



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPORTANCIA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LAS BAJAS TEMPERATURAS

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARICARMEN GUADARRAMA SOLIS

MÉXICO, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: MARINA GAVILANES RUIZ

VOCAL: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

SECRETARIO: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

1er. SUPLENTE: AURORA LARA NUÑEZ

2° SUPLENTE: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARINA GAVILANES RUIZ

SUSTENTANTE:

MARICARMEN GUADARRAMA SOLIS

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al proyecto PAPIIT IN222815, UNAM, CONACYT CB 238368 y PAIP 50009115, Facultad de Química, UNAM.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 LAS PLANTAS Y SU EXPOSICIÓN A VARIACIONES DE TEMPERATURA. VARIACIONES DIURNAS Y ESTACIONALES. EL PAPEL DE LA LATITUD GEOGRÁFICA.	1
2. OBJETIVOS GENERALES	4
3. OBJETIVOS PARTICULARES	4
4. LA MEMBRANA PLASMÁTICA	5
4.1 GENERALIDADES	5
4.1.1 <i>Función y composición de las membranas biológicas.</i>	5
4.1.2 <i>Lípidos membranales</i>	6
4.1.2.1 <i>Glicerofosfolípidos</i>	6
4.1.2.2 <i>Esteroles</i>	8
4.1.2.3 <i>Esfingolípidos</i>	8
4.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS LÍPIDOS.....	11
4.3 POLIMORFISMO LIPÍDICO	17
4.3.1 <i>Fases lipídicas</i>	17
4.3.3 <i>Mesomorfismo liotrópico y termotrópico</i>	20
5. LA PLANTA EN LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS ..	22
5.1 ESTRÉS A BAJAS TEMPERATURAS. DAÑO POR FRÍO. DAÑO POR CONGELACIÓN	22
5.1.1 <i>Daño por congelación. Formación de cristales de hielo en el espacio extracelular.</i>	23
5.2 ACLIMATACIÓN.....	24
5.2.1 <i>Mecanismos de resistencia al daño por frío</i>	25
5.2.1.1 <i>Desarrollo de estructuras resistentes a la congelación. Formación de compuestos anticongelantes</i>	25
5.2.2 <i>Genes de respuesta a frío</i>	26
5.2.2.1 <i>Estabilización membranal y remodelación</i>	27
6. LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS	29
6.1 REMODELACIÓN LIPÍDICA.....	29
6.2 CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA	32
6.3 CAMBIOS EN LA FLUIDEZ	36
6.4 LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA SEÑALIZACIÓN EN LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS.....	38
6.4.1 <i>Otros elementos señalizadores</i>	39
6.5 PAPEL DE LOS ESFINGOLÍPIDOS EN LA FLUIDEZ MEMBRANAL EN BAJAS TEMPERATURAS ...	40

6.5.1	<i>Mutantes de Arabidopsis thaliana en la SPT</i>	41
6.5.1.1	<i>Serina palmitoil-transferasa (SPT) en Arabidopsis thaliana</i>	41
6.5.1.1.1	<i>Plantas lcb2a-1</i>	42
6.5.1.1.2	<i>Plantas lcb2b hp/lcb2a</i>	43
6.5.2	<i>Mutantes en enzimas hidroxilasas</i>	44
6.5.2.1	<i>Plantas sbh1-1</i>	45
6.5.3	<i>Esfingolípidos con BCL insaturadas</i>	46
7.	CONCLUSIONES	48
	REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición lipídica de membranas en células vegetales	14
Tabla 2. Distribución de glicerolípidos en membranas de células vegetales.	16
Tabla 3. Contenido de lípidos de membrana plasmática en diferentes especies de plantas no aclimatadas.....	33
Tabla 4. Contenido de lípidos de membrana plasmática en diferentes especies de plantas aclimatadas.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperatura global promedio.	1
Figura 2. Estructura de algunos glicerofosfolípidos de importancia	7
Figura 3. Estructura de dos esfingolípidos simples y precursores de esfingolípidos complejos.	10
Figura 4. Estructura de los esfingolípidos complejos.	12
Figura 5. Relación entre la forma molecular de los lípidos y las fase lipídicas que conforman.	19
Figura 6. Reacciones de hidrólisis de las diferentes fosfolipasas y sus productos.	29
Figura 7. Modelo propuesto de percepción de temperatura y transducción de la señal durante la expresión de genes que codifican para enzimas desaturasas.	39

RESUMEN

A lo largo de este trabajo se hace una revisión de la función de la membrana plasmática, así como de la composición y la distribución de las especies lipídicas en esta estructura celular. Asimismo, y debido a que las plantas son organismos que se exponen a cambios importantes de temperatura, se analiza el impacto que tienen factores abióticos de estrés sobre la planta, particularmente el estrés por frío, que causa daño por congelación y la formación de hielo en el espacio extracelular. La supervivencia de estos organismos está determinada por su capacidad de percibir los cambios y montar una respuesta que tenga como resultado la adaptación y evitar la muerte celular; por lo tanto se estudia la respuesta adaptativa de la planta durante el proceso conocido como aclimatación, en el que ocurre la activación de diversos mecanismos de resistencia al estrés por bajas temperaturas. Ésta es metabólica y génica, ya que existe síntesis de compuestos anticongelantes, remodelación de algunas estructuras celulares y la activación de genes que codifican para enzimas involucradas en estos procesos.

Posteriormente, se analiza el impacto que tienen las bajas temperaturas en la membrana plasmática, donde ocurre remodelación lipídica a cargo de enzimas fosfolipasas y desaturasas. Asimismo, tras la exposición a frío ocurren cambios en la composición lipídica de la membrana, observándose una disminución en la cantidad de esfingolípidos y un aumento de glicerofosfolípidos. Estas modificaciones a la membrana, reflejo de la respuesta adaptativa de las plantas, impactan en la fluidez de la membrana, ya que es necesario que la planta mantenga cierta fluidez a bajas temperatura, evitando la rigidez para mantener la viabilidad de la célula. Finalmente, se propone el rol de la membrana plasmática como receptor a frío, con cambios en la fluidez como termómetro biológico y encargado de comenzar la señalización celular que dé lugar a la respuesta adaptativa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas y su exposición a variaciones de temperatura. Variaciones diurnas y estacionales. El papel de la latitud geográfica.

Alrededor del mundo existen diferentes ecosistemas y un amplio rango de climas que, junto con otros factores abióticos, limitan y regulan el crecimiento de las plantas. Éstas, al ser inmóviles, ven determinada su supervivencia por su capacidad de respuesta y adaptación al medio ambiente. Uno de los factores ambientales de mayor importancia es la temperatura, determinada en gran medida por la ubicación geográfica en la que se desarrollan las especies vegetales. Este factor abiótico varía en función de la distancia al Ecuador; a medida que aumenta la latitud y, por lo tanto la distancia hacia este paralelo es mayor, la temperatura disminuye. Así, las plantas que se ubican en latitudes cercanas a los 90°N y 90°S , se enfrentan a temperaturas gélidas, mientras que aquellas plantas en latitudes más cercanas a los 0° , viven en un clima predominantemente cálido (**Fig. 1**).

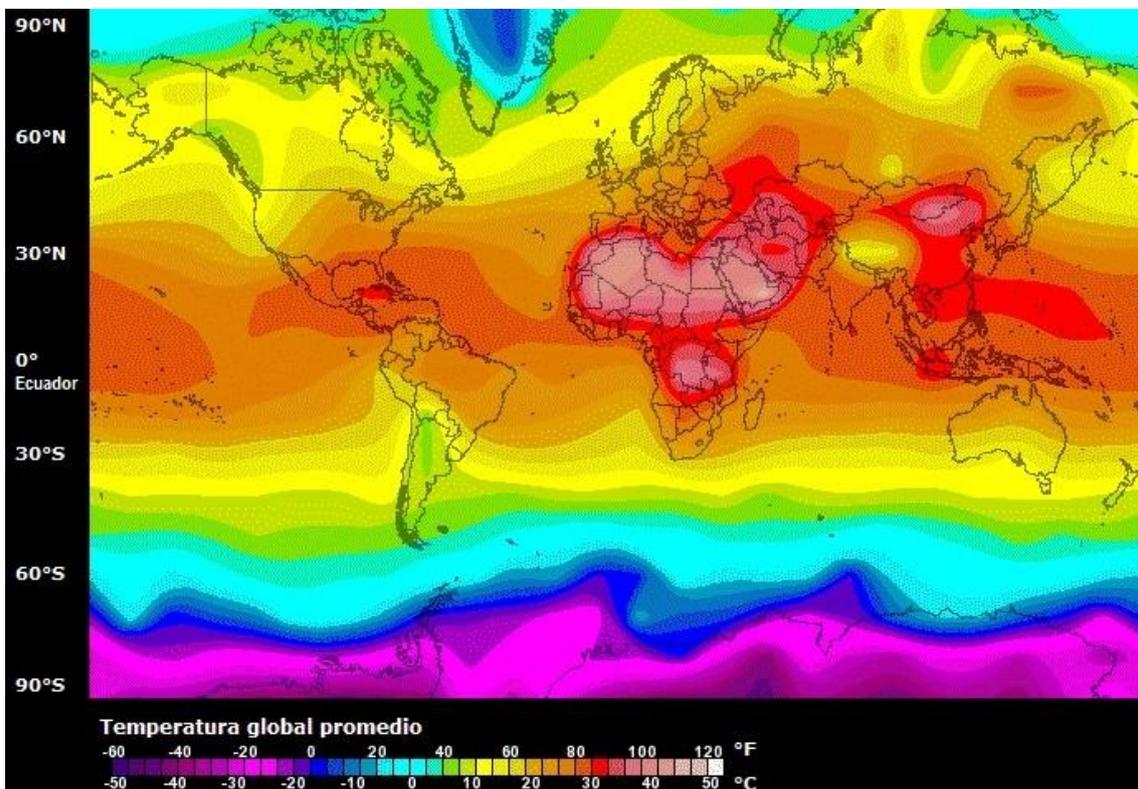


FIGURA 1. TEMPERATURA GLOBAL PROMEDIO. LA TEMPERATURA DISMINUYE GRADUALMENTE CONFORME SE INCREMENTA LA DISTANCIA HACIA EL ECUADOR (US Department of Commerce, NOAA 2016).

Es así como la latitud geográfica determina la temperatura predominante en una región. Como se observa en la **Figura 1**, la temperatura promedio de regiones cercanas al Ecuador, es decir, regiones que se encuentran entre los 30°N y 30°S, ronda los 20°C y alcanza los 30°C. Las plantas que se encuentran en estas latitudes se enfrentan a climas tropicales o semitropicales. La temperatura promedio disminuye gradualmente, pues en regiones que se ubican entre los 30° y los 60° N y S, respectivamente, puede alcanzar valores entre 0°C y 10°C. En latitudes mayores, la temperatura promedio se encuentra por debajo de los 0°C, siendo temperaturas congelantes la mayor parte del año (Key et al., 1997).

Sin embargo, las plantas se exponen no únicamente a diferentes temperaturas en función de la latitud y de las estaciones del año, sino que también se someten a variaciones diurnas, pues durante las horas de luz solar la temperatura se incrementa y disminuye a lo largo de la noche. Tanto las variaciones diurnas como estacionales pueden alcanzar diferencias de grados centígrados de una o más órdenes de magnitud (Ruelland et al., 2002). Estas fluctuaciones diarias pueden tener altas y bajas que se comportan de manera errática, por lo que resultan muy importantes los mecanismos que las plantas despliegan para contender con estas variaciones de temperatura ante su nula capacidad de migración.

Las bajas temperaturas son un factor limitante para el crecimiento de algunas plantas, aunque el frío es subjetivo para cada especie. Las plantas tropicales sufren daños por frío cuando la temperatura desciende por debajo de los 12.5°C; sin embargo, plantas de climas polares tienen respuestas de shock por calor si la temperatura es mayor a 5°C. Esta heterogeneidad en la respuesta a la temperatura es una respuesta evolutiva de las plantas, dada principalmente por su ubicación geográfica y a su incapacidad de migrar. Las plantas deben ser

capaces de percibir los cambios de temperatura, responder a éstos y adaptar sus mecanismos al régimen de temperatura más común. Estas respuestas involucran adaptaciones a nivel molecular, celular, bioquímico y fisiológico (Sanghera et al., 2011; Fleury y Walker, 2014).

