



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

CONTRIBUCIÓN DE LOS ESFINGOLÍPIDOS A LA
ACTIVIDAD DE LA ATPasa de H⁺ EN PLANTAS JÓVENES
DE *Arabidopsis thaliana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

EDGAR MEJÍA HERNÁNDEZ



MEXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Profesora Marina Gavilanes Ruíz
Vocal	Profesor Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	Profesora Rebecca Elizabeth Franco y Bourland
1er. Suplente	Profesor José Ignacio Páramo Ramírez
2do. Suplente	Profesora Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Asesor del tema

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Sustentante

Edgar Mejía Hernández

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, en el laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Edgar Mejía Hernández realizó esta tesis de licenciatura gracias a una beca del programa PAPIIT No.IN211409 (DGAPA –UNAM) y a una beca otorgada por CONACYT No. 101521.

A la colaboración técnica de la Q.F.B. Ma. del Consuelo Enríquez Arredondo, la cual es muy apreciada.

Al Dr. Edgar B. Cahoon (Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E. U.) por proporcionarnos las semillas de *Arabidopsis thaliana* usadas en este trabajo de tesis.

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por permitirme llegar hasta este punto de mi vida.

Le agradezco también a toda mi familia por apoyarme siempre y estar conmigo en todos los momentos bueno y malos por los que he pasado para estar aquí en la Universidad, pero en especial, a mi mamá Guadalupe, a mi hermana Adriana y a mi papá Enrique por sus consejos y su comprensión para conmigo.

Este trabajo de tesis también se lo dedico a los amigos que han compartido conmigo infinidad de momentos tanto en la Preparatoria como en la Universidad. De manera especial quisiera referirme a los ex-512 con los que pasé la mayoría de mis años en la Preparatoria y con los que compartí muchos viajes y fiestas, pues algunos de ellos aún están muy presentes en mi vida.

También la dedicatoria es para las personas que conocí en la Facultad de Química y que considero como mis grandes amigos QA's: Ana, Oscar, Alejandra, Selene y Marie, gracias por todos los momentos que pasamos y que pasaremos juntos, pero sobretodo por estar conmigo en estos años.

También les dedico este trabajo a las personas que laboraron y compartieron conmigo este tiempo en el laboratorio 101 del conjunto E, por apoyarme desde que inicié mi servicio social hasta este momento, en el que terminé mi trabajo de tesis, y por esas horas de comida que fueron geniales,

De manera muy especial agradezco a la Dra. Marina quien con su guía, sus consejos y su comprensión este trabajo se hizo posible, y a Chelo quien siempre supo ayudarme y me apoyó en todo momento.

Por último le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella y de esta maravillosa facultad de Química.

¡GRACIAS!

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
Función de la membrana plasmática en plantas	1
Función membranal en la transducción de señales	1
Función membranal en el Transporte	2
Estructura de la membrana plasmática de plantas	3
Propiedades generales de las membranas	3
Tipos de Lípidos Membranales	4
Glicerofosfolípidos	4
Esfingolípidos	5
Esteroles	8
Tipos de Proteínas de acuerdo a su forma de asociación con la membrana	9
Tipos de Proteínas membranales transportadoras de solutos de acuerdo a su mecanismo de transporte	10
Acarreadores	11
Canales iónicos	12
Bombas	13
ATPasa de H ⁺	13
Estructura	13
Isoformas	16
Procesos fisiológicos en los que participa	17
Interacción con lípidos membranales	18
ATPasa de Ca ²⁺	19
Otras bombas de cationes	20
Hidratos de carbono	21
ANTECEDENTES	22
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Germinación de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Aplicación de metoxifenzida para promover el silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT en las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Obtención de raíces y hojas de las plántulas y preparación de homogenados para la obtención de su fracción microsomal	27
Determinación de proteína por el método de Lowry	28
Determinación del fosfato inorgánico por el método de Chifflet modificado. Curva estándar	28
Ensayo de hidrólisis de ATP	28
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
RESULTADOS	31
Efectos fenotípicos del silenciamiento de la subunidad LCB2b en plántulas del genotipo silvestre y de las líneas <i>Atlcb2a-1</i> y <i>Atlcb2b hp/Atlcb2a</i>	31
Contenido membranal total de raíces en cada línea. Rendimiento en proteína membranal	36

Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H ⁺ en las fracciones microsomales de raíces de cada línea	37
Determinación de hidrólisis total de ATP	37
Determinación de la sensibilidad a Na ₃ VO ₄ de la hidrólisis total de ATP	38
Contenido membranal total de hojas en cada línea. Rendimiento en proteína membranal	40
Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H ⁺ en las fracciones microsomales de hojas de cada línea	41
Determinación de hidrólisis total de ATP	41
Determinación de la sensibilidad a Na ₃ VO ₄ de la hidrólisis total de ATP	42
Contenido membranal total de raíces en cada línea con mayor tiempo de exposición al inductor	46
Rendimiento en proteína membranal	
Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H ⁺ en las fracciones microsomales de raíces de cada línea	47
Determinación de hidrólisis total de ATP	47
Determinación de la sensibilidad a Na ₃ VO ₄ de la hidrólisis total de ATP	48
Contenido membranal total de hojas en cada línea con mayor tiempo de exposición al inductor	50
Rendimiento en proteína membranal	
Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H ⁺ en las fracciones microsomales de hojas de cada línea	51
Determinación de hidrólisis total de ATP	51
Determinación de la sensibilidad a Na ₃ VO ₄ de la hidrólisis total de ATP	52
DISCUSIÓN	56
Efectos fenotípicos del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b en las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
Recuperación de la cantidad de proteína en las fracciones microsomales de plántulas expuestas a condiciones de silenciamiento	60
Efectos del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT en la actividad de ATPasa de H ⁺ de las fracciones microsomales	62
La actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de las raíces de las plántulas con el silenciamiento del gene <i>LCB2b</i>	62
La actividad de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de la parte aérea de las plántulas con el silenciamiento del gene <i>LCB2b</i>	67
CONCLUSIONES PARTICULARES	77
CONCLUSIÓN GENERAL	78
PERSPECTIVAS	78
APÉNDICE	79
BIBLIOGRAFÍA	90

INTRODUCCIÓN

1. Función de la membrana plasmática en plantas

La principal función de la membrana plasmática es permitir la separación fundamental a nivel celular, actuando como frontera física entre los medios intra y extracelulares manteniendo las propiedades de cada uno de ellos (Callen, 2000). El funcionamiento celular implica la importación continua de materia prima y la exportación de productos (incluidos desechos) del metabolismo, para transportar con eficacia todos los compuestos del entorno indispensables para la vida. Las células cuentan con sistemas específicos constituidos por proteínas especializadas llamadas receptores, las cuales actúan como sensores de señales externas transfiriendo información a través de la membrana sobre la mayoría de las funciones biológicas relacionadas con la concentración de ciertos compuestos (incluida la función de mensajeros secundarios). Adicionalmente, las membranas y en especial la plasmática, contienen proteínas transmembranales que llevan a cabo el transporte bidireccional de solutos entre el interior celular y el medio externo (Alberts y col., 1994; Callen, 2000).

1.1. Función membranal en la transducción de señales

La transducción de señales consiste en la transformación de un tipo de señal externo en una señal intracelular de distinto tipo, la cual incluye una serie de reacciones en cascada en el interior de la célula dando lugar a una variación de la actividad celular directa tanto a nivel de metabolismo como de la expresión de genes.

La membrana plasmática contiene proteínas intrínsecas cuya función es detectar las diversas señales provenientes del entorno de la célula, éstas pertenecen a la familia de receptores membranales. Estas moléculas tienen en común un dominio extracelular voluminoso que reconoce y fija moléculas específicas tales como hormonas polipeptídicas, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular o proteínas asociadas a las membranas de otra célula. Estas proteínas no simplemente fijan al ligando, si no que envían información a través de la membrana en forma de una modificación en su configuración (Callen, 2000). En algunos casos, sin embargo, los receptores están dentro de las células blanco y el ligando debe entrar a la célula para activarlo, estas moléculas señal por tanto deben ser lo suficientemente pequeñas e hidrofóbicas para difundir a través de la membrana plasmática (Alberts y col., 1994).

Las moléculas señal pueden actuar en blancos a distancia o como mediadores locales actuando sólo en las células cercanas a la célula que secretó la molécula; este último proceso es conocido como señalización parácrina. Para que la señalización parácrina resulte ser adecuada es necesario que las moléculas secretadas no puedan difundir lejos, es por esta razón que son tomadas rápidamente por las células blanco vecinas, destruidas por enzimas extracelulares o inmovilizadas por la matriz extracelular. Otro tipo de señalización especializada es la mediada por células endócrinas, estas secretan moléculas llamadas hormonas, las cuales llevan la señal a las células blanco situadas a grandes distancias por toda la estructura de la planta (Alberts y col., 1994).

1.2. Función membranal en el transporte

Todos los sistemas de transporte conocidos (canales, acarreadores o bombas) están constituidos por proteínas intrínsecas o integrales, transmembranales, que atraviesan la membrana una o múltiples veces. Esta disposición de todas las proteínas transportadoras es fundamental para asegurar de manera conveniente sus funciones de transferencia orientada a solutos (Callen, 2000).

Las modalidades de intercambio en cuanto a la direccionalidad de las especies que son transportadas a través de la membrana por la misma proteína se dividen en tres tipos:

- a. Uniporte. Cuando se transporta un sólo compuesto.
- b. Simporte. Cuando el transporte de dos solutos se realiza en el mismo sentido.
- c. Antiporte. Cuando el intercambio de solutos se da en sentidos opuestos.

Energéticamente, las modalidades del transporte mediado por proteínas se dividen en:

- a. Transporte pasivo. En el caso de moléculas sin carga, la ley que determina el sentido del transporte es la de difusión; este movimiento espontáneo no necesita aporte de energía y se realiza del compartimiento más concentrado al más diluido. Este es entonces el transporte pasivo, o espontáneo.
- b. Transporte activo. Por otra parte, las células se pueden oponer a la difusión mediante consumo de energía, generalmente en forma de una reacción de hidrólisis de ATP, así, son capaces de transportar iones o moléculas a contracorriente gracias a un mecanismo que se denomina bombeo.

Se tiene entonces el transporte activo, que necesariamente requiere una fuente de energía. En el caso de sustancias con carga, además de su concentración es preciso tomar en cuenta la diferencia de potencial eléctrico existente. Existe también un transporte activo de tipo secundario,

en el cual se transportan moléculas o iones en contra de su gradiente de concentración pero sin utilizar la hidrólisis de ATP como fuente directa de energía, lo anterior se efectúa mediante el apareamiento del transportador con otro compuesto, el cual se desplaza espontáneamente en el sentido de su gradiente, este compuesto que actúa como motor es algún ion que presenta un fuerte gradiente de concentración (H^+ en el caso de células vegetales o bacterias) el cual es producido por bombas que utilizan ATP o por reacciones de oxidoreducción (Callen, 2000).

Las proteínas que efectúan este tipo de transporte poseen dos sitios de reconocimiento: uno para el ión motor y otro para el soluto a transportar. La fijación del ión motor sobre su sitio favorece la fijación del soluto sobre su espacio correspondiente, mediante una transición conformacional de la proteína (Callen, 2000).

2. Estructura de la membrana plasmática de plantas

2.1. Propiedades generales de las membranas

La bicapa lipídica ha sido firmemente establecida como la base universal de la estructura de la membrana celular, está formada por dos monocapas (o caras) de composición lipídica diferente y moléculas proteicas que se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes, lo cual hace que tengan propiedades de estabilidad, de continuidad estructural y de permeabilidad selectiva. En general, la bicapa lipídica está compuesta por tres grupos de macromoléculas: Lípidos, Proteínas e Hidratos de carbono.

La asimetría es una característica fundamental de las membranas biológicas; todas sus propiedades fisiológicas se basan en ella. La asimetría se refiere a la característica que tiene la bicapa lipídica de poseer distinto orden y localización de sus componentes en una y otra de sus monocapas.

En relación a las proteínas presentes, éstas tienen organización y orientación muy precisas en la bicapa, la cual permanece relativamente fija; la asimetría relacionada con los carbohidratos es un fenómeno adicional dentro de la asimetría membranal, ya que éstos se unen a los otros tipos de moléculas: proteínas y lípidos y originando por tanto glicoproteínas y glicolípidos (Callen, 2000; Heldt, 2005), dichos carbohidratos se localizan en la cara no citosólica de la bicapa. La fluidez de la membrana es otra propiedad biológica importante y se refiere a la capacidad que manifiestan sus diversos constituyentes de moverse sobre su sitio o desplazarse, en ocasiones, a distancias relativamente grandes (Alberts y col., 1994; Callen, 2000). A esta propiedad contribuye de manera fundamental la movilidad o difusión lateral de

lípidos y proteínas que puede consistir en el desplazamiento de las moléculas de manera lateral o vertical, en un movimiento de rotación sobre su propio eje o en el caso de un lípido, en un movimiento de flexión de sus cadenas acílicas, ocurriendo todos estos movimientos dentro de una misma monocapa. Sin embargo, puede presentarse también un movimiento en el cual un lípido migra por completo de una a otra monocapa, denominado “flip-flop”, aunque éste es muy lento y poco frecuente (Alberts y col., 1994).

La mayoría de las membranas, incluyendo la membrana plasmática, son sintetizadas en el retículo endoplásmico (RE) (Heldt, 2005). Este proceso es muy complejo, pues requiere de la síntesis y ensamblaje de áreas membranales en forma de vesículas que contienen tanto proteínas como lípidos específicos destinados a la membrana apropiada. Es en el RE en donde se genera parte de la asimetría de los lípidos membranales que se van integrando a la vesícula naciente en el RE, por medio de translocadores que mueven moléculas específicas de fosfolípidos de una a otra monocapa lipídica (Alberts y col., 1994).

2.2. Tipos de lípidos membranales

2.2.1. Glicerofosfolípidos

Un glicerofosfolípido, conocido comúnmente sólo como fosfolípido (PL), es la molécula que forma la “columna vertebral” de la membrana plasmática. En su tercera función alcohol presenta un grupo fosfato mientras que en los C1 y C2 posee enlaces éster con cadenas de ácidos grasos, al tener esta estructura se le denomina como ácido fosfatídico. La esterificación de una molécula al OH del grupo fosfato en el ácido fosfatídico da lugar formalmente a un PL.

Los glicerofosfolípidos por tanto, tienen como estructura fundamental la siguiente:

- a. Una molécula de glicerol.
- b. Dos moléculas de ácido graso.
- c. Un grupo fosfato.
- d. Una molécula suplementaria enlazada al grupo fosfato. Esta molécula puede ser un alcohol (como glicerol, inositol, colina o etanolamina) o un aminoácido (como serina).

Los PL son moléculas anfífilas pues los grupos fosfato y los grupos de cabeza son las porciones polares, mientras que las cadenas de ácidos grasos son sus partes no polares. En algunos PL de membranas biológicas, las cadenas de ácidos grasos que se encuentran en el C1 están saturadas conteniendo de 16 a 18 carbonos, mientras que las cadenas que se encuentran en el C2 frecuentemente están insaturadas.

Este tipo de lípidos definen los dominios polares y no polares de la bicapa, lo cual tiene importancia en sus propiedades químicas, biológicas y físicas (Luckey, 2008).

Los PL proporcionan fuentes de segundos mensajeros para la señalización a través de la membrana, la intensificación de la actividad de las enzimas de membrana y el transporte de proteínas. Su grado de insaturación contribuye a la fluidez de la membrana influyendo en la inserción y secuestro de proteínas (Luckey, 2008).

2.2.2. Esfingolípidos

Los esfingolípidos son una clase de lípidos ubicua que está presente tanto en organismos eucariontes como en bacterias. Sólo en *Arabidopsis* se ha descrito que hay cerca de 168 esfingolípidos distintos; en general para las plantas, los esfingolípidos pueden ser divididos en esfingolípidos complejos: glicosil inositol fosfoceramidas y glicosilceramidas y sus intermediarios metabólicos, mismos que pueden provenir de las vías de biosíntesis o de degradación y comprenden a las ceramidas y a las BCL libres. Todos estos esfingolípidos vegetales tienen una estructura compleja, con numerosas combinaciones posibles de ácidos grasos, bases esfingoideas y grupos de cabeza (Markham y col., 2007).

Al contenido total de especies de esfingolípidos dentro de una planta determinada o de sus órganos o tejidos se le denomina "esfingolipidoma". Si bien hay una gran diversidad en la composición del esfingolipidoma, la base sobre la cual se construyen todos los esfingolípidos es un alcohol aminado de cadena larga o base de cadena larga (BCL) formado predominantemente por 18 átomos de carbono, la cual presenta un grupo hidroxilo en el C1 y C3 y un grupo amino en el C2. Para la formación de la ceramida, el grupo amino de la BCL es acilado con un ácido graso, y para el caso de células vegetales, este ácido graso tiene entre 14 y 26 átomos de carbono (Pata y col., 2010).

Esta *N*-acil-BCL es la columna vertebral de los esfingolípidos que se han detectado en las células, y por lo tanto el bloque de construcción básico para la síntesis de esfingolípidos más complejos.

La estructura de la ceramida es susceptible de ser modificada tanto en la fracción correspondiente al ácido graso como en la de la BCL; pudiendo variar su longitud, grado de metilación, o características de hidroxilación o desaturación (número y posición de las modificaciones) (Figura 1) (Pata y col., 2010).

La estructura fundamental de los esfingolípidos comprende:

- Una molécula de esfingosina (alcohol aminado de cadena larga).
- Una molécula de ácido graso.
- Una molécula de ácido fosfórico, en el caso de los esfingolípidos ácidos.
- Una molécula suplementaria enlazada al ácido fosfórico que es en general un carbohidrato, dicho carbohidrato en el caso de los esfingolípidos complejos neutros, se encuentra unido directamente al OH del C1 de la esfingosina.

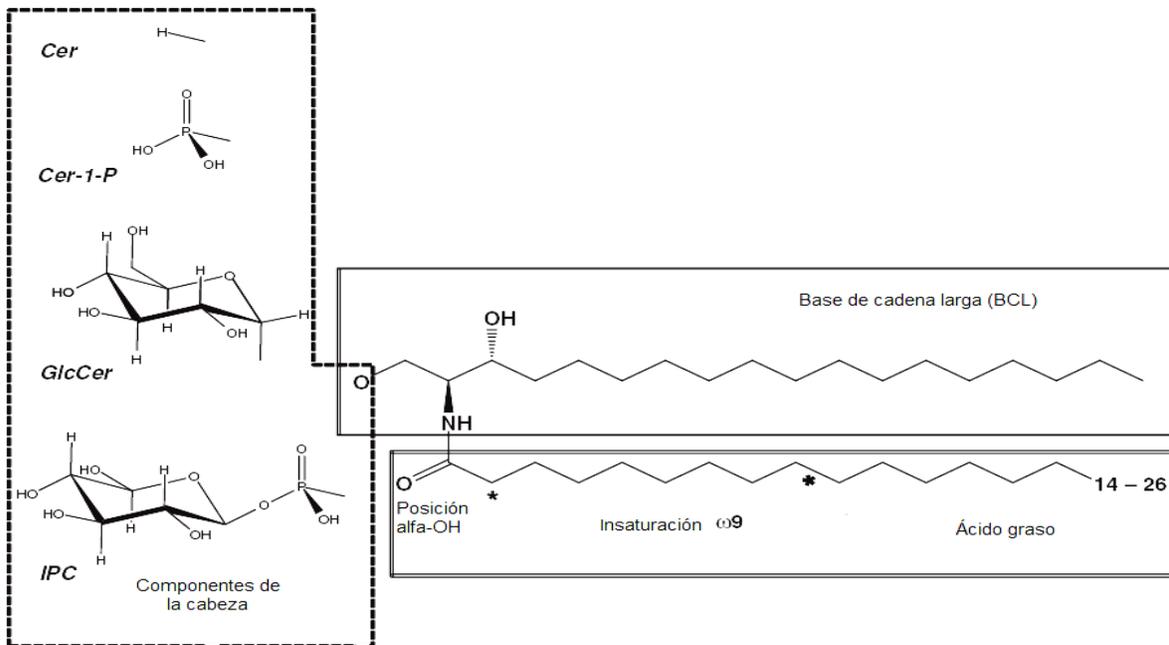


Figura1. **Esfingolípidos complejos en plantas.** La estructura está formada de una parte hidrofóbica (ceramida) y una cabeza polar, la cual puede por ejemplo, ser un grupo fosfato (*Cer-1-P*), un azúcar (*GlcCer*, glicosilceramida) o un grupo fosfato unido a uno o más residuos de azúcar (*IPC*, inositolfosfoceramida) (Pata y col., 2010).

Las glicosil-inositol-fosfoceramidas (GIPCs) son los esfingolípidos complejos más abundantes en plantas y hongos, pero están ausentes en células animales. Muchos de ellos han sido ampliamente caracterizados pudiéndose obtener mediante técnicas de extracción tradicionales. Se les denomina también esfingolípidos ácidos o negativos por el grupo fosfato.

Otra clase de esfingolípidos en plantas, como se mencionó anteriormente, son las glicosilceramidas (*GlcCer*) de estructura más simple que las GIPCs. A menudo se les denomina cerebrósidos o glucocerebrósidos pues son similares a la galactosilceramida presente en el cerebro.

También han sido ampliamente caracterizados en términos de su estructura pues son muy abundantes en las membranas plasmática y vacuolar de la planta y son relativamente fáciles de extraer y purificar. Para estos esfingolípidos, la cabeza polar la constituye una hexosa, ya sea β -glucosa o β -manosa unida al C1 de la BCL. Además de la hexosa, de manera frecuente el ácido graso de las glicosilceramidas de plantas está α -hidroxilado en el C16, al no tener ácido fosfórico, su cabeza polar constituida por un azúcar le confiere su identidad a la molécula (Callen, 2000; Pata y col., 2010). Estos esfingolípidos se encuentran en la monocapa apoplástica de la bicapa lipídica. Numerosas son las funciones que se han atribuido a las GlcCer, incluyendo la estabilidad y permeabilidad de la membrana y patogénesis; han sido implicadas también en la tolerancia al enfriamiento y congelación, mediante un mecanismo de criostabilidad de la membrana pudiendo actuar de dos formas:

- a. Influenciando la fluidez de la monocapa mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, conduciendo a una menor temperatura de transición de la membrana de un gel a líquido cristalino. (Pata y col., 2009).
- b. Afectando la curvatura intrínseca de la membrana plasmática conduciendo a la reducción del espacio entre la membrana plasmática y las endomembranas. (Pata y col., 2009).

Las GlcCer se han implicado también en la tolerancia a la sequía, pues estudios lipidómicos han demostrado que la membrana vacuolar posee altas concentraciones de GlcCer al estar la planta en un proceso de adaptación a la sequía, con lo cual se sugiere una función de tolerancia asociada a dicho proceso.

Las ceramidas por otra parte, han sido menos documentadas pues su abundancia es mucho menor que la de las GIPCs y las GlcCer. Las ceramidas son relativamente simples pues sólo están formadas por la acilación de un ácido graso (de cadena α -hidroxilada muy larga) a la BCL, la cual por lo general es trihidroxilada. Estas han sido referidas como importantes en la muerte celular programada de plantas (Pata y col., 2010). Por su lado, tanto las BCL como las BCL que están fosforiladas (BCL-Ps) son especies que están en muy bajas concentraciones en la célula, por lo que son mediadores potencialmente interesantes de las respuestas celulares.

A este respecto, dos son los procesos en los que las BCL intervienen como segundos mensajeros en plantas: el cierre de los estomas y la muerte celular programada en plantas (Pata y col., 2010). Datos referentes a la localización de estos esfingolípidos en la célula revelan que se encuentran ubicados en la membrana plasmática, la composición y proporción relativamente similar entre las GIPCs y las BCL en fracciones aisladas de hojas de *Arabidopsis*

parecen dar crédito a esta suposición. Las GIPCs en plantas pueden ser determinantes importantes en los procesos de señalización celular y en su comunicación, así como en la clasificación de proteínas; de manera similar al papel de los esfingolípidos complejos en el desarrollo de los animales (Pata y col., 2010). Sin embargo, dada la gran variedad de estructuras esfingolípídicas no hay estudios que describan con precisión la composición de esfingolípidos en las diferentes membranas celulares.

En particular, en plantas el desafío es mayor, debido a la gran heterogeneidad encontrada en el componente de la base de cadena larga y en las otras dos porciones (Markham y col., 2007; Pata y col., 2010). Ensayos de solubilización y separación de este tipo de moléculas en hojas de plantas de *Arabidopsis* han demostrado que los esfingolípidos de tipo aniónico contienen BCL trihidroxiladas en más del 95% de los casos y que los esfingolípidos neutros contienen alrededor de 65% de BCL que además de estar trihidroxiladas presentan insaturaciones, como por ejemplo la t18:1, la cual presenta al mismo tiempo una mayor proporción del isómero t18:1(8Z) que del t18:1(8E) (Markham y col., 2006).

A este respecto, mediante ensayos por HPLC para analizar y caracterizar la fracción de esfingolípidos neutros se pudo conocer que estaban presentes la ceramida, la 2-hidroxi-ceramida, y la monohexosilceramida al hacer la comparación con los estándares puros disponibles. Además, mediante espectroscopía de masas y analizando la fracción de los esfingolípidos aniónicos se pudo determinar que el esfingolípidos cargado más abundante en *Arabidopsis* podría ser la hexosa- hexurónico-inositolfosfoceramida (Markham y col., 2006)

2.2.3. Esteroles

La tercera clase de lípidos que se pueden encontrar en la membrana son los esteroides, los cuales incluyen compuestos derivados de una unidad de cinco carbonos llamada isopreno. Los esteroides libres más comunes de la membrana plasmática de plantas son el campesterol (C₂₈) el sitosterol (C₂₉) y el stigmasterol (C₂₉), los cuales difieren de los esteroides presentes en levaduras, mohos o células animales. El sitosterol es el esteroide más abundante representando del 50% al 80% de los esteroides totales contenidos en algunas plantas (Buchanan y col., 2000).

El colesterol, que es el esteroide libre más abundante de las células animales es el menor componente en la vasta mayoría de las especies de plantas analizadas hasta la fecha siendo la avena la excepción a esta tendencia; los ésteres de esteroide, los glucósidos esteroides y los glucósidos esteroides acilados son más abundantes en plantas que en animales.

Todos los esteroides de las plantas se sintetizan a partir del cicloartenol y como característica, presentan una alquilación en el C24 con sustituyentes en el C1 o el C2 (Buchanan y col., 2000).

2.3. Tipos de proteínas de acuerdo a su forma de asociación con la membrana

La forma en la que están asociadas las proteínas a la membrana con los lípidos de la bicapa usualmente refleja la función de las proteínas (Alberts y col., 1994). En general se distinguen proteínas intrínsecas (integrales) y proteínas extrínsecas (periféricas). Las integrales forman enlaces fuertes y estables, aunque no son de tipo covalente con los lípidos, atraviesan la bicapa y pueden presentar dominios que incluyen ambas partes de ella, por lo que se dice que son transmembranales. En algunos casos, un dominio atraviesa sólo uno u otro lado, por lo que se les llaman intrínsecas, externas o internas (Callen, 2000).

Presentan regiones que son hidrofóbicas y regiones que son hidrofílicas; las regiones hidrofóbicas pasan a través de la membrana (una o varias veces mediante α -hélices u hojas β) e interactúan con las colas acílicas de los lípidos en el interior de la bicapa; las regiones hidrofílicas están expuestas hacia el agua en uno y otro lado de la membrana. Las proteínas de tipo intrínseco son por tanto singulares, en el sentido de que para mantenerse en su sitio presentan grandes dominios hidrofóbicos a lo largo de sus cadenas que les permiten internarse en la bicapa lipídica (Alberts y col., 1994).

Por otro lado, las proteínas periféricas no entran jamás en contacto directo con la porción hidrofóbica de la bicapa, sino que se encuentran unidas mediante enlaces débiles con las proteínas integrales o bien con las partes polares de los lípidos. Entre las proteínas periféricas también se distinguen las de tipo interno y externo; hay casos en los que las proteínas extrínsecas se unen a la bicapa por medio de enlaces covalentes con lípidos, y en otros casos, a través de oligosacáridos unidos a lípidos.

Debido a su ubicación, las proteínas de tipo extrínseco tienen las propiedades clásicas de proteínas hidrosolubles, las interacciones entre la proteína y la membrana se rompen fácilmente por modificaciones de fuerza iónica o pH del entorno, interrumpiéndolas a nivel de enlaces electrostáticos (Callen, 2000).

Las representaciones de las distintas formas de unión de las proteínas a la membrana plasmática se muestran en la Figura 2.

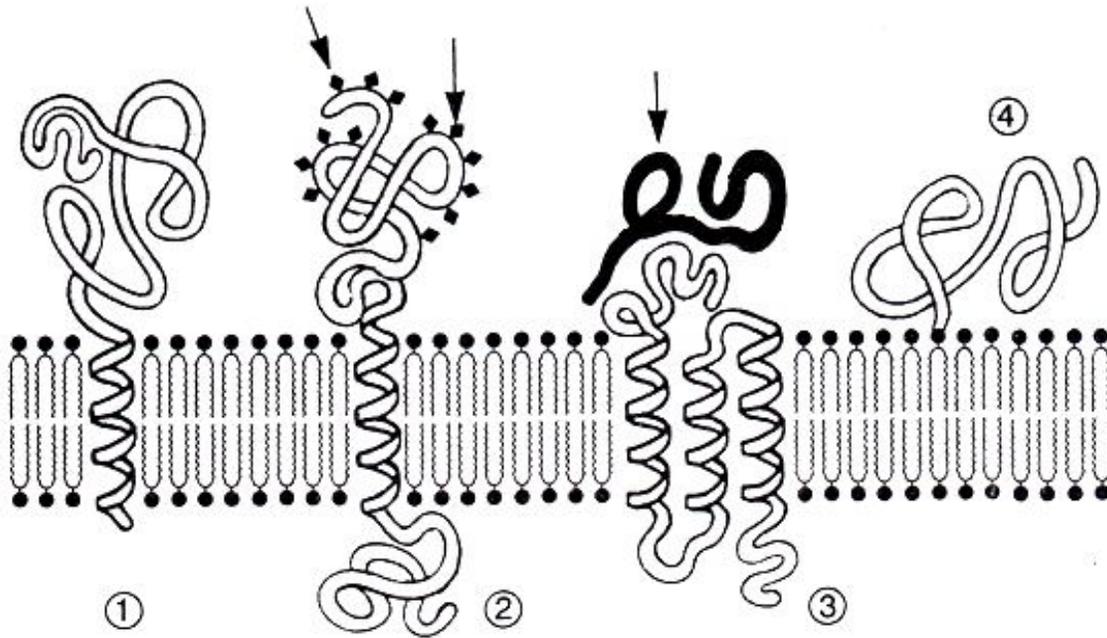


Figura 2. **Tipos de proteínas en membrana.** Se muestran las distintas formas de unión de proteínas a la membrana plasmática de la célula. En 1 y en 2 se ejemplifican proteínas integrales que atraviesan la membrana una sola vez, una de ellas fuertemente glicosilada (indicado por flechas); en 3 una proteína que la atraviesa múltiples veces sobre la cual se encuentra anclada una proteína extrínseca (en trazo más oscuro) y en 4 se muestra una proteína extrínseca unida mediante un lípido membranal (Callen, 2000).

