:

[³H]-Timidina

Amersham Biosciences

En solución acuosa

Cat: TRK 758