Además de conocer la biología de estas respuestas por su valor intrínseco, es necesario estudiar la tolerancia al frío y la resistencia a la congelación para buscar aplicaciones potenciales que beneficien los cultivos en el área de la agricultura y los de cualquier especie en su propio ecosistema (Sanghera et al., 2011).

2. OBJETIVOS GENERALES

- Obtener información acerca del efecto del estrés por frío en las plantas, particularmente en la membrana plasmática.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir la respuesta adaptativa de las plantas tras la exposición a bajas temperaturas que se encuentra reportada en la bibliografía.
- Describir los cambios membranales que ocurren en la membrana plasmática en condiciones de frío.
- Establecer el papel de los esfingolípidos en la membrana plasmática de las plantas en bajas temperaturas.

4. LA MEMBRANA PLASMÁTICA

4.1 Generalidades

4.1.1 Función y composición de las membranas biológicas.

Las membranas biológicas son esenciales en la compartimentalización celular, sin embargo su función no se limita únicamente a esto. La membrana es una estructura dinámica que, gracias a su permeabilidad selectiva, mantiene los gradientes de concentración y carga eléctrica necesarios para el metabolismo celular, utilizando medios de transporte transmembranal específicos. Además de la regulación del transporte de solutos, las membranas biológicas son encargadas de la comunicación intercelular, la transducción de señales, el reconocimiento celular y la antigenicidad, así como de generar ATP (Stillwell, 2013; Luckey, 2014).

Las membranas biológicas se conforman principalmente por lípidos, aunque también contienen con proteínas y carbohidratos. Los componentes lipídicos de la membrana, glicerofosfolípidos, esfingolípidos y esteroides, le otorgan a ésta la conformación de bicapa gracias a su carácter anfipático. Los grupos polares se exponen hacia el medio acuoso, mientras que las cadenas acílicas forman un dominio no polar en la parte interna de la bicapa (Luckey, 2014).

Por otro lado, los componentes proteicos se clasifican en integrales y periféricos. Las proteínas integrales pueden ser transmembranales o ancladas a lípidos. Las primeras se refieren a aquellas que atraviesan la bicapa, con partes de su estructura expuestas a ambos lados de la membrana. Aquellas proteínas ancladas a lípidos, también conocidas como lipoproteínas, se encuentran unidas de manera covalente a un lípido insertado en una de las monocapas de la membrana (Stillwell, 2013; Luckey, 2014).

Las proteínas periféricas, por otro lado, se encuentran asociadas a la superficie membranal, ya sea gracias a la interacción con la parte expuesta de proteínas integrales o con la cabeza polar de los lípidos que conforman la bicapa (Stillwell, 2013; Luckey, 2014).

4.1.2 Lípidos membranales

4.1.2.1 Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos pertenecen al grupo de los glicerolípidos y son los lípidos membranales más abundantes, con una cabeza polar y dos cadenas acílicas apolares. Se componen de una molécula de glicerol, un grupo fosfato, un par de moléculas de ácidos grasos y otro sustituyente variable que esterifica al grupo fosfato (Hauser y Poupart, 2004; Stillwell, 2013).

El glicerofosfolípido más sencillo es el ácido fosfatídico y es precursor de glicerofosfolípidos más complejos. Algunos de éstos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol (**Fig. 2**) (Hauser y Poupart, 2004; Luckey, 2014). En estos lípidos anfipáticos, la región no polar la constituyen las cadenas de ácidos grasos, de diferentes longitudes y diferentes grados de saturación, que se encuentran unidos al esqueleto de glicerol y la región polar se forma por el grupo fosfato esterificado (van Meer et al., 2008).

Algunos de los glicerofosfolípidos estructurales de mayor relevancia incluyen la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). Los involucrados en la señalización, por otro lado, incluyen el ácido fosfatídico (PA), diacilglicerol pirofosfato (DGPP), ácido lisofosfatídico (LPA), fosfatidilinositol monofosfato (PIP) y fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) (Furt et al., 2010).

En *Arabidopsis thaliana*, el porcentaje de glicerofosfolípidos en la membrana plasmática es el 46.8 % de los lípidos totales (Uemura et al., 1995; Furt et al., 2010).

Existen otros lípidos con esqueleto de glicerol pero con sustituyentes glicosilados unidos mediante un enlace glucosídico al C3 del 1,2-diacilglicerol, a diferencia del enlace fosfodiéster en los glicerofosfolípidos. A estos lípidos se les conoce como gliceroglicolípidos (Zeiger, 2006). En las plantas, los gliceroglicolípidos más comunes son monogalactosil y digalactosil diacilgliceroles (MGDG y DGDG), particularmente en las membranas de los cloroplastos (Voet y Voet, 2006).

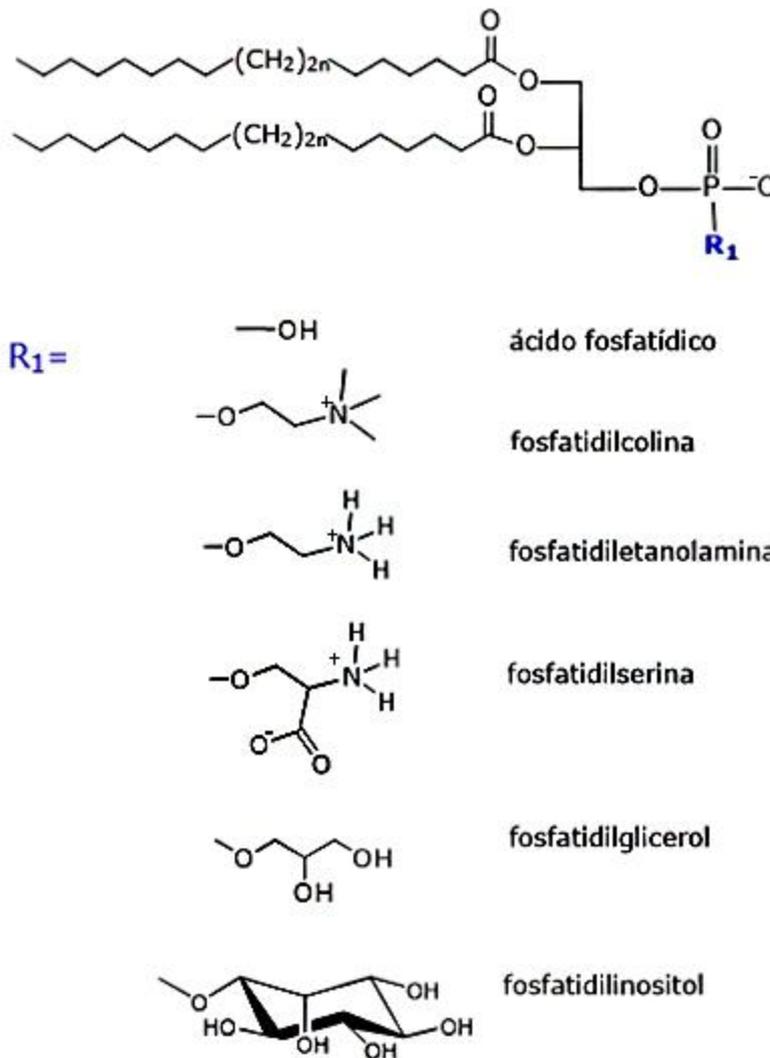


FIGURA 2. ESTRUCTURA DE ALGUNOS GLICEROFOSFOLÍPIDOS DE IMPORTANCIA. FIGURA CREADA CON EL PROGRAMA ACD/LABS® ACD/CHEMSKETCH.

4.1.2.2 Esteroles

Los esteroides son compuestos cíclicos derivados del isopreno; se encuentran dispuestos en tres anillos hexagonales, un anillo pentagonal y un grupo hidroxilo en el carbono 3 que conforma la parte polar en la molécula. El colesterol es el esteroide más abundante en las membranas animales; mientras que en las células vegetales, los esteroides **más abundantes son el β -sitosterol y el estigmasterol**. A estas moléculas se les conoce como fitosteroides y usualmente tienen cadenas laterales alifáticas en C17. En estas cadenas hidrocarbonadas, se pueden encontrar ramificaciones adicionales en C24 o dobles ligaduras en C22 (Hauser y Poupart, 2004; Gül y Amar, 2006).

La variedad en los fitosteroides se debe al número de átomos de carbono en las cadenas laterales unidas a C17 y al número y posición de las insaturaciones en la parte cíclica de la molécula. Los fitosteroides libres, es decir, que mantienen el grupo hidroxilo intacto, son el producto mayoritario en la síntesis de fitosteroides y constituyen del 70 al 90 % de los esteroides de la membrana plasmática vegetal (Gül y Amar, 2006).

En *Arabidopsis thaliana*, el porcentaje de esteroides es de 46 % de los lípidos totales de la membrana plasmática. De éstos, la mayor parte la constituyen los fitosteroides libres, siendo el 37.7 % de los esteroides, seguidos de esteril glucósidos (4.9 %) y esteril glucósidos acilados (3.4 %) (Uemura et al., 1995; Furt et al., 2010).

4.1.2.3 Esfingolípidos

A diferencia de los glicerofosfolípidos que tienen un esqueleto de glicerol, los esfingolípidos utilizan un amino alcohol de cadena larga como base estructural y de síntesis. El amino alcohol, también llamado

base de cadena larga (BCL), es una cadena compuesta por 18 átomos de carbono, hidroxilaciones en C1 y C3 y un grupo amino en C2. La esfingosina (**Fig. 3A**) es una de las BCL más abundantes en las plantas, y de ella se derivan otras bases esfingoideas gracias a insaturaciones o hidroxilaciones.

Los tres primeros carbonos de la cadena de la esfingosina son estructuralmente análogos al glicerol de los glicerofosfolípidos. Ambos tipos de lípidos tienen una cabeza polar y dos colas hidrofóbicas. Sin embargo, en el caso de los esfingolípidos, únicamente una de las colas hidrofóbicas corresponde a un ácido graso. La otra cadena hidrofóbica forma parte de la BCL esfingosina. El ácido graso se encuentra unido mediante un enlace amida, formando la ceramida (**Fig. 3B**) (Stillwell, 2013). La ceramida es el esfingolípidos más sencillo y es precursor de otros esfingolípidos más complejos, ya sea con modificaciones en la longitud de las cadenas, metilaciones, hidroxilaciones o cambios en el grado de saturación tanto de la BCL, como del ácido graso. Esto brinda gran diversidad estructural a los esfingolípidos (Pata et al., 2010; Mouritsen y Bagatolli, 2015).

En las plantas, cerca del 90 % de los esfingolípidos se encuentran como esfingolípidos complejos; es decir, con diferentes grupos polares unidos al hidroxilo del C1 (Markham et al., 2013). Algunos de éstos grupos polares pueden ser mono- o pluri-hexosas, formando glicosilceramidas, o grupos inositol fosfato, que dan origen a inositol fosforilceramidas (IPC). Éstas a su vez pueden estar poliglicosiladas, formando glicosil inositol fosforilceramidas (GIPCs) (**Fig. 4**) (Hauser y Poupart, 2004; Pata et al., 2010; Stillwell, 2013; Luckey, 2014; Mouritsen y Bagatolli, 2015).