2.4 Tipos de proteínas membranales transportadoras de solutos de acuerdo a su mecanismo de transporte

Si bien la difusión es un fenómeno que permite el intercambio de solutos a través de la membrana plasmática, se ha observado que numerosos compuestos orgánicos la atraviesan con una velocidad mucho mayor de lo que permite prever su coeficiente de permeabilidad medido en bicapas artificiales; fenómenos como el de saturación de transporte, en el cual la velocidad de transporte no es siempre proporcional a la concentración de soluto y la inhibición del transporte de otras moléculas por parte de estos compuestos orgánicos, revelan la existencia de una familia de transportadores proteicos que actúan acelerando la difusión de diversos compuestos a través de la bicapa lipídica. Las proteínas de este tipo se denominan acarreadores o permeasas o transportadores, canales y bombas (Callen, 2000).

2.4.1 Acarreadores

Un acarreador puede transportar de 10^2 a 10^4 moléculas por segundo, puede transportar solutos de forma activa o pasiva. Funciona de tal manera que nunca presenta un sitio de fijación de soluto simultáneamente en ambos lados de la bicapa, en ellos se observa un mecanismo de unión o enlace entre el compuesto transportado y la molécula portadora pues presenta uno o diversos sitios de reconocimiento y fijación específica del soluto, que tiene como consecuencia un cambio de conformación (fenómeno conformacional) de dicho acarreador y el paso del soluto al otro lado de la membrana como se muestra en la Figura 3. El funcionamiento de estos transportadores es reversible y el sentido del transporte sólo depende de las concentraciones relativas en ambos lados de la membrana (Callen, 2000).

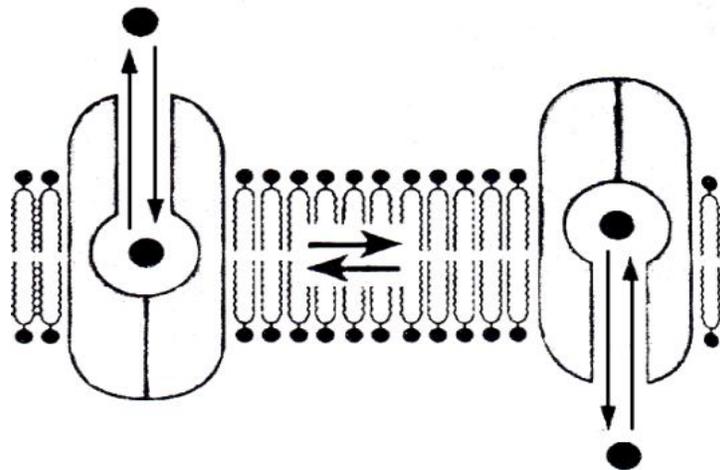


Figura 3. **Acarreadores o permeasas o transportadores.** Se ilustra el cambio de conformación que sufre un transportador tipo permeasa al trasladar un soluto de uno a otro lado de la membrana plasmática (Callen, 2000).

2.4.2 Canales iónicos

Están constituidos por una amplia categoría de proteínas portadoras que funcionan según el principio de un canal acuoso simple, es decir, forman un poro interno forrado literalmente con aminoácidos hidrofílicos que se encuentran llenos de agua y por el que se difunden selectivamente iones más o menos de manera precisa.

Esta selectividad se debe a la presencia de características no sólo del interior del canal, sino de la región de entrada, de modo que sólo un tipo específico de iones pueda atravesar con facilidad. Los canales son sistemas sumamente eficaces de intercambio pues transportan cerca de 10^6 a 10^8 iones por segundo, el transporte es puramente pasivo llevándose a cabo necesariamente en el sentido del gradiente tanto de concentración como electroquímico del soluto.

En general, los canales se comportan como compuertas cerradas de apertura temporal breve y muy frecuentemente regulada por una señal exterior (Figura 4) como las siguientes:

- Canales regulados por el potencial de membrana. Se abren por la modificación del campo eléctrico transmembranal.
- Canales regulados por un ligando. Son sensibles a la fijación de un ión, neurotransmisor, nucleótido o proteína.
- Canales regulados mecánicamente. Sensibles a fenómenos mecánicos.

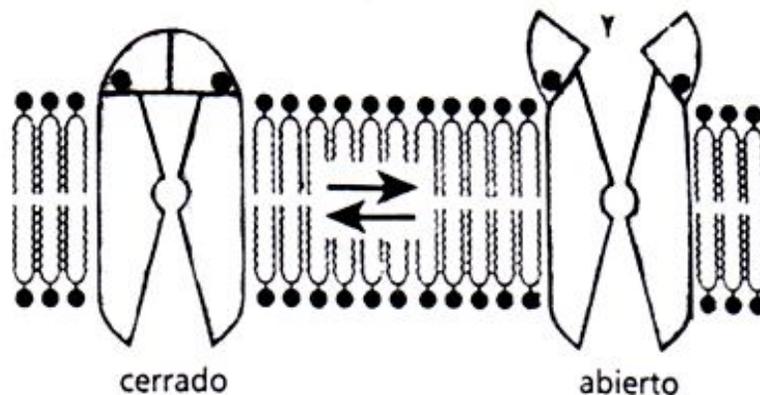


Figura 4. **Canal iónico.** Esquema de dos estados posibles de un canal iónico, el cual se abre para dar paso al soluto a transportar mediante estímulos eléctricos, químicos o mecánicos (Callen, 2000).

2.4.3 Bombas

Las bombas son complejos proteicos que, en general, utilizan la energía de hidrólisis del ATP para impulsar el paso de iones a través de las membranas en contra de su gradiente de concentración (Callen, 2000). Son por lo tanto proteínas que llevan a cabo transporte activo a una velocidad de 10^0 a 10^3 iones por segundo. Se encuentran en la membrana plasmática y en todas las endomembranas.

2.4.3.1 ATPasa de H^+

2.4.3.1.1 Estructura

La presencia de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de células vegetales se ha detectado en infinidad de especies de mono y dicotiledóneas, en cualquier órgano de la planta (raíz, tubérculo, tallo, hoja, fruto) y prácticamente en cualquier fase de su desarrollo (Gavilanes y col., 1995)

La ATPasa de H^+ de membrana plasmática es una proteína integral que se localiza en la membrana plasmática de la célula y cuyo peso aproximado es de 100 kDa; funciona transportando H^+ desde el citoplasma hacia el espacio extracelular o apoplástico hidrolizando ATP; ambas reacciones se acoplan energéticamente. Esta ATPasa tiene las siguientes características generales (Kasamo, 2003):

- a) Aproximadamente el 70% de su estructura es de carácter hidrofílico y está expuesta al citoplasma.
- b) Las hélices transmembranales que presenta cuentan con un total de entre 15 y 30 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica.
- c) Sólo el 5% de su estructura está expuesta hacia la cara extracelular.
- d) Tanto el amino como el carboxilo terminal se encuentran localizados en el espacio citosólico de la célula

Su estructura específica (tomando como ejemplo la isoforma AHA2) consiste en cuatro dominios bien definidos: un dominio con diez hélices transmembranales (denominadas M1 a M10) y tres dominios citosólicos denominados: N (dominio de unión del nucleótido; residuos 338-488) seguido por las hélices M4 y M5; P (dominio de fosforilación; residuos 308-337 y 489-625), el cual contiene el sitio de unión del ATP, y el dominio A (dominio actuador; residuos 12-57 y 120-233) el cual incluye a la región del amino terminal y la porción de la molécula formada

por el asa entre M2 y M3 (Figura 5) (Palmgren, 2001; Pedersen y col., 2007). Usando anticuerpos dirigidos contra péptidos sintéticos diseñados a partir de secuencias de aminoácidos específicas de la proteína, se ha obtenido evidencia de la presencia de un dominio autoinhibitorio denominado R. Originalmente se pensaba que este dominio constaba de 28 aminoácidos, sin embargo, ahora se ha postulado que el dominio autoinhibitorio está formado por 100 aminoácidos localizados en la región del C-terminal (Kasamo, 2003).

El ión Mg^{2+} es absolutamente requerido por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática para llevar a cabo la hidrólisis de ATP, pues el sustrato de la reacción enzimática es Mg-ATP. Se ha sugerido que el ión Mg^{2+} se coordina a dos residuos de aspartato que pudieran corresponder al Asp588 y al Asp592, este enlace se propone próximo al Asp329, el cual se fosforila durante la catálisis (Palmgren, 2001).

La estructura cristalizada de la forma activa de la ATPasa de H^+ presentó para su estudio, un complejo con adenosina 5'-(β - γ , metileno)-trifosfato (AMPPCP, un análogo no hidrolizable del ATP), el cual está unido a través de la adenosina al dominio N y el grupo trifosfato está orientado hacia el dominio P. El dominio A se mueve lejos del dominio P, permitiendo que el dominio N se acerque lo necesario para que la fosforilación pueda ocurrir. El dominio N se inserta dentro del dominio P mediante una articulación o bisagra; con el nucleótido unido puede avanzar hacia el dominio P para montar el sitio catalítico en el cual el Asp329 será fosforilado en cada ciclo de bombeo. (Pedersen y col., 2007).

Se cree que la ATPasa de H^+ alterna entre al menos dos conformaciones principales, E_1 y E_2 . La forma E_1 tiene gran afinidad por el ATP, así como por el ión a ser transportado fuera del citoplasma. La forma E_2 tiene baja afinidad por los ligandos, pero tiene una alta afinidad por el inhibidor vanadato. Ésta es la forma que une covalentemente al P_i durante la reacción en el Asp329. El transporte del catión de un lado de la membrana hacia el otro está asociado con el cambio conformacional entre E_1 y E_2 (Figura 6); esta característica sugiere un mecanismo de acoplamiento elegante de la ATPasa de H^+ entre la formación del sitio de fosforilación en los dominios citoplasmáticos y la oclusión de los sitios de unión a H^+ (Palmgren, 2001; Pedersen y col., 2007).

Puesto que la ATPasa de H^+ forma un estado de transición covalente durante su ciclo de reacción, esta enzima está clasificada como una ATPasa tipo P (para reflejar la presencia de su forma E -P). Las ATPasas de tipo P constituyen una gran familia de bombas de cationes que (a) forman un intermediario aspartil fosfato en el ciclo de reacción, (b) son inhibidas por vanadato y (c) comparten una organización común en sus dominios (Palmgren, 2001).

El Asp 684, que está conservado en todas las ATPasas de H^+ de membrana plasmática, es el único residuo ácido localizado en el dominio transmembranal de la AHA2. Estudios en algunas mutantes demuestran que este residuo es esencial para el transporte de protones durante las transiciones E_1 y E_2 , y es por tanto el mejor candidato para el sitio de unión del H^+ en las ATPasas de H^+ de tipo P. El Asp 684 se yuxtapone a la Asn 106 localizada en M2; siendo ambos compatibles con la formación de enlaces de hidrógeno; el par protonado Asp 684-Asn 106 funge por tanto como el guardián de la puerta a lo largo de la vía de transporte (Pedersen y col., 2007).

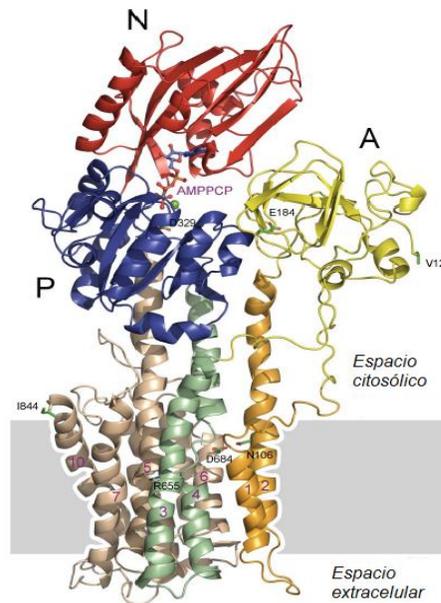


Figura 5. **La ATPasa de H^+ de membrana plasmática.** Se muestran los cuatro dominios reconocidos en la ATPasa de H^+ de membrana plasmática junto con el complejo de adenosina 5'-(β - γ , metileno)-trifosfato, como ejemplo de la isoforma AHA2 (Pedersen y col., 2007).

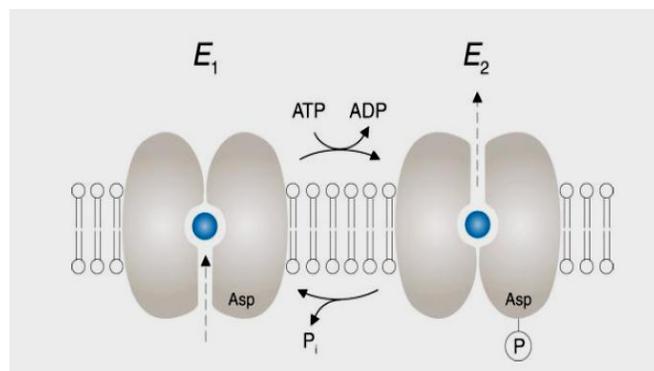


Figura 6. **Estados de transición durante la catálisis de la ATPasa de H^+ .** Las formas E_1 y E_2 son estados por los que atraviesa la ATPasa de H^+ de membrana plasmática durante su ciclo catalítico (Palmgren, 2001).

2.4.3.1.2 Isoformas

Para el género *Arabidopsis* se sabe que existen 12 genes que codifican para la síntesis de variantes de la ATPasa de H⁺. Un árbol filogenético basado en la disposición de secuencias de aminoácidos revela la presencia de subfamilias de la ATPasa de H⁺; los genes AHA1, AHA2, AHA 3 y AHA5 constituyen un grupo, la AHA6, AHA8 y AHA9 forman otro y las restantes están distribuidas en 3 pequeñas ramas en el árbol filogenético. El gene AHA12 tiene dos grandes supresiones por lo que podría representar un pseudogene (Tabla I) (Palmgren, 2001).

Tabla I. Se muestra la diversidad de genes que codifican para la síntesis de la ATPasa de H⁺ en plantas de *Arabidopsis thaliana*, en total se conoce la existencia de 12 genes (Palmgren, 2001).

Aspectos generales de la familia de genes para la ATPasa de H⁺ en Arabidopsis thaliana

Entrada	Nombre del gene	Ubicación cromosómica (Centimorgans) ^a	Peso molecular ^b	pI	Longitud (aminoácidos)
P20649 ^c /AC003673 ^d	AHA1/At2g18960	2; 35	104313	6.3	949
P19456/AL161576	AHA2/At4g30190	4; 81	104401	6.5	948
P20431/AB019233	AHA3/At5g57350	5; 114	104449	6.7	949
Q9SU58/AL049658	AHA4/At3g47950	3; 65	105679	6.1	960
Q9SJB3/AC006954	AHA5/At2g24520	2; 39	104739	6.8	949
Q9SH76/AC007662	AHA6/At2g07560	2; 19	105012	5.8	949
Q9LY32/AL163852	AHA7/At3g60330	3; 78	105520	6.4	961
Q9M2A0/AL138640	AHA8/At3g42640	3; 53	104131	5.5	948
Q42556/AC011713	AHA9/At1g80660	1; 124	105208	6.0	954
Q43128/S74033 ^e	AHA10/At1g17260	1; 23	104815	6.0	947
Q9LV11/AB020751	AHA11/At5g62670	5; 119	105123	6.1	956
Q9T0E0/AL049500 ^f	AHA12/At4g11730	4; 40	90439	6.4	813

^a La posición en centimorgans es la posición del marcador genético más cercano conocido, de acuerdo a los recursos de información de *Arabidopsis* (<http://www.arabidopsis.org>).

^b Peso molecular calculado (Da).

^c Entrada de la base de datos de SWISS-PROT

^d Entrada de la base de datos de EMBL/GenBank/DDBJ

^e La secuencia original de la proteína es en parte derivada de los datos genómicos de ADN. Una propuesta de exones frontera ha sido cambiada por la eliminación de un aminoácido, una deficiencia de aminoácidos que sólo se encuentra en esta secuencia.

^f Esta secuencia es atípica, pues faltan 100 residuos de aminoácidos de una zona conservada y el C-terminal también parece estar ausente. En esta forma no puede ser una ATPasa activa, pero podría ser un pseudogene o tener otra función en la célula.

2.4.3.1.3 Procesos fisiológicos en los que participa

Tanto los gradientes eléctricos como de pH debidos a la actividad de la ATPasa de H^+ pueden ser utilizados para distintas funciones metabólicas en la planta y entre las más importantes se pueden mencionar las siguientes:

- a. Transporte secundario. El transporte de sacáridos involucra un sistema de tipo simporte sacárido/ H^+ a través de un acarreador, al tratarse de hexosas y sacarosa. Al requerir diferencias de potencial eléctrico o de pH, se necesita una fuerza impulsora para el transporte dada por la acción de la ATPasa de H^+ , pues al bombear los H^+ al exterior de la célula genera una diferencia de potencial y aumenta la concentración externa de estos iones, lo cual favorece la entrada de un protón acompañado de un azúcar.

Las hexosas son fundamentales para procesos oxidativos que producen energía, y por otra parte, la sacarosa constituye el fotosintato más importante producido por la planta que debe ser distribuido a los tejidos no autótrofos de la misma (Gavilanes y col., 1995). Los aminoácidos también entran a la célula por medio de un sistema simporte, en este caso se trata de acarreadores en simporte aminoácido/ H^+ altamente dependientes del pH.

Otro tipo de transporte secundario en el cual participa la ATPasa de H^+ involucra la movilidad de iones a través de acarreadores y canales. Para el caso del Na^+ se ha reportado un antiportador Na^+/H^+ y para el K^+ se tienen canales sensibles al voltaje que permiten su paso a través de la membrana. La localización de la ATPasa de H^+ en los tejidos de las raíces sugiere un papel para esta bomba en el movimiento de los solutos hacia el xilema para ser transportados hacia la parte aérea de la planta. En *Arabidopsis*, se expresa con mayor fuerza tanto en la endodermis de la raíz como en sus flores (Palmgren, 2001).

El proceso de internalizar iones K^+ a la célula conduce a la eventual acumulación de éstos y otros osmolitos, como el malato. Lo anterior promueve la entrada de agua a la célula para equilibrar las concentraciones internas y externas de soluto, provocando que las células se hinchen y generen cambios en la curvatura de la pared celular (Gavilanes y col., 1995), fenómeno fundamental para la apertura y cierre de los estomas y el intercambio gaseoso de la planta con su medio ambiente; se sabe también que pequeños pulsos de luz pueden ser registrados por un receptor lumínico en las células guardia y la señal ser transmitida a las ATPasas de H^+ de la membrana

plasmática de estas células (Palmgren, 2001), las cuales generan cambios de voltaje que ayudan en el proceso de apertura de estomas. El bombeo de H^+ al exterior de la célula y su posterior reingreso a la misma permite también el ingreso de, por ejemplo, aniones SO_4^{2-} . (Gavilanes y col., 1995).

- b. Regulación del pH celular. La ATPasa de H^+ se ha considerado como parte del mecanismo de regulación de pH por su capacidad de bombear H^+ al espacio apoplástico manteniendo estable el del citosol (7-7.5); no obstante, la magnitud de su contribución no está totalmente esclarecida pues hay otros factores involucrados tales como la producción de ácidos orgánicos, amortiguadores citoplásmicos, actividad de antiportadores y actividad de otras ATPasas de H^+ distintas a las de membrana plasmática como la del tonoplasto y las pirofosfatasa que influyen en el pH intracelular (Gavilanes y col., 1995).
- c. Elongación celular. Los polímeros que se entretrejen en la pared celular forman un entramado compuesto de distintas redes: una de celulosa entrecruzada con polisacáridos, otra de pectinas y una tercera formada por proteínas y distintos componentes más presentes en la pared celular. El aumento de H^+ al exterior de la célula vegetal se traduce en una relajación y debilidad de su pared, y debido a lo anterior la célula es capaz de expandirse y crecer. Las auxinas parecen ser las responsables del aumento de H^+ , pues promueven un aumento en la síntesis e incorporación masivas de la ATPasa de H^+ a la membrana plasmática (Gavilanes y col., 1995).

2.4.3.1.4 Interacción con lípidos membranales

La ATPasa de H^+ de membrana plasmática requiere de lípidos membranales para su actividad, dicha actividad parece ser estimulada por los fosfolípidos en el siguiente orden: asolectina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y fosfatidilglicerol, donde la máxima activación se observó por ejemplo, con alrededor de 0.05-0.03% (p/v) de asolectina.

Grupos como el glicerol, inositol y serina sólo activan un poco o nada a la enzima, mientras que teniendo etanolamina o colina no se tiene ningún efecto (Kasamo, 2003). Lo anterior está en función tanto de la longitud de las cadenas de ácidos grasos esterificadas y su grado de saturación, como de la parte hidrofílica, que es la cabeza polar del lípido membranal.

Se pueden postular dos teorías para la modulación de la actividad de la ATPasa y el bombeo de H^+ por parte de los lípidos: la teoría de los lípidos en conjunto y la teoría de los lípidos frontera (anulares).

La teoría de los lípidos en conjunto (bulk) establece que los cambios en la composición de la membrana alteran la fluidez de ésta, lo cual provoca un cambio conformacional en la enzima, así como en el bombeo de H^+ y de su actividad; la teoría de los lípidos frontera o anulares establece que algunas moléculas lipídicas de la membrana están unidas estrechamente a la proteína, las interacciones entre estos lípidos anulares y las proteínas en la membrana son causa de la modificación de la actividad de la proteína y por ello de regulación. Se ha propuesto que la composición de los fosfolípidos anulares alrededor de la proteína podría diferir de la composición del resto del conjunto de los fosfolípidos que integran la bicapa, lo cual ofrece una explicación más lógica sobre la especificidad de las interacciones y uniones entre los lípidos y las proteínas de membrana (Kasamo, 2003).

Un punto importante que se podría establecer en el marco de esta teoría, es el de indagar qué parte de la ATPasa de H^+ es la que se puede unir al lípido anular. Una posibilidad es que los lípidos anulares se combinen con el dominio autoinhibitorio, de esta manera, los lípidos anulares activarían a la ATPasa de H^+ enmascarando o desplazando el dominio autoinhibitorio. Otra posibilidad es que el dominio autoinhibitorio interactúe con el sitio activo de la ATPasa de H^+ siendo éste accesible a tales lípidos anulares (Kasamo, 2003).

2.4.3.2 ATPasa de Ca^{2+}

La mayor parte del Ca^{2+} presente en una planta está localizado en el espacio apoplástico y en la pared celular, ligado a otros compuestos. La concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma es muy baja (0.1-0.2 μM) siendo varios órdenes de magnitud más pequeña que en el espacio apoplástico. Las ATPasas de Ca^{2+} son importantes para mantener baja la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma, dicha concentración es regulada por la actividad tanto de la ATPasa de Ca^{2+} como de antiportadores Ca^{2+}/H^+ . La concentración de Ca^{2+} debe mantenerse controlada para evitar la precipitación de ortofosfato y para disminuir su competencia por sitios de unión con iones Mg^{2+} , ya que de llegar a suceder, se podrían presentar interferencias en el metabolismo de la célula (Blatt, 2004). Los antiportadores Ca^{2+}/H^+ poseen gran capacidad de transporte pero son poco afines al Ca^{2+} , se encuentran principalmente en la membrana vacuolar aunque en algunas plantas también se han observado en la membrana plasmática; por otro lado la ATPasa de Ca^{2+} tiene una baja capacidad pero alta afinidad por los iones Ca^{2+} y se

encuentra principalmente en la membrana plasmática y en distintas endomembranas. Para *Arabidopsis*, las ATPasas de Ca^{2+} se han dividido en dos grupos: IIA y IIB. Del grupo IIA se han identificado cuatro tipos (isoformas) de la enzima y para el tipo IIB se han identificado diez (Blatt, 2004).

Estudios acerca de la función fisiológica de este tipo de ATPasa en diversas plantas tales como *Arabidopsis*, tabaco, tomate o soya reportan que la expresión de ATPasa de Ca^{2+} aumenta cuando la planta es sometida a un estrés salino, lo anterior se ve acompañado además de un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el citosol; el hecho de que la cantidad de enzima aumente se debe probablemente a que se necesitan más ATPasas de Ca^{2+} para remover los iones Ca^{2+} internalizados en la célula como respuesta al estrés salino (Blatt, 2004).

El Ca^{2+} tiene también una función estabilizante en las membranas y en las paredes celulares de la plantas. Al ser sometidas a un estrés salino se presenta un efecto tóxico en la planta, cuando, al parecer, los iones Ca^{2+} son desplazados por iones Na^+ de sus sitios de unión en la membrana plasmática y en la pared celular; se puede suponer lo antes descrito pues al suministrar Ca^{2+} exógeno al medio de crecimiento de la planta los efectos tóxicos se ven contrarrestados. El aumento en la expresión de ATPasas de Ca^{2+} durante el estrés salino, puede incrementar el transporte de Ca^{2+} de sitios intracelulares hacia el apoplasto, lo que sería benéfico para la planta, pues se presentaría una obstrucción en los sitios de unión del Na^+ en la membrana plasmática y en la pared celular (Blatt, 2004).

2.4.3.3 Otras bombas de cationes

Además de las bombas de cationes antes descritas hay otras muchas, todas pertenecientes a la familia de ATPasas tipo P.

Aparte de las bombas de H^+ (P_3) y Ca^{2+} (P_2) se encuentran bombas que transportan metales pesados (P_1) y otras cuyo sustrato específico no ha sido aún determinado y su función fisiológica no se ha entendido por completo y que se denominan P_4 y P_5 . La presencia de estas bombas parece estar generalizada en células eucariontes pero ausentes en células procariontes (Blatt, 2004).

2.5 Hidratos de carbono

Generalmente, las proteínas de membrana no sobresalen al exterior celular desnudas, sino que lo hacen decoradas con carbohidratos, los cuales recubren la superficie no citosólica de todas las células eucariotas. Estos carbohidratos se encuentran en forma de oligosacáridos unidos covalentemente a las proteínas de membrana (llamadas glicoproteínas) y a lípidos (glicolípidos). También se encuentran como cadenas de polisacáridos de moléculas de *proteoglicanos* integrales de membrana; estos proteoglicanos son largas cadenas de polisacáridos unidos covalentemente a un núcleo proteínico encontrándose principalmente en el exterior celular como parte de la matriz extracelular; en algunos casos, el núcleo proteínico se extiende a través de la bicapa lipídica o se une a ella mediante un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) (Alberts y col., 1994).

El término cubierta celular o glicocáliz se utiliza a menudo para describir la zona de la superficie celular enriquecida en carbohidratos, a pesar de que la mayoría de los carbohidratos están unidos a moléculas intrínsecas de la membrana plasmática, habitualmente el glicocáliz presenta glicoproteínas y proteoglicanos que han sido secretados al espacio extracelular y que luego son adsorbidos en la superficie celular. Una de las probables funciones de esta cubierta celular es proteger a la célula contra agresiones químicas y mecánicas y mantener objetos extraños y otras células a distancia, evitando interacciones proteína-proteína indeseables (Alberts y col., 1994).

Las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas y los glicolípidos son extremadamente diversas en cuanto a la organización y composición de sus azúcares. A pesar de que habitualmente contienen menos de 15 residuos glucosídicos, éstos suelen estar ramificados y los azúcares pueden estar unidos entre sí mediante diversos enlaces covalentes. En principio, la diversidad y la posición expuesta de los oligosacáridos en la superficie celular los hace especialmente indicados para participar en procesos de reconocimiento celular (Alberts y col., 1994).

ANTECEDENTES

La membrana plasmática tiene una composición lipídica que incluye fosfolípidos, esteroides y esfingolípidos. Mientras que se ha reportado que miembros de las dos primeras clases lipídicas afectan la actividad de la ATPasa de H^+ , no hay reportes sobre la acción de los esfingolípidos en esta enzima. Ya que la ATPasa de H^+ es una proteína integral de la membrana plasmática con funciones fisiológicas esenciales para las plantas, en este trabajo se exploró el efecto de los esfingolípidos en la actividad de esta proteína. Para determinar el efecto que los esfingolípidos endógenos ejercen en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática de plantas se optó por desarrollar una mutante que sintetizara menos esfingolípidos, la cual al ser comparada con una línea control que expresara niveles normales de ellos permitiera establecer si hay presencia o no de cambios en la actividad catalítica de la enzima.

Aprovechamos para ello la línea de *Arabidopsis* que el Dr. Edgar B. Cahoon generó como estrategia para examinar el papel de los esfingolípidos en las células vegetales. Esta estrategia consistió en reducir la síntesis celular de esfingolípidos modificando la expresión de los genes de la primera enzima de la vía de su síntesis: la serina palmitoiltransferasa (SPT), que es una proteína que está formada por los dímeros LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b. Para ello este grupo generó una mutante de *Arabidopsis thaliana* denominada *Atlcb2a-1* que no expresaba a la subunidad LCB2a, por lo cual sólo podía sintetizar a la SPT con los monómeros LCB1 y LCB2b. En esta mutante se realizó la construcción de una horquilla de ARN que funciona como un ARNi para silenciar el gene remanente *LCB2b*.