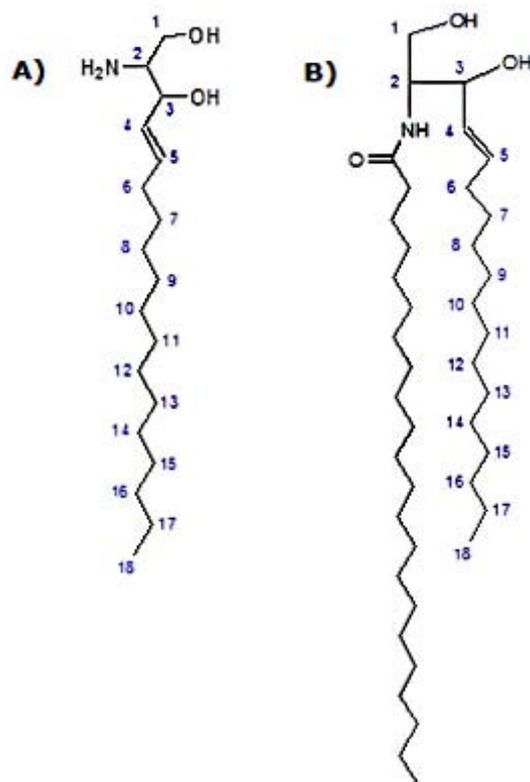


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE DOS ESFINGOLÍPIDOS SIMPLES Y PRECURSORES DE ESFINGOLÍPIDOS COMPLEJOS. **A)** ESFINGOSINA, BCL DE 18 ÁTOMOS DE CARBONO. **B)** CERAMIDA, FORMADA POR LA UNIÓN DE ESFINGOSINA Y UN ÁCIDO GRASO. FIGURA CREADA CON EL PROGRAMA ACD/LABS® ACD/CHEMSKETCH.

En la célula vegetal no se encuentran presentes las esfingomielinas, típicas de células animales (**Fig. 4A**) y que son esfingolípidos complejos con cabezas polares de compuestos fosforilados, como la fosfocolina o fosfoetanolamina (Buré et al., 2014). En cambio, en plantas abundan las glicosilinositilfosfoceramidas (GIPCs) en *Arabidopsis thaliana* éstas componen cerca del 60 % de los esfingolípidos, mientras que las glicosilceramidas, principalmente las glucosilceramidas, constituyen aproximadamente el 30 % y las ceramidas el 2 % de los esfingolípidos membranales (Furt et al., 2010; Markham et al., 2013). La estructura base de las GIPCs es una ceramida unida por un enlace fosfodiéster a una unidad de inositol-ácido glucurónico. A esta estructura base se le pueden unir diferentes sacáridos (**Fig. 4D**). Se ha determinado que en plantas, la cabeza polar de las GIPCs generalmente es del tipo Hex(R1)-HexA-inositol-1-fosforilceramida, en donde el

sustituyente R1 puede ser un grupo hidroxilo, una amina o una *N*-acetilamina, los azúcares involucrados son hexosas y los ácidos urónicos también son derivados de hexosas (Cacas et al., 2013; Buré et al., 2014). Este tipo de GIPC corresponde a la serie A; existen siete series de GIPC que se encuentran unidas desde uno (serie 0) hasta siete (serie F) sacáridos.

Se ha determinado que las bases de cadena larga de las GIPCs suelen ser especies tri-hidroxiladas, y los ácidos grasos consisten de cadenas de ácidos grasos muy largas (VLCFA), de hasta 26 átomos de carbono, hidroxilados en la posición C2 (Cacas et al., 2013).

La gran variedad de esfingolípidos debida tanto a las diferentes variaciones de BCL, como de ácidos grasos y de cabezas polares, permite que existan al menos 500 diferentes especies de esfingolípidos en las células de las plantas; en *Arabidopsis thaliana* se han reportado al menos 168 esfingolípidos diferentes (Pata et al., 2010).

4.2 Distribución de los lípidos

La distribución lipídica en la membrana es asimétrica, es decir, que a pesar de que las membranas biológicas tienen esencialmente los mismos componentes lipídicos, el contenido y distribución de éstos varía en cada una de las dos monocapas. La cantidad de glicerofosfolípidos, esteroides libres y conjugados y esfingolípidos cambia entre la monocapa citosólica y la monocapa exoplásmica, en una proporción molar de 65:35, 30:70 y 30:70, respectivamente (Furt et al., 2010).

Sin embargo, no únicamente influye la cara de la membrana, sino que la distribución lipídica varía en función de los organelos celulares. Las funciones membranales están influenciadas por el tipo de lípidos presentes y sus respectivas propiedades biofísicas y son, por lo tanto,

controladas por la célula mediante una regulación en la síntesis, transporte y degradación de los lípidos (van Meer et al., 2008).

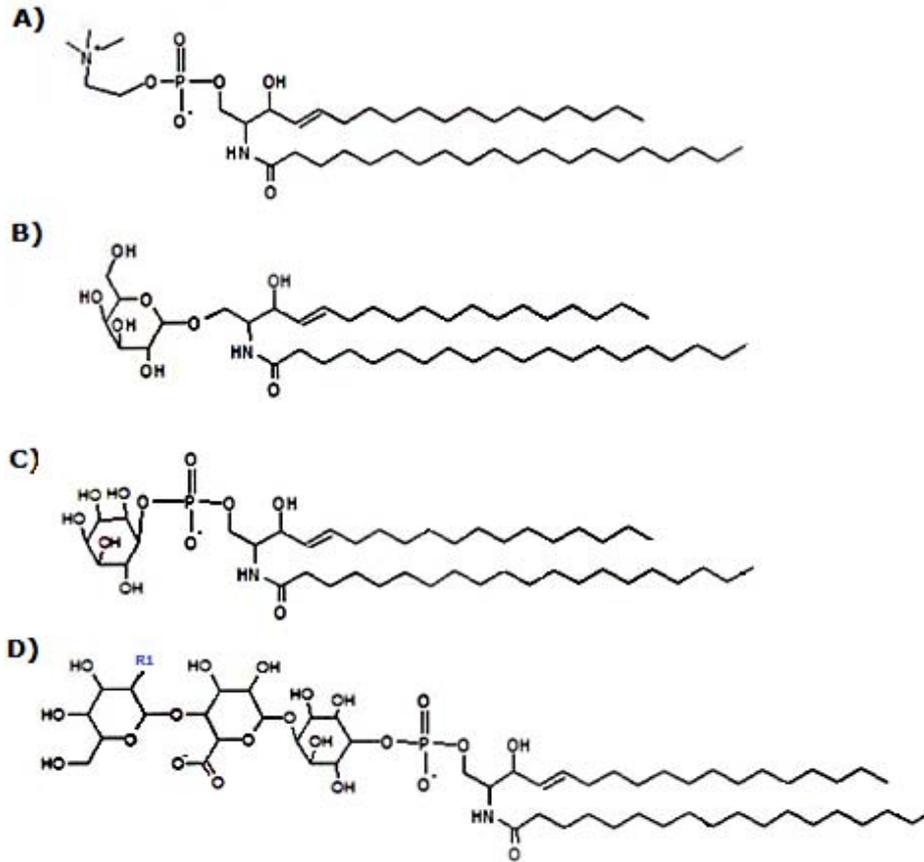


FIGURA 4. ESTRUCTURA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS COMPLEJOS: **A)** ESFINGOMIELINA DE CÉLULAS ANIMALES **B)** GLUCOSILCERAMIDA **C)** INOSITOL FOSFORILCERAMIDA (IPC) **D)** GLICOSIL INOSITOL FOSFOCERAMIDA (GIPC) DEL TIPO Glc(R1)-GlcA-IPC DONDE R1 PUEDE SER UN GRUPO HIDROXILO, UNA AMINA O UNA *N*-ACETILAMINA; GLC: GLUCOSA, GLCA: ÁCIDO GLUCURÓNICO. FIGURA CREADA CON EL PROGRAMA ACD/LABS® ACD/CHEMSKETCH.

En la **Tabla 1** se puede observar la composición lipídica de membranas vegetales de diversos tejidos. Se observa que los glicerolípidos son los constituyentes principales de las membranas biológicas; esto se debe a la función estructural que juegan estos lípidos, contribuyendo a la formación de fases lamelares de la membrana. Los ácidos grasos libres usualmente se encuentran en bajas proporciones en las membranas biológicas, sin embargo, se observa que la membrana del glioxisoma tiene una mayor proporción de éstos.

Asimismo, existe una proporción elevada de esteroides libres en la membrana plasmática, así como en el tonoplasto. En estas mismas estructuras, existe también una cantidad importante de esteril glicósidos, esteril glicósidos acilados y glicoesfingolípidos en comparación con otras membranas de organelos. A pesar de que la membrana plasmática y el tonoplasto tienen composiciones lipídicas similares, los glicoesfingolípidos y esteroides libres se encuentran en mayor proporción en la membrana plasmática que en el tonoplasto (**Tabla 1**) (Cassagne, 1998). Los esfingolípidos son particularmente abundantes en la membrana plasmática y en el tonoplasto y contribuyen en la formación de balsas lipídicas y en propiedades membranales de adaptación a congelación y sequía, además de ser partícipes en procesos de muerte celular programada (Chen et al., 2012).

TABLA 1. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE MEMBRANAS EN CÉLULAS VEGETALES

Membrana	Glicerolípidos	Esteroles libres	Esteril glicósidos (esteril glicósidos acilados)	Esteroles totales / Glicerolípidos totales	Glicoesfingolípidos	Ácidos grasos libres	Lípido/Proteína (w/w)
Envoltura plastidial	>80	1.2		<0.02			
OM							
IM							3.0
Tilacoide	>90	0.08		<0.001			0.8
Retículo endoplásmico	>80	3-14	0.1 (1.1)	0.03-0.02		<2	0.4
Membrana plasmática	30-80	2-50	2-16 (1-32)	0.2-1.5	6-30	2-5	1.5
Tonoplasto	40-60	5-20	2-12 (7-11)	0.5-0.6	12-17	0-5	0.85
Glioxisoma/peroxisoma	25-50					30-40	2.3
Membrana mitocondrial	>80	12.1	0.8 (1.6)	0.15			
OM							0.8
IM							0.39

IM: membrana interna OM: membrana externa. Cantidades expresadas en % mol de lípidos totales (Cassagne 1998)

Los glicerolípidos son los lípidos mayoritarios en las membranas biológicas; sin embargo, los diferentes tipos de glicerolípidos también varían en función del organelo celular. Las especies monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y digalactosil diacilglicerol (DGDG), así como los sulfolípidos se asocian con membranas plastidiales, de acuerdo con la **Tabla 2**. Asimismo, el difosfatidilglicerol (DPG) es específico de las membranas internas mitocondriales y, en baja proporción, del retículo endoplásmico. La fosfatidilcolina está ausente en la membrana del tilacoide y en la membrana plastidial interna, mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina también están ausentes en la membrana plastidial externa. El fosfatidilinositol se encuentra en altas proporciones en el tonoplasto (Cassagne, 1998).

La distribución lipídica también se afecta por la formación de microdominios de membrana, también conocidos como rafts o balsas lipídicas, formada por la asociación entre esfingolípidos y esteroides. Esto implica que existe una distribución lipídica desigual a lo largo de las membranas y que es dependiente de la cantidad de esfingolípidos y esteroides presentes (Minami et al., 2009).

La caracterización bioquímica de las balsas lipídicas se basa principalmente en ser resistentes a detergentes no iónicos, por lo que acuñan el término membranas resistentes a detergentes (DRMs) o membranas insolubles en detergentes (DIMs) (Furt et al., 2010).

Se observa, por lo tanto, que la distribución lipídica es variable dentro de las células vegetales. Sin embargo, el contenido de lípidos varía no únicamente en función de los organelos celulares, sino también en función de las especies de plantas, lo que está relacionado con la capacidad de aclimatación y las condiciones de crecimiento en los diferentes climas (Ver sección 6.2).

TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE GLICEROLÍPIDOS EN MEMBRANAS DE CÉLULAS VEGETALES

Membrana	PA	PC	PE	PG	PI	PS	DPG	MGDG	DGDG	SL
Envoltura plastidial										
OM	--	32	0	10.0	5	0	0	17	29	6
IM	--	0	0	9.0	1	0	0	55	30	5
Tilacoide	--	0	0	7.0	1	0	0	57	27	7
Retículo endoplásmico	0.6	49.6	27.3	6.5	6.8	3.2	1.4	0.9	3.7	--
Membrana plasmática	5-20	25-45	30-40	2-6	2-8	3-12	0	0-1	0-2	--
Tonoplasto	1.7	37.6	37.8	3.3	12.8	3.4	--	0.8	2.6	--
Glioxisoma /peroxisoma	--	57.7	20.8	11.2	10.2	--	--	--	--	--
Membrana mitocondrial										
OM	--	59.8	25.2	3.4	11.6	--	--	--	--	--
IM	--	42.1	38.2	1.9	5.0	--	12.8	--	--	--

IM: membrana interna OM: membrana externa. Cantidades expresadas en % mol de glicerolípidos totales (Cassagne 1998)

DGDG: digalactosil diacilglicerol

DPG: difosfatidilglicerol

MGDG: monogalactosil diacilglicerol

SL: sulfolípidos

4.3 Polimorfismo lipídico

El polimorfismo lipídico es una propiedad que exhiben los lípidos anfipáticos que les permite adoptar diferentes formas de agregación que generan fases específicas en un medio acuoso. Esta capacidad resulta importante en procesos como la formación de vesículas en la división celular, en la fusión de membranas, en el movimiento de macromoléculas a través de la membrana y en la estabilización de complejos proteicos de membrana, entre otros (Torrecillas Sánchez, 2003).

El polimorfismo se basa en la capacidad de los lípidos de asociarse formando arreglos estructurales muy diversos, siempre dependiendo de su estructura y configuración química, de su concentración, de la temperatura y de la cantidad de agua en el medio (**Fig. 5**). Los esfingolípidos, particularmente las GIPC, y los lisofosfolípidos adoptan una forma de cono invertido, debido al gran tamaño de la cabeza polar con respecto a las cadenas no polares (**Fig. 5A**). Los lípidos con una cabeza polar de diámetro similar a las colas hidrofóbicas, como los glicerofosfolípidos PC, PG, PI y los glicolípidos como DGDG, tienen una forma cilíndrica (**Fig. 5B**). Aquellos lípidos con cabezas polares pequeñas, como PE, PS, PA y MGDG tienen una forma de cono (**Fig. 5C**). (Sprong et al., 2001; Torrecillas Sánchez, 2003; Jouhet, 2013).

4.3.1 Fases lipídicas

Las fases se pueden nombrar de acuerdo al tipo de organización que presentan e incluyen las formas lamelares o de bicapa (L), hexagonales (H) y cúbicas (Q). La organización de las fases hexagonales puede ser del tipo I (H_I) o del tipo II (H_{II}). La primera, la fase H_I , se refiere a la formación de los túbulos micelares con las cabezas polares en el exterior, mientras que la fase H_{II} forma túbulos invertidos, con las ca-

denas hidrofóbicas hacia afuera del túbulo y las cabezas polares hacia el centro, formando un canal acuoso (Jouhet, 2013).

Los lípidos con forma geométrica de cono invertido favorecen la formación de fases H_I (**Fig. 5A**), mientras que los de forma cilíndrica conducen a la formación de bicapas (**Fig. 5B**) y la forma cónica induce la fase H_{II} o la fase cúbica (**Fig. 5C**) (Gómez Fernández, 1996; Jouhet, 2013). El aumento en el número de carbonos en las cadenas de ácidos grasos y en el número de insaturaciones favorece la formación de la fase H_{II} (Jouhet, 2013). La formación de estas fases es un evento interbicapa, es decir, que ocurre entre dos bicapas; al formarse la fase H_{II} , en regiones donde la membrana plasmática se encuentra muy cercana a otra endomembrana, existe una pérdida de respuesta osmótica (LOR). Entre estas endomembranas, la de la envoltura del cloroplasto es la que forma fases H_{II} con la membrana plasmática con mayor frecuencia, dando origen a un daño con pérdida de respuesta osmótica asociada a la fase H_{II} , o LOR- H_{II} (Uemura y Steponkus 1999).

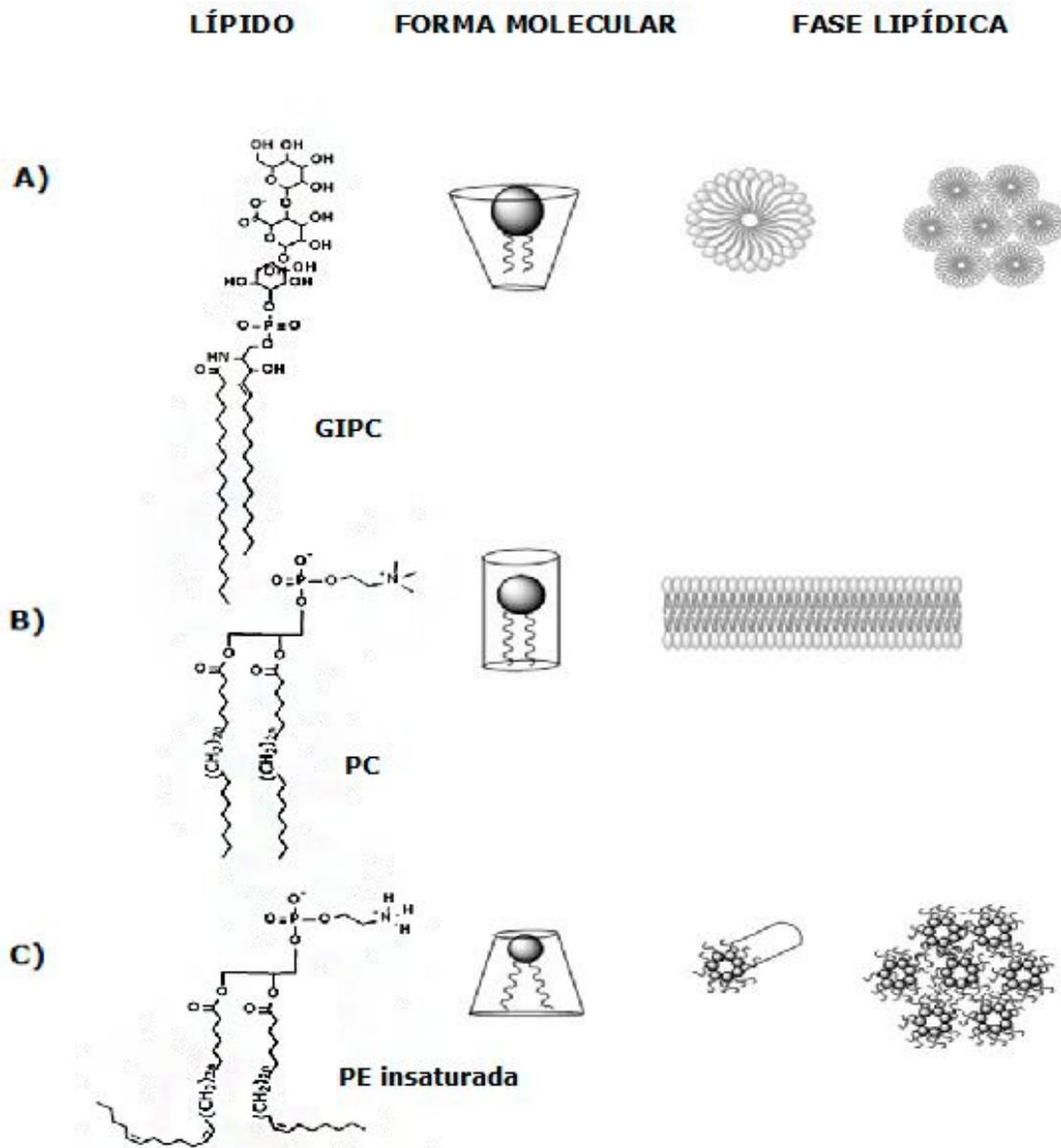


FIGURA 5. RELACIÓN ENTRE LA FORMA MOLECULAR DE LOS LÍPIDOS Y LAS FASE LIPÍDICAS QUE CONFORMAN **A)** LA FORMA MOLECULAR DE CONO INVERTIDO INDUCE LA FASE LIPÍDICA H_1 O MICELAR. **B)** LA FORMA CILÍNDRICA INDUCE LA FORMACIÓN DE FASES LIPÍDICAS LAMELARES O BICAPA **C)** LA FORMA MOLECULAR DE CONO INDUCE LA FASE H_{II} . GIPC: GLICOSIL INOSITOL FOSFORILCERAMIDAS PC: FOSFATIDILCOLINA PE: FOSFATIDILETANOLAMINA FIGURA CREADA CON EL PROGRAMA ACD/LABS® ACD/CHEMSKETCH.

Las estructuras lamelares tienden a unir los bordes expuestos para evitar que las cadenas hidrofóbicas entren en contacto con el medio acuoso. De ahí surgen las vesículas, que son estructuras esféricas conformadas por una bicapa lipídica; esta estructura es continua y

estable, pues las porciones hidrofóbicas no están en contacto con el medio acuoso.

4.3.2 Curvatura de la membrana

La curvatura de la membrana se considera positiva cuando la monocapa es convexa hacia la fase acuosa y es negativa cuando es cóncava hacia dicha fase (Torrecillas Sánchez, 2003). El polimorfismo lipídico repercute en la generación de curvaturas en la membrana; los lípidos con forma de cono inducen curvaturas negativas, mientras que lípidos con forma de cono invertido inducen curvaturas positivas. Los lípidos de forma cilíndrica, de fase lamelar, no inducen cambios en la curvatura membranal (Jouhet, 2013).

4.3.3 Mesomorfismo liotrópico y termotrópico

El mesomorfismo se refiere a los diferentes tipos de fases que adoptan los lípidos de la membrana. Si es en función de la cantidad de agua, se trata de mesomorfismo liotrópico, y si es en función de la temperatura es mesomorfismo termotrópico (Gómez Fernández, 1996). La fase que se adopta, sin embargo, también está en función del tipo de lípido, de las insaturaciones, de la longitud de las cadenas hidrofóbicas y la cantidad de esteroides presentes (van Meer et al., 2008).

Con base en parámetros como el ordenamiento de las cadenas acílicas y la difusión lateral, la organización lipídica puede ser: ordenada, líquida-ordenada y líquida-desordenada. Estas fases se presentan en los estados lamelar o de bicapa, ya que las fases hexagonales se encuentran involucradas más bien en eventos transitorios como fusión, fisión y formación de poros (van Meer et al., 2008).

La fase líquida-desordenada (L_d) presenta un bajo grado de ordenamiento en las cadenas hidrofóbicas insaturadas y un alto grado de difusión lateral ($D_T = 1 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). Esta fase se ve favorecida por las cadenas insaturadas presentes en la mayoría de los glicerofosfolípidos (Torrecillas Sánchez, 2003; Meer et al., 2008).

La fase ordenada, o fase gel (L_β), presenta un alto grado de ordenamiento lipídico, con cadenas acílicas largas y saturadas o con insaturaciones en *trans* y con un grado limitado de difusión lateral ($D_T = 10^{-3} \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). La fase líquida-ordenada (L_o) presenta características de las dos fases mencionadas anteriormente, ya que conjuga el alto orden conformacional de los lípidos en la fase ordenada y la difusión lateral de la fase líquida-desordenada (van Meer et al., 2008).

Los esteroides son esenciales en la composición de las membranas, ya que alteran el orden lipídico y modifican la transición de fases de líquido-desordenado a fase ordenada, induciendo la fase líquido-ordenada. De esta manera, aumentan la permeabilidad de la bicapa y optimizan el movimiento lipídico, mientras que mantienen la fase líquida (Furt et al., 2010).

5. LA PLANTA EN LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS

5.1 Estrés a bajas temperaturas. Daño por frío. Daño por congelación.

El estrés en las plantas se refiere a condiciones adversas que no permiten el funcionamiento normal del organismo (Mahajan y Tuteja, 2005). Durante su desarrollo, las plantas están sometidas a diversas fuentes de estrés, que pueden ser abióticos, como cambios en la intensidad de la luz, sequía o temperatura, o bióticos, como presencia de patógenos (Ruelland et al., 2002). La temperatura es un factor abiótico de estrés ya que no todas las plantas tienen la capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas y/o a temperaturas de congelación. Sin embargo, aquellas con capacidad de respuesta, la llevarán a cabo mediante mecanismos que tienen como finalidad evitar la congelación o resistirla.