Se diseñaron entonces condiciones para inducir el silenciamiento del gene *AtLCB2b* de manera controlada al aplicar el insecticida metoxifenoza (Intrepid®). Para ello, la expresión de los genes *AtLCB2a* y *AtLCB2b* fue monitoreada mediante RT-PCR después de la aplicación de metoxifenoza. Tres días después de la inducción, la expresión del gene *AtLCB2b* disminuyó en las plantas silvestres, en cambio, la expresión del gene *AtLCB2a* no se vio afectada. De esta manera se determinó que la construcción del ARNi era específica para el silenciamiento inducible del gene *AtLCB2b* (Dietrich y col., 2008).

Posteriormente, el mismo vector binario conteniendo a la construcción con la horquilla de ARN, se introdujo en la línea mutante *Atlcb2a-1*. Esta mutante fue designada como *Atlcb2b-hp/Atlcb2a* y plantas de tres semanas de edad se trataron añadiendo el inductor. Después de 5 a 7 días de la inducción, se presentó una clorosis extensiva, seguida del desarrollo de lesiones necróticas y de la eventual muerte de la planta. Este fenotipo se observó en más de 40 líneas

independientes, pero no se vio en plantas ni de tipo silvestre (*wt*) ni en las mutantes *Atlcb2a-1* carentes de la construcción del ARNi inducible para el silenciamiento del gene *AtLCB2b*.

En estudios posteriores, con objeto de cuantificar los niveles de esfingolípidos totales, se midió la cantidad de bases de cadena larga (BCL) 7 días después de la aplicación del inductor, y para la línea *Atlcb2a-1* que contenía la construcción de ARNi, se encontró que contenía cerca del 40% menos de bases de cadena larga (BCL) totales provenientes de esfingolípidos complejos en comparación con la línea *Atlcb2a-1* que no tenía dicha construcción de ARNi (Dietrich y col, 2008). Para confirmar que el fenotipo de muerte celular observado se debía a una reducción de esfingolípidos endógenos debido a la pérdida de actividad de la SPT, las líneas en estudio se crecieron en medios que contenían BCL exógenas (esfinganina, d18:0).

Las líneas de *Atlcb2a-1* que contenían la construcción de ARNi se germinaron en medio con metoxifenoza pero sin d18:0. Como resultado, éstas tuvieron una reducción en el crecimiento de la raíz, en esta etapa también se observaron zonas cloróticas excepto en la región del meristemo. En contraste, las plantas que se crecieron en medio con metoxifenoza, pero al cual sí se le añadió d18:0 presentaron un crecimiento normal de la raíz y recuperaron parcialmente el desarrollo de sus brotes; plantas mutantes *Atlcb2a-1* y plantas *wt* se crecieron en medios con inductor y en presencia y ausencia de d18:0 sin mostrar cambios aparentes en su crecimiento (Dietrich y col., 2008).

Estos resultados brindan una evidencia directa de que el bloqueo de la síntesis de las BCL (que son los bloques fundamentales alrededor de los cuales se sintetiza el resto del esfingolípidos) produce pérdida de viabilidad de la célula y que por lo tanto son esenciales en las diferentes fases de crecimiento de la planta, tanto en la etapa de establecimiento de la plántula, como en su etapa joven previa a la floración y en la madura después de la floración (Dietrich y col., 2008).

Por otra parte, en ensayos realizados para determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ en vesículas de membrana plasmática (VMP) de hojas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 tanto de tipo silvestre como en sus mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (la cual contiene el silenciamiento inducible del gene *AtLCB2b*), no se encontró variación significativa entre los valores promedio de los diferentes tiempos en los cuales se midió la actividad de ATPasa después de la aplicación de la metoxifenoza. La actividad determinada fue sensible a Na₃VO₄ o insensible a Na₃MoO₄ y KNO₃. Sin embargo, al sexto día de exposición al inductor, la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea *Atlcb2b-hp/Atlcb2a* tuvo un incremento significativo en su actividad (cerca a un 55 %) que se mantuvo al séptimo día de exposición al inductor (Vázquez, 2009).

Mediciones de cinética enzimática revelaron que el aumento en la hidrólisis de ATP observado en la línea *At/cb2b-hp/At/cb2a* inducida estaba correlacionado con un aumento en el valor de su V_{max} y de la eficiencia catalítica de la enzima, si bien el valor de K_m permaneció sin alterarse comparado con el de las enzimas de las otras líneas (*wt* y *At/cb2a-1*) y tratamientos (González, 2010). El aumento en la V_{max} en la enzima de la línea con el silenciamiento génico que expresa una reducción en el contenido de esfingolípidos, no puede ser asociado a una mayor cantidad de la enzima en la membrana, pues los niveles de la proteína permanecieron iguales a los de las líneas controles.

HIPÓTESIS

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* con un contenido disminuido de esfingolípidos presentan mayor actividad de ATPasa de H⁺ de membrana plasmática que aquellas que poseen niveles normales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en fracciones microsomales de raíz y hojas de líneas de *Arabidopsis thaliana* que contengan tanto cantidades normales de lípidos, como cantidades disminuidas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Germinar y cultivar plántulas de *Arabidopsis thaliana* de las distintas líneas en estudio (*wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) por un periodo de 3 semanas para proseguir con la inducción del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b.
- 2) Cosechar las raíces y las hojas de las plántulas para la obtención de su fracción microsomal.
- 3) Determinar los efectos fenotípicos de la inducción con metoxifenoziata en las plántulas de las líneas utilizadas.
- 4) Estimar el contenido membranal total de cada línea en estudio por determinación de la cantidad de proteína membranal en cada fracción microsomal.
- 5) Determinar la actividad específica de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las fracciones microsomales obtenidas en cada línea.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1) Germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Proporcionadas por el Dr. Edgar B. Cahoon. Center for Plant Science Innovation & Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, E. U.)

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (*wt*, *Atlcb2a-1* o *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) se colocan en un tubo Eppendorf estéril con 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) elaborada a partir de Cloralex comercial y una concentración de Tween 20 al 0.1%, (v/v). Se agitan por 20 min en un agitador eléctrico. Posteriormente se centrifuga y se retira el sobrenadante; se colocan de nuevo en solución de hipoclorito de sodio al 20% (1 mL) y sin Tween 20, se agitan por 10 min, se centrifuga y se retira de nuevo el sobrenadante. Se realizan 5 lavados consecutivos con agua estéril (1 mL) con periodos de agitación de 30 segundos seguidos de un periodo de centrifugación de 10 segundos entre cada lavado. Las semillas se resuspenden en agua estéril y se siembran en cajas Petri con medio Gamborg B-5 más agar (1%) y sacarosa (1%).

Las semillas se siembran en cajas circulares si se trata de cultivar plántulas para obtener fracciones membranales y en cajas cuadradas si se quieren registrar fenotipos. Las semillas se aplican en una línea de aproximadamente 5.5 cm de largo en un extremo de la caja circular. Las cajas sembradas se mantienen a 4 °C por 48 h en oscuridad y posteriormente se transfieren a una cámara a 22°C con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad.

- 2) Aplicación de metoxifenoza para promover el silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la serina palmitoiltransferasa (SPT) en las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, la cual contiene la horquilla de ARNi que se une al ARN codificante de la subunidad LCB2b una de las subunidades de la SPT y que por tanto conduciría a una disminución en los niveles de esfingolípidos complejos, sólo puede generar dicha horquilla tras la exposición a metoxifenoza. Se elaboran por tanto disoluciones cuya concentración es 1:5000 (v:v) y 1:10000 (v:v) de metoxifenoza partiendo del insecticida Intrepid®, para establecer las condiciones de inducción a usar en las líneas en estudio (*wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*). Tras 3 semanas de crecimiento y en campana de flujo laminar se aplica la disolución de metoxifenoza a las plántulas mediante un aspersor manual de vidrio esterilizable, con una capacidad máxima de 20 mL, aplicando 6 aspersiones por cada caja Petri a una distancia de 5 cm. Las cajas se cierran nuevamente y se continúan creciendo a 22°C con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad hasta pasados 3 a 7 días.

3) Obtención de raíces y hojas de las plántulas y preparación de homogenados para la obtención de su fracción microsomal

Tras el periodo de inducción se cortan las raíces y hojas de las plántulas. Las raíces se separan de la parte aérea por medio de una navaja de acero inoxidable o ayudándose de una espátula mediante un corte en el medio donde se crecieron y ya separadas, se retira el agar remanente en ellas con ayuda de pinzas y espátulas limpias. En el caso de las hojas, estas se toman con pinzas, y poco a poco se retiran del agar cuidando de no romper las hojas y tallos. Ninguno de los tejidos recolectados se enjuaga. Tanto los tejidos de las plántulas inducidas como los de las que no se indujeron, se pesan rápidamente y se envasan en tubos Eppendorf individualmente para cada tejido, previamente pesados y rotulados cuidando de anotar también su peso ya con el tejido en ellos. Se congelan inmediatamente con N₂ líquido para su posterior uso, manteniéndose a -70°C.

Para preparar los homogenados se procede de la siguiente forma:

- El tejido congelado de raíz u hoja (alrededor de 0.84 g) se muele en mortero hasta conseguir un polvo fino, se agrega N₂ líquido periódicamente para evitar que se descongelen.
- El tejido pulverizado se pasa a un vaso de precipitados pequeño de 10 mL, se añaden 4 mL de amortiguador de homogeneización por cada 0.84 g de muestra. Se homogeniza en dos periodos de 10 segundos con un intermedio de 20 segundos con un homogenizador eléctrico a una velocidad de 3.0, manteniendo el vaso sumergido en baño de hielo-agua.
- Se filtra el homogenado a través de 3 capas de gasa previamente humedecida, recibiendo el filtrado en otro vaso pequeño, se exprime la gasa y se recupera el líquido. Se lava el residuo que quedó sobre la gasa con 1 mL más de amortiguador de homogeneización y se exprime nuevamente para recuperar muestra.
- El filtrado final se coloca en tubos de centrifuga de policarbonato pequeños. Se centrifuga a 15000 rpm (10000 x g) a 4°C por 15 min en una microfuga refrigerada TL-100 (Beckman) usando el rotor TLA 100.4.
- El sobrenadante se recupera, se decanta en un tubo limpio de policarbonato y se centrifuga nuevamente ahora a 43000 rpm (100000 x g) a 4°C por 120 min. Finalizando la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se descarta.

- El botón obtenido se resuspende en 50 μL de amortiguador de ajuste de peso con un pincel fino. Ya disuelto el botón, se lava el pincel con 50 μL de amortiguador de ajuste de peso añadiéndosele también este volumen.
 - Por último se determina la cantidad de proteína por el método de Lowry, tomando 2 μL de muestra y 2 μL del amortiguador de ajuste de peso por triplicado.
- 4) Determinación de proteína por el método de Lowry
- Es un ensayo colorimétrico para determinar la concentración de proteína en una muestra, haciendo uso de una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) en una concentración de 1 mg/mL. Se destinan 6 o más tubos de ensayo para la elaboración de la curva estándar, 3 tubos para el amortiguador usado y 3 tubos para la muestra a analizar. Todos los tubos son tratados añadiendo cantidades distintas de BSA y de agua, 100 μL de desoxicolato de sodio 0.15% (m/v), 1 mL de reactivo A, el cual contiene partes iguales de CTC (carbonato de sodio 10% (m/v), tartrato sodio-potasio 0.2% (m/v) y sulfato de cobre 0.1% (m/v)), NaOH 0.8 N, SDS 10% (m/v) y H₂O. Se agregan posteriormente 500 μL de reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu, diluído 1:5 (v:v) con agua desionizada). Los tubos se dejan reposar cerca de 30 min a temperatura ambiente, para posteriormente medir la absorbencia a 750 nm.
- 5) Determinación del fosfato inorgánico por el método de Chifflet modificado. Curva estándar
- También es un ensayo colorimétrico, en el cual se determina la cantidad de fosfato inorgánico en el medio proveniente de la hidrólisis de ATP. Se colocan en distintos tubos de ensayo cantidades diferentes de agua y de K₂HPO₄ 1 mM, de tal forma que se completen 150 μL totales para la elaboración de la curva patrón. Posteriormente se adicionan 150 μL de SDS 24%, 300 μL de solución B/C (molibdato de amonio 2% y ácido ascórbico 12%, ambos en HCl 1N) en relación 1:1, por último se añaden 450 μL de reactivo E (2% citrato de sodio, 2% metarsenito de sodio, 2% ácido acético todo disuelto en agua bidestilada). Se esperan 20 min para el desarrollo y estabilización del color y se lee la absorbencia a 850 nm.
- 6) Ensayo de hidrólisis de ATP
- Se procede a mezclar los componentes necesarios para el medio de hidrólisis a usar, procurando preparar siempre un exceso de medio de hidrólisis. El medio contiene los siguientes componentes a sus concentraciones finales: 250 mM de sacarosa ajustada con 20 mM de PIPES a pH 6.5, CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) 7 μM , Brij

58 0.015% (v/v), ATP 10 mM y $MgCl_2$ 10 mM. Se colocan 3 tubos para cada condición a ensayar: hidrólisis total, hidrólisis química (T0) e hidrólisis con inhibidores.

Los tubos de hidrólisis química no contienen medio de hidrólisis, sino 150 μ L de SDS 24% (m/v) y la cantidad de muestra equivalente a 5 μ g de proteína. Los demás tubos contienen sólo medio de hidrólisis o medio con inhibidores (si contiene Na_3VO_4 se maneja a una concentración final de 200 μ M; si es el medio con mezcla de NaN_3 , $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y KNO_3 las concentraciones finales son de 2 mM, 2 mM y 50 mM, respectivamente).

Se añaden los 5 μ g de proteína al primer tubo, se agita y se coloca en un baño de agua a 29°C por 20 min, se continúa con los tubos restantes hasta los T0 a los cuales se les añade medio de hidrólisis (150 μ L), antes de incubarlos. Pasados los 20 min para cada tubo se detiene la reacción con 150 μ L de SDS 24% (m/v); los tubos de hidrólisis química (T0) sólo se sacan del baño de agua. Se añaden 300 μ L de solución B/C y pasados de 3 a 7 minutos se añaden 450 μ L de reactivo E. Se esperan 20 min para el desarrollo y estabilización del color, se lee su absorbencia a 850 nm.

A la par del ensayo de hidrólisis de ATP se realiza una curva patrón de determinación de fosfato inorgánico.

DISEÑO EXPERIMENTAL

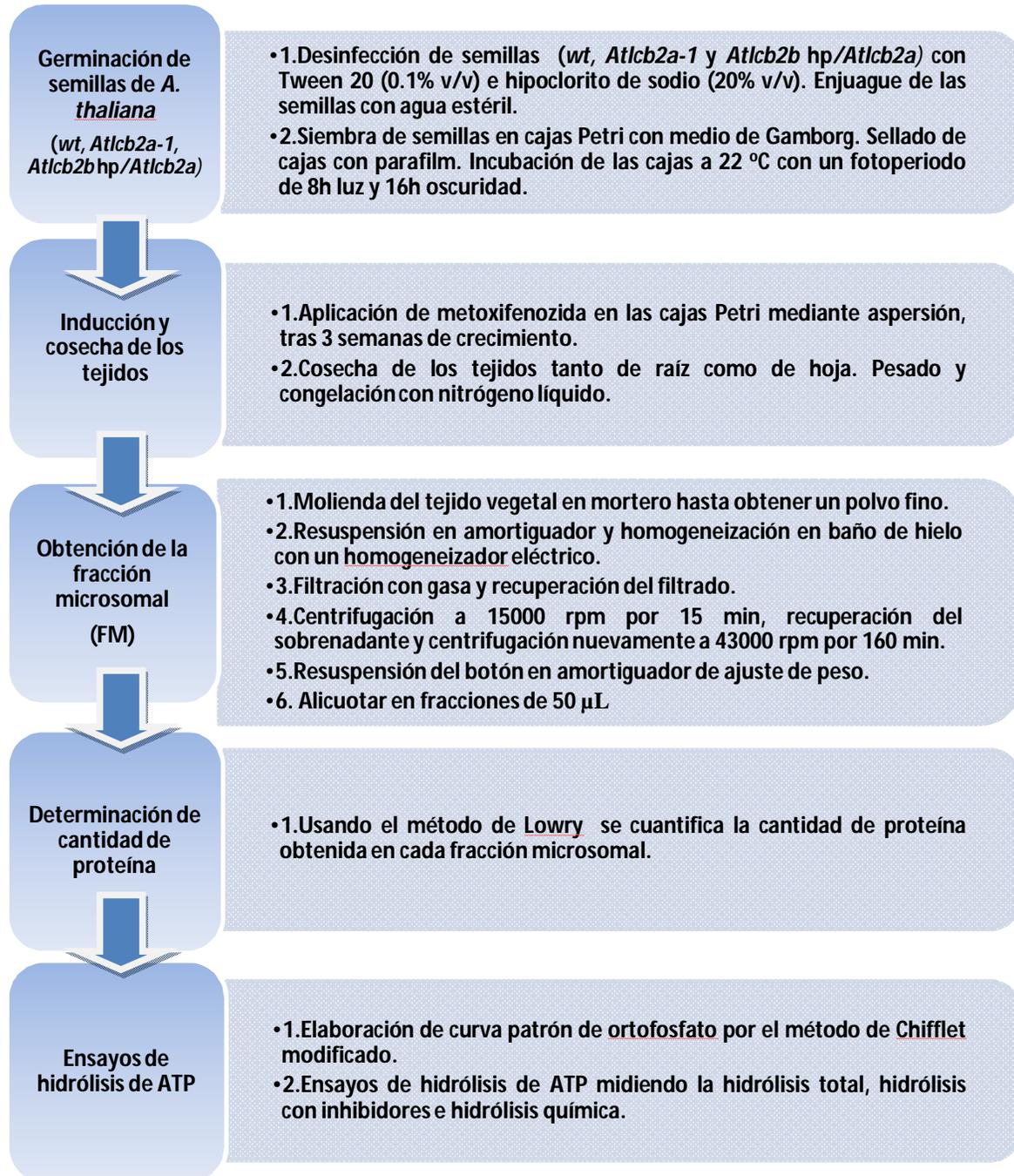


Figura 7. **Procedimiento experimental.** Se muestran los pasos seguidos para la determinación de la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, desde el proceso de siembra de la semillas hasta los ensayos de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales correspondientes.

RESULTADOS

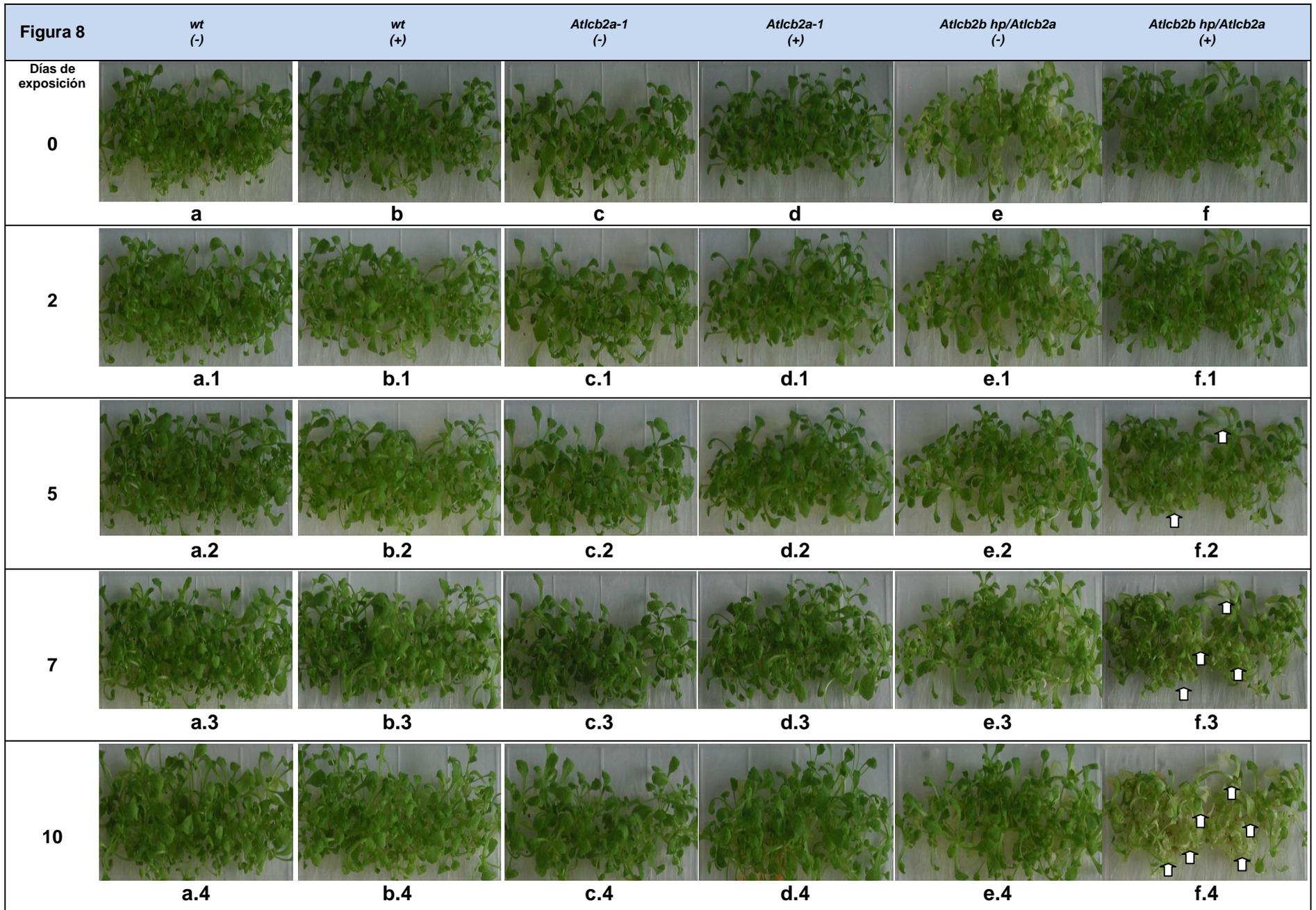
Efectos fenotípicos del silenciamiento de la subunidad LCB2b en plántulas del genotipo silvestre y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*

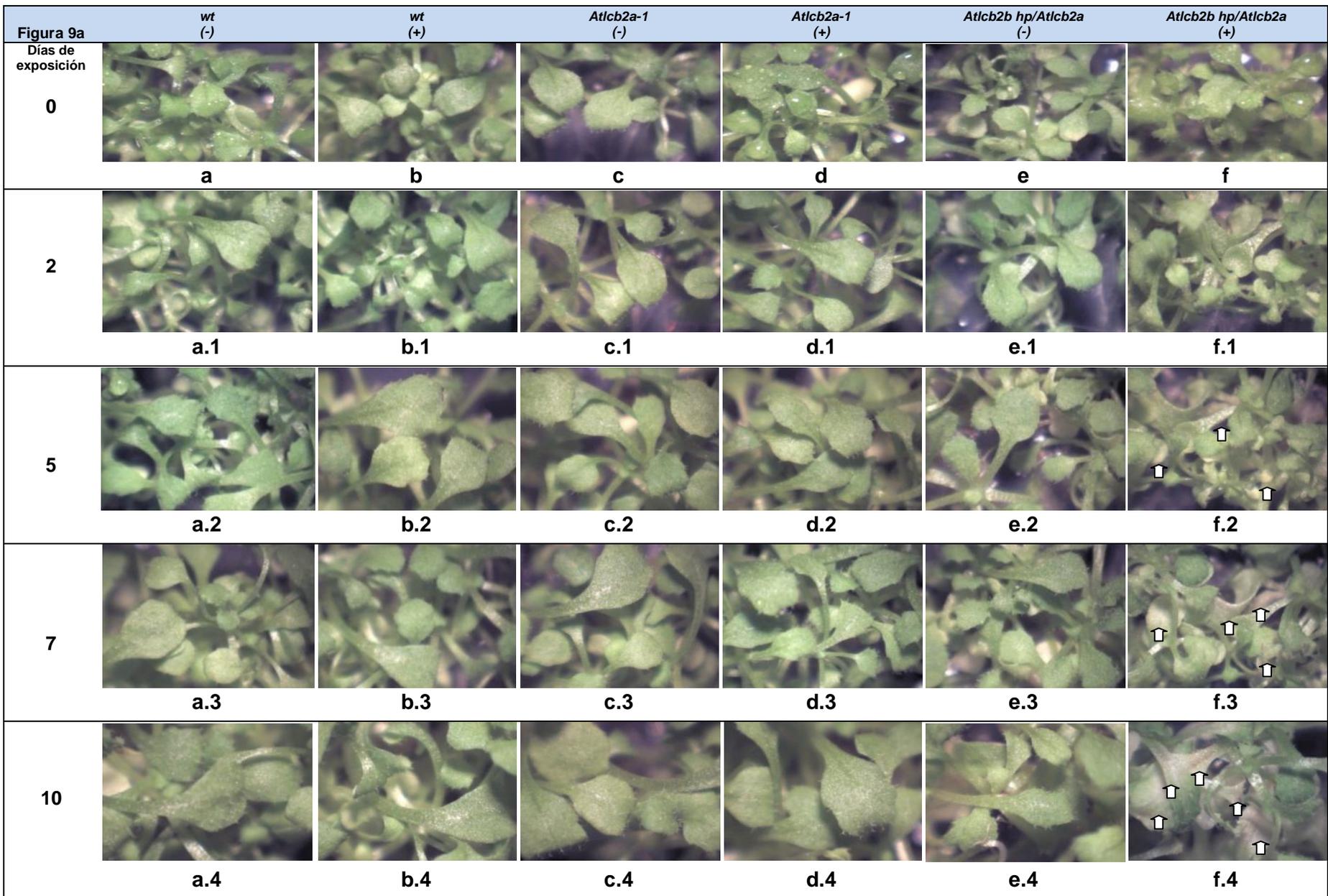
En este trabajo, inicialmente no se sabía con exactitud si los cambios fenotípicos que se observarían en las plántulas tras el silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b serían de la misma magnitud que el de los que se presentaban en plantas adultas, al ser sistemas biológicos en diferentes estados de desarrollo.

La Figura 8 muestra el fenotipo observado en todas las líneas con y sin exposición a la metoxifenoza a una concentración 1:5000 (v:v). Sólo en el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor se observó a los 3 y 5 días la aparición de algunas hojas cloróticas. Por ello, se decidió que las plántulas con estas características se utilizarían al comienzo del trabajo de medición de actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática.

Posteriormente, se realizaron mediciones de la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática partiendo de fracciones microsomales provenientes de tejidos con 7 días de exposición a metoxifenoza a una concentración de 1:5000 (v:v), registrándose también los fenotipos a este tiempo, e inclusive a los 10 días de estar expuestos los tejidos al inductor, para así asegurarse de los efectos de la inducción del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT a tiempos más largos en los que eran más claros y evidentes los cambios fenotípicos presentados por las hojas y raíces de todas las líneas comparados con los de las otras líneas y condiciones control.

Interesantemente, la línea *Atlcb2a-1* (tanto inducida como no inducida) mostró un desarrollo mayor en el tejido aéreo (hojas) de las plántulas y además en muchas de las cajas con los cultivos, las raíces se apreciaron con mayor abundancia en comparación a los tejidos de las otras líneas a ese mismo tiempo y con las mismas condiciones de siembra. Éste fue un efecto reproducible.





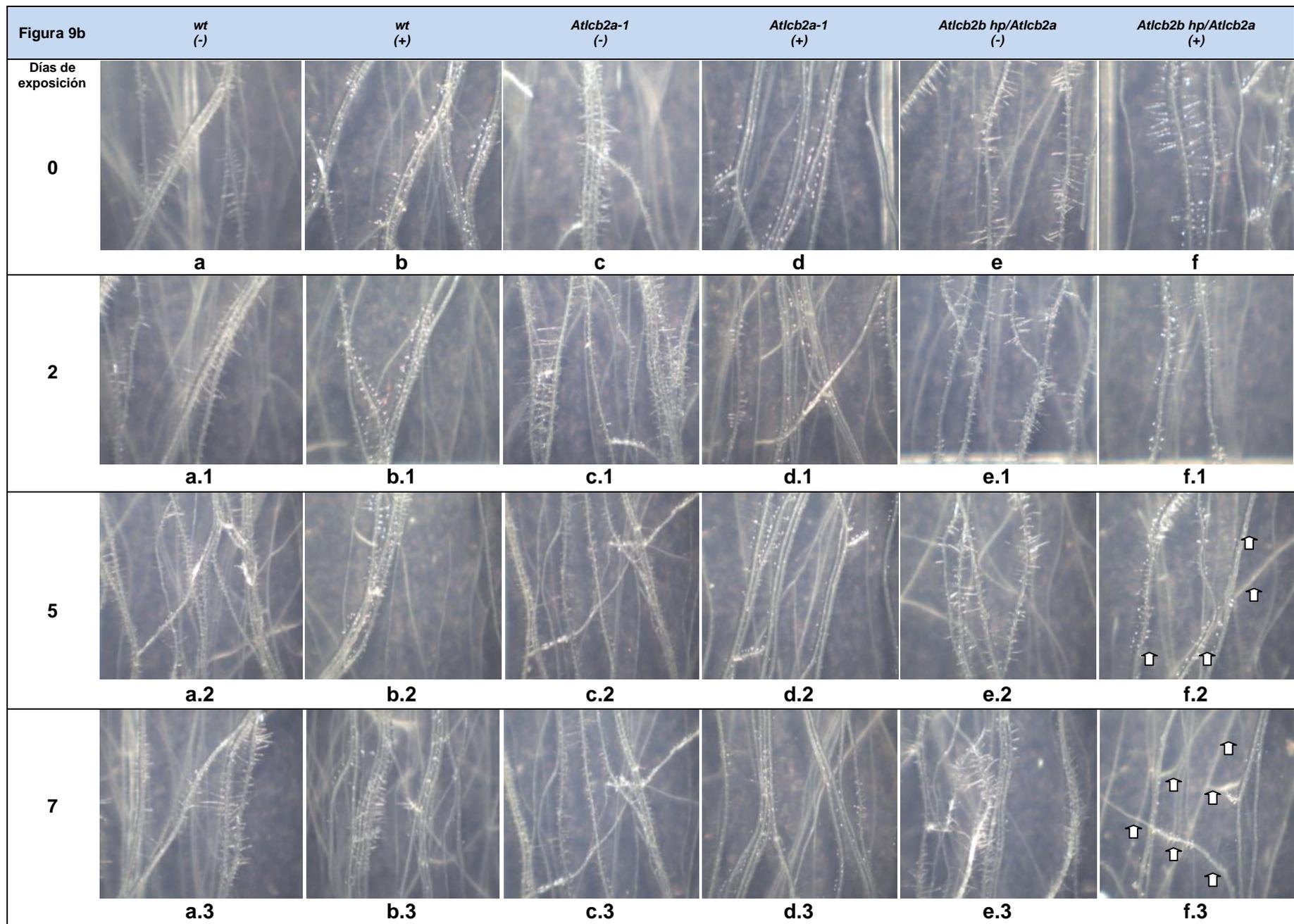


Figura 8. **Efectos fenotípicos de la aplicación de metoxifenoizida a las líneas de *Arabidopsis thaliana silvestre* (wt), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* tratadas con o sin inductor.** Se aplicó la metoxifenoizida (1:5000, v.v) por aspersión como inductor de silenciamiento del gene LCB2b de la SPT a las plántulas de *Arabidopsis* de 3 semanas de edad. Se realizó el registro fotográfico desde los 0 hasta los 10 días después de la aspersión. Se denota con un (-) a aquellas plántulas que no se asperjaron con la disolución de metoxifenoizida y con (+) a las que sí se asperjaron. **(a-a.4)** Línea silvestre sin inductor. **(b-b.4)** Línea silvestre con inductor. **(c-c.4)** Línea *Atlcb2a-1* sin inductor. **(d-d.4)** Línea *Atlcb2a-1* con inductor. **(e-e.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* sin inductor. **(f-f.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* con inductor. Las flechas indican la clorosis presente en las hojas.

Figura 9a. **Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la serina palmitoiltransferasa en el fenotipo de la parte aérea de las líneas de *Arabidopsis thaliana silvestre* (wt), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* tratadas con o sin inductor.** Se muestra un acercamiento de las hojas de las plántulas con 3 semanas de crecimiento, al cabo de las cuales fueron expuestas a condiciones control (sin metoxifenoizida) o a 2, 5, 7 y 10 días de exposición a metoxifenoizida a una concentración 1:5000 (v.v). Se denota con un (-) a aquellas plántulas que no se asperjaron con la disolución de metoxifenoizida y con (+) a las que sí se asperjaron. **(a-a.4)** Línea silvestre sin inductor. **(b-b.4)** Línea silvestre con inductor. **(c-c.4)** Línea *Atlcb2a-1* sin inductor. **(d-d.4)** Línea *Atlcb2a-1* con inductor. **(e-e.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* sin inductor. **(f-f.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* con inductor. Las flechas indican la clorosis presente en las hojas.

Figura 9b. **Efecto del silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la serina palmitoiltransferasa en el fenotipo de la raíz de las líneas de *Arabidopsis thaliana silvestre* (wt), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* tratadas con o sin inductor.** Se muestra un acercamiento de las raíces de las plántulas con 3 semanas de crecimiento, al cabo de las cuales fueron expuestas a condiciones control o de 7 días de exposición a metoxifenoizida a una concentración 1:5000 (v.v). Se denota con un (-) a aquellas plántulas que no se asperjaron con la disolución de metoxifenoizida y con (+) a las que sí se asperjaron. **(a-a.4)** Línea silvestre sin inductor. **(b-b.4)** Línea silvestre con inductor. **(c-c.4)** Línea *Atlcb2a-1* sin inductor. **(d-d.4)** Línea *Atlcb2a-1* con inductor. **(e-e.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* sin inductor. **(f-f.4)** Línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* con inductor. Las flechas indican la disminución en el número de pelos radiculares en las raíces principales.

Los resultados sobre el efecto del silenciamiento génico pudieron ser igualmente apreciados en los registros fotográficos mostrados en la Figuras 9a y 9b, en las que un acercamiento de las plántulas mostró una evidente clorosis en las hojas de las plántulas de la línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* expuesta a metoxifenoizida por 7 días a una concentración de 1:5000 (v:v). Lo anterior indica que el efecto de la disminución de la síntesis de esfingolípidos complejos se acentuó al aumentar el número de días de exposición al insecticida aún a la misma concentración del inductor.

Adicionalmente, tanto las hojas como las raíces de la línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* presentaron diferencias notorias respecto a su morfología: en el caso de las hojas, como se mencionó, hubo un aumento en el grado de clorosis, y a nivel de las raíces se pudo apreciar una aparente disminución en la cantidad de pelos radiculares cuando se trataba de las plántulas inducidas y un adelgazamiento de la raíz principal.

Contenido membranal total de raíces en cada línea. Rendimiento en proteína membranal

Como se muestra en la Figura 10, la obtención de las fracciones microsomales de las raíces de plántulas de las diferentes líneas mostró rendimientos promedio muy similares, entre 0.48 y 0.69 mg/g, independientemente de la presencia del inductor (metoxifenoza a una concentración 1:10000 (v:v) por un periodo de 3 días). No obstante, las fracciones microsomales obtenidas de las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* a la cual se le adicionó metoxifenoza presentaron un valor promedio de concentración de proteína más bajo que el resto (0.3 mg/g). La desviación estándar, por tanto, indicó diferencias significativas entre las preparaciones obtenidas, poniendo en evidencia que las raíces de las plántulas en las que se indujo el silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, presentaron un menor contenido de proteína en la fracción microsomal que la misma línea no inducida y que las otras líneas con inductor o no.

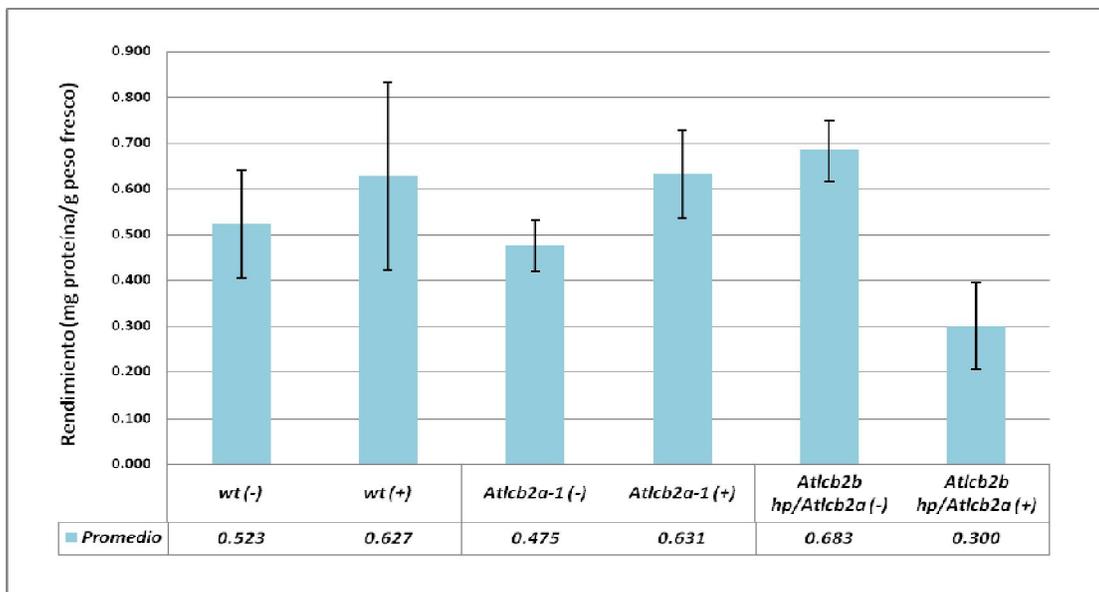


Figura 10. Rendimientos de las fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor de silenciamiento (1:10000, v:v) por 3 días, las raíces fueron cosechadas y los homogenados obtenidos. A éstos se les determinó la concentración de proteína total. Los rendimientos se presentan en términos de proteína obtenida por g de peso húmedo de tejido. Se muestran las tres líneas en estudio con los dos diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de los tejidos de plántulas no inducidas y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos de plántulas que se indujeron con metoxifenoza así como el promedio \pm DE de cada una. Los valores mostrados son los promedios de 2 a 3 preparaciones independientes, realizándose 3 determinaciones de cantidad de proteína con estas preparaciones.

Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H⁺ en las fracciones microsomales de raíces de cada línea

Determinación de hidrólisis total de ATP

La actividad de hidrólisis total de ATP medida en las raíces de las dos líneas de *Arabidopsis* y de la silvestre estuvo entre las 80 y las 160 nmolPi/min/mg (Figura 11, Apéndice Tabla I). Esta diferencia en los valores no mostró una correlación específica entre algunas de las líneas o del tratamiento de las plántulas. Por ejemplo, en el caso de los cinco controles representados por las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* con o sin metoxifenozida y la *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* sin el inductor; los valores de hidrólisis total de ATP determinados no fueron iguales, a excepción de las líneas control *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* y silvestre, que presentaron valores cercanos a los 80 nmolPi/min/mg, pero que contrastados con el obtenido en la línea *Atlcb2a-1* (que alcanzó un valor de más de 160 nmolPi/min/mg), resultaron ser menores.

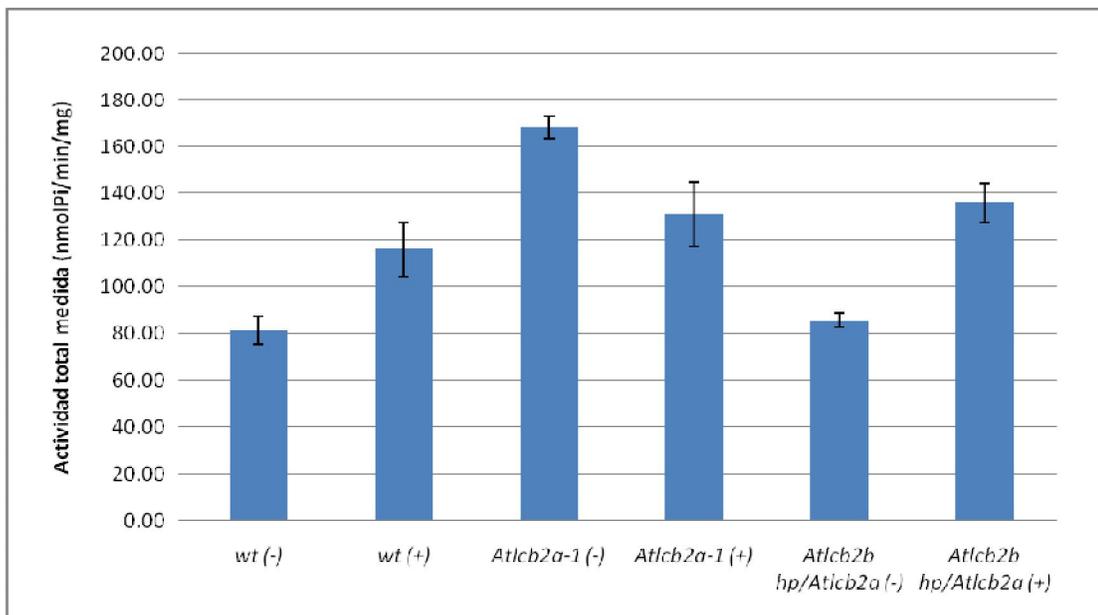


Figura 11. Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (wt), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:10000, v:v) por 3 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La gráfica muestra los valores obtenidos para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 12 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

En el caso de las líneas a las que sí se les aplicó metoxifenoazida se presentaron valores muy similares entre las tres. Se puede apreciar claramente que la fracción microsomal de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, en la que se esperaría un aumento en la hidrólisis total de ATP debido a un efecto sobre la actividad de hidrólisis de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, no presentó ningún incremento, e inclusive el valor promedio obtenido, fue más pequeño que el que se encontró para la línea *Atlcb2a-1* sin inducción en el que se observó la máxima actividad.

Determinación de la sensibilidad a Na₃VO₄ de la hidrólisis total de ATP

En la Figura 12 (Apéndice, Tabla IIa) se muestra el porcentaje que representa la actividad asociada a la ATPasa de H⁺ respecto a la hidrólisis total de ATP. En este caso, se aprecia que aunque tanto la actividad total y la sensible a Na₃VO₄ fueron diferentes entre líneas y tratamientos, la proporción o porcentaje que representa dicha actividad sensible a Na₃VO₄ fue bastante parecida en todos los casos.

Para poder estimar la contribución que la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática otorgaba a la hidrólisis total, se midió la hidrólisis de ATP en presencia del inhibidor Na₃VO₄, con el cual la actividad de la enzima se vería bloqueada (Figura 13, Apéndice Tabla IIb).

La mayor actividad sensible a Na₃VO₄ la presentaron todas las líneas con valores semejantes sin diferencias significativas entre líneas y tratamientos, excepto la silvestre y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, ambas en ausencia de inductor, las cuales mostraron una actividad de alrededor del 20 % menor que el promedio de actividad de las otras líneas.

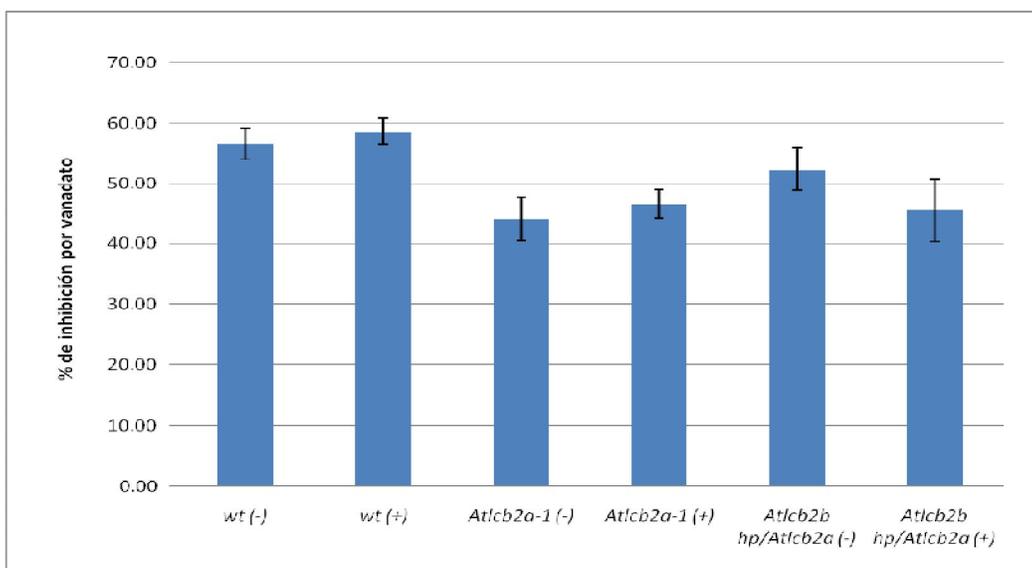


Figura 12. Determinación de la fracción de la hidrólisis total de ATP que es inhibida por Na_3VO_4 en las fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:10000, v:v) por 3 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. Se muestran los porcentajes y su promedio \pm EE, que representan la proporción de actividad enzimática que es suprimida en fracciones microsomales de raíz al usar el inhibidor Na_3VO_4 en el medio de hidrólisis de ATP. Se realizaron como mínimo 12 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

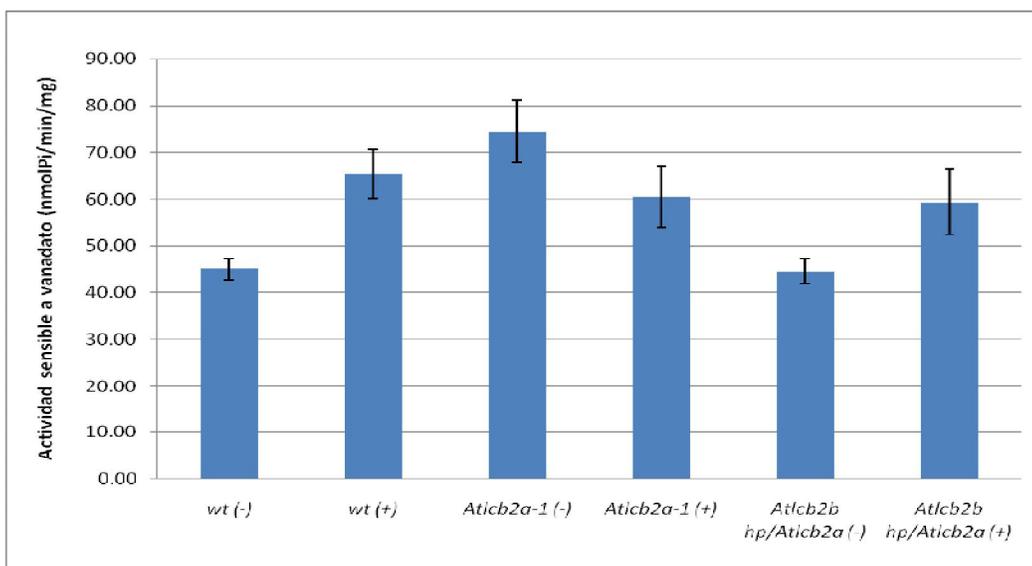


Figura 13. Determinación de la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:10000, v:v) por 3 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La actividad mostrada es el resultado de la substracción de la hidrólisis medida en presencia del inhibidor, de la hidrólisis total de ATP. La gráfica muestra los valores obtenidos para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 12 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes.

Contenido membranal total de hojas en cada línea. Rendimiento en proteína membranal

Debido a que no se encontró el efecto de aumento de actividad en las fracciones microsomales en las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* bajo las condiciones de inducción con metoxifenoza de 1:10000 (v:v) por 3 días, como se había encontrado en fracciones de vesículas de membrana plasmática de plantas adultas, aún y cuando había indicios fenotípicos de silenciamiento, se optó por investigar si las preparaciones membranales de la parte aérea de las plántulas sí mostraban el aumento de actividad. Además, para posibilitar este efecto, se exacerbaron las condiciones de inducción del silenciamiento. Se usó pues, una concentración de 1:5000 (v:v) de metoxifenoza por un periodo de 5 días. Los resultados mostrados en la Figura 14 indican los rendimientos de las fracciones microsomales obtenidas de los homogenados preparados a partir del tejido aéreo (hojas y tallos) de las plántulas silvestres (*wt*) y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, en ausencia y presencia del tratamiento de metoxifenoza a una concentración 1:5000 (v:v) por un periodo de 5 días.

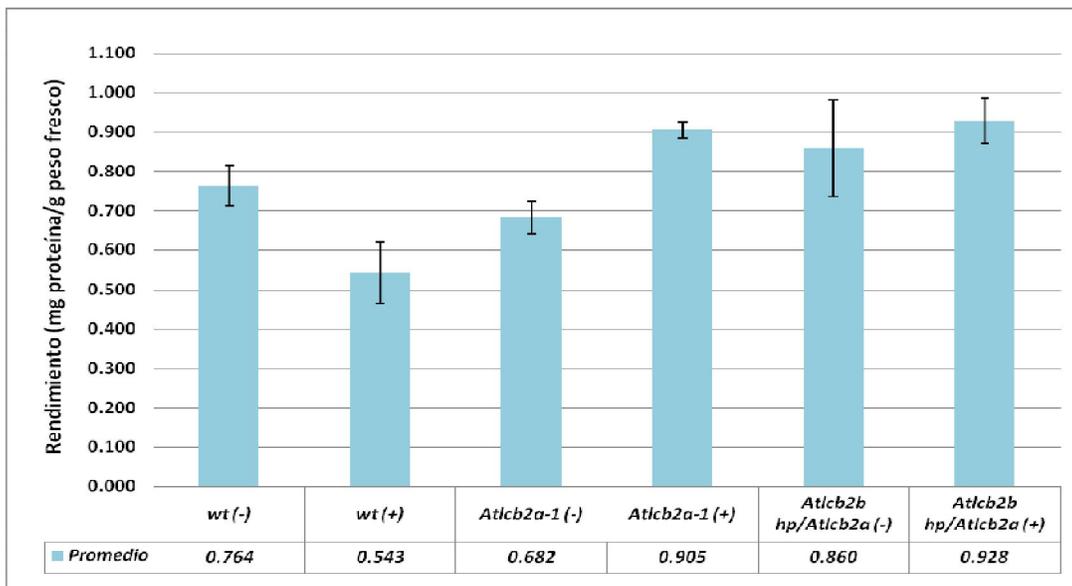


Figura 14. Rendimientos de las fracciones microsomales de hojas para las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza (1:5000, v:v) por 5 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, las hojas fueron cosechadas y los homogenados obtenidos. A éstos se les determinó la proteína total. Los rendimientos se presentan en términos de proteína obtenida por g de peso húmedo de tejido. Se muestran las tres líneas en estudio con los dos diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de los tejidos de plántulas no inducidas y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos de plántulas que se indujeron con metoxifenoza, así como el promedio \pm DE de cada una. Se usaron como mínimo 2 preparaciones independientes de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* para la determinación del rendimiento y para la línea silvestre se usó 1 preparación, realizándose 3 determinaciones de cantidad de proteína con dichas preparaciones.

Comparados con los rendimientos obtenidos en las raíces, los encontrados en las hojas resultaron ser un poco más altos, pero muy similares entre sí, ya que cuatro de ellos estuvieron por arriba de 0.7 mg/g (0.78 a 0.92 mg/g), y para el caso de las raíces, el máximo obtenido fue de 0.69 mg/g. A diferencia de lo obtenido en el tejido de la raíz, en el caso de los homogenados de las hojas no se encontró una disminución en la cantidad de proteína microsomal derivada de la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor.

Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H⁺ en las fracciones microsomales de hojas en cada línea

Determinación de hidrólisis total de ATP

En cuanto a la hidrólisis total de ATP obtenida en las fracciones microsomales de las hojas y tallos de las plántulas silvestres y de las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (Figura 15, Apéndice Tabla III), se observaron valores más homogéneos que los obtenidos con los de las raíces. Estas fracciones microsomales demás, presentaron en general, valores más bajos de actividad, ya que en ninguna línea ni tratamiento se alcanzaron actividades de 70 nmolPi/min/mg, mientras que en el caso de las preparaciones obtenidas a partir de las raíces se obtuvieron valores mínimos de 80 nmolPi/min/mg aproximadamente.

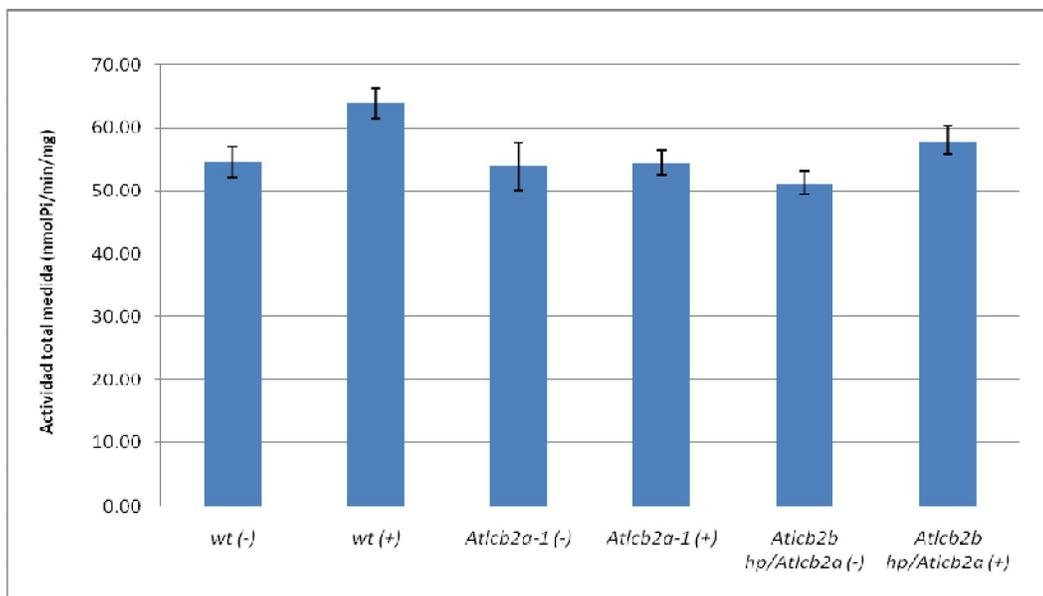


Figura 15. **Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza (1:5000, v:v) por 5 días.** Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La gráfica muestra los valores obtenidos en promedio para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 9 repeticiones para cada línea usando por lo menos 1 preparación para la línea silvestre y 2 preparaciones independientes para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Determinación de la sensibilidad a Na_3VO_4 de la hidrólisis total de ATP

Cuando se determinó el porcentaje de actividad sensible al inhibidor Na_3VO_4 en las fracciones microsomales obtenidas de las hojas de las líneas silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en ausencia o presencia de metoxifenoza (Figura 16, Apéndice Tabla IVa), se encontraron niveles similares a los obtenidos a partir del tejido de la raíz, es decir, de un 50% aproximadamente.

Sin embargo, fue notoria la presencia de dos grupos definidos: uno formado por las plántulas silvestres (*wt*) que mostraron entre el 32 y 36% de actividad inhibida por Na_3VO_4 independientemente del tratamiento usado; y el segundo grupo que incluye a las líneas mutantes *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con y sin exposición a metoxifenoza, en las cuales se observó un porcentaje de inhibición por Na_3VO_4 un tanto mayor, entre el 45 y 50%, de la actividad total medida en dichas líneas.

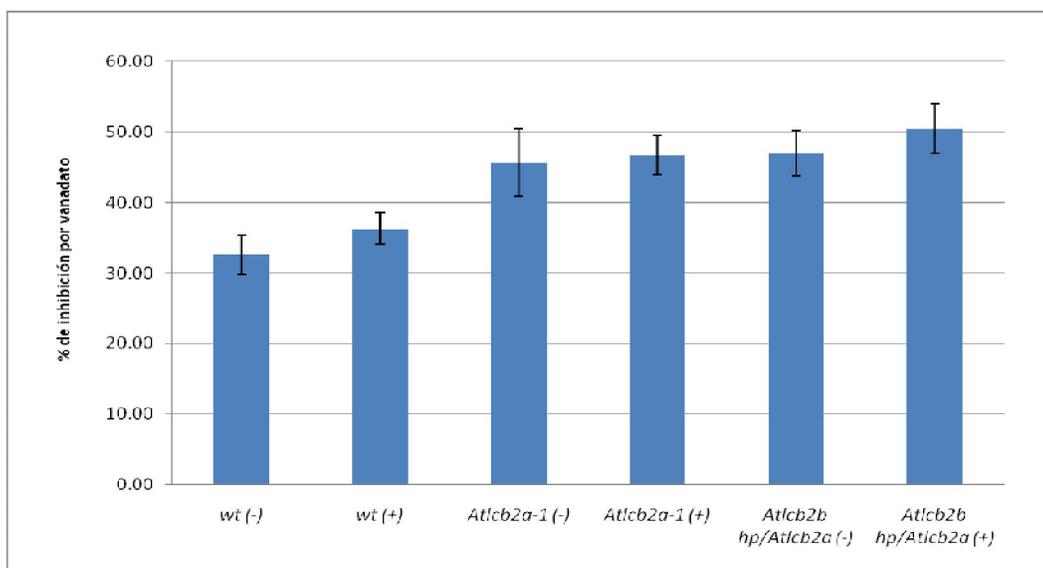


Figura 16. **Determinación de la fracción de la hidrólisis total de ATP que es inhibida por Na_3VO_4 en las fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 5 días.** Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. Se muestran los porcentajes y su promedio \pm EE, que representan la proporción de actividad enzimática que es inhibida o suprimida en fracciones microsomales de hoja al usar el inhibidor Na_3VO_4 en el medio de hidrólisis. Se realizaron como mínimo 10 repeticiones para cada línea usando por lo menos 1 preparación para la línea silvestre y 2 preparaciones independientes para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

De manera similar al procedimiento seguido en las fracciones microsomales de la raíz, se cuantificó la actividad asociada a la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en las preparaciones de hojas para cada una de las tres líneas (*wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) y tratamientos mediante el uso del inhibidor Na_3VO_4 en el medio de hidrólisis (Figura 17, Apéndice Tabla IVb). Para el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenozida se observó un ligero aumento en esta actividad en comparación con las demás líneas (*wt* y *Atlcb2a-1*) dentro de su mismo grupo, si bien, la dispersión de los datos en todas las líneas no permitió determinar con certeza esta pequeña diferencia.

Con el objeto de obtener información más precisa sobre el posible aumento de la actividad sensible a Na_3VO_4 en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor del silenciamiento, se hizo un tratamiento estadístico de los datos, con diez repeticiones para cada línea usando una preparación para la línea silvestre y dos preparaciones independientes para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

Para ello los resultados se dividieron en dos grupos (Figura 18). El grupo denominado *Control* estuvo conformado por los valores de hidrólisis de ATP sensible a vanadato correspondientes a las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición a metoxifenoazida. En este grupo se observaron valores promedio similares de actividad sensible a Na_3VO_4 para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (entre 23 y 24 nmolPi/min/mg, respectivamente), y en la línea *wt* se obtuvo un valor ligeramente menor (18 nmolPi/min/mg). En el grupo *Tratamiento*, integrado por los valores de hidrólisis de ATP sensible a vanadato correspondientes a las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuestas a metoxifenoazida, el pequeño aumento en el valor de la actividad sensible a Na_3VO_4 en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* fue de cerca de 30 nmolPi/min/mg y que se compara con los que presentaron la línea *wt* y *Atlcb2a-1* (23 y 25 nmolPi/min/mg respectivamente). Al realizar el análisis (ANOVA) para determinar si había o no diferencias significativas entre los valores obtenidos dentro de cada grupo y aplicando la prueba de comparación de medias de Bonferroni a todos estos datos, se estableció que no había diferencia significativa entre los valores de hidrólisis de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* y los de las líneas silvestre (*wt*) y *Atlcb2a-1* en ninguno de los dos grupos.