El daño por frío y el daño por congelación, si bien están relacionados con las bajas temperaturas, no tienen el mismo significado debido a la forma en que impactan a la planta. El primero se refiere a un efecto directo de temperaturas bajas pero que se encuentran por encima de los 0°C. En estas condiciones, el daño en la planta se observa generalmente como clorosis, necrosis y crecimiento retardado (Sanghera et al., 2011; Fleury y Walker, 2014;). Asimismo, el estrés por frío puede causar la fuga de electrolitos, que es un reflejo de daño membranal (Alonso et al., 1997). El daño por congelación, por otro lado, se refiere principalmente al daño causado en la planta por la formación extracelular de cristales de hielo en temperaturas por debajo de los 0°C (Fleury y Walker 2014). El daño puede ocurrir por tres mecanismos celulares: lisis inducida por expansión, transiciones **de fase lamelar a fase hexagonal y lesiones de "salto de fractura"** (Welti et al., 2002).

5.1.1 Daño por congelación. Formación de cristales de hielo en el espacio extracelular.

La formación de hielo comienza en el espacio extracelular, debido a la diferencia en los puntos de congelación entre el espacio intracelular y extracelular. En éste último, existen agentes nucleadores de hielo, partículas que favorecen la formación de cristales. Los diferentes nucleadores hacen que la congelación sea un proceso lento y controlado (Atici y Nalbantoglu, 2003). Sin embargo, la formación de cristales de hielo causa la deshidratación de la célula porque en temperaturas por debajo de 0°C, el hielo tiene un menor potencial hídrico que el agua no congelada, causando un desbalance osmótico. Para restaurar el desequilibrio del potencial hídrico alterado, en el que disminuye la concentración externa del agua líquida libre y se formó un gradiente de potencial hídrico, la célula libera agua intracelular (Uemura y Steponkus, 1999). Lo anterior, además de concentrar los solutos intracelulares y de deshidratar a la célula, causa el crecimiento del cristal externo (Ouellet 2007; Fleury y Walker, 2014;). En el caso posterior, cuando los cristales de hielo pasan al estado líquido, causan una entrada abrupta de agua a la célula, lo que resulta en una lisis inducida por el efecto de expansión del volumen intracelular (Welti et al., 2002).

Si ocurre la formación de hielo al interior de la célula, ésta resulta letal debido al colapso y desestabilización de la membrana plasmática, originando alteraciones en la permeabilidad de la misma, lo que conduce al paso descontrolado de solutos en ambas direcciones: de afuera hacia el interior de la célula y viceversa (Atici y Nalbantoglu, 2003).

Bajo estas condiciones de deshidratación celular, la transición de fases de los lípidos de la bicapa membranal ocurre con mayor frecuencia, pudiendo pasar de la configuración de la fase lamelar a la de fase

hexagonal II. Se ha determinado que la aparición de esta transición en las membranas celulares conduce a una pérdida de estructura y compartimentalización (Uemura et al., 1995; Jouhet, 2013). Ver sección 4.3.

5.2 Aclimatación

Durante el proceso de aclimatación, las plantas se exponen a un periodo de bajas temperaturas, por encima de los 0°C con el fin de aumentar la tolerancia a temperaturas congelantes; es decir, temperaturas bajo 0°C. La aclimatación lleva a cabo cambios que incluyen la estabilización de la membrana contra el daño causado por congelación (Mahajan y Tuteja, 2005), por lo que aquellas plantas con capacidad de aclimatarse, podrán desarrollar resistencia a temperaturas por debajo de 0°C (Ouellet, 2007). Éste es un proceso de reprogramación metabólica y génica en el cual se implementan diversos mecanismos que tienen como finalidad permitirle a la planta tolerar la congelación. De manera natural, este proceso se lleva a cabo durante el otoño, cuando las temperaturas no son congelantes.

Una de las consecuencias de la aclimatación en la membrana celular es el aumento de su fluidez, lo que incrementa la crioestabilidad de la membrana, ya que disminuye la formación de fases H_{II} (Uemura et al., 1995; Minami et al., 2010). Es por ello que la capacidad de aclimatarse es una de las estrategias más importantes para la planta, pues le permiten resistir condiciones adversas de temperatura y que impactan en su crecimiento.

5.2.1 Mecanismos de resistencia al daño por frío

5.2.1.1 Desarrollo de estructuras resistentes a la congelación. Formación de compuestos anticongelantes

La resistencia a la congelación se define como la capacidad de soportar la formación extracelular de cristales de hielo y evitar su formación intracelular (Atici y Nalbantoglu, 2003). Para evitar la congelación, las plantas pueden favorecer la formación de estructuras específicas como las semillas, que contienen poca agua y por lo tanto, baja probabilidad de formación de hielo o pueden formar rizomas que, gracias a su crecimiento subterráneo, evitan temperaturas por debajo de 0°C (Fleury y Walker, 2014). Se ha informado que las semillas de algunas especies germinan tras exponerse a -20°C, mientras que plantas que desarrollan rizomas pueden resistir temperaturas que van de -13°C a -20°C (Noshiro y Akira, 1979).

También se puede abatir el punto de congelación del agua mediante la síntesis de compuestos anticongelantes o crioprotectores. Algunos de estos compuestos crioprotectores son proteínas intracelulares, aunque también existen proteínas extracelulares que modifican la pared celular, proteínas relacionadas a patógenos (PR) y proteínas anticongelantes (AFP), cuya síntesis se ve favorecida en bajas temperaturas (Atici y Nalbantoglu, 2003). Además de la síntesis proteica, existe síntesis de solutos de bajo peso molecular, como la prolina, que ayudan a mantener el balance osmótico y a prevenir la deshidratación celular causada por la formación de hielo extracelular (Ouellet, 2007).

Muchos estudios *in vitro* señalan el efecto crioprotector y estabilizador de los azúcares en la membrana plasmática durante procesos de congelación y descongelación, por lo que es posible que también exis-

ta síntesis y acumulación de azúcares en el citosol durante la aclimatación (Uemura y Steponkus, 1999) .

Los compuestos crioprotectores tienen cierta capacidad de abatir el punto de congelación, pues una concentración 1M de cualquiera de estos solutos abate el punto de congelación en promedio 1.84°C (Fleury y Walker, 2014). Otros anticongelantes incluyen compuestos como los flavonoides y taninos, presentes en plantas que viven en condiciones polares, ya que tienen una mayor capacidad de abatir el punto de congelación que los solutos de bajo peso molecular (Fleury y Walker, 2014; Kuwabara et al., 2012).

5.2.2 Genes de respuesta a frío

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado a los genes ***CBF1***, ***CBF2***, y ***CBF3***, cuya expresión se regula mediante la exposición a bajas temperaturas (Medina et al. 1999). Existe una posible influencia del ciclo circadiano, pues la expresión génica de ***CBF1*** y ***CBF2*** se regula por una proteína que interacciona con TOC1, componente del oscilador central, y con PHYB, fotoreceptor de luz roja (Thomashow, 2010).

Los genes ***CBF1***, ***CBF2***, y ***CBF3*** alcanzan su máxima expresión tras 1-3 h de incubación a 4 °C y actúan como factores de transcripción de algunos genes de respuesta a frío, los genes COR. Éstos últimos constituyen más de 2000 genes, con 1200 de ellos regulados por las bajas temperaturas y aproximadamente 170 de ellos regulados por las proteínas CBF (Medina et al., 1999; Zhao et al., 2015).

Mutantes de *Arabidopsis thaliana* que expresan de manera constitutiva los genes ***CBF1***, ***CBF2***, y ***CBF3*** presentan elevada tolerancia al frío sin necesidad de llevar a cabo el proceso de aclimatación. Se ha nombrado a CBF1 un regulador positivo del proceso de aclimatación,

pues controla la expresión de otros genes y favorece la tolerancia a la congelación (Medina et al., 1999).

También se ha identificado el gen **FAD8**, que codifica para una enzima desaturasa de ácidos grasos, que va a ser auxiliar en la modificación de la composición lipídica de la membrana y por lo tanto, en su fluidez y temperatura de transición (Mahajan y Tuteja, 2005). La familia de desaturasas de ácidos grasos (FAD), dentro de los que se incluye a la enzima codificada por el gen **FAD8**, se ve involucrada en procesos de respuesta a bajas temperaturas, ya que se ha observado que las mutantes **fad2**, **fad5** ven afectado su crecimiento en temperaturas bajas y en temperaturas congelantes. Asimismo, desaturasas de otros lípidos acílicos han sido identificadas en *Arabidopsis thaliana*, y están codificadas por los genes **ADS1**, **ADS2** y **ADS3**. Mutantes de **ads2** tienen una menor tolerancia a temperaturas congelantes que las plantas silvestres y que está, relacionada con una perturbación en las reacciones de desaturación de ácidos grasos inducidas por frío (Chen y Thelen, 2013). Particularmente, en el caso de esfingolípidos, se han identificado en *Arabidopsis thaliana* dos genes que codifican para desaturasas $\Delta 8$ de bases de cadena larga; éstos son **AtSLD1** y **AtSLD2**. Mutaciones en estos genes se observan como diferencias fenotípicas tras una exposición prolongada a bajas temperaturas (Chen et al., 2012).

5.2.2.1 Estabilización membranar y remodelación

La membrana plasmática es el sitio donde ocurre mayor daño por congelamiento, pues es la interfase entre el medio extracelular que contiene cristales de hielo y el citoplasma. La membrana actúa como barrera semipermeable que permite la entrada y salida de agua durante los periodos de congelación y descongelación (Uemura y Steponkus 1999). Por lo tanto, la estabilización de la membrana

plasmática es necesaria para la supervivencia de las plantas cuando se exponen a temperaturas congelantes (Minami et al., 2009).

Existen diversos mecanismos de estabilización membranal, que incluye la modificación de los lípidos membranales y la síntesis de solutos y compuestos crioprotectores. Por ello, durante el periodo de aclimatación, ocurren cambios en la composición lipídica, aumentando la proporción de especies di-insaturadas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y una disminución en la proporción de esfingolípidos, particularmente glucocerebrósidos (Uemura et al., 1995; Minami et al., 2009).

6. LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN LA RESPUESTA A BAJAS TEMPERATURAS

6.1 Remodelación lipídica

Las plantas cuentan con familias de enzimas que se especializan en eventos relacionados con la regulación del metabolismo celular en respuesta a condiciones de estrés, como la síntesis de segundos mensajeros, regulación del tráfico vesicular, re-arreglos del citoesqueleto, eventos de remodelación de membrana y degradación de lípidos. La remodelación lipídica ocurre en gran medida debido a reacciones de las enzimas fosfolipasas y desaturasas, cuya acción varía en función del sustrato, requerimiento de cofactores y condiciones de reacción (Wang et al., 2012).

Las fosfolipasas se clasifican en cuatro tipos: la fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa A1 (PLA₁) y la fosfolipasa A2 (PLA₂), en función del sitio de hidrólisis en el glicerofosfolípido (**Fig. 6**) (Wang et al., 2012; Hong et al., 2016).