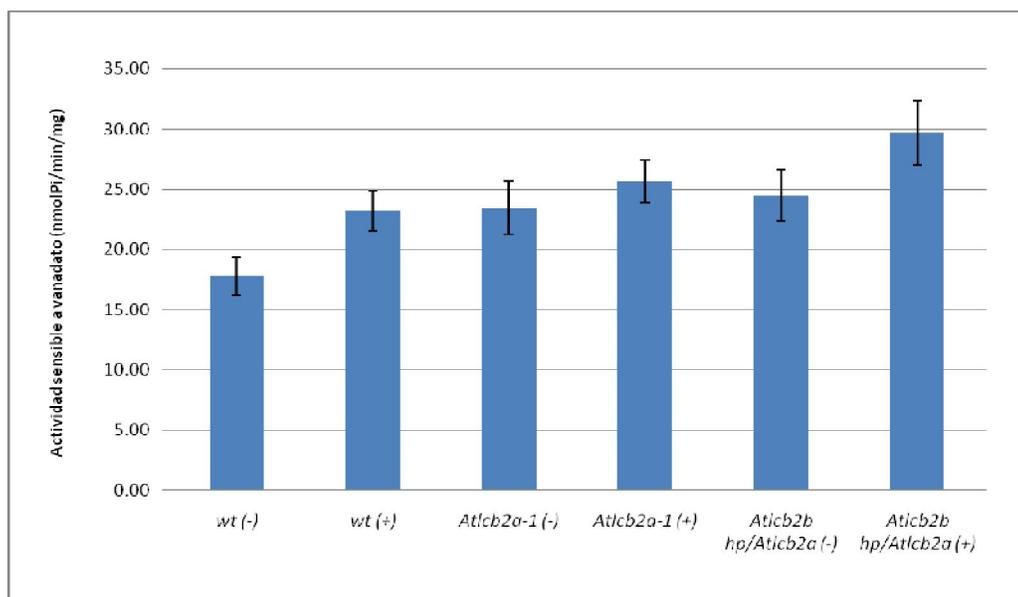


Figura 17. **Determinación de la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoazida (1:5000, v:v) por 5 días.** Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La actividad mostrada es el resultado de la substracción de la hidrólisis medida en presencia del inhibidor, de la hidrólisis total. La gráfica muestra los valores obtenidos en promedio para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 10 repeticiones para cada línea usando 1 preparación para la línea silvestre y 2 preparaciones independientes para las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*.

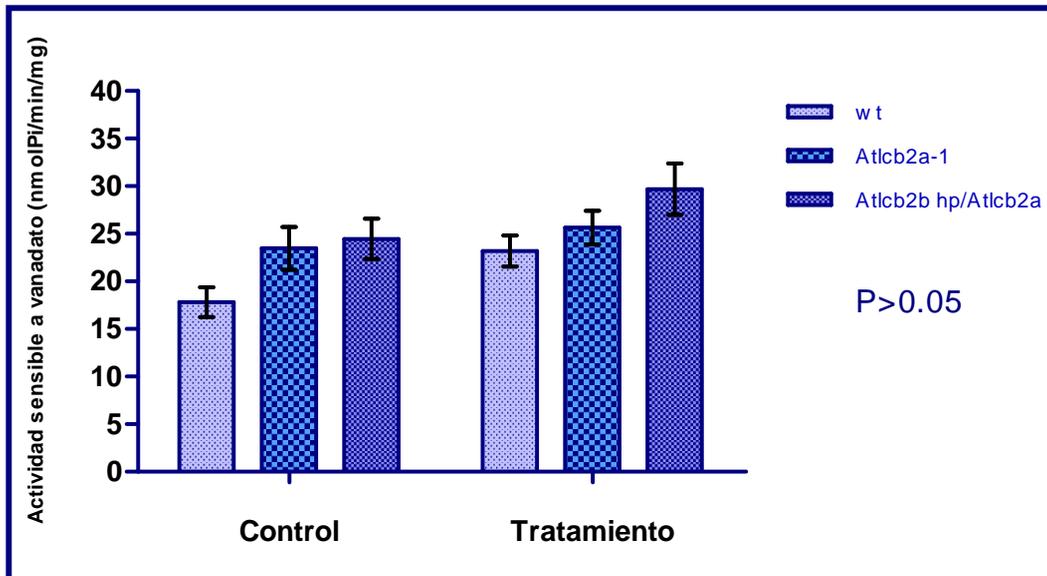


Figura 18. **Determinación de diferencias significativas de la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato de las fracciones microsomales de las líneas de *Arabidopsis thaliana silvestre*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza (1:5000, v:v) por 5 días.** Se muestran los valores de actividad sensible a Na_3VO_4 obtenidos en la Figura 17, y que fueron divididos en dos grupos: el grupo *Control* integrado por las líneas expuestas a condiciones control (sin metoxifenoza) y el grupo denominado *Tratamiento* formado por las líneas expuestas al inductor (con metoxifenoza) del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT. Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con varias muestras por grupo y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

Debido a los resultados anteriores, y esperando que con condiciones más drásticas de exposición al inductor, se observaran los efectos de aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, se procedió a obtener nuevas fracciones microsomales de hojas y raíces de las mismas líneas en estudio, pero ahora con una exposición al inductor de 7 días a una concentración de metoxifenoza de 1:5000 (v:v). En esta condición, sólo se trabajó con la línea *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor y *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con inductor.

Contenido membranal total de raíces en cada línea con mayor tiempo de exposición al inductor. Rendimiento en proteína membranal

La Figura 19 muestra los rendimientos referentes a la cantidad de proteína, obtenidos a partir de tejidos de raíz de las líneas silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tras 7 días de inducción con metoxifenoza (1:5000, v:v). Tal como se observó en los rendimientos de sus similares (raíces de plántulas expuestas a metoxifenoza 1:10000 por 3 días, Figura 10), hubo un aparente decremento en los niveles de proteína cuando se trató de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a la metoxifenoza.

Los rendimientos obtenidos para las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* y sus respectivos tratamientos fueron bastante similares, con promedios que van de 0.55 y 0.7 mg proteína/g peso fresco de tejido; los cuales contrastan con el valor promedio de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida, pues ésta apenas alcanzó un valor de 0.27 mg proteína/g peso fresco de tejido, lo que correspondió a aproximadamente la mitad del valor de las otras condiciones.

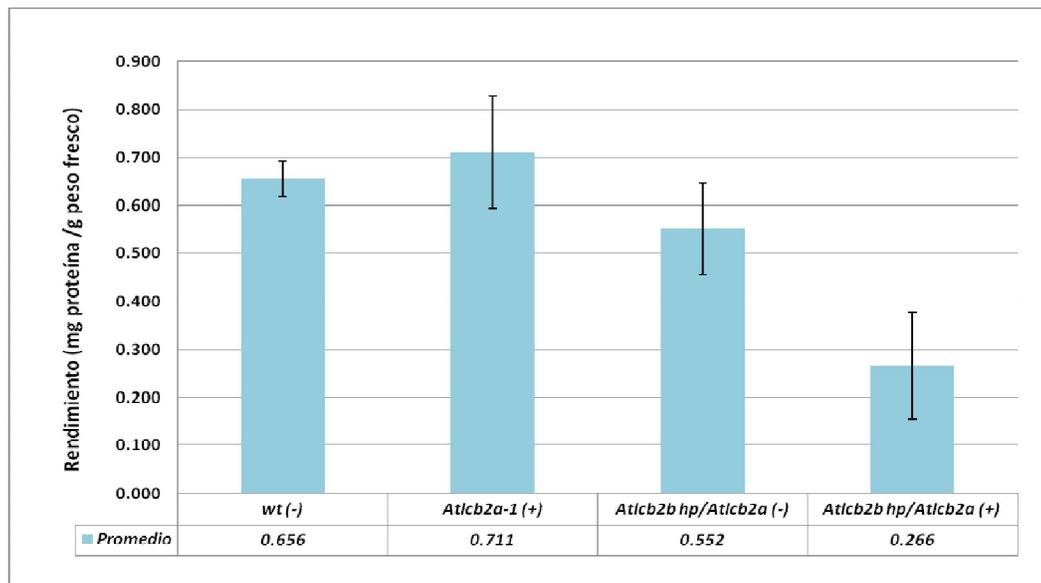


Figura 19. Rendimientos de las fracciones microsomales de raíces para las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza (1:5000, v:v) por 7 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, las raíces fueron cosechadas y los homogenados obtenidos. A éstos se les determinó la proteína total. Los rendimientos se presentan en términos de proteína obtenida por g de peso húmedo de tejido. Se muestran las tres líneas en estudio con diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de tejidos de plántulas no inducidas y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos de plántulas que se indujeron con metoxifenoza, así como el promedio \pm DE de cada uno. Los valores mostrados son los promedios de 2 preparaciones independientes, realizándose 3 determinaciones de cantidad de proteína con estas preparaciones.

Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H⁺ en las fracciones microsomales de raíces en cada línea

Determinación de hidrólisis total de ATP

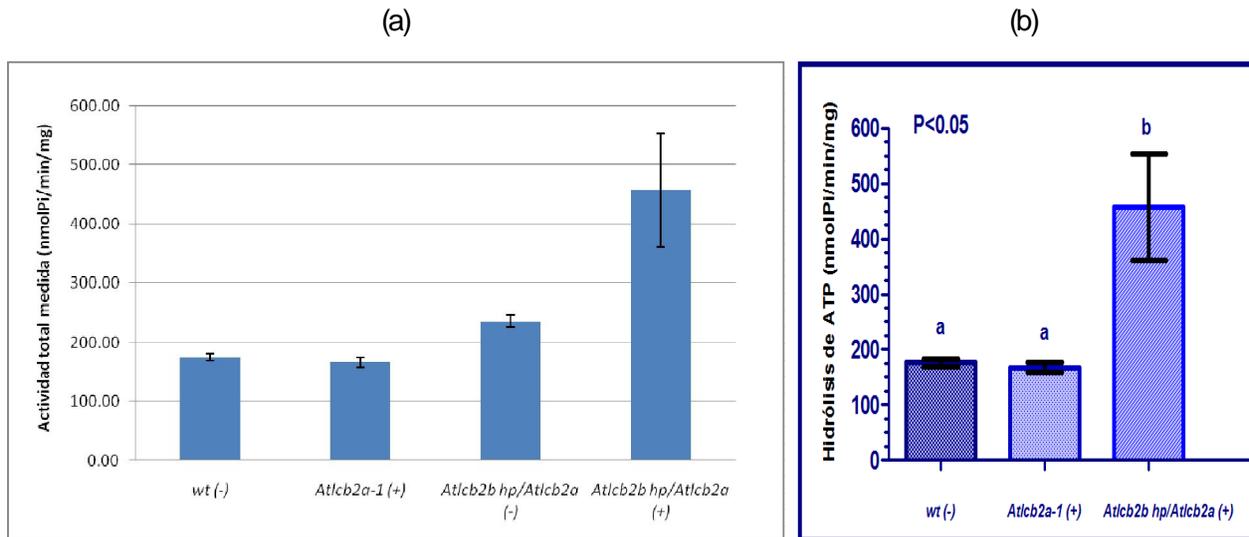


Figura 20. Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 7 días y establecimiento de diferencias significativas. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. (a) La gráfica muestra los valores obtenidos para cada línea con su tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. (b) Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

Las fracciones microsomales obtenidas de estos tejidos de raíces con mayor tiempo de exposición al inductor se usaron para determinar la actividad específica de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, tal y como se hizo en las ocasiones anteriores para tiempos más cortos de inducción de silenciamiento génico y/o menores concentraciones de metoxifenozida.

Tras 7 días de exposición, se encontró que la hidrólisis total medida en raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada con el inductor mostró un gran aumento en la actividad medida, llegando por arriba de 400 nmolPi/min/mg proteína. Las líneas *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* ambas sin inductor, y la *Atlcb2a-1* con inductor mostraron valores mucho más bajos, estando alrededor de 200 nmolPi/min/mg proteína (Figura 20a, Apéndice Tabla V).

Puesto que los tejidos de las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* tratados con y sin metoxifenozida y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada sin metoxifenozida presentaron valores de hidrólisis total de ATP de órdenes de magnitud similares en los ensayos con menores tiempos de exposición, se realizó una ANOVA de una vía, considerando que no era realmente significativo el que las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* estuvieran o no inducidas, y así poder contrastar el valor de su hidrólisis total con el de la línea de interés *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor. Se realizó pues, el análisis de varianza con los datos de las líneas *wt* (-), *Atlcb2a-1* (+) y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (+) encontrándose que efectivamente había una diferencia significativa entre esta última línea bajo la inducción del silenciamiento génico de la subunidad LCB2a de la SPT y las dos primeras (Figura 20b).

Determinación de la sensibilidad a Na_3VO_4 de la hidrólisis total de ATP

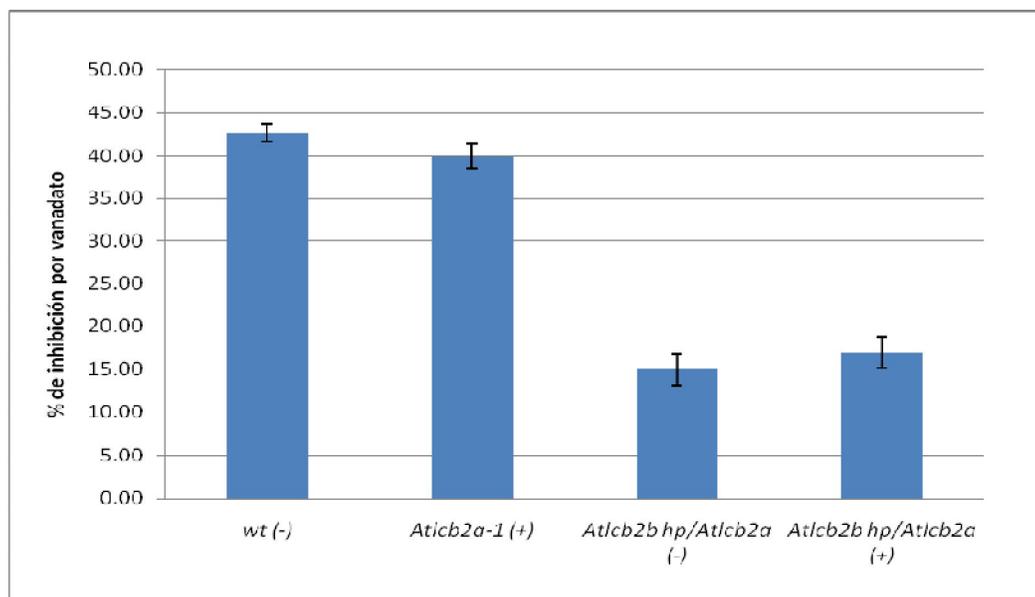


Figura 21. **Determinación de la fracción de la hidrólisis total de ATP que es inhibida por Na_3VO_4 en las fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 7 días.** Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. Se muestran los porcentajes y su promedio \pm EE, que representan la proporción de actividad enzimática que es suprimida en fracciones microsomales de raíz al usar el inhibidor Na_3VO_4 en el medio de hidrólisis de ATP. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando 2 preparaciones independientes.

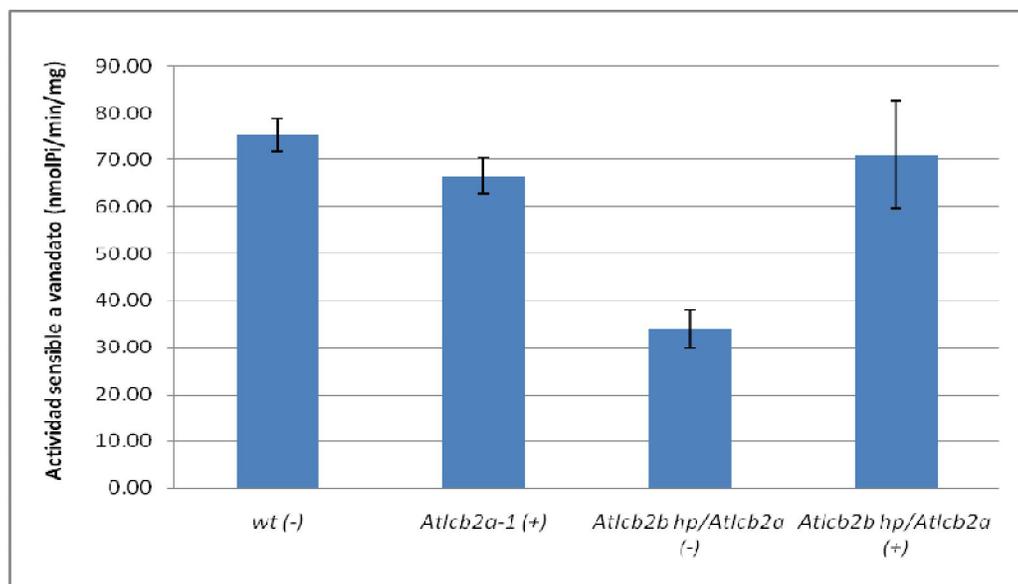


Figura 22. Determinación de la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de raíces de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoazida (1:5000, v:v) por 7 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las raíces fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La actividad mostrada es el resultado de la sustracción de la hidrólisis medida en presencia del inhibidor, de la hidrólisis total. La gráfica muestra los valores obtenidos para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 6 repeticiones para cada línea usando 2 preparaciones independientes.

Al cuantificar el porcentaje que representaba la actividad sensible a vanadato respecto de la hidrólisis total que se midió, las líneas *wt*(-) y *Atlcb2a-1*(+) mostraron valores similares cercanos al 40-45% mientras que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta o no expuesta al inductor, presentó valores más bajos, siendo alrededor del 15% (Figura 21, Apéndice Tabla VIa).

Al determinar la actividad sensible a vanadato, la cual es la que está asociada directamente a la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, se encontró que la actividad de las fracciones microsomales de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* tratadas con o sin metoxifenoazida y la *Atlcb2b hp/Atlcb2a* también con metoxifenoazida 1:5000, (v:v) por 7 días, tenían magnitudes del mismo orden, alrededor de 70 nmolPi/min/mg proteína; sin embargo la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor presentó valores menores y cercanos a 35 nmolPi/min/mg de proteína (Figura 22, Apéndice Tabla VIb).

Contenido membranal total de hojas en cada línea con mayor tiempo de exposición al inductor. Rendimiento en proteína membranal

En el caso de los rendimientos obtenidos del tejido aéreo de las mismas plántulas expuestas por 7 días a metoxifenoza (1:5000, v:v), se encontró que no había una disminución aparente en el contenido de proteína entre las líneas silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con los tratamientos usados (Figura 23).

En el caso de los tejidos aéreos por tanto, se vuelve a tener la misma tendencia que en los tejidos expuestos por 5 días al inductor (1:5000, v:v), es decir, al parecer no se presentó una disminución en la cantidad de proteína en estos tejidos como ocurrió en la de las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida.

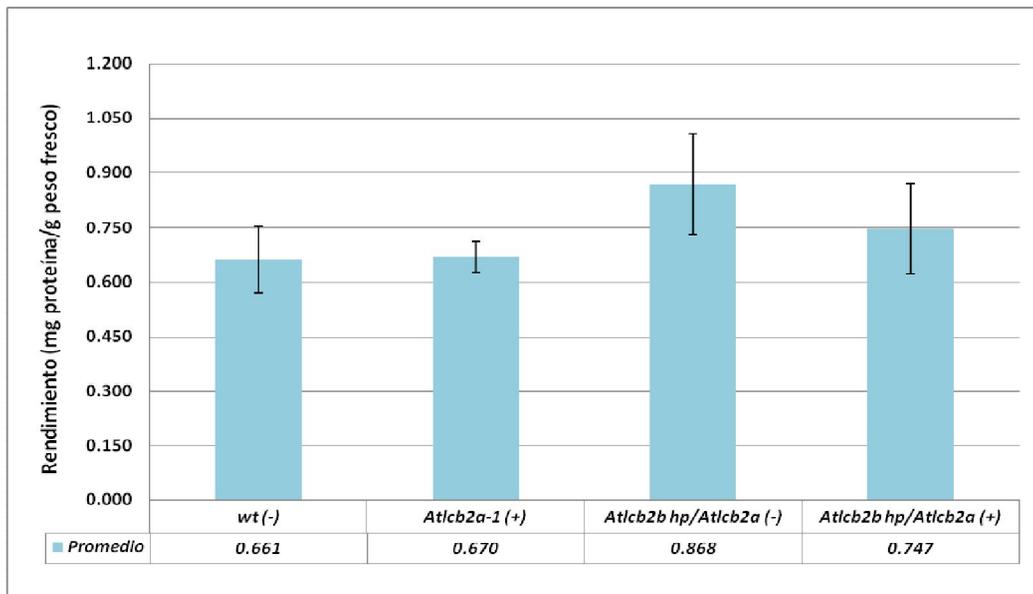


Figura 23. Rendimientos de las fracciones microsomales de hojas para las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenoza (1:5000, v:v) por 7 días. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor de silenciamiento, las hojas fueron cosechadas y los homogenados obtenidos. A éstos se les determinó la proteína total. Los rendimientos promedio se presentan en términos de proteína obtenida por g de peso húmedo de tejido inicial. Se muestran las tres líneas en estudio con los diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de tejidos de plántulas no inducidas y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos de plántulas que se indujeron con metoxifenoza, así como el promedio \pm DE de cada uno. Los valores mostrados son los promedios de 2 preparaciones independientes, realizándose 3 determinaciones de cantidad de proteína con estas preparaciones.

Determinación de la actividad específica de la ATPasa de H⁺ en las fracciones microsomales de hojas en cada línea

Determinación de hidrólisis total de ATP

Al medir la hidrólisis total de ATP en las fracciones microsomales obtenidas de los tejidos aéreos de las plántulas se pudo observar que, de igual manera que como se vio en las mediciones de la hidrólisis de ATP en las raíces, hubo un aumento considerable en la actividad de hidrólisis de ATP en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada con el inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, llegando a valores de aproximadamente 100 nmolPi/min/mg proteína, mientras que las líneas *wt(-)* y *Atlcb2a-1(+)* e inclusive la misma *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin exposición permanecieron con valores de actividad enzimática entre 55-60 nmolPi/min/mg proteína (Figura 23a, Apéndice Tabla VII), valores muy parecidos a los obtenidos en las fracciones microsomales de hojas mostradas en la Figura 15. Lo anterior reveló un aumento de alrededor del 40 al 45 % en la actividad de liberación de Pi a partir del ATP por las enzimas de las fracciones microsomales obtenidas de las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* bajo condiciones en las que se ha activado el silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT.

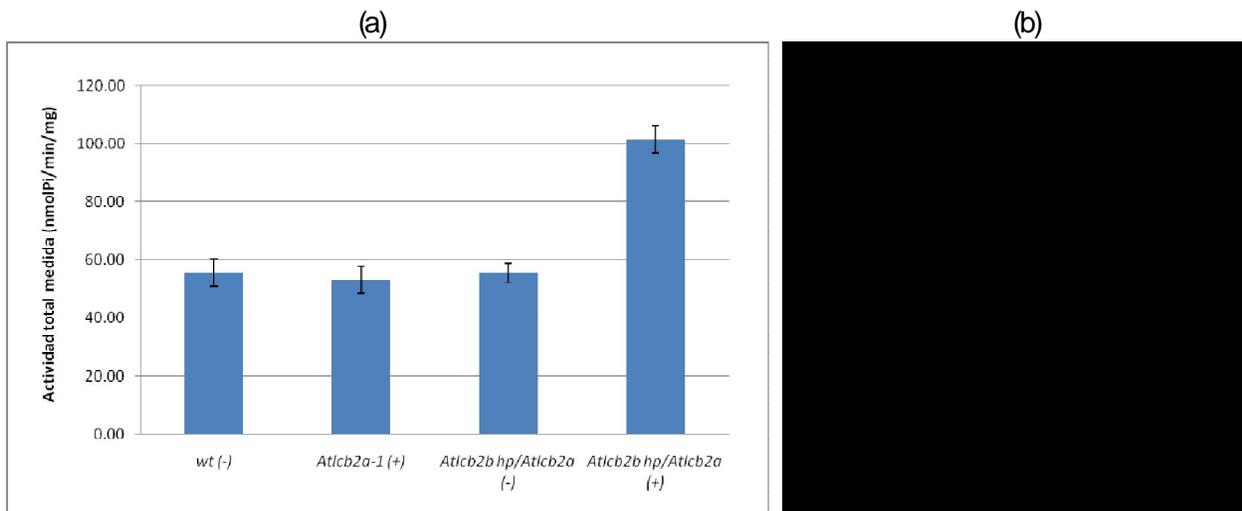


Figura 23. Determinación de la hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 7 días y establecimiento de diferencias significativas. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. (a) La gráfica muestra los valores obtenidos en promedio para cada línea con su tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 11 repeticiones para cada línea usando por lo menos 2 preparaciones independientes. (b) Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

Para tener un dato del aumento de actividad más robusto en su significancia estadística, al igual que para el caso de las raíces, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de comparación de medias de Bonferroni. En este caso también se corroboró una diferencia significativa entre la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada con el inductor y la *wt* y *Atlcb2a-1* tratadas con y sin inductor respectivamente (Figura 23b).

Determinación de la sensibilidad a Na_3VO_4 de la hidrólisis total de ATP.

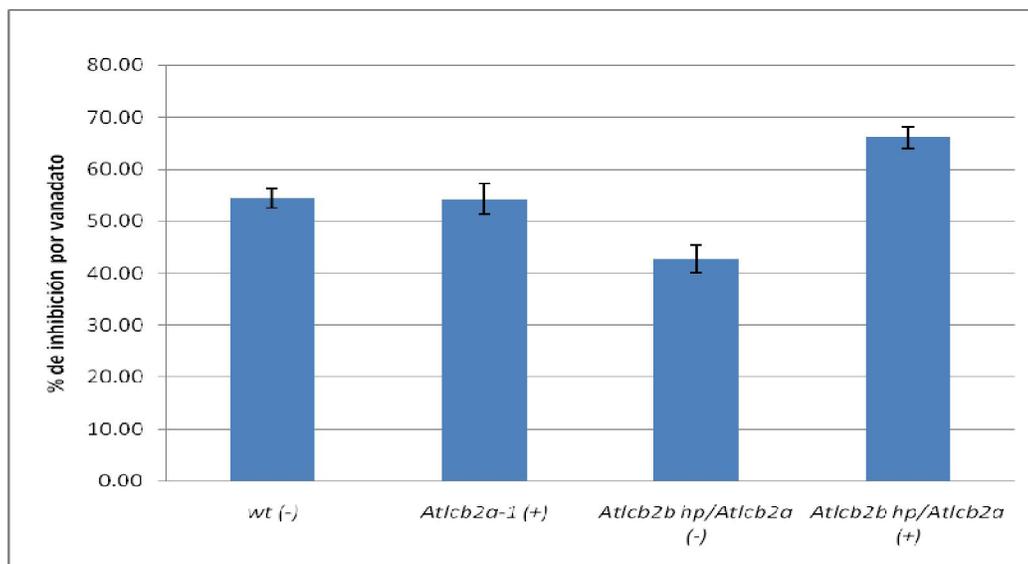


Figura 24. **Determinación de la fracción de la hidrólisis total de ATP que es inhibida por Na_3VO_4 en las fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 7 días.** Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. Se muestran los porcentajes y su promedio \pm EE, que representan la proporción de actividad enzimática que es suprimida en fracciones microsomales de hoja al usar el inhibidor Na_3VO_4 en el medio de hidrólisis. Se realizaron como mínimo 11 repeticiones para cada línea usando 2 preparaciones independientes.

El porcentaje de actividad sensible a vanadato encontrado para las fracciones microsomales de hoja con mayor tiempo de exposición al inductor fue en promedio de 50% aproximadamente (Figura 24, Apéndice Tabla VIIIa), valor que también resultó similar al obtenido anteriormente con las fracciones microsomales con menor tiempo de exposición al inductor y ya mencionado anteriormente: alrededor de 45%.

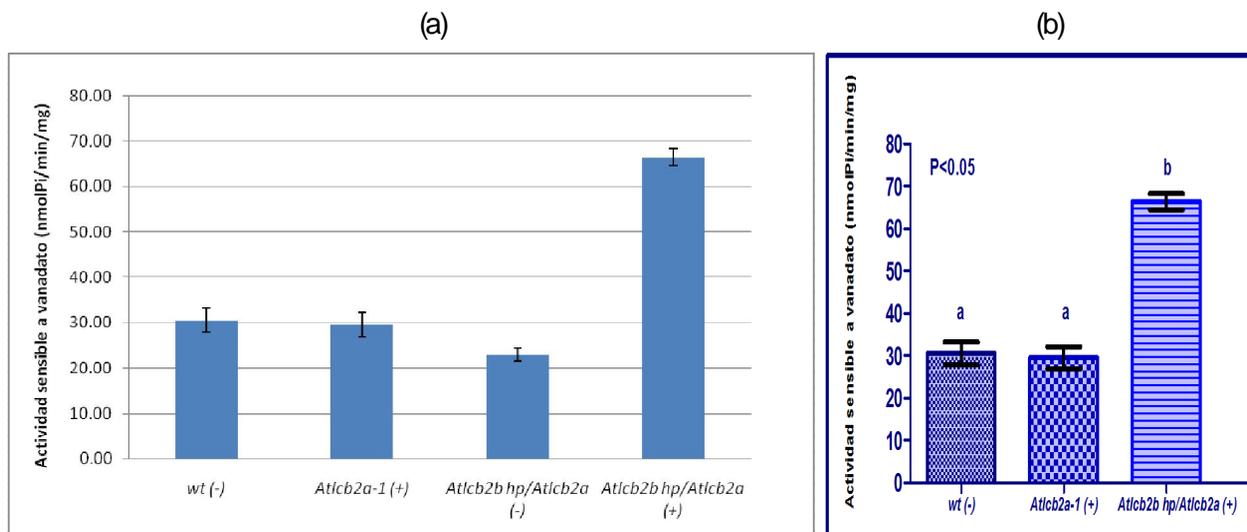


Figura 25. Determinación de la hidrólisis de ATP sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de hojas de las líneas de *Arabidopsis thaliana* silvestre (*wt*), *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratadas con o sin metoxifenozida (1:5000, v:v) por 7 días y establecimiento de diferencias significativas. Las plántulas fueron expuestas o no al inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT según se indica, las hojas fueron cosechadas y se obtuvieron las fracciones microsomales a las que se les determinó la hidrólisis de ATP. La actividad mostrada es el resultado de la substracción de la hidrólisis medida en presencia del inhibidor, de la hidrólisis total. (a) La gráfica muestra los valores obtenidos para cada línea y tratamiento, expresados como nmolPi/min/mg y su promedio \pm EE. Se realizaron como mínimo 11 repeticiones para cada línea usando 2 preparaciones independientes. (b) Los datos fueron procesados con el programa estadístico *GraphPad Prism 5* aplicando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una comparación de medias por el método de Bonferroni.

Con objeto de determinar la contribución de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática a la actividad de ATPasa total, se midió la actividad sensible a vanadato en estas fracciones microsomales de hojas que también tuvieron un mayor tiempo de exposición al inductor. Se encontró que como en el caso de la hidrólisis total, también se presentó un aumento en la actividad sensible a vanadato únicamente en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada con metoxifenozida, llegando a valores de 70 nmolPi/min/mg proteína. En comparación, los valores alcanzados por la línea *wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor y la *Atlcb2a-1* con inductor (condiciones controles), presentaron valores de entre 25 y 30 nmolPi/min/mg proteína (Figura 25a, Apéndice Tabla VIIIb), siendo estos últimos similares a los obtenidos en las fracciones microsomales del tejido aéreo con un menor tiempo de exposición al inductor mostrados en la Figura 17, en los cuales se observaron valores promedio cercanos a 25 nmolPi/min/mg proteína. La diferencia en actividad correspondió entonces a un aumento del 56 al 66 % en la actividad sensible a vanadato que por tanto es adjudicable a la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática.

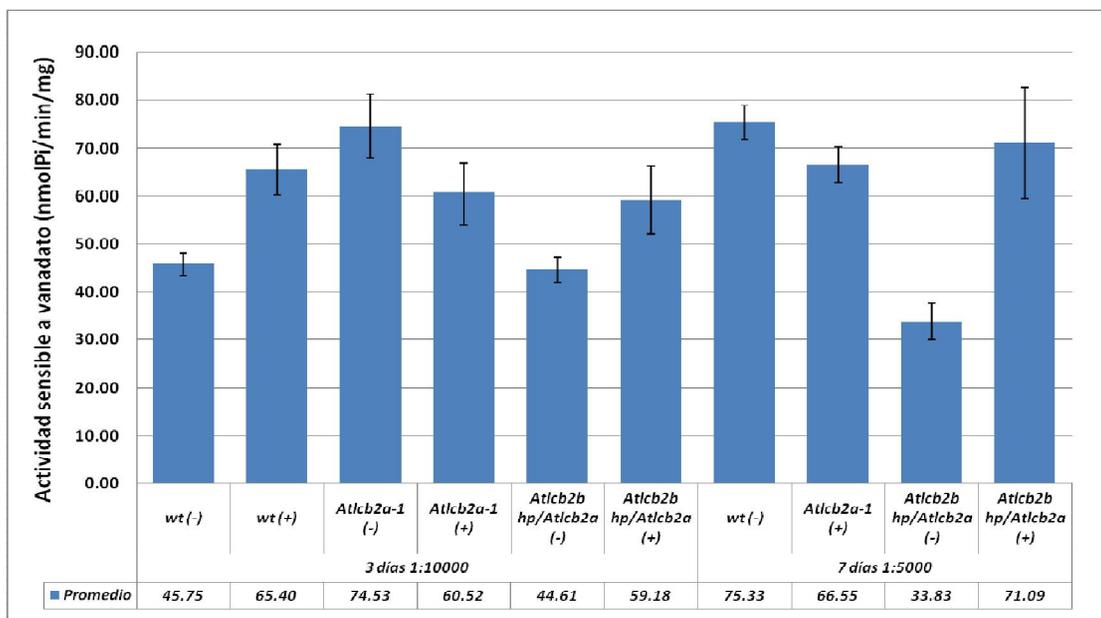


Figura 26. **Actividad sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de raíz con distintas condiciones de inducción.** Se muestran los valores promedio \pm EE de la actividad sensible a vanadato medida en las fracciones microsomales de raíz en las dos condiciones ensayadas de inducción con metoxifenozida: 3 días 1:10000 (v.v) y 7 días 1:5000 (v.v) mostradas en las Figuras 13 y 22 respectivamente. Se muestran las tres líneas en estudio con diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de tejidos de plántulas no inducidos y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos de plántulas que se indujeron con metoxifenozida.

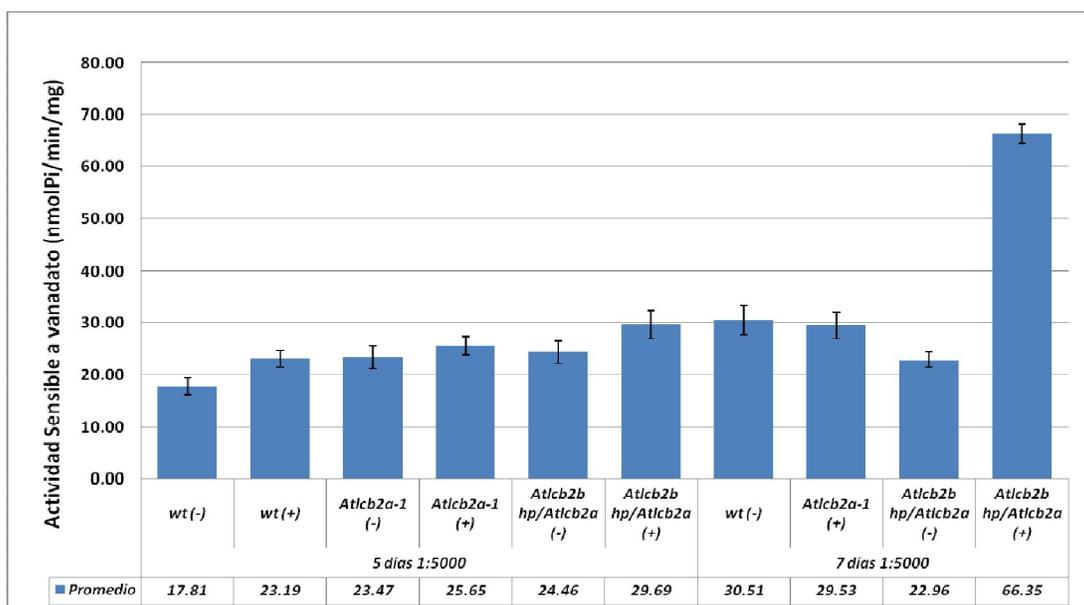


Figura 27. **Actividad sensible a Na_3VO_4 en fracciones microsomales de hoja con distintas condiciones de inducción.** Se muestran los valores promedio \pm EE de la actividad sensible a vanadato medida en las fracciones microsomales de hoja en las dos condiciones ensayadas de inducción con metoxifenozida: 5 días 1:5000 (v.v) y 7 días 1:5000 (v.v) mostradas en las Figuras 17 y 25 respectivamente. Se muestran las tres líneas en estudio con diferentes tratamientos; se denota con (-) a los homogenados que se obtuvieron de tejidos no inducidos y con (+) a los que se obtuvieron de tejidos que se indujeron con metoxifenozida.

Considerando los resultados obtenidos de la hidrólisis de ATP de las fracciones microsomales de raíces o parte aérea de plántulas de las diferentes líneas en estudio y expuestas a condiciones control o de silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT, se hizo evidente que un factor que modificaba la magnitud de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática medida como actividad sensible a vanadato, era la condición en la que se agregaba el inductor del silenciamiento (3 días con metoxifenoza 1:10000 (v:v), 5 días con metoxifenoza 1:5000 (v:v) ó 7 días con metoxifenoza 1:5000 (v:v)). Por ello, en las Figuras 26 y 27 se resumen los datos para raíces y parte aérea, respectivamente con respecto a las condiciones de inducción.

Como se aprecia en la Figura 26, la actividad sensible a vanadato medida en las fracciones microsomales de raíz presentó muchas fluctuaciones en los valores tanto a 3 días como a 5 días de exposición al inductor, independientemente de la línea y concentración de inductor usada, sin que pueda verse alguna tendencia en ellos. Sin embargo, los valores promedio de cada línea y tratamiento en la condición de 3 días de exposición al ser comparados con los obtenidos a los 7 días de exposición son muy similares, a excepción de la línea *wt* sin inductor, en la que a los 7 días se determinó un aumento significativo respecto al obtenido a los 3 días de exposición.

Para el caso de la actividad sensible a vanadato medida en las fracciones microsomales de hojas obtenidas también con condiciones distintas de inducción (5 días con metoxifenoza 1:5000, v:v y 7 días con metoxifenoza 1:5000, v:v) se obtuvieron valores bastante similares tanto con 5 como con 7 días de inducción en las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* con o sin inductor y la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor, a excepción de lo encontrado con la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta por 7 días a la metoxifenoza, en la cual se vio un claro aumento en la actividad enzimática de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, de aproximadamente el 50% respecto a las demás líneas y tratamientos (Figura 27).

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudia la influencia que tienen los esfingolípidos sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Para ello se utilizó una mutante silenciante construida a partir de la planta silvestre (*wt*) ecotipo Columbia, de la cual se generó una línea de plantas mutantes denominada *Atlcb2a-1* y con base en la que se hizo la construcción de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducible al silenciamiento del gen que codifica para la proteína LCB2b, una de las subunidades de la SPT, que es la enzima que cataliza la condensación de la serina con la palmitoil-CoA para generar el precursor de la esfinganina, una de las bases de cadena larga constitutivas de los esfingolípidos complejos (Dietrich y col., 2008). La línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* bajo condiciones de silenciamiento, muestra una reducción del 40 % de las bases de cadena larga totales, que son uno de los componentes de los esfingolípidos complejos (Dietrich y col., 2008).

Para poder caracterizar los efectos de la disminución de esfingolípidos en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, fue necesario incluir en el presente estudio a las líneas de *Arabidopsis thaliana* y los tratamientos que se condujeran como controles dentro del diseño experimental. Dichas líneas y tratamientos fueron precisamente la línea mutante *Atlcb2a-1* (progenitora de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) y la planta con el genotipo silvestre o *wt* (progenitora de la línea *Atlcb2a-1*).

Los tratamientos que se usaron fueron el de adición de metoxifenoazida a las plántulas, el cual es el compuesto inductor del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT; este tratamiento tuvo dos variantes; dos diferentes concentraciones: 1:5000 y 1:10000 (v:v) y la exposición de las plántulas al inductor durante 3, 5 y 7 días. Adicionalmente, la misma línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* al no exponerse a metoxifenoazida sirvió de control. De esta manera se podía corroborar que el silenciamiento descrito anteriormente ocurría únicamente en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en presencia del inductor.

La atenuación en el contenido de los niveles de esfingolípidos endógenos como resultado del silenciamiento génico inducido por la metoxifenoazida fue estudiado fundamentalmente en la actividad de ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de fracciones microsomales, sin embargo, fue necesario corroborar el grado de silenciamiento en otros dos niveles: en los cambios en el fenotipo de las plantas y en la recuperación de la cantidad de proteína en las fracciones membranales obtenidas.

Efectos fenotípicos del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b en las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Ya que la pregunta central de esta tesis era la de determinar si la disminución de esfingolípidos endógenos era capaz de producir un aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*, era importante determinar el grado de silenciamiento génico que se alcanzaba en las plántulas tras la adición del inductor para poder correlacionar la disminución de los esfingolípidos endógenos con los cambios en la actividad catalítica de la enzima. Adicionalmente, era interesante correlacionar estos cambios con el aparente aumento en el grado de acidificación del medio por parte de las raíces de éstas plántulas, mismo que se había observado en ensayos previos en los que las plántulas fueron crecidas en un medio con púrpura de bromocresol como indicador de pH (Vázquez, 2009). En los ensayos en plantas adultas realizados previamente (Vázquez, 2009) la magnitud del silenciamiento se había determinado estimando los niveles de transcrito de la subunidad LCB2b en plantas adultas asperjadas con metoxifenoza. Sin embargo, en esta tesis, plantas jóvenes (plántulas) de *Arabidopsis thaliana* se expusieron por primera vez al inductor en nuestro laboratorio. Una de las formas más sencillas de estimar el silenciamiento era a través del análisis fenotípico de las plántulas expuestas a metoxifenoza.

En una de las líneas control, la línea *Atlcb2a-1*, los registros fotográficos permitieron documentar un crecimiento mayor en las plántulas, comparado con el de la línea silvestre y también comparado con el de la mutante silenciada *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducción. Esta observación fue inesperada, ya que según los reportes de la literatura, para las tres líneas: silvestre, *Atlcb2a-1* (con o sin inductor) y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (sin inductor), la cantidad de esfingolípidos endógenos no cambian (Chen y col., 2006; Dietrich y col., 2008), pues todas tienen o bien la versión LCB1/LCB2a o LCB1/LCB2b de la SPT o bien a ambas. En los casos de las dos líneas mutantes y de las plantas silvestres, la subunidad LCB1 está siempre presente, mientras que las subunidades LCB2a/b, pueden estar ausentes, según la mutante y el tipo de tratamiento del que se trate (Figura 8). Estos resultados están de acuerdo con la demostración de que tras una atenuación de entre el 60 y 80% de la expresión del transcrito de la subunidad LCB1 de la SPT, las plantas de *Arabidopsis thaliana* no se recuperan de los daños sufridos por ausencia de esta subunidad (de lo cual se concluyó que los esfingolípidos son esenciales para la viabilidad de la planta) (Chen y col., 2006).

Sin embargo, con respecto a la otra subunidad, la LCB2, los estudios realizados en microsomas obtenidos de levaduras que sólo podían expresar el heterodímero LCB1/LCB2a comparados con otras que sólo podían expresar el heterodímero LCB1/LCB2b presentaron prácticamente la misma actividad de la SPT, llegándose a la conclusión de que los dos polipéptidos LCB2 son catalíticamente redundantes en el complejo del heterodímero de la SPT (Dietrich y col., 2008). Respecto a lo anterior, el crecimiento ligeramente mayor que fue observado en las plántulas de la línea *Atlcb2a-1* con y sin metoxifenoza resultó ser interesante, sugiriendo que las dos subunidades LCB2 no son estrictamente redundantes, pues al carecer la línea *Atlcb2a-1* de la subunidad LCB2a de la SPT y ser ésta la única diferencia con su línea progenitora (línea silvestre), se podría sugerir que aunque las funciones básicas de las subunidades LCB2a y LCB2b son iguales, hay ciertos procesos más finos en los que cada una interviene de manera especializada y que son los que probablemente determinen el mayor crecimiento observado.

Con respecto a las diferencias fenotípicas observadas tras la exposición a la metoxifenoza, el fenotipo de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida por 7 días y con una concentración de metoxifenoza 1:5000 (v:v), reveló efectos de clorosis más acentuados que los observados con un tiempo de exposición de 3 días a una concentración 1:10000 (v:v) ó de 5 días a una concentración 1:5000 (v:v) de metoxifenoza. El efecto observado de clorosis es parte del proceso de la muerte del tejido vegetal por disminución de los esfingolípidos endógenos de la planta, mismos que son necesarios para estructurar las membranas celulares y para señalar procesos como la apertura de los estomas (Chen y col., 2008) y de la misma muerte celular programada (Saucedo, 2007). De ahí, que la clorosis sea uno de los indicadores de la eficiencia del inductor para la síntesis de la horquilla de ARN que es la responsable de silenciar la expresión del gene que codifica para la síntesis de la proteína LCB2b en la línea mutante de interés *Atlcb2b hp/Atlcb2a*. Estos niveles de silenciamiento y por tanto de contenido de esfingolípidos endógenos constituyeron las condiciones en las que fueron obtenidas las fracciones membranales en las que se hicieron los estudios subsecuentes.

Los registros fenotípicos mostrados en las Figuras 8, 9a y 9b permitieron corroborar los efectos selectivos del inductor en las plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* (Vázquez, 2009), ya que solamente las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tratada con metoxifenoza presentaron clorosis. Por lo anterior se concluye que las plántulas con las que se trabajó durante el desarrollo experimental de este trabajo presentaron un comportamiento similar al de las plantas adultas, en el sentido de que sólo la línea inducible al silenciamiento del gene de la subunidad LCB2b de la SPT desarrolló hojas cloróticas a medida que el proceso de

silenciamiento avanzaba. Al no observarse estos efectos en ninguna de las otras dos líneas expuestas al inductor con las que se trabajó, es decir, la silvestre y la *Atlcb2a-1* se puede asegurar que la metoxifenoazida aplicada a plantas jóvenes actúa diferencialmente en las plántulas según sus fondos genéticos, generando un proceso que desemboca en la disminución de los niveles de esfingolípidos complejos solamente en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida, ya que es la única que contiene la construcción de la horquilla inducible de ARN. Adicionalmente, el hecho de que ninguna de las líneas y condiciones control presentara indicios de daño tras la aplicación del inductor metoxifenoazida, que es un insecticida, implica que éste tampoco tuvo algún otro efecto deletéreo sobre la integridad de la planta.

Se apreció por otra parte, que las raíces de las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor presentaron una longitud similar a la de las líneas control, aunque su grosor y abundancia fueron menores y estuvieron acompañados de una apreciable disminución en el número de pelos radiculares. Estas características fueron más notorias a partir de los 7 días de haberse iniciado la exposición al inductor; y no se presentaron en ninguna de las otras líneas con o sin el tratamiento de metoxifenoazida. Los genes *AtLCB1*, *AtLCB2a* y *AtLCB2b*, se expresan en todos los órganos de plántulas de *Arabidopsis*, incluyendo el cuerpo y punta de sus raíces. Sin embargo, en estas últimas, la expresión del gen *AtLCB2a* es mayor que la del *AtLCB2b* (Chen y col., 2006; Dietrich y col., 2008).

Se puede entonces inferir que la SPT está presente ampliamente en la raíz de la plántula y que de verse alterada de alguna manera su funcionalidad, la integridad de los tejidos se vería afectada especialmente por la falta de esfingolípidos complejos, necesarios para mantener la adecuada morfología y fisiología de la raíz. Este fenómeno pudo haberse presentado en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida 1:5000 (v:v) a partir de los 7 días de exposición produciendo las características fenotípicas descritas en sus raíces y pelos radiculares. Se sabe también, que plantas del género *Arabidopsis* en las cuales hay una disminución en el nivel de BCL trihidroxiladas se presenta una disminución en la longitud de sus raíces de por lo menos un 34% a los 10 días de edad y también una notable reducción en las zonas meristemáticas y del número de las células corticales de éstas, respecto a las plantas que presentan BCL trihidroxiladas con niveles normales (Chen y col. 2008). Tales evidencias abren la posibilidad de que la alteración inducida en la SPT (línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*) y que lleva a una reducción en los esfingolípidos endógenos, produzca también cambios diferenciales en la composición de los esfingolípidos complejos y que algunos de éstos, como los que contienen BCL trihidroxiladas, estén menos representados en las membranas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* generando las deficiencias estructurales observadas en la raíz.

Recuperación de la cantidad de proteína en las fracciones microsomales de plántulas expuestas a condiciones de silenciamiento

Según las condiciones de silenciamiento establecidas, se esperaba que las fracciones microsomales obtenidas de los tejidos de la raíz y de las hojas con las condiciones más acentuadas de inducción contaran con una disminución mayor del contenido de esfingolípidos complejos endógenos, en comparación con la cantidad presente en los tejidos con menores tiempos de exposición a la metoxifenoza. La fracción membranal celular total o fracción microsomal, está constituida por vesículas o fragmentos de las membranas de los organelos y de la membrana plasmática y una forma de cuantificar esta fracción es determinando sus lípidos o algún componente lipídico como ácidos grasos, pero una forma más rápida e igualmente útil es cuantificando sus proteínas.

Los rendimientos de proteína obtenidos de las raíces para las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* con o sin metoxifenoza (a una concentración de 1:10000 (v:v) por 3 días y 1:5000 (v:v) por 7 días) y de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inducción fueron en general, muy parecidos. Sin embargo, la disminución en la cantidad de proteína cuantificada en la fracción microsomal obtenida de las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a la metoxifenoza a concentraciones tanto de 1:10000 (v:v) como 1:5000 (v:v) por 3 y 7 días respectivamente reflejaron la baja cantidad de membranas que fueron obtenidas en esas condiciones en comparación con la proteína cuantificada en las líneas silvestre y *Atlcb2a-1* con y sin exposición al inductor en los mismos casos. Este resultado es comparable entre las líneas, pues la cantidad de proteína recuperada en la fracción microsomal está expresada por gramo de tejido fresco en cada línea. Lo anterior se puede atribuir a que en la línea mutante silenciada se está presentando un efecto en la disminución de la síntesis y cantidad de esfingolípidos endógenos producidos gracias a la progresiva inhibición de la actividad de la SPT al no estar disponible la subunidad LCB2a desde el principio y al silenciamiento gradual de la expresión del gene de la subunidad LCB2b.

Es factible que una cantidad disminuida de esfingolípidos no permita la síntesis de nuevas membranas en la célula, por lo que bajo esta deficiencia, no haya materiales membranales suficientes para ensamblar a las proteínas y así ser exportados como vesículas a todas las membranas celulares. Ello, por tanto, podría explicar que las fracciones microsomales obtenidas de las raíces de las plántulas *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en ambas condiciones de inducción tuvieran un rendimiento proteico más bajo.

Adicionalmente, el cambio en los niveles de esfingolípidos podría llevar a cambios en los niveles de algunos glicerolípidos, aunque éste se ha reportado sólo para los glucolípidos del cloroplasto (Chen y col., 2008). También, el déficit de esfingolípidos endógenos podría originar variaciones en la distribución de esteroides y ácidos grasos que pueden ser responsables de un cambio en la fluidez de la bicapa lipídica (Alexandre y col., 1996) obstaculizando así la incorporación de nuevas membranas en ella. Tanto las membranas celulares como sus regiones discretas llamadas balsas o microdominios (caracterizadas por su enriquecimiento en esfingolípidos y esteroides y con bajo contenido de glicerolípidos) son sintetizadas y ensambladas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi a partir de proteínas y lípidos (Alberts y col., 1994; Grennan, 2007; Larsson, 2007).

Una información complementaria se podrá obtener al cuantificar tanto a los esfingolípidos como a otros lípidos presentes en estas fracciones microsomales, esperándose que su abundancia en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida sea menor a la presente en las líneas silvestre (*wt*) y *Atlcb2a-1* con y sin metoxifenoza y también menor a la que se encontrara en la misma línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* pero sin haber sido expuesta al inductor.

Otra posible explicación del bajo rendimiento obtenido en estas mismas fracciones microsomales, es que aún cuando las proteínas pudieran enviarse a las membranas celulares por las vías del tráfico vesicular, el ambiente lipídico que las rodea (alterado por los cambios en el nivel de esfingolípidos), no sea el adecuado para que las proteínas sean funcionales y por ello se degraden y se pierdan con más rapidez (mayor recambio).

El tejido aéreo de las plántulas se estudió también con dos condiciones de inducción: 5 días y 7 días con una concentración de metoxifenoza de 1:5000 (v:v) para ambos tiempos. Basándose en las diferencias fenotípicas, estas condiciones de inducción suponían niveles de esfingolípidos menores que en las líneas control. En las dos condiciones experimentales que se ensayaron, los tejidos aéreos de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con exposición a metoxifenoza no presentaron una disminución en los niveles de proteína cuantificados, siendo su valor promedio bastante parecido al valor promedio de proteína cuantificada para sus respectivas líneas control, *wt* y *Atlcb2a-1* con sus tratamientos, por lo que no hubo una disminución significativa en los niveles de proteína en estas preparaciones derivadas de tejidos de la parte aérea.

Las diferencias entre los rendimientos obtenidos en las fracciones microsomales de las hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en las dos condiciones de inducción (metoxifenoza por 5 y 7 días a 1:5000, v:v), en comparación con las de las dos condiciones de las muestras de raíces (3 y 7 días; 1:10000 y 1:5000 v:v, respectivamente) de la misma línea, contrastaron claramente. Lo anterior indica que los dos tejidos no presentan la misma respuesta al inductor en términos

moleculares, habiendo por tanto una afectación diferencial en la cantidad de proteína en función del tipo de tejido del que se obtiene, aún cuando se trate de una misma línea y tratamiento. Esto podría estar mediado por los procesos fisiológicos que cada tipo de tejido efectúa para la sobrevivencia de la plántula y en los que pueden participar los esfingolípidos de maneras diferentes tanto cualitativamente como cuantitativamente.

Efectos del silenciamiento génico de la subunidad LCB2b de la SPT en la actividad de ATPasa de H⁺ de las fracciones microsomales

La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de las raíces de las plántulas con el silenciamiento del gene *LCB2b*

Previamente, en hojas de plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en condiciones de entre 6 y 7 días de exposición a una concentración 1:10000 (v:v) de metoxifenoza se había reportado un aumento del 49% en la actividad de la ATPasa de H⁺ (González Reyes y col., 2009). Este trabajo se realizó con preparaciones de vesículas de membrana plasmática (VMP) purificadas. En la presente tesis, se utilizaron las fracciones microsomales de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de diferentes líneas.

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas es inhibible por Na₃VO₄. La inhibición es muy específica y esto permite que cuando se añade el inhibidor al medio de reacción en que hay ATP y Mg²⁺, la actividad que desaparece corresponde a la hidrólisis de ATP catalizada por esta enzima membranal (O'Neill y col., 1984; De Michelis y col., 1986).

Las otras fuentes probables de hidrólisis de ATP en el tipo de preparaciones que se usaron en este trabajo son las ATPasas de H⁺ de las membranas de la vacuola y de la mitocondria y las fosfatasas, siendo todas ellas insensibles al Na₃VO₄.

El uso de inhibidores selectivos permitió diferenciar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de las otras fuentes de formación enzimática de fosfato (Pi) a partir del ATP en estas preparaciones membranales que no estaban purificadas.

Como se ha mencionado con anterioridad, se obtuvieron fracciones microsomales de tejidos de raíz y hoja con distintas condiciones de inducción: en el caso de las raíces se usó primero una concentración de metoxifenoza 1:10000 (v:v) por 3 días y para las hojas una de 1:5000 (v:v) por 5 días. Posteriormente se ensayó una tercera condición usando una concentración de metoxifenoza de 1:5000 (v:v) por 7 días para ambos tejidos; para así determinar si el aumento en los días de exposición al inductor realmente incrementaba la actividad total de hidrólisis de ATP y en particular, la asociada directamente a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Los ensayos usando una concentración de metoxifenoza de 1:5000 (v:v) por 7 días se realizaron entonces, con plántulas tanto de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* que presentaron características fenotípicas que revelaban un claro déficit de esfingolípidos (como las mostradas en la Figura 8, panel f.3), como con plántulas de la línea silvestre (*wt*) y *Atlcb2a-1* con los mismos días de exposición al inductor y con igual concentración de éste, o sin él.

Los resultados del porcentaje de inhibición por Na_3VO_4 en la actividad de hidrólisis de ATP de las preparaciones de raíces con una concentración de metoxifenoza de 1:10000 (v:v) por 3 días fueron muy similares en todas las líneas y tratamientos, lo cual indica que la proporción de la ATPasa de H^+ que contribuye a dicha hidrólisis total es bastante similar y sugiere una contribución equitativa de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en las preparaciones de todas las líneas con o sin inductor. La actividad sensible al inhibidor determinada para estas fracciones microsomales de raíces fue similar entre las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuestas a la metoxifenoza. De igual forma, se observó que los valores obtenidos de actividad sensible a Na_3VO_4 para estas mismas líneas eran parecidos cuando no se había llevado a cabo la exposición al inductor, en este caso solamente la línea *Atlcb2a-1* presentó valores más elevados que los de las otras dos (*wt* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a*).

La ausencia de un aumento de la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática en las fracciones microsomales de raíz expuestas a metoxifenoza 1:10000 (v:v) por 3 días, podría explicarse de dos formas: porque en estas condiciones la isoforma o isoformas de la enzima presente en el tejido de la raíz de la plántula no es dependiente de esfingolípidos o bien, porque esta isoforma presenta una sensibilidad sólo a grandes cambios en el contenido de éstos.

Por ello, aunque haya una disminución de esfingolípidos tras el silenciamiento inducido, a juzgar por los cambios fenotípicos detectados en presencia del inductor del silenciamiento, la actividad de la ATPasa de H^+ presente no aumentó.

Con esta línea de pensamiento, posteriormente se obtuvieron fracciones microsomales del tejido de las raíces de las plántulas con exposición al inductor a una concentración de 1:5000 (v:v) por 7 días. De manera interesante, la hidrólisis total medida en estas fracciones microsomales presentó un aumento en la actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática en la línea mutante *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza, comparándola con sus líneas y tratamientos control correspondientes; dicho aumento fue del 50% aproximadamente respecto a la línea inducida, siendo significativamente diferente a los valores obtenidos con la línea *wt* y *Atlcb2a-1* en las respectivas condiciones que se ensayaron y según el análisis de varianza realizado.

Se pudo observar también que para estas fracciones microsomales de raíz con mayor tiempo de inducción, en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida, los valores de hidrólisis total de ATP medidos fueron en general más altos respecto a los determinados en un inicio, cuando se trataba de microsomas con menor tiempo de exposición al inductor; pues con las fracciones microsomales de raíz con menor tiempo de exposición se llegaron como máximo a valores de 160 nmolPi /min/mg proteína y en las fracciones microsomales de raíz con mayor tiempo de exposición se encontraron valores alrededor de 400 nmolPi/min/mg, si bien en este último caso la desviación estándar fue más alta.

No obstante, los datos individuales obtenidos a tiempos más largos de inducción superaron los valores individuales encontrados en las primeras fracciones microsomales del tejido de la raíz con menor tiempo de inducción. Pese a que la hidrólisis total de ATP era mayor en la fracción microsomal de raíz de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida a una concentración de 1:5000 (v:v) por 7 días, la actividad sensible a vanadato determinada a partir de la hidrólisis total no presentó un aumento, pues el valor promedio de estos ensayos fue muy parecido al obtenido en la línea *wt* sin inductor y la *Atlcb2a-1* con inductor, sólo se presentó una diferencia con el valor de la misma línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* sin inductor, pues éste se encontró alrededor de la mitad de lo que se determinó para las demás líneas y tratamientos mencionados.