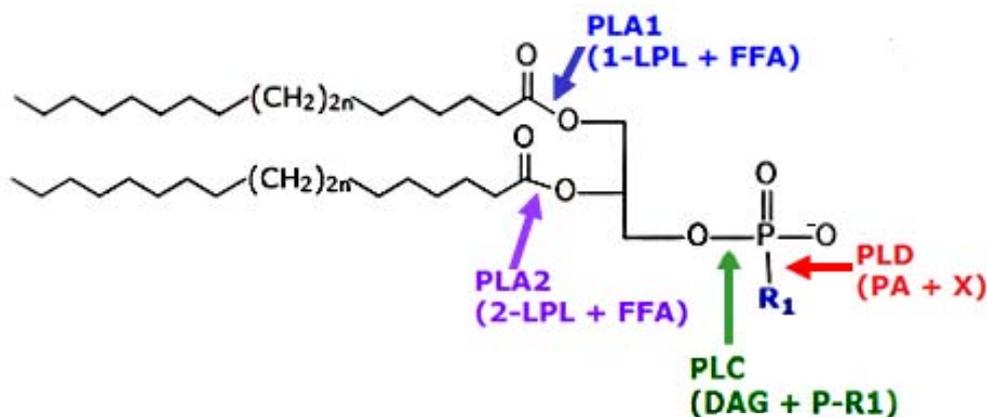


FIGURA 6. REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE LAS DIFERENTES FOSFOLIPASAS Y SUS PRODUCTOS. PLA₁, PLA₂, FOSFOLIPASAS A₁ Y A₂, RESPECTIVAMENTE, PRODUCEN LISOFOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS LIBRES. PLC: FOSFOLIPASA C, PRODUCE DIACILGLICEROL Y CABEZAS POLARES FOSFORILADAS. PLD: FOSFOLIPASA D, PRODUCE ÁCIDO FOSFATÍDICO Y CABEZAS POLARES LIBRES. R: CABEZA POLAR. FIGURA CREADA CON EL PROGRAMA ACD/LABS® ACD/CHEMSKETCH.

Las PLAs se encuentran en el cloroplasto, en el citosol y en las mitocondrias y producen lisofosfolípidos (LPL) y ácidos grasos a partir de los lípidos membranales. Las PLA₁ y PLA₂ liberan ácidos grasos de la posición sn-1 y sn-2, respectivamente (Wang et al., 2012).

Las PLCs, en cambio, hidrolizan a los glicerofosfolípidos para producir diacilglicerol y cabezas polares fosforiladas; existen dos familias de PLCs, aquellas específicas para fosfoinosítidos (PI-PLC) y las no-específicas, que hidrolizan fosfolípidos (NPC). La expresión de las PI-PLC se favorece en función de diversas condiciones ambientales, como el frío, concentraciones de sales y nutrientes, deshidratación y presencia de ácido abscísico (Wang et al., 2012).

Por otro lado, las PLDs hidrolizan a los glicerofosfolípidos y forman ácido fosfatídico y cabezas polares libres, como lo son la colina, la etanolamina, la serina, el glicerol y el inositol. Las PLDs se relacionan con la regulación celular en la apertura y cierre de estomas y también se involucran en procesos de respuesta a estrés por factores bióticos y abióticos, como la presencia de patógenos, sequía, concentración de sales, producción de especies reactivas de oxígeno y bajas temperaturas (Ruelland et al., 2002; Wang et al., 2012; Hong et al., 2016). **La PLD más abundante en plantas es la PLD α , cuyo sustrato principal es la PC; glicerofosfolípidos como la PE y PG son mayormente hidrolizados por otras fosfolipasas debido a una mayor afinidad por estos sustratos (Welti et al., 2002).**

Cuando existe una disminución de temperatura, se induce la activación de las PLCs y PLDs, que se observa como un aumento en la cantidad de DAG, PA y de LPLs como lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina, así como disminución de especies como PIP y PIP₂, PC, PE y PG. El aumento de ácido fosfatídico se debe tanto a la acción de las PLDs, como a la acción conjunta de las PLCs y una diacilglicerol

kinasa (DAGK) y esto, además de modificar la estructura membranar, se relaciona con la síntesis de lípidos más complejos y por lo tanto, en su metabolismo, pues el ácido fosfatídico es precursor de otras especies lipídicas. Asimismo, tiene funciones de señalización, ya que interactúa de manera directa con algunas proteínas transductoras (Ruelland et al., 2002; Hong et al., 2016).

Cuando las plantas se someten al proceso de aclimatación, modifican el grado de saturación de los ácidos grasos, generando principalmente ácidos grasos C18:2 y C18:3. Las desaturasas se encargan de remover átomos de hidrógeno, causando la formación de dobles enlaces, que pueden ser en posición *cis*- o en posición *trans*. Con ello, disminuye la temperatura de transición de fases de líquido ordenado a gel, ya que tras la exposición a frío la membrana requiere de insaturaciones en sus lípidos para garantizar que la membrana permanecerá con la mayor fluidez posible, evitando la formación de la fase gel (Ouellet, 2007).

En el caso de los esfingolípidos, **enzimas como la BCL Δ 4 desaturasa y la BCL Δ 8 desaturasa han sido identificadas en *Arabidopsis thaliana*** como las responsables de las insaturaciones en el C8 de las bases de cadena larga. Una de las proteínas esenciales de la membrana plasmática es la H⁺ATPasa, que se ubica en balsas lipídicas ricas en esfingolípidos, por lo que las insaturaciones en éstos durante las exposiciones a frío puede contribuir en su funcionamiento. Asimismo, el remodelamiento de esfingolípidos se puede llevar a cabo gracias a enzimas ceramidasa, que generan BCL y ácidos grasos (Chen et al., 2012).

Si la remodelación lipídica no se lleva a cabo en condiciones de estrés por frío, ocurre un gran daño estructural en la membrana plasmática cuando se lleva a cabo la transición de fases disparada por el descen-

so en la temperatura. Al disminuir la temperatura de transición y al mantenerse la fluidez en las bajas temperaturas, las funciones membranales pueden llevarse a cabo y el daño disminuye (Ouellet, 2007).

6.2 Cambios en la composición lipídica

Los cambios lipídicos adecuados reducen la probabilidad de que la membrana plasmática sufra transiciones de fase lamelar a fase hexagonal inducida por congelación (Lynch y Steponkus, 1987).

Las membranas biológicas de las plantas consisten mayormente en glicerofosfolípidos y esfingolípidos. De éstos, la PC, la PE, las GIPCs (glicosilinositolfosfoceramidas) y las GC (glucosil ceramidas) son los constituyentes lipídicos principales; la membrana plasmática en particular tiene un porcentaje importante de ácido fosfatídico **(Tablas 1 y 2)**. (Ver sección 4.2) (Yoshida y Uemura, 1986; Cassagne, 1998). En el caso de las GIPCs, la abundancia de las diferentes series (Ver sección 4.1.2.3) está en función de la planta; en las monocotiledóneas abunda la serie B y en las dicotiledóneas abunda la serie A (Cacas et al., 2013).

En plantas sometidas a procesos de aclimatación, se observa que existe una disminución en la cantidad de esfingolípidos y esfingolípidos complejos y un aumento de glicerofosfolípidos en la membrana plasmática **(Tablas 3 y 4)**. También se reduce la formación de fases hexagonales. Éstos son fenómenos comunes para todas las plantas aclimatadas (Uemura et al., 1995; Uemura y Steponkus, 1999).

TABLA 3. CONTENIDO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN DIFERENTES ESPECIES DE PLANTAS NO ACLIMATADAS.

	Plántulas <i>Vigna radiata</i>	Hojas de <i>Secale cereale</i>	Hojas de <i>Secale cereale</i>	Hojas de avena primaverales <i>Avena sativa</i>	Hojas de avena invernales <i>Avena sativa</i>	Plántulas verdes de trigo invernal	Raíces de <i>Zea mays</i> L	Hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas de <i>Solanum tuberosum</i>	Hojas de <i>Solanum commersonii</i>
PL	48.9	31.7	36.6	28.8	28.9	37.1	43.9	46.8	46.4	48.3
SL	6.8	16.2	16.4	27.2	30.4	13.7	6.8	7.3	6.5	6.1
St	43.3	52.1	46.6	41.3	39.1	49.1	49.3	46	45	41.6
Otros	1	--	0.4	2.7	1.7	0.1	--	--	2.1	4
St/PL	0.9	1.6	1.3	1.5	1.3	1.3	1.1	1	1	0.9
Referencia	(Yoshida y Uemura 1986)	(Lynch y Steponkus 1987)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Bohn <i>et al.</i> 2007)	(Bohn, Heinz, y Lüthje 2001)	(Uemura, Joseph, y Steponkus 1995)	(Palta, Whitaker, y Weiss 1993)	(Palta, Whitaker, y Weiss 1993)

SL: Esfingolípidos St: Esteroles St/PL: Proporción de esteroles y glicerofosfolípidos. PL: Fosfolípidos
Cantidades expresadas en % mol de lípidos totales

TABLA 4. CONTENIDO DE LÍPIDOS DE MEMBRANA PLASMÁTICA EN DIFERENTES ESPECIES DE PLANTAS ACLIMATADAS.

	Hojas de <i>Secale cereale</i>	Hojas de <i>Secale cereale</i>	Hojas de avena primaverales <i>Avena sativa</i>	Hojas de avena invernales <i>Avena sativa</i>	Plántulas verdes de trigo invernal	Hojas de <i>Ara-bidopsis thaliana</i>	Hojas de <i>Solanum tuberosum</i>	Hojas de <i>Solanum commersonii</i>
AC (°C)	2	2	2	2	2	2	2-4	2-4
PL	41.9	43.3	36.8	39.5	43.2	57.1	46.8	51.1
SL	6.8	10.5	24.2	22.5	10.3	4.3	5	4.9
St	51.2	46	36.9	37.4	46.5	38.7	46.2	40.7
Otros	0.1	0.2	2.1	0.6	--		2	3.3
St/PL	1.2	1.1	1.0	0.9	1.1	0.7	1.0	0.8
Referencia	(Lynch y Steponkus 1987)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Uemura y Steponkus 1994)	(Bohn <i>et al.</i> 2007)	(Uemura, Joseph, y Steponkus 1995)	(Palta, Whitaker, y Weiss 1993)	(Palta, Whitaker, y Weiss 1993)

AC: Temperatura de aclimatación

SL: Esfingolípidos St: Esteroles St/PL: Proporción de esteroles y glicerofosfolípidos PL: Fosfolípidos.

Cantidades expresadas en % mol de lípidos totales

El aumento en la proporción observada de glicerofosfolípidos en las plantas aclimatadas es resultado del incremento de especies disaturadas de PC y PE principalmente durante los primeros días del proceso de aclimatación (Uemura y Steponkus, 1994; Uemura y Steponkus, 1999) mientras que la disminución de esfingolípidos ocurre gradual y progresivamente durante las cuatro semanas de exposición a bajas temperaturas (Uemura y Steponkus, 1999).

La estrategia de disminución de esfingolípidos puede deberse no únicamente al bajo grado de hidratación que presentan estos lípidos, lo cual podría favorecer la poca separación con lípidos de otras endomembranas. También puede deberse a que la porción de la ceramida presente en todos los esfingolípidos es rígida y esto disminuye la flexibilidad o fluidez membranal; es posible que las ceramidas se encuentren dentro de los primeros constituyentes hidrofóbicos afectados de manera importante por las bajas temperaturas. Una posibilidad adicional es que las ceramidas contienen ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA), lo cual favorece la interdigitación entre monocapas opuestas de las cadenas muy largas de ácidos grasos (VLCFA), fenómeno que posibilita la formación de fases hexagonales (Bohn et al., 2007).

Tras el periodo de aclimatación, la membrana plasmática reduce la formación de fases hexagonales, lo que puede deberse a diferentes factores que influyan en: la hidratación membranal a nivel de las superficies de las cabezas polares, que se relaciona con la separación espacial entre bicapas; la separación de especies lípido-lípido o lípido-proteína o en la curvatura de las monocapas. Aumentos en el grado de hidratación membranal, que resultan en una mayor separación espacial entre bicapas en la exposición a temperaturas congelantes, se pueden lograr ya sea aumentando la proporción de lípidos hidratados, como los fosfolípidos PC y PE, y disminuyendo la cantidad de lípidos

poco hidratados, como las ceramidas y los esteroides libres (Uemura et al., 1995).

Esta interacción podría explicar cómo, a pesar de que la PE bajo ciertas condiciones tiende a formar fases H_{II} , el aumento en la proporción de este lípido aumenta la hidratación de la membrana, lo que aumenta a su vez la separación con otras bicapas y hace a la membrana plasmática menos propensa a la formación de esta fase hexagonal causada por deshidratación por frío (Uemura y Steponkus, 1999).

6.3 Cambios en la fluidez

La remodelación membranal y el cambio en las proporciones de especies lipídicas pretenden evitar la disminución en la fluidez de la membrana plasmática, que puede inducir la separación de fases membranales en fase ordenada y fase líquida-desordenada (Minami et al., 2009).

El grado de insaturación y la longitud de las cadenas acílicas de los lípidos membranales contribuyen a modular la fluidez; las plantas sensibles al frío usualmente tienen una mayor proporción de ácidos grasos saturados y, por lo tanto, la temperatura de transición de estado líquido-ordenado a gel es mayor. Esto obstaculiza termodinámicamente que los lípidos adopten una configuración que favorezca una mayor fluidez. Por otro lado, las plantas resistentes a frío tienen mayor abundancia de insaturaciones y una temperatura de transición más baja dando los efectos opuestos y alcanzando una mayor fluidez a una temperatura menor (Mahajan y Tuteja, 2005).

Debido a que en el daño por congelamiento existe salida de agua hacia el espacio extracelular, el daño también está asociado al daño por deshidratación. Es por esto que la criostabilidad de la membrana plasmática se ve afectada por alteraciones en la composición lipídica que influyen en el mesomorfismo liotrópico (Uemura y Steponkus, 1999). Durante el cambio en la composición lipídica relacionada con

el proceso de aclimatación, se observa una menor proporción esterol-fosfolípido (St/PL) **(Tablas 3 y 4)**(Ver sección 6.2), que se asocia con una mayor fluidez (Palta et al., 1993).

6.4 La membrana plasmática en la señalización en la respuesta a bajas temperaturas

Algunas hipótesis relacionadas con la cascada de señalización de la temperatura proponen que, parecido a otros tipos de estrés ambiental, las primeras señales de estrés son percibidas por receptores de la membrana plasmática. Los receptores pueden transmitir la información a otros elementos, algunos membranales y otros intracelulares, entre ellos, algunos que actúan como segundos mensajeros como el ión calcio, especies reactivas de oxígeno e inositol fosfatos. Esto causa cambios en los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos, que son percibidos por receptores de Ca^{2+} , que inician una cascada de fosforilación de proteínas cinasas y que eventualmente activan los genes de respuesta a frío y otras respuestas metabólicas (Mahajan y Tuteja, 2005). Este receptor hipotético podría ser similar a las His cinasas de levaduras, que son fosforiladas en respuesta a aumentos de osmolaridad (Murata y Los, 1997)

Sin embargo, una vía de señalización de estrés ambiental por bajas temperaturas o frío, con la membrana plasmática como el receptor implica que no se requiere de un receptor proteico en la membrana plasmática, sino que las alteraciones en la fluidez, debidas a la abundancia y saturación de los lípidos membranales, son las encargadas de comenzar la señalización (Mahajan y Tuteja, 2005). La membrana plasmática, mediante alteraciones físicas que repercuten en la fluidez, fungiría como termómetro biológico y como receptor al frío, aunque también podría responder al calor.

Se desconoce el mecanismo exacto de transducción de señales en condiciones de bajas temperaturas; sin embargo, se sabe que la expresión de los genes que codifican para enzimas desaturasas se regula positivamente tras la disminución de temperatura y fluidez membranar (**Fig. 7**). Los blancos de las enzimas desaturasas sintetizadas

de novo se encuentran tanto en la membrana plasmática, como en la membrana del tilacoide (Murata y Los, 1997).

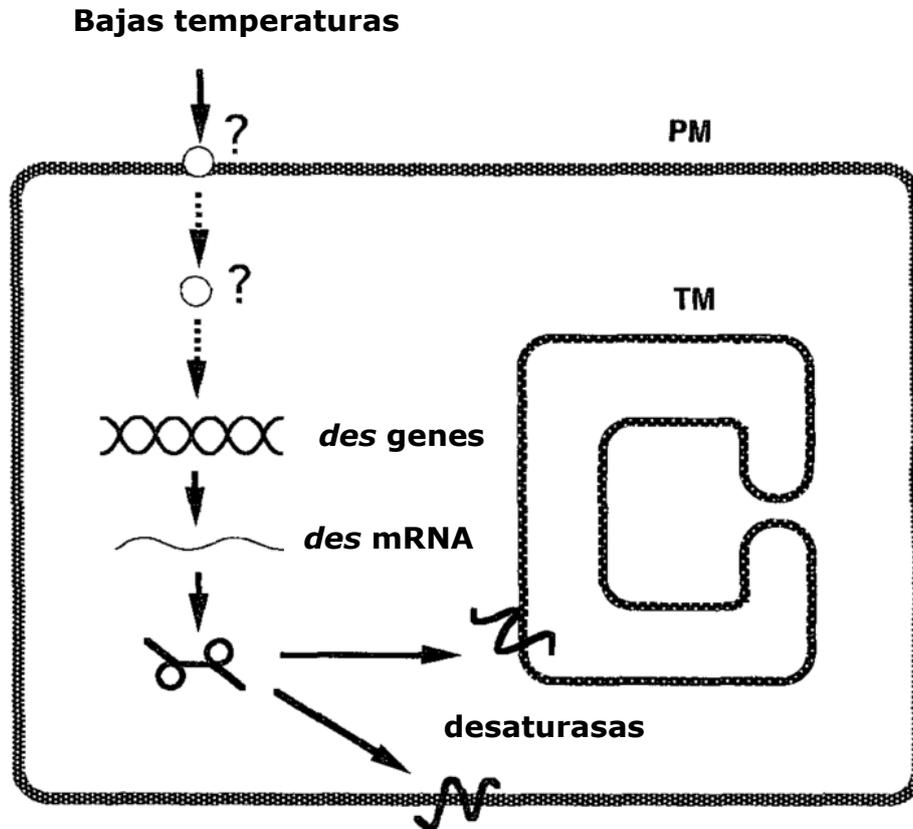


FIGURA 7. MODELO PROPUESTO DE PERCEPCIÓN DE TEMPERATURA Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DURANTE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DESATURASAS. PM: MEMBRANA PLASMÁTICA. TM: MEMBRANA DEL TILACOIDE. (Murata y Los, 1997)

6.4.1 Otros elementos señalizadores

Se desconoce la identidad y función de todas las especies involucradas en la compleja red de señalización en la transducción de frío, sin embargo, se han identificado transductores de señal muy relevantes de la señal de frío.

Además de su papel como componentes estructurales de la membrana, los esfingolípidos, así como sus metabolitos y derivados, se ven involucrados en la respuesta a diversos factores de estrés. Especies como fitoesfingosina-1-fosfato y algunas ceramidas fosforiladas están implicadas en la respuesta de las plantas a las

bajas temperaturas (Michaelson et al., 2016). La exposición a frío lleva a la producción transitoria de fitoesfingosina-1-fosfato, que es activador de enzimas MAP cinasas como la MPK6. La MPK6 está involucrada en procesos de percepción de estímulos abióticos, como el frío, y bióticos como los patógenos. Asimismo, la fitoesfingosina-1-fosfato añadida de manera exógena actúa como inductora de genes de respuesta a frío (Dutilleul et al. 2012).

En el caso de los glicerofosfolípidos, se ha observado que uno de sus derivados, el ácido fosfatídico, actúa como mediador en la respuesta a frío, ya que en esta condición, la concentración de esta especie aumenta transitoriamente de manera importante, como un segundo mensajero. El origen, sin embargo, puede deberse tanto a la acción de enzimas fosfolipasas D (PLD) (Ver sección 6.1) o a la acción de enzimas fosfolipasas C, cuyo producto, diacilglicerol, puede ser fosforilado a ácido fosfatídico mediante diacilglicerol cinasas. El ácido fosfatídico actúa como un transductor en la regulación de genes de respuesta a frío (Dutilleul et al. 2012).

6.5 Papel de los esfingolípidos en la fluidez membranal en bajas temperaturas

Considerando que la fluidez de la membrana plasmática es esencial para preservar su integridad ante temperaturas de congelación, y que los esfingolípidos son agentes cuya abundancia puede modular la rigidez membranal, una estrategia para evaluar la función de los esfingolípidos en la fluidez de la membrana, es interfiriendo en la ruta biosintética de estas especies lipídicas para manipular sus niveles endógenos. Esto se puede realizar, ya sea añadiendo inhibidores específicos o realizando mutaciones en los genes que codifican para las enzimas de dicha ruta (González-Solís et al., 2014).

6.5.1 Mutantes de *Arabidopsis thaliana* en la SPT

6.5.1.1 Serina palmitoil-transferasa (SPT) en *Arabidopsis thaliana*

La SPT es un heterodímero que cataliza el primer paso en la síntesis de esfingolípidos, que es la condensación de la serina con el palmitoil-coA (**Fig. 8**), y se compone de las subunidades LCB1 y LCB2 (Chen et al., 2006). La SPT de *Arabidopsis thaliana* tiene dos genes que codifican para isoformas funcionales de la subunidad LCB2, los genes *LCB2a* y *LCB2b* (Dietrich et al., 2008).

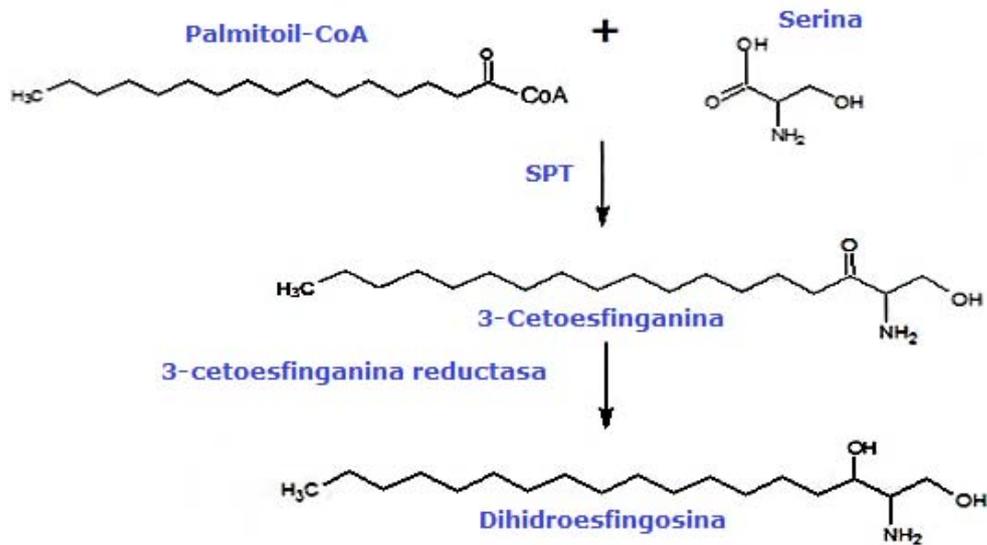


FIGURA 8. BIOSÍNTESIS DE LAS BCL DE LOS ESFINGOLÍPIDOS (Chen et al., 2006)

6.5.1.1.1 Plantas *lcb2a-1*

Se han generado líneas de *Arabidopsis thaliana* con mutaciones en los genes de las subunidades LCB1 y LCB2 de la serina palmitoil-transferasa (SPT) que presentan diferente contenido cualitativo y cuantitativo de esfingolípidos y diferente grados de fluidez membranal.

Las mutantes *lcb2a-1* tienen modificaciones en el gene de la subunidad LCB2a de la SPT por lo que esta subunidad no se expresa y no puede formar el heterodímero con la subunidad LCB1 de la SPT. En esta mutante, la síntesis de BCL continúa gracias a que la subunidad LCB2b continúa viable y tiene una actividad redundante con la subunidad LCB2a ausente (Chen et al., 2006; Dietrich et al., 2008; González-Solís et al., 2014). La mutante *lcb2a-1* presentan mayor cantidad de esfingolípidos en la membrana plasmática, a pesar de que en la planta completa no se observan diferencias con la planta silvestre, lo cual indica que existe una redistribución lipídica en las membranas celulares en esta mutante (Cano Ramírez, 2014)

Es decir, la mutación se refleja en un aumento de esfingolípidos en la membrana plasmática, por encima de otros organelos celulares; del total de estas especies lipídicas, la mayor parte corresponden a GIPCs, seguidas de glucosilceramidas. Sin embargo, se ha reportado que los valores de energía de activación del proceso de fluidificación de la membrana de la línea mutante son menores que los valores de la línea silvestre. La energía de activación del proceso de fluidificación de la membrana es un indicativo del grado de ordenamiento debido al ensamblado lipídico; si aumenta el orden de la membrana plasmática, disminuye la energía de activación del proceso (Cano Ramírez, 2014). Gracias a este parámetro se puede determinar que esta línea de *Arabidopsis thaliana* presenta un mayor grado de ordenamiento y una menor fluidez que la línea silvestre, asociando a la mayor cantidad de esfingolípidos con esta característica.