El aumento que se cuantificó entonces en la hidrólisis total correspondiente a las fracciones microsomales de raíz con un tiempo de exposición de 7 días a una concentración de 1:5000 (v:v) del inductor pudo deberse, no a un aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, sino probablemente, a un aumento de la actividad de otras ATPasas de H⁺ presentes en los microsomas, tales como la de mitocondria o de la del tonoplasto, así como de algunas fosfatasas.

Al analizar el porcentaje que la actividad asociada a la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática representó del total (medido en estas fracciones microsomales de raíz con mayor tiempo de exposición al inductor), se encontró que la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tanto inducida como no inducida solamente contribuía con un 15% del total de la hidrólisis mientras que las líneas *wt* sin inductor y *Atlcb2a-1* con inductor contribuían con un 45% de actividad a sus hidrólisis totales respectivas.

El hecho de que el porcentaje asociado a la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática haya decaído en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta por más tiempo al inductor en estas fracciones microsomales, podría atribuirse a una menor cantidad de proteína presente en esta fracción microsomal, pero aún así, resulta significativo que esta baja cantidad de proteína

logre mantener niveles de hidrólisis de ATP similares a la de la línea *wt* y la mutante *Atlcb2a-1*, según se observó al cuantificar su actividad sensible a vanadato.

Puede admitirse otra posibilidad, que incluye dos observaciones ya mencionadas: 1) que las fracciones microsomales derivadas de las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* fueron más pobres en rendimientos que las controles y 2) que estas fracciones presentaron una menor inhibición por vanadato. Lo anterior significa que en esa menor cantidad de membranas, la proporción de ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática es menor. Sin embargo, el hecho de que esa proporción menor de membranas con menor cantidad de enzima muestre la misma actividad que las preparaciones análogas de las líneas controles, implica que las membranas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con menor contenido de esfingolípidos tienen en realidad una mayor actividad que las controles, sólo que esta diferencia no se puede notar porque la cantidad de enzima es menor.

Se ha postulado que *in vivo*, una alta cantidad de ATPasa de H⁺ podría compensarse con una disminución en su actividad (Gévaudant y col., 2007). Bajo esta suposición, se puede postular la hipótesis de que la fracción microsomal de raíz de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, expuesta a metoxifenoza 1:5000 (v:v) por 7 días, presentó un contenido menor de proteína total (y en el caso de que la cantidad de ATPasa también estuviera disminuida) y que entonces esta disminución debería haberse compensado con un aumento en la actividad de la enzima, pero esto al parecer no sucedió, pues la actividad sensible a vanadato de la enzima debería haberse modificado con respecto a los controles; o bien, sí ocurrió un aumento en la actividad de la enzima, pero al ser tan baja la cantidad de ella, dicho aumento no sobresalió de entre los valores obtenidos de actividad sensible a vanadato con las líneas y tratamientos control usados.

Recientemente, Carmona (no publicado), determinó que los niveles de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática en preparaciones de VMP purificadas de las hojas de plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza, eran los mismos que en las preparaciones análogas de las líneas controles que también se utilizaron aquí.

Estos resultados sugieren que si bien en las plántulas de esta línea la actividad es igual a la de los controles, y muy probablemente la cantidad de enzima sea menor, la enzima existente es más activa para compensar lo anterior, aún y cuando los niveles de esfingolípidos estén disminuidos. Un experimento importante para aclarar este punto, es determinar los niveles de la ATPasa en las raíces de las plantas jóvenes de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuestas 7 días a una concentración de 1:5000 (v:v) del inductor y comparar estos niveles con los de las otras líneas y condiciones.

La disminución observada en el número de pelos radiculares en las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida 1:5000 (v:v) por 7 días o más, puede afectar la capacidad de transporte transmembranal de estas células y por tanto el crecimiento de la raíz. Se sabe que muchos genes que codifican para la síntesis de proteínas de transporte se expresan en los pelos radiculares de la raíz, y en plantas del género *Arabidopsis* se ha demostrado que éstos influyen en la absorción de nutrientes como fosfato y K^+ y por tanto son fundamentales en las vías de entrada de nutrimentos en la planta (Sondergaard y col, 2004).

Un ejemplo de ello es que en una serie de mutantes de *Arabidopsis* como la mutante *trh1-1* (bloqueada para el transportador *AtKT3/KUP4* de K^+) ha mostrado una alteración en la morfología de los pelos radiculares de la raíz; descritos como "diminutos" y la mutante *rhd6*, que está casi desprovista éstos (Sondergaard y col, 2004).

Cuando se compararon las mutantes con plantas de tipo silvestre se demostró que existía una correlación positiva entre el número de pelos radiculares y el crecimiento, con una baja cantidad de K^+ . Por ello se ha postulado que el pobre crecimiento detectado en estas líneas mutantes (*trh1-1* y *rhd6*) podría asociarse a la falta de sistemas de transporte específicos de K^+ en la periferia de la raíz (Sondergaard y col, 2004).

Además de lo anterior, las plántulas usadas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoazida por 7 días a una concentración de 1:5000 (v:v) pudieron tener afectado su crecimiento y metabolismo debido a la disminución en el tamaño de sus raíces y pelos radiculares mientras más prolongado fue el tiempo de exposición al inductor. Se sabe que el transporte de solutos en una cuesta arriba energética en las células de la raíz, es un proceso que consume energía, y los sistemas de absorción de nutrientes se energizan indirectamente al formarse un gradiente electroquímico de H^+ (Morsomme y col., 2000; Sondergaard, y col., 2004) por bombas primarias como la ATPasa de H^+ , y si este sistema de bombeo se ve afectado, la absorción de nutrimentos también, traduciéndose en un desarrollo y crecimiento deficiente de la plántula.

La acción del inductor en las fracciones microsomales de raíz con tiempos de exposición al inductor de 7 días a una concentración de 1:5000 (v:v) pudo provocar entonces una disminución en la cantidad de esfingolípidos complejos, que en el caso de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* redujo la capacidad de la célula de sintetizar nuevas membranas y de anclar correctamente a las enzimas en la superficie celular, por lo que esto también contribuiría a una menor capacidad de sintetizar raíces principales y pelos radiculares y de poder llevar a cabo un intercambio adecuado de solutos y nutrimentos, además de un buen crecimiento ya sea por división celular o elongación, a falta de material membranal disponible en la célula.

Respecto al resultado sobre la acidificación mediada por las raíces de las plántulas hecha en medio con indicador de pH (Vázquez, 2009) es necesario explorar qué otros factores puede estar causando el aumento de la capacidad de acidificación de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor comparado con sus controles, pues por los resultados obtenidos en esta tesis, al parecer la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática no contribuye de manera especial a dicha acidificación, ya que en las fracciones microsomales de raíz no hubo un aumento de la actividad de la ATPasa de H⁺ sensible a vanadato, en ninguna de las condiciones de inducción ensayadas.

En relación con lo anterior, se sabe que la secreción de carboxilatos en raíces, a menudo, pero no siempre, está acompañada por una acidificación del suelo, debido a la presencia de las bombas de protones que se localizan en la membrana plasmática. Esta acidificación y excreción de carboxilatos sucede tanto en raíces que presentan micorrizas como en las que no lo hacen (Meyer y col., 2009) por lo que no sólo la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática puede estar involucrada en la acidificación del medio, sino también otras bombas que estén presentes en la célula y que quizás contribuyan en mayor medida al proceso de descenso en el pH.

En este caso, este tipo de acarreadores también tendrían que verse afectados por los niveles de esfingolípidos endógenos, ya que la acidificación del medio fue observada en las raíces de las plántulas de la línea mutante inducible en condiciones de inducción (Vázquez, 2009).

La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de la parte aérea de las plántulas con el silenciamiento del gene *LCB2b*

Cuando las mediciones de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se hicieron en las fracciones microsomales de hojas expuestas a metoxifenzida a una concentración de 1:5000 (v:v) por 5 días, se observó que el porcentaje de inhibición asociado a la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática era de magnitud parecida en las líneas *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con o sin metoxifenzida estando cercanos a un 50%, valor semejante al obtenido en las fracciones microsomales de raíz expuestas al inductor por 3 días a una concentración de 1:10000 (v:v) y sólo la línea *wt* tanto expuesta como no expuesta al inductor arrojó valores un tanto menores, estando alrededor del 35 al 40%.

Estos datos indican que independientemente del tejido del cual procedieron las membranas microsomales y de la magnitud de la hidrólisis total de ATP, la cantidad de actividad con la que contribuye la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática al Pi liberado del ATP es la mitad del total en todas las preparaciones, lo que revela que las fracciones microsomales estaban

enriquecidas en vesículas de membrana plasmática, por lo menos en comparación con otras membranas cuyas enzimas podían hidrolizar al mismo sustrato (la ATPasa de H⁺ del tonoplasto, la mitocondrial y fosfatasas).

Con respecto a la actividad sensible a vanadato, que es la correspondiente a la de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, las fracciones microsomales de hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* (en condiciones de exposición a la metoxifenoza a una concentración 1:5000 (v:v) por un periodo de 5 días) presentaron un ligero aumento, mismo que resultó ser no significativo, pues al realizar las pruebas estadísticas descritas, los valores promedio graficados no presentaron una significancia estadística dentro de cada uno de los 2 grupos en los que se dividió la población en estudio.

Este último resultado hizo pensar en la posibilidad de que el tratamiento de inducción, si bien a nivel fenotípico tenía efectos, no era suficiente para llegar a producir una disminución de la cantidad de esfingolípidos endógenos con la magnitud suficiente para aumentar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Lo anterior llevó a proponer que con más días de exposición al inductor y una concentración igual a la usada en este ensayo, se podría observar el efecto esperado, como se ha reportado que sucede en las plantas adultas e inducidas de esta línea.

En estas condiciones, los niveles reducidos de esfingolípidos en la membrana celular, permitirían que la ATPasa de H⁺ llegara mediante un transporte específico por endosomas (Gaigg y col, 2005) a la superficie celular e interactuara con ella, modulando así la actividad de la enzima.

La actividad total medida en las fracciones microsomales de hoja de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza 1:5000 (v:v) por un periodo ahora de 7 días presentó un aumento, pasando de aproximadamente 55 nmolPi/min/mg proteína a 100 nmolPi/min/mg proteína, lo que se tradujo en un aumento de actividad de hidrólisis cercano al 45% respecto a este último valor; comparado a la de las líneas control *wt* y *Atlcb2a-1* con sus respectivos tratamientos. Lo anterior corroboraba que el pequeño aumento observado en la actividad sensible a vanadato de las fracciones microsomales de hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza 1:5000 (v:v) por un periodo de 5 días, podría magnificarse más claramente aumentando el tiempo de exposición al inductor.

En esta nueva condición (7 días con metoxifenoza 1:5000, v:v), pero ahora evaluando la actividad de hidrólisis de ATP sensible a vanadato, se pudo observar un aumento pasando de 30 nmolPi/min/mg de proteína a más de 60 nmolPi/min/mg de proteína, lo que se traduce en un aumento de actividad de hidrólisis por parte de esta última de 50%, comparada a las

actividades respectivas obtenidas para las líneas control *wt* y *Atlcb2a-1* con sus respectivos tratamientos; aumento que sólo se presentó en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor y no en las líneas *wt* y *Atlcb2a-1* sin y con metoxifenoazida respectivamente.

De esta manera se encontró el mismo fenómeno reportado en las plantas de *Arabidopsis thaliana* adultas y en la misma magnitud. Considerando que el porcentaje de actividad sensible a vanadato determinado en las fracciones microsomales de partes aéreas de plántulas de hoja expuestas a la misma condición (7 días de inducción a la concentración 1:5000,v:v) resultó muy parecido entre las líneas *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuestas o no al inductor, se puede decir que el aumento en la actividad de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta al inductor no se debió a un aumento en la cantidad de vesículas de membrana plasmática presentes en la fracción microsomal o a la cantidad de ATPasa de H⁺ en dicha preparación, y sí probablemente este aumento esté relacionado a un cambio en la actividad catalítica de la enzima de esa línea que está deficiente en esfingolípidos.

Sin embargo, es importante establecer lo anterior determinando los niveles de la enzima en esta preparación. Es significativo subrayar que tanto la actividad de hidrólisis de ATP total como la medida por su sensibilidad a vanadato resultaron ser significativamente mayores en la mutante silenciable bajo el efecto de la metoxifenoazida con respecto a las de las demás líneas y tratamientos ensayados.

Tanto las hojas como las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* con tiempos de exposición cortos y cantidades de inductor bajas pudieron haber desarrollado una reducción parcial en el nivel de esfingolípidos complejos en las células, pero según los datos obtenidos, en estas condiciones no se produjo un aumento en el valor de la hidrólisis total ni en el de la sensible a vanadato.

El hecho de que sólo a tiempos largos de exposición al inductor y usando concentraciones elevadas de éste se observara un aumento en el valor de la hidrólisis sensible a vanadato de las preparaciones microsomales de hoja de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, puede sugerir que es necesario llegar a una concentración mucho más baja de esfingolípidos, es decir, una concentración crítica, en la cual la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática e inclusive otras ATPasas (por el aumento en la hidrólisis total en fracciones microsomales de raíz y hoja a tiempos largos y concentraciones mayores de inductor), “resienta(n)” el cambio en la composición de los lípidos que la(s) rodea(n) generando el efecto de aumentar su actividad catalítica.

La actividad sensible a vanadato en microsomas de raíces de esta misma línea y tratamiento no presentó un aumento significativo en su valor respecto a sus controles, independientemente del tiempo de exposición al inductor y de su concentración, siendo tal vez, la(s) ATPasa(s) de H⁺ de membrana plasmática presente(s) en este tejido, menos sensible a los cambios lipídicos de su entorno por lo que no hubo un aumento en su actividad catalítica.

La actividad sensible a vanadato sólo se vio aumentada en las fracciones microsomales provenientes de hojas de la línea *Atlcb2b* hp/*Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza 1:5000 (v:v) por periodos largos de tiempo (7 días), por lo que cuando se alcanzaron niveles más bajos de esfingolípidos, la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática aumentó su actividad de hidrólisis, al ser sensible al cambio en la cantidad y al tipo de éstos. Se puede plantear entonces la posibilidad de que la(s) isoforma(s) de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática existente en las hojas de la planta joven y en las hojas de la planta adulta tienen la misma dependencia de esfingolípidos, por lo que muy probablemente sea(n) la(s) misma(s.).

También puede ocurrir que las isoformas de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de las hojas de las plantas jóvenes y adultas sean diferentes, pero que respondan de manera muy semejante a los cambios en la composición de esfingolípidos complejos de la bicapa lipídica en la que se encuentran.

En *Arabidopsis thaliana* se han descrito 11 genes (*AHA1-11*) que codifican para 11 isoformas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. También se ha descrito un doceavo gen con una secuencia atípica, pues carece de 100 residuos de aminoácidos de una zona conservada y el C-terminal también parece estar ausente; esta forma no puede ser un gene codificante para una ATPasa activa, pero podría ser un pseudogene o tener otra función en la célula (Palmgren, 2001). Los genes *AHA1* y *AHA2* se expresan prácticamente en todos los tejidos y órganos de la planta, sobre todo en las hojas; el gen *AHA1* se transcribe además en los brotes y el *AHA2* en los pelos radiculares de las raíces.

Los genes *AHA3*, *AHA4* y *AHA11* también muestran expresión amplia en toda la planta, pero en menor grado que los 1 y 2; el *AHA4* tiene una alta expresión en la endodermis de la raíz, y *AHA3* y *AHA11* son también de los principales genes que se transcriben en las hojas. El gen *AHA5* se expresa poco en la planta; *AHA6* y *AHA9* se expresan en las anteras, *AHA8* y *AHA7* son de expresión casi exclusiva en el polen y *AHA10* se expresa más en las silicuas. La mayor parte de los genes que se transcriben se traducen con éxito para la síntesis de la enzima. Las características anteriores sugieren que las bombas codificadas por estos genes tienen una función más especializada en cada tejido u órgano de la planta y que como consecuencia de su estructura primaria altamente conservada, poseen prácticamente la misma estructura terciaria,

pero que sin embargo, pueden presentar diferencias funcionales entre ellas (Palmgren, 1994; Gaxiola y col., 2007).

Con respecto a la posibilidad de que el aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ en la línea de bajo contenido de esfingolípidos se deba a una mayor cantidad de enzima en la membrana hay que mencionar el resultado de Carmona (no publicado) en las hojas de las plantas adultas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a*, que estableció que la cantidad de la ATPasa de H⁺ en esta línea era la misma que en todas las líneas de *Arabidopsis* y en las condiciones que se estudiaron en esta tesis. Es por ello importante corroborar que el mismo resultado se obtendría en las preparaciones correspondientes de las hojas de plántulas.

En conjunto, los resultados sugieren que el aumento encontrado en la actividad de la ATPasa de H⁺ no se debe a que la disminución de los esfingolípidos endógenos haya producido una mayor expresión de la enzima en la membrana plasmática, sino a que esta deficiencia de esfingolípidos aumentó su capacidad catalítica.

En términos de lo que estaría ocurriendo realmente en la plántula silvestre, en la que los niveles de esfingolípidos endógenos son normales (y mayores a los que se encuentran en la mutante silenciable), nuestros resultados revelaron que los esfingolípidos basales endógenos mantienen a la ATPasa en unos niveles de actividad moderados aún cuando la enzima es capaz de tener actividades de por lo menos el doble.

El aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática puede ser el reflejo de un cambio en la estructura de la enzima, inducido por la alteración en la composición de los esfingolípidos circundantes. De ser esta la explicación sobre los cambios en la actividad de la ATPasa de H⁺, es evidente que la interacción lípido-proteína resulta tener gran relevancia en el control de la actividad de la proteína. A este respecto hay que mencionar que aunque las propiedades físicas y químicas de los lípidos individuales y también de mezclas de lípidos se han estudiado ampliamente *in vitro*, y se ha descrito que pueden actuar como una especie de cofactores que facilitan el plegado o estabilizan las estructuras de las proteínas, no está claro cómo relacionar esta información con un estado *in vivo* (Fiedler y col., 2010).

Los lípidos no tienen una actividad catalítica inherente, pero estudios bioquímicos han demostrado que los lípidos pueden tener efectos secundarios en procesos de reconstitución *in vitro* sobre proteínas (Dowhan y col., 2009), con lo que los ensayos realizados en este trabajo, gracias a la disponibilidad de las mutantes, son un acercamiento a lo que podría estar pasando en el tejido vivo y en cada célula de la planta.

Respecto a la forma en la que los esfingolípidos podrían estar afectando la actividad de la enzima, se ha visto en la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*, que la correcta asociación de dicha enzima a los lípidos que forman parte de las vesículas generadas en el RE es importante para determinar la orientación superficial de la proteína y su subsecuente estabilización, lo cual es apoyado por las interacciones de los dominios extramembranales de la proteína y los grupos de cabeza de los lípidos que se encuentran circundantes a su lugar de inserción en la superficie celular (Gaigg y col., 2005; Bogdanov y col., 2009).

Esto implicaría que la correcta funcionalidad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática requiere de una alta especificidad en el tipo de lípidos circundantes, en especial de esfingolípidos y no sólo eso, sino que es posible que ciertas regiones específicas de la proteína transmembranal podrían someterse a cambios y reorganizaciones reversibles *in vivo* dictados no sólo por los lípidos, sino también por los componentes de la maquinaria de translocación, los ligandos, y sustratos, así como por otros eventos celulares, como despolarización de la membrana, afectando de esta manera a la enzima (Kasamo, 2003; Dowhan y col., 2009).

Mediante ensayos con esfingolípidos fotolábiles se han detectado claras interacciones lípido-proteína, por lo que cambiando la composición lipídica de la membrana ya sea antes o después de la inserción de la ATPasa de H^+ en ella, se puede modificar la topología de esta proteína de membrana cuya secuencia proteica está definida para un entorno de lípidos específicos (Haberkant y col., 2008; Bogdanov y col., 2009). Se ha visto también, que lípidos con carga negativa pueden actuar como cofactores, aunque no son esenciales para el montaje de los canales iónicos como el KcsA y su presencia se requiere para la conducción de iones a través del canal; algo similar podría entonces pasar con la ATPasa de H^+ de membrana plasmática, pues dado que las hélices transmembranales deben someterse a un cambio de conformación cuando el canal se abre y se cierra para dar paso al flujo de H^+ , cabría esperar que un lípido influya en la sincronización de cambios conformacionales y en las propiedades de la estructura proteica (Valiyaveetil y col., 2002).

No debe olvidarse sin embargo, que la abundancia y actividad de la ATPasa de H^+ de membrana plasmática pueden estar influenciadas también por la edad de la planta, pues se ha descrito su activación durante el envejecimiento de ésta o en respuesta a tensiones mecánicas (Portillo, 2000). Además, la enzima es modulada por hormonas como auxinas, por luz, por lisofosfatidilcolina y por toxinas como *fusicoccina*, una toxina fúngica utilizada a menudo para estabilizar el complejo ATPasa H^+ -proteína 14-3-3 en plantas y también por *siringomicina* (Portillo, 2000; Dambly y col., 2001; Bunney y col., 2002).

Se sabe también que cuando la distancia entre proteínas membranales vecinas se hace más corta por modificaciones en la bicapa lipídica en la que se encuentran, éstas pueden interactuar de manera diferente. Además, dependiendo de la forma de las proteínas, estas interacciones mediadas por la membrana pueden ser de atracción o repulsión entre ellas (Phillips y col., 2009).

Se podría sugerir entonces que cuando se obtienen los microsomas de los tejidos de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática puede quedar cerca de otra similar o de otra proteína de membrana que pueda interactuar de alguna forma con ella. Estas interacciones son potencialmente de largo alcance, sin embargo, la relevancia fisiológica de estas interacciones aún no se ha demostrado (Phillips y col., 2009).

Para el caso de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se han establecido interacciones con otras proteínas, por ejemplo, las proteínas 14-3-3 a través de motivos de fosfoserina o fosfotreonina ubicados en los últimos 52 residuos (región del C-terminal) ó con la Proton Pump Interactor 1 (PPI1), las cuales pueden regular la actividad de la enzima, siendo máxima en el caso de la PPI1 por ejemplo, cuando se encuentra a un pH de 6.4 y decreciendo a niveles dramáticos a valores de pH de 6.8 (Anzi y col., 2008). Se sabe que la PPI1 estimula la actividad de la enzima *in vitro* (Anzi y col., 2008; Visconti y col. 2008; Duby y col., 2009) y además que se localiza mayoritariamente en el retículo endoplásmico de la célula (Bonza y col., 2009).

Cuando la ATPasa se une a la proteína 14-3-3, que integra una gran familia de proteínas reguladoras (Heldt, 2005), se regulariza el transporte de iones interactuando tanto con canales de K⁺ como con la ATPasa de H⁺ misma, en este sentido, la unión de la proteína 14-3-3 a esta última puede también verse alterada por la acción de cinasas como la PKS5, que al fosforilar un residuo de serina en el dominio autoinhibitorio del C-terminal de la ATPasa de H⁺ evita que la proteína 14-3-3 la active (Fuglsang y col., 2007). No hay que descartar que el ambiente de esfingolípidos también altere la interacción de la proteína 14-3-3, la PPI1 u otros elementos regulatorios con la ATPasa de H⁺, pues las interacciones específicas de ciertos lípidos que pueden enlazarse con proteínas de la membrana, de manera similar a un cofactor, pueden conferir estabilidad estructural afectando la función de la proteína.

Estudios bioquímicos han demostrado la unión específica de lípidos a determinadas proteínas integrales de membrana (Valiyaveetil y col., 2002, Visconti, y col. 2008). Por lo anterior, la presencia de las distintas isoformas de las proteínas 14-3-3 en las fracciones microsomales obtenidas no puede pasarse por alto, y sería conveniente realizar ensayos para

determinar qué tanta hay presente, y en qué grado interactúa con la ATPasa H^+ de la membrana plasmática en las plantas con los diferentes entornos genéticos utilizados aquí.

Uno de los aspectos a los que se pueden extender estos resultados es al entendimiento de las consecuencias de la interacción esfingolípido-enzima en regiones de balsas de lípidos de la membrana plasmática. En estas regiones hay una gran abundancia de esfingolípidos y esteroides (Bhat y col., 2005; Laloi y col., 2007). La ATPasa de H^+ se ha ubicado en estas regiones, por lo que resulta muy relevante el efecto que los esfingolípidos pueden tener en su actividad. Este trabajo aporta evidencia de que la enzima puede modificar la catálisis de acuerdo a los esfingolípidos que la circunden.

En resumen, este trabajo reporta que *Arabidopsis thaliana* en su estadio de plántula presenta una actividad de ATPasa de H^+ en su membrana plasmática que es modificada por los niveles de esfingolípidos endógenos, los cuales son fundamentales para el desarrollo de la parte aérea y de la raíz (Figura 28). A su vez, esta tesis presenta resultados que sugieren que la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática regula su actividad por interacciones con los esfingolípidos de la membrana (Figura 29).

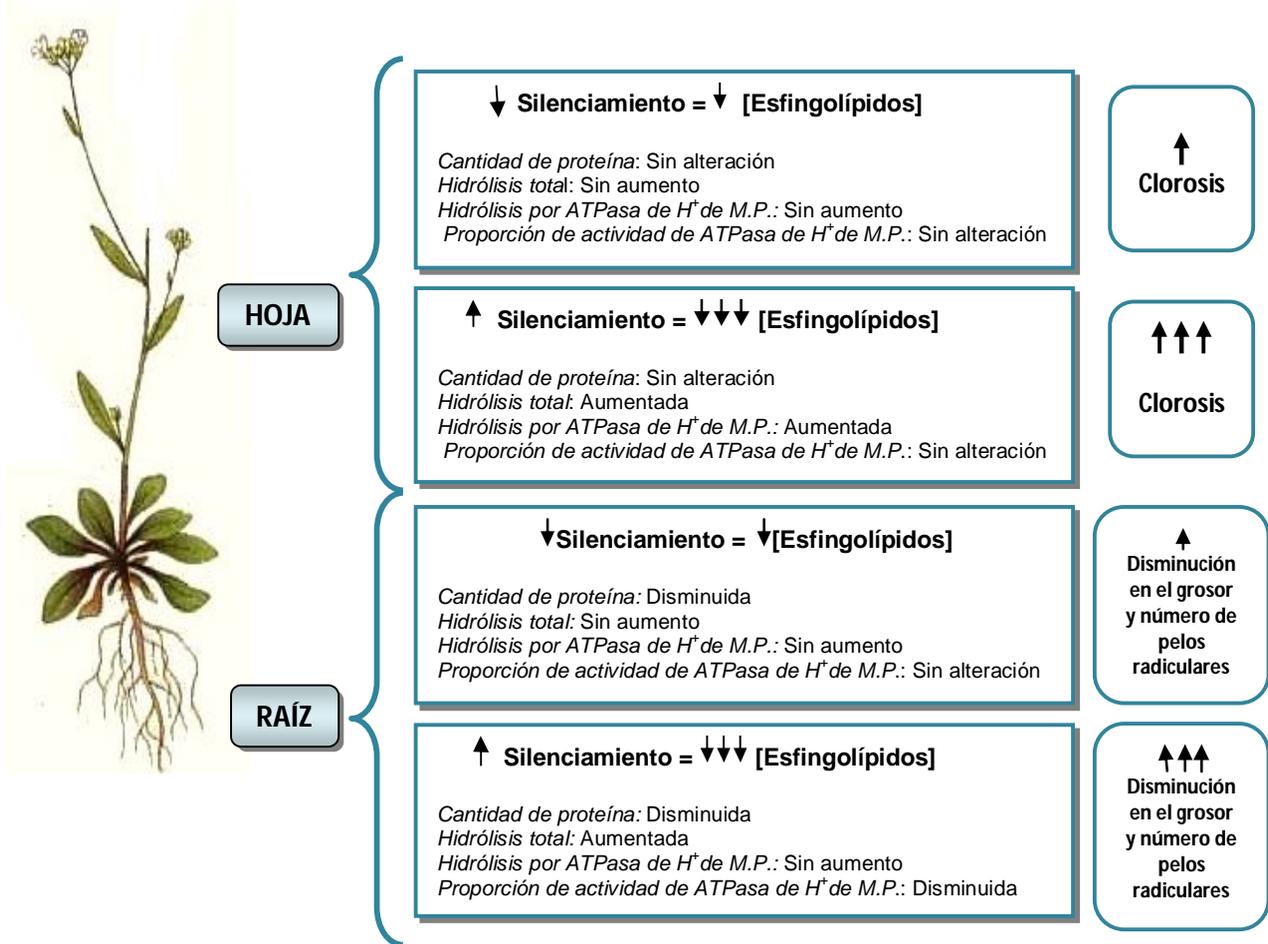


Figura 28. Comparación de los niveles de recuperación de proteína y actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática (M.P.) en los tejidos de raíz y hoja de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra un esquema a manera de resumen, de las observaciones y resultados obtenidos al trabajar con las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, tanto en el tejido de raíz como en el aéreo (hojas), considerando los grados de silenciamiento que estuvieron presentes en las diferentes condiciones experimentales que se ensayaron.

REGULACIÓN DE LA ATPasa de H⁺ POR ESFINGOLÍPIDOS

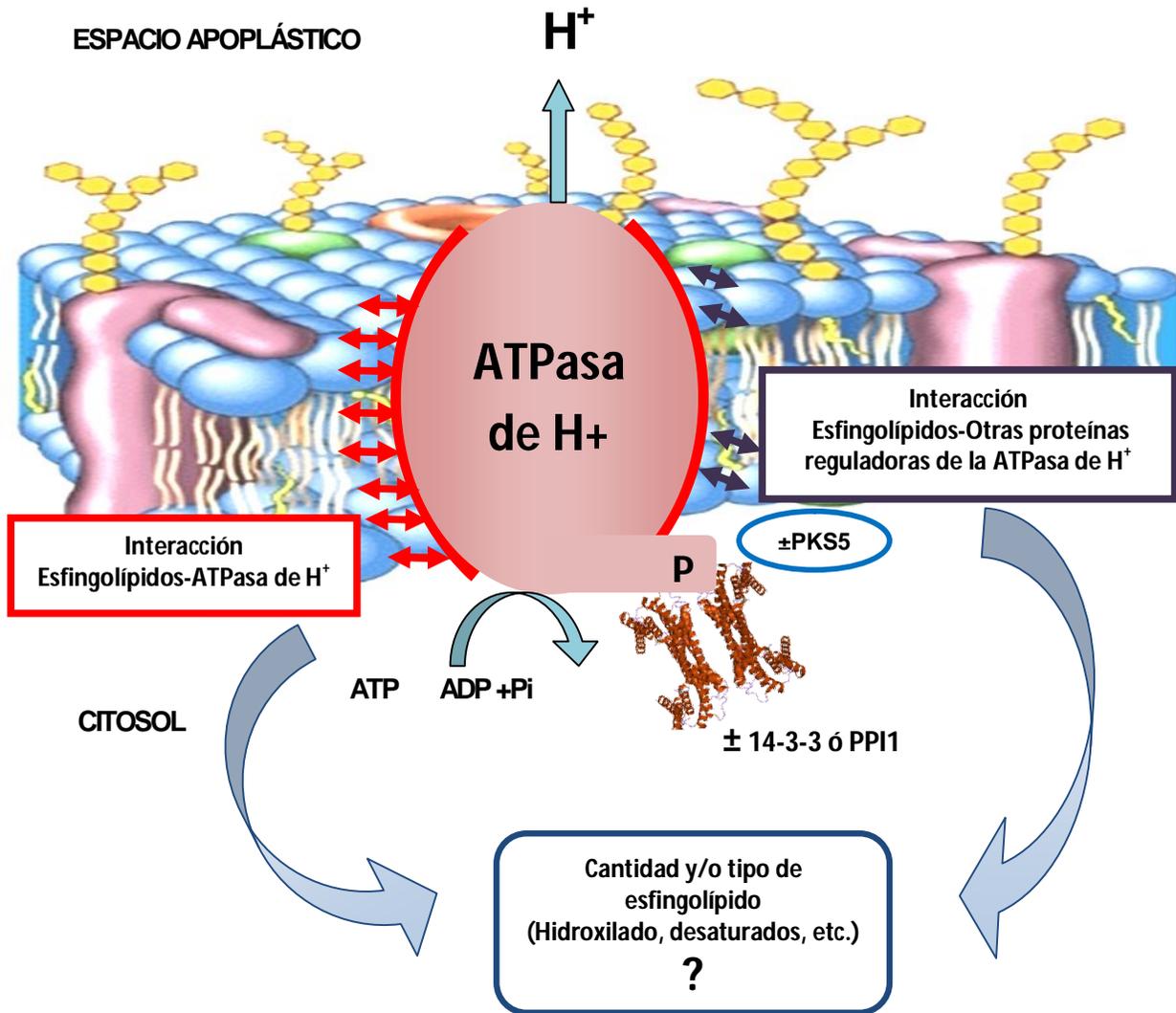


Figura 29. **Modulación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática en las fracciones microsomales obtenidas de los tejidos de raíz y hoja de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.** Se muestran los factores que pudieron afectar la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática presente en las fracciones microsomales tanto del tejido de la raíz como del tejido aéreo; entre los cuales figuran el tipo y/o cantidad de esfingolípidos en la membrana celular, así como la presencia o ausencia de enzimas reguladoras.

CONCLUSIONES PARTICULARES

- 1) El fenotipo observado en las raíces de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza 1:5000 por 7 días, en el que se refleja una reducción de grosor y número de raíces principales y una disminución de sus pelos radiculares podría alterar la absorción de nutrientes y afectar por tanto el crecimiento de la plántula.
- 2) La clorosis observada solamente en las hojas de las plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* fue una clara evidencia del proceso de silenciamiento del gen *LCB2b*. Dicha clorosis fue evidente parcialmente al estar las plántulas por 3 días expuestas a la metoxifenoza 1:10000 (v:v), y fue totalmente clara al estar expuestas al inductor (1:5000, v:v) por 7 días.
- 3) Comparada con las líneas y condiciones control, la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza presentó una disminución en los niveles de proteína total de las fracciones microsomales de raíces, independientemente del tiempo de inducción, sugiriendo que la cantidad de membranas sintetizadas es menor en las raíces de estas plántulas.
- 4) No se presentó una disminución en los niveles de proteína de las fracciones microsomales de hojas en línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza independientemente del tiempo de exposición, resultando por tanto, en niveles similares a los de las líneas y tratamientos control.
- 5) El aumento en la hidrólisis total de ATP en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza fue evidente tanto en fracciones microsomales de hoja como de raíz, pero sólo a tiempos largos de exposición y concentraciones elevadas de inductor.
- 6) El aumento en la actividad sensible a vanadato fue evidente sólo en microsomas provenientes de hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza por periodos largos de tiempo; en microsomas provenientes de raíces de esta misma línea no se apreció un aumento en la actividad sensible a vanadato en ninguno de los periodos de tiempo de exposición a metoxifenoza estudiados.
- 7) El aumento en la actividad total medida en microsomas de hojas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* expuesta a metoxifenoza por 7 días se asoció a un aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática, mientras que el aumento en la actividad total medida en microsomas de raíces de esta misma línea y tratamiento, parece deberse a la contribución de otras enzimas presentes, tales como las ATPasas de H⁺ de mitocondria o de tonoplasto, así como fosfatasa.

CONCLUSIÓN GENERAL

Tanto raíces como hojas de plántulas de la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* inducida mostraron fenotipos consistentes con niveles disminuidos de esfingolípidos respecto a las líneas controles. En estas condiciones las fracciones membranales exhibieron una mayor hidrólisis total de ATP, pero sólo en las hojas este aumento estuvo asociado al aumento en la actividad de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática.

De lo anterior se deduce por tanto, que los esfingolípidos complejos que interactúan de manera cercana con la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática modulan la actividad y funcionalidad de ésta de manera muy controlada en hojas de plantas jóvenes de *Arabidopsis thaliana*.

PERSPECTIVAS

- 1) Determinación de los niveles de esfingolípidos complejos a los 3, 5 y 7 días de iniciada la exposición a metoxifenoazida en las líneas que se utilizaron en este trabajo: *wt*, *Atlcb2a-1* y *Atlcb2b hp/Atlcb2a* tanto en microsomas como en vesículas de membrana plasmática (VMP), para comparar dichos niveles con los efectos en la actividad de la enzima en fracciones membranales con distintos grados de pureza.
- 2) Determinación de los niveles del ARNm que codifica para la síntesis de la subunidad LCB2b del heterodímero de la SPT para corroborar el avance del silenciamiento en la línea *Atlcb2b hp/Atlcb2a* en las plantas jóvenes a lo largo de las condiciones de inducción probadas.
- 3) Determinar la cantidad de ácidos orgánicos y la actividad de otras ATPasas presentes en la raíz para confirmar el hecho de que la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática no sea la principal responsable de aumentar la acidez del medio donde crece dicha raíz.
- 4) Identificar mediante ensayos con anticuerpos, las isoformas presentes en cada tipo de tejido de la plántula para establecer diferencias o similitudes con las isoformas presentes en los respectivos tejidos de plantas adultas y asignar los cambios de actividad por efecto de esfingolípidos con formas específicas de la enzima.

APÉNDICE

Resultados obtenidos de los experimentos originales y que generaron las gráficas mostradas en la sección de Resultados.

Tabla I. **Hidrólisis total de ATP de fracciones microsomales de raíces de plántulas de *A. thaliana***. Se muestran las diferentes líneas en estudio y los respectivos tratamientos para cada una. La concentración de principal de metoxifenoazida usada fue de 1:10000 (v.v) por 3 días. El ensayo de hidrólisis se llevó a cabo con 5 µg de proteína en promedio. Los valores están expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=12).

	<i>wt</i> (-)	<i>wt</i> (+)	<i>Atlcb2a-1</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	91.79	147.99	153.63	191.83	89.50	157.19
	98.97	141.96	159.88	177.89	88.50	161.19
	120.51	145.48	156.52	226.45	94.50	149.20
	82.50	146.95	153.42	210.06	81.72	181.13
	91.50	149.94	149.20	198.50	80.19	179.11
	87.50	139.99	140.05	207.55	75.62	179.62
	64.10	149.02	165.72	68.43	76.39	102.48
	90.84	156.67	156.17	57.15	75.39	85.56
	105.19	149.02	171.37	61.56	81.92	73.16
	45.77	61.14	194.84	101.07	84.04	89.72
	53.35	60.13	198.45	100.00	114.19	95.77
	61.21	64.68	192.78	91.43	91.08	151.26
	67.68	55.13	173.17	83.21		158.09
		58.15	178.81	74.64		154.94
			179.32	77.86		128.45
				148.35		133.63
				142.62		132.08
				144.19		
Promedio	81.61	116.16	168.22	131.27	86.09	136.03
DE	21.78	43.77	17.81	58.50	10.86	34.99
EE	6.04	11.70	4.60	13.79	3.13	8.49

Tabla IIa. **Determinación del porcentaje de actividad sensible a vanadato respecto a la hidrólisis total de ATP medida en fracciones microsomales de raíz expuestas 3 días al inductor.** Se muestran los porcentajes obtenidos de la hidrólisis de ATP en presencia de Na_3VO_4 , para cada línea y tratamiento, y expresados en $\text{nmolPi}/\text{min}/\text{mg}$. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=12)

	<i>wt</i> (-)	<i>wt</i> (+)	<i>Atlcb2a-1</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	48.05	59.42	38.79	20.05	51.40	57.52
	51.30	52.39	40.28	37.57	42.94	55.16
	51.49	51.47	47.59	45.65	49.21	47.88
	48.48	55.52	50.91	52.15	71.44	51.53
	54.64	56.41	60.14	47.59	50.64	60.28
	45.14	52.95	53.76	51.09	33.56	53.37
	53.29	52.04	16.00	48.00	64.47	63.13
	49.05	51.13	13.81	24.87	53.33	64.57
	69.18	53.41	30.54	26.28	71.77	73.96
	56.31	66.91	58.46	54.06	52.02	71.19
	59.68	55.43	52.46	56.79	55.45	69.85
	66.67	71.48	49.46	51.56	27.59	14.26
	73.53	67.45	47.38	63.52		28.28
		74.32	54.20	54.07		15.96
			46.61	52.29		13.71
				52.99		18.22
				46.36		20.00
				48.74		
Promedio	55.91	58.60	44.03	46.31	51.98	45.82
DE	8.88	8.00	14.06	11.70	13.37	22.15
EE	2.46	2.14	3.63	2.76	3.86	5.37

Tabla IIb. **Determinación de la actividad sensible a vanadato en fracciones microsomales de raíz expuestas 3 días al inductor.** Se muestran los valores para cada línea y tratamiento obtenidos por diferencia de los valores de hidrólisis total y los de hidrólisis del medio con Na₃VO₄ en fracciones microsomales de raíz, expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos (n=12).

	<i>wt</i> (-)	<i>wt</i> (+)	<i>Atlcb2a-1</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	44.10	87.94	59.59	38.46	46.00	90.41
	50.77	74.37	64.40	66.83	38.00	88.91
	62.05	74.87	74.49	103.37	46.50	71.43
	40.00	81.59	78.11	109.55	58.38	93.34
	50.00	84.58	89.73	94.47	40.61	107.97
	39.50	74.13	75.30	106.03	25.38	95.86
	34.16	77.55	26.52	32.84	49.25	64.70
	44.55	80.10	21.57	14.22	40.20	55.24
	72.77	79.59	52.33	16.18	58.79	54.11
	25.77	40.91	113.89	54.64	43.72	63.87
	31.84	33.33	104.10	56.79	63.32	66.89
	40.81	46.23	95.34	47.14	25.13	21.57
	49.77	37.19	82.04	52.86		44.71
		43.22	96.91	40.36		24.72
			83.58	40.71		17.61
				78.61		24.34
				66.12		26.42
				70.28		
Promedio	45.08	65.40	74.53	60.53	44.61	59.54
DE	12.51	20.06	26.28	29.11	12.05	29.45
EE	3.47	5.36	6.79	6.86	3.48	7.14

Tabla III. **Determinación de los valores de hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de plántulas de *A. thaliana*.** Se muestran las diferentes líneas en estudio y los respectivos tratamientos para cada una. La concentración de metoxifenozida usada fue de 1:5000 (v:v) por 5 días. El ensayo de hidrólisis se llevó a cabo con 5 µg de proteína en promedio. Los valores están expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=5)

	<i>wt</i> (-)	<i>wt</i> (+)	<i>Atlcb2a-1</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	64.12	54.21	56.06	55.32	55.11	45.76
	48.30	60.12	61.92	54.64	41.16	53.94
	53.53	59.30	65.88	53.73	52.72	49.63
	63.02	67.30	68.89	70.28	46.45	63.92
	67.44	71.46	75.36	55.72	43.92	62.29
		77.13	71.97	57.05	43.44	50.21
			43.80	44.25	51.37	72.66
			43.66		60.66	68.76
			52.33		58.32	63.36
Promedio	59.28	64.92	59.99	55.86	50.35	58.95
DE	8.02	8.56	11.73	7.64	6.97	9.37
EE	3.59	3.50	3.91	2.89	2.32	3.12

Tabla IVa. **Determinación del porcentaje de actividad sensible a vanadato respecto a la hidrólisis total de ATP medida en fracciones microsomales de hoja expuestas 3 días al inductor.** Se muestran los porcentajes obtenidos de la hidrólisis de ATP en presencia de Na₃VO₄, para cada línea y tratamiento, y expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=5)

	<i>wt</i> (-)	<i>wt</i> (+)	<i>Atlcb2a-1</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	43.53	18.78	24.50	35.01	44.65	54.27
	38.30	43.10	35.24	37.76	31.17	43.80
	42.80	29.89	30.90	45.81	45.03	47.76
	40.73	40.06	21.74	54.32	47.25	70.95
	35.28	33.86	29.60	38.77	28.81	48.66
		35.60	59.98	51.73	35.96	37.02
			55.91	42.79	56.59	71.19
			68.50		55.21	55.92
			57.16		65.17	59.08
Promedio	40.13	33.55	42.62	43.74	45.54	54.29
DE	3.39	8.59	17.62	7.28	12.16	11.57
EE	1.51	3.51	5.87	2.75	4.05	3.86

Tabla IVb. **Determinación de la actividad sensible a vanadato en fracciones microsomales de hoja expuestas 5 días al inductor.** Se muestran los valores para cada línea y tratamiento obtenidos por diferencia de los valores de hidrólisis total y los de hidrólisis del medio con Na_3VO_4 en fracciones microsomales de raíz, expresados en $\text{nmolPi}/\text{min}/\text{mg}$. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos (n=5)

	<i>wt (-)</i>	<i>wt (+)</i>	<i>Atlcb2a-1 (-)</i>	<i>Atlcb2a-1 (+)</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a (-)</i>	<i>Atlcb2b hp/Atlcb2a (+)</i>
	27.91	10.18	21.82	20.63	24.61	24.83
	18.50	25.91	20.36	24.62	12.83	23.63
	22.91	17.73	22.31	38.18	23.74	23.70
	25.67	26.96	14.98	19.37	21.95	45.35
	23.79	24.20	13.73	21.60	12.65	30.31
		27.46	43.17	29.51	15.62	18.58
			24.49	18.93	29.07	51.73
			29.91		33.49	38.45
			29.91		38.01	37.43
Promedio	23.76	22.07	24.52	24.69	23.55	32.67
DE	3.51	6.82	8.96	6.98	8.94	11.22
EE	1.57	2.78	2.99	2.64	2.98	3.74

Tabla V. **Hidrólisis total de ATP de fracciones microsomales de raíces de plántulas de *A. thaliana***. Se muestran las diferentes líneas en estudio y los respectivos tratamientos para cada una. La disolución de metoxifenoza para inducir fue de 1:5000 (v:v) por 7 días. El ensayo de hidrólisis se llevó a cabo con 5 µg de proteína en promedio. Los valores están expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=6).

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	183.22	156.63	279.39	328.32
	195.99	158.66	279.88	335.46
	201.63	153.86	295.31	269.43
	195.75	201.36	271.17	288.56
	197.68	209.48	255.97	773.66
	195.62	209.07	283.50	748.20
	166.12	177.90	244.78	
	158.91	184.70	245.10	
	161.05	173.43	247.10	
	139.88	121.96	241.14	
	157.45	124.70	218.71	
	159.48	136.21	180.96	
			186.95	
			191.04	
			180.65	
			167.76	
Promedio	176.06	167.33	235.59	457.27
DE	21.08	30.66	42.43	236.62
EE	6.09	8.85	10.61	96.60

Tabla VIa. **Determinación del porcentaje de actividad sensible a vanadato respecto a la hidrólisis total de ATP medida en fracciones microsomales de raíz expuestas 7 días al inductor.** Se muestran los porcentajes obtenidos de la hidrólisis de ATP en presencia de Na_3VO_4 , para cada línea y tratamiento, y expresados en $\text{nmolPi}/\text{min}/\text{mg}$. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=6)

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	46.71	26.88	6.42	21.28
	45.05	43.53	4.09	17.68
	46.46	37.10	5.91	20.41
	42.12	38.73	23.69	17.10
	45.04	37.82	18.51	16.42
	39.54	39.03	20.43	8.76
	36.62	44.16	9.59	
	37.01	41.32	9.96	
	44.60	40.69	8.60	
	45.33	43.82	11.18	
	41.15	38.59	15.26	
	42.25	47.81	26.33	
			27.37	
			17.77	
			18.50	
			16.60	
Promedio	42.66	39.96	15.01	16.94
DE	3.49	5.20	7.33	4.44
EE	1.01	1.50	1.83	1.81

Tabla VIb. **Determinación de la actividad sensible a vanadato en fracciones microsomales de raíz expuestas 7 días al inductor.** Se muestran los valores para cada línea y tratamiento obtenidos por diferencia de los valores de hidrólisis total y los de hidrólisis del medio con Na₃VO₄ en fracciones microsomales de raíz, expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos (n=6).

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	90.44	42.03	17.94	70.62
	87.22	68.07	11.44	58.69
	89.95	58.02	17.45	56.94
	82.70	80.03	64.19	47.71
	88.44	78.15	50.14	127.05
	77.64	80.66	55.34	65.53
	59.34	78.91	23.49	
	59.97	73.84	24.40	
	72.26	72.70	20.25	
	69.03	55.93	26.35	
	62.66	49.25	35.95	
	64.34	61.02	49.06	
			50.99	
			33.11	
			32.22	
			28.92	
Promedio	75.33	66.55	33.83	71.09
DE	12.20	13.07	15.64	28.51
EE	3.52	3.77	3.91	11.64

Tabla VII. **Determinación de los valores de hidrólisis total de ATP en fracciones microsomales de hojas de plántulas de *A. thaliana*.** Se muestran las diferentes líneas en estudio y los respectivos tratamientos para cada una. La concentración de metoxifenoazida usada fue de 1:5 000 (v:v) por 7 días. El ensayo de hidrólisis se llevó a cabo con 5 µg de proteína en promedio. Los valores están expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=11)

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	46.83	26.77	52.93	110.16
	46.53	26.57	53.74	117.63
	27.57	47.50	56.65	124.77
	41.45	47.77	53.50	116.07
	42.30	62.44	56.90	113.55
	59.61	57.26	56.98	117.97
	70.50	63.65	54.46	92.60
	81.69	74.25	45.97	83.34
	81.60	53.86	59.14	91.27
	50.85	54.75	66.16	90.59
	55.32	68.86	81.09	84.13
	63.06		88.62	76.85
			65.93	
			44.82	
			55.44	
			36.02	
			29.78	
			39.00	
Promedio	55.61	53.06	55.40	101.58
DE	16.50	15.40	14.40	16.64
EE	4.76	4.64	3.39	4.80

Tabla VIIIa. **Determinación del porcentaje de actividad sensible a vanadato respecto a la hidrólisis total de ATP medida en fracciones microsomales de hoja expuestas 7 días al inductor.** Se muestran los porcentajes obtenidos de la hidrólisis de ATP en presencia de Na_3VO_4 , para cada línea y tratamiento, y expresados en $\text{nmolPi}/\text{min}/\text{mg}$. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos. (n=11)

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	50.51	42.77	52.69	66.41
	46.82	43.41	40.50	59.83
	42.89	68.33	48.99	63.86
	60.56	67.73	36.24	59.017
	66.94	64.91	37.18	56.671
	50.90	49.18	17.60	56.713
	52.19	59.64	57.73	77.60
	55.94	45.25	45.31	73.42
	58.22	49.57	40.91	63.67
	57.70	50.54	26.52	68.91
	53.39	55.85	27.20	70.93
	56.84		49.73	76.49
			37.86	
			51.13	
			41.75	
			62.81	
			44.30	
			49.68	
Promedio	54.41	54.29	42.67	66.13
DE	6.41	9.58	11.34	7.40
EE	1.85	2.89	2.67	2.14

Tabla VIIIb. **Determinación de la actividad sensible a vanadato en fracciones microsomales de hoja expuestas 7 días al inductor.** Se muestran los valores para cada línea y tratamiento obtenidos por diferencia de los valores de hidrólisis total y los de hidrólisis del medio con Na₃VO₄ en fracciones microsomales de raíz, expresados en nmolPi/min/mg. Se muestra además el promedio, desviación estándar (DE) y error estándar (EE) de cada grupo de datos (n=11)

	<i>wt</i> (-)	<i>Atlcb2a-1</i> (+)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (-)	<i>Atlcb2b</i> <i>hp/Atlcb2a</i> (+)
	20.36	13.24	28.69	78.05
	18.87	13.44	22.05	70.31
	17.29	35.92	26.67	75.05
	28.94	35.60	20.22	68.38
	31.99	34.13	20.75	65.66
	24.32	31.99	9.82	65.71
	40.67	38.79	30.71	69.28
	43.59	29.43	24.10	65.54
	45.37	29.33	21.76	56.83
	32.55	29.90	20.85	57.79
	30.12	33.04	21.39	59.48
	32.06		39.10	64.14
			20.97	
			28.33	
			23.13	
			21.94	
			15.47	
			17.35	
Promedio	30.51	29.53	22.96	66.35
DE	9.33	8.53	6.34	6.46
EE	2.69	2.57	1.49	1.86

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. Third edition. Garland Publishing Inc. New York (1994) Pp 477-487, 510.
- Alexandre, H., Mathieu, B. and Charpentier, C. Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiology*, 142: 469-475 (1996).
- Anzi, C., Pelucchi, P., Vazzola, V., Murgia, I., Gomarasca, S., Piccoli, M.B. and Morandini, P. The proton pump interactor (Ppi) gene family of *Arabidopsis thaliana*: expression pattern of Ppi1 and characterisation of knockout mutants for Ppi1 and 2. *Plant Biology*, 10:237–249 (2008).
- Bhat, R.A. and Panstruga, R. Lipid rafts in plants. *Planta*, 223: 5-19 (2005).
- Blatt, M. Membrane transport in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 15: 89-95 (2004).
- Bogdanov, M., Xie, J. and Dowhan, W. Lipid-protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule. *J Biol Chem*, 284:9637-9641 (2009).
- Bonza, M.C., Fusca, T., Homann, U., Thiel, G. and De Michelis, M.I. Intracellular localisation of PPI1 (proton pump interactor, isoform 1), a regulatory protein of the plasma membrane H⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*, 11:869–877 (2009).
- Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. L. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS. American Society of Plant Physiologists. Rockville (2000) Pp 902-903.
- Bunney, T.D., van den Wijngaard, P.W.J. and de Boer, H. A. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol Biol*, 50: 1041–1051 (2002).
- Callen, J. BIOLOGÍA CELULAR DE LAS MOLÉCULAS A LOS ORGANISMOS. Primera edición. Compañía Editorial Continental. Ciudad de México (2000) Capítulos 5-6.
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C.R., Dunn, T.M. and Cahoon, E.B. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the identification and functional characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*, 18: 3576–3593 (2006).

- Chen, M., Cahoon, E.B., Saucedo-García, M., Plasencia, J. y Gavilanes-Ruíz, M. (2008) Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis, and Function. En: Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions. (H. Wada and N. Murata eds.) Advances in Photosynthesis and Respiration, Volume 30. Springer. New York. 77-116.
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C.R., Jaworski, J.G. and Cahoon, E.B. Sphingolipid Long-Chain Base Hydroxylation Is Important for Growth and Regulation of Sphingolipid Content and Composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20: 1862–1878 (2008).
- Dambly, S. and Boutry, M. The two major plant plasma membrane h1-atpases display different regulatory properties. *J Biol Chem*, 276: 7017–7022 (2001).
- De Michelis, M.I. and Spanswick, R.M. H⁺-pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiol*, 81: 542-547 (1986).
- Dietrich, C., Han, G., Chen, M., Berg, R.H., Dunn, T.M. and Cahoon, E.B. Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of *Arabidopsis* LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *Plant J*, 54: 284-298 (2008).
- Dowhan, W. and Bogdanov, M. Lipid-dependent membrane protein topogenesis. *Ann Rev Biochem*, 78: 515-540 (2009).
- Duby, G. and Boutry, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflug Arch Eur J*, 457: 645–655 (2009).
- Fiedler, S., Broecker, J. and Keller, S. Protein folding in membranes. *Cell Mol Life Sci*, 67: 1779–1798 (2010).
- Fuglsang, A. T., Guo, Y., Cuin, T.A., Qiu, Q., Song, C., Kristiansen, K.A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K.S., Palmgren, M.G. and Zhu J-K. Arabidopsis Protein Kinase PKS5 Inhibits the Plasma Membrane H1-ATPase by Preventing Interaction with 14-3-3 Protein. *Plant Cell*, 19: 1617–1634 (2007).
- Gaigg, B., Timischl, B., Corbino, L. and Schneiter, R. Synthesis of sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *J Biol Chem*, 280: 22515–22522 (2005).
- Gavilanes, M., Sánchez, S., Enríquez, M. y García, O. Aspectos moleculares y fisiológicos de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de células vegetales. *Ciencia*, 46: 251-262 (1995).

- Gaxiola, R., Palmgren, M.G. and Schumacher, K. Plant proton pumps. *FEBS Lett*, 581: 2204–2214 (2007).
- Gévaudant, F., Duby, G., von Stedingk, E., Zhao, R., Morsomme, P. and Boutry, M. Expression of a constitutively activated plasma membrane H⁺-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. *Plant Physiol*, 144: 1763–1776 (2007)
- González-Reyes, K.M., Vázquez-Vázquez, C., Enríquez-Arredondo, MC., Sánchez-Nieto, S., y Gavilanes-Ruíz, M. Caracterización de la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de plantas mutantes en la vía de síntesis de esfingolípidos. XVI Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Noviembre 8-13, Boca del Río, Veracruz, México. 2009. p 33.
- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S. and Gavilanes-Ruíz, M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem*, 200: 235-238 (1992).
- Grennan, A.K. Lipid rafts in plants. *Plant Physiol*, 143: 1083-1085 (2007).
- Haberkant, P., Schmitt, O., Contreras, F.-X., Thiele, C., Hanada, K., Sprong, H., Reinhard, C., Wieland, F.T. and Brügger, B. Protein-sphingolipid interactions within cellular membranes. *J Lipid Res*, 49: 251-262 (2008).
- Heldt, H-W. PLANT BIOCHEMISTRY. Third edition. Elsevier Academic Press. San Diego (2005) Página 287.
- Kasamo, K. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res*, 116: 517–523 (2003).
- Laloi, M., Perret, A-M., Chatre, L., Melsner, S., Cantrel, C., Vaultier, M-N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J-M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M-A. and Moreau, P. Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*, 143: 461-472 (2007).
- Larsson, C., Sommarin, M., Pical, C., Kjellbom, P. and Widell, S. Plant plasma membrane. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7 (2007).
- Luckey, M. Structural Biology with Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge University Press. New York (2008) Pp 17-23.
- Markham, J.E., Li, J., Cahoon, E.B. and Jaworski, J.G. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281: 22684–22694 (2006).

- Markham, J. and Jaworski, J.G. Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*, 21: 1304–1314 (2007).
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A.R. and Martinoia, E. Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci*, 15:40-47 (2009).
- Morsomme, P. and Boutry, M. The plant plasma membrane H⁻ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 1-16 (2000).
- O'Neill, S.D. and Spanswick, R.M. Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol*, 75: 586-591 (1984).
- Palmgren, M.G. and Christensen, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. *J Biol Chem*, 269: 3027-3033 (1994).
- Palmgren, M.G. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52: 817–845 (2001).
- Pata, M.O., Hannun, Y.A. and Ng, C. K-Y. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol*, 185: 611–630 (2010).
- Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G. and Niseen, P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 45: 1111-1112 (2007)
- Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally aplicable. *Anal Biochem*, 83:346-356 (1977).
- Phillipis, R., Ursell, T., Wiggins, P. and Sens, P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature*, 459: 379-385 (2009).
- Portillo, F. Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 1469: 31-42 (2000).
- Saucedo-García, M. (2007). Activación de MAPKs inducidas por bases de cadena larga en una especie mono y una dicotiledónea. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Sondergaard, T.E., Schulz, A. and Palmgren, M.G. Energization of transport processes in plants roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*, 136: 2475–2482 (2004).

- Vázquez-Vázquez C., Meza-Bernal, L. González-Reyes K.M., Ponce-Leyva, G., Carmona-Salazar, L., Enríquez-Arredondo MC., Dietrich C., Ming C., Cahoon, B.E. and Gavilanes-Ruíz M. H⁺-ATPase activity in plasma membrane vesicles isolated from *Arabidopsis* mutants in sphingolipid synthesis. III Pan-American Plant Membrane Biology Workshop. Puebla, México. January 13-16, 2010. p. 77.
- Valiyaveetil, F.I., Zhou, Y. and MacKinnon, R. Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K⁺ channel. *Biochemistry*, 41: 10771-10777 (2002).
- Visconti, S., Camoni, L., Marra, M. and Aducci, P. Role of the 14-3-3 C-terminal region in the interaction with the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol*, 49: 1887–1897 (2008).