6.5.1.1.2 Plantas *lcb2b hp/lcb2a*

La línea mutante *lcb2b hp/lcb2a* es una mutante con un silenciamiento inducible del gen *LCB2b* con el fondo genético de la línea *lcb2a-1*. Estas mutantes tienen una horquilla (hairpin) de RNA_i que silencia específicamente al gen de la subunidad LCB2b de la SPT cuando se encuentra en presencia de metoxifenazida, que actúa como inductor. Si el inductor no se encuentra presente, es decir, que la línea es *hp-*, las plantas presentan las características de la línea *lcb2a-1*: una mayor cantidad de esfingolípidos en la membrana plasmática que en otros organelos y con un nivel de esfingolípidos en la planta total similar a la línea silvestre (Dietrich et al., 2008; González-Solís et al., 2014).

La energía de activación en la planta mutante *hp-* es menor que la energía de activación de la planta wild-type en las bajas temperaturas, lo cual muestra una estructuración más rígida en condiciones de frío. Este ordenamiento también se refleja en una menor fluidez de la

membrana plasmática, comparando con la fluidez a bajas temperaturas de las plantas silvestres (Cano Ramírez, 2014). Esto se debe a que esta línea tiene el mismo fondo genético que la línea *lcb2a-1* y en ausencia del inductor, presenta las mismas características.

Por otro lado, si el inductor se encuentra presente, es decir que la línea *lcb2b hp/lcb2a* es *hp+*, la planta no cuenta con la subunidad LCB2b de la SPT y tampoco cuenta con la subunidad LCB2a. Esto se debe al fondo genético *lcb2a-1* y a que la horquilla de RNA causó el silenciamiento del gen *LCB2b*. Esta línea tiene el 64 % de esfingolípidos totales determinados en la planta control (González-Solís et al., 2014). Sin embargo, como mecanismo de compensación, las plantas *hp+* presentan una mayor cantidad de esfingolípidos, particularmente GIPCs, en la membrana plasmática (Cano Ramírez, 2014).

Esta línea presenta una menor fluidez que la línea silvestre y también presenta una menor energía de activación que la planta wild-type. También presenta una fase líquido-desordenada más rígida y, por lo tanto menos fluida que las membranas de plantas silvestres (Cano Ramírez, 2014).

Esto indica que una mayor cantidad de esfingolípidos membranales, consecuencia de la redistribución inducida por las mutaciones, causan la disminución de la fluidez membranal y favorecen un mayor ordenamiento de la membrana plasmática a bajas temperaturas.

6.5.2 Mutantes en enzimas hidroxilasas

Las hidroxilaciones de los esfingolípidos contribuyen a la gran variedad de estas especies en las plantas, y se pueden encontrar tanto en la BCL como en el ácido graso. Las bases de cadena larga pueden tener en su estructura hasta tres hidroxilaciones; los grupos hidroxilo de la posición C1 y C3 provienen de la serina y la palmitoil-coA, mientras que la hidroxilación en C4 ocurre enzimáticamente por

hidroxilasas específicas. Esta reacción ocurre tras la acilación de la BCL (Chen et al., 2008). Por otro lado, los ácidos grasos de los esfingolípidos generalmente son una mezcla de cadenas de 16 átomos de carbono (LCFA) y cadenas de ácido graso muy largas (VLCFA) con cadenas de 20-26 átomos de carbono. Éstas pueden contener grupos α - o C2 hidroxilo (Chen et al., 2008; Chen et al., 2009). El 90% de los esfingolípidos complejos de las plantas tiene ácidos grasos C2-hidroxilados (Nagano et al., 2012).

6.5.2.1 Plantas *sbh1-1*

Las BCL tri-hidroxiladas son esenciales para el crecimiento y viabilidad de las plantas; constituyen cerca del 90 % de las BCL y permiten la formación de esfingolípidos complejos del tipo GIPCs y glucosilceramidas. Las BCL di-hidroxiladas usualmente forman esfingolípidos complejos únicamente del tipo glucosilceramidas (Chen et al., 2008). Las mutantes *sbh1-1* no expresan la hidroxilasa-1 de BCL, encargada de las hidroxilaciones en el C4 y debido a ello, sintetizan aproximadamente un 50 % de los esfingolípidos tri-hidroxilados de las plantas silvestres y muestran 1.5 veces más especies di-hidroxiladas como respuesta a esta mutación (Chen et al., 2008; González-Solís et al., 2014).

Las líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con menor proporción de BCL tri-hidroxiladas (mutantes *sbh1-1*) presentan una mayor cantidad de esfingolípidos tipo glucosilceramidas, generalmente con cadenas de ácidos de 16 átomos de carbono (Chen et al., 2008; Chen et al., 2012). Estos esfingolípidos tienen una cabeza polar de menor tamaño que las GIPCs, por lo que favorecen un mejor empaquetamiento membranar, que se refleja en un aumento del orden membranar y en una menor fluidez que las plantas wild-type (Cano Ramírez, 2014).

6.5.3 Esfingolípidos con BCL insaturadas

Las especies lipídicas saturadas o con insaturaciones todas en posición *trans* favorecen un mayor ordenamiento membranal, ya que propician la interacción con las moléculas de esteroides y, por lo tanto, aumentan la rigidez de la membrana plasmática. **Las enzimas $\Delta 4$ y $\Delta 8$ desaturasas son las encargadas de** la formación de dobles enlaces mediante la remoción de átomos de hidrógeno. En el caso de la $\Delta 4$ desaturasa, ésta forma dobles enlaces en posición *trans* y en el caso de la $\Delta 8$ las insaturaciones pueden encontrarse en posición *cis/trans* (Chen et al., 2012). Las insaturaciones *cis* $\Delta 8$ se ven involucradas en la resistencia a bajas temperaturas; se ha reportado que las plantas resistentes al frío tienen cantidades elevadas de **t18:1 $\Delta 8$ *cis***, comparando con **t18:1 $\Delta 8$ *trans***, en glucosilceramidas (Chen et al., 2012).

El uso de líneas mutantes como son *sld1* y *sld2*, que no presentan la **enzima $\Delta 8$ desaturasa**, revela una disminución en la cantidad de BCL insaturadas, una reducción en los niveles de glucosilceramidas y un aumento en las GIPCs (Chen et al., 2012; González-Solís et al., 2014).

La línea *sld1-sld2* tiene modificaciones en los dos genes que codifican **para la $\Delta 8$ desaturasa y presentan daño cuando se exponen a bajas temperaturas**, así como una disminución de glucosilceramidas y un aumento de GIPCs (Chen et al., 2012; González-Solís et al., 2014).

Se ha determinado que las glucosilceramidas juegan un papel importante en la estabilidad y fluidez membranal tras procesos de calentamiento y enfriamiento. En especies mutantes de *Arabidopsis thaliana* con el gen que codifica para la glucosilceramida sintasa silenciado y, por lo tanto, con menor proporción de este esfingolípido, se determinó la fluidez membranal en ciclos de calentamiento (de -5°C a 41°C) y posteriormente, de enfriamiento (de 41°C a -5°C).

Se observó que las especies mutantes no recuperan el estado de fluidez previo al ciclo calentamiento-enfriamiento. Esto es indicativo del rol estabilizador de la glucosilceramida en la membrana, pues su ausencia se ve reflejada como una menor fluidez al final del tratamiento de calentamiento-enfriamiento (Cano Ramírez, 2014).

Se observa, por lo tanto, que los esfingolípidos disminuyen la fluidez de la membrana plasmática, ya que contribuyen al ordenamiento de la membrana biológica. Permiten la formación de balsas lipídicas y en general, aumentan la rigidez. Tanto estas especies complejas de lípidos como sus precursores o metabolitos, incluyendo las BCL esfingoides, las BCL fosforiladas y las ceramidas, tienen funciones señalizadoras en eventos que incluyen apoptosis, senescencia, cierre de estomas y, en general, de respuestas a estrés (Furt et al., 2010).

7. CONCLUSIONES

El daño por la exposición a bajas temperaturas tiene un impacto negativo en las plantas que no son capaces de aclimatarse y montar una respuesta adaptativa, lo que tiene consecuencias negativas en la agricultura y en la ecología, ya que existe muerte celular.

La exposición a temperaturas congelantes causa la deshidratación celular debido a la formación de hielo extracelular, que a su vez, provoca la formación de fases HII y con ello, la pérdida de estructura en la célula vegetal.

Las bajas temperaturas en plantas capaces de aclimatarse inducen una respuesta adaptativa que incluye síntesis de compuestos crioprotectores y remodelación de la membrana plasmática. Los cambios en la membrana plasmática tienen como finalidad mantener la fluidez membranal en condiciones de frío e incluyen la disminución en la cantidad de esfingolípidos y el aumento de glicerofosfolípidos.

Los esfingolípidos aumentan la rigidez de la membrana plasmática, porque permiten un mayor ordenamiento, mientras que las hidroxilaciones en las bases de cadena larga favorecen la fluidez membranal.

Los esfingolípidos participan en la vía de señalización celular en condiciones de estrés por frío que lleva a aumentar la fluidez en bajas temperaturas como respuesta adaptativa.

La membrana plasmática es un componente celular clave en la tolerancia al frío, porque mediante cambios en la fluidez mantiene la viabilidad de la célula. Con estos cambios podría desencadenar la respuesta que permita sobrevivir al congelamiento, actuando como receptor a frío.

REFERENCIAS

- Alonso, Antonio, Cristina S. Queiroz, y Antonio C. Magalhães. 1997. «Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings.» *Biochimica et Biophysica Acta* 1323: 75-84. doi: 10.1016/S0005-2736(96)00177-0.
- Atici, Okkeş, y Barbaros Nalbantoglu. 2003. «Antifreeze proteins in higher plants.» *Phytochemistry* 64: 1187-96. doi: 10.1016/S0031-9422(03)00420-5.
- Bohn, Matthias, Ernst Heinz, y Sabine Lühje. 2001. «Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387 (1): 35-40. doi: 10.1006/abbi.2000.2224.
- Bohn, Matthias, Sabine Lühje, Petra Sperling, Ernst Heinz, y Karl Dörffling. 2007. «Plasma membrane lipid alterations induced by cold acclimation and abscisic acid treatment of winter wheat seedlings differing in frost resistance.» *Journal of Plant Physiology* 164 (2): 146-56. doi: 10.1016/j.jplph.2005.12.008.
- Buré, Corinne, Jean-Luc Cacas, Sébastien Mongrand, y Jean-Marie Schmitter. 2014. «Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry.» *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (4): 995-1010. doi: 10.1007/s00216-013-7130-8.
- Cacas, Jean Luc, Corinne Buré, Fabienne Furt, Jean Paul Maalouf, Alain Badoc, Stéphanie Cluzet, Jean Marie Schmitter, Elvire Antajan, y Sébastien Mongrand. 2013. «Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity.» *Phytochemistry* 96 (August 2013): 191-200. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.08.002.
- Cano Ramírez, Dora Luz. 2014. «Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*». Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cassagne, C. 1998. «Lipid trafficking in plant cells.» *Progress in Lipid Research* 37 (6). doi: 0163-7827.
- Chen, Ming, Edgar B. Cahoon, Mariana Saucedo-García, Javier Plasencia, y Marina Gavilanes-Ruíz. 2009. «Plant sphingolipids: structure, synthesis and function». En , editado por Hajime Wada y Norio Murata, 30: 77-115. doi: 10.1007/978-90-481-2863-1_5.
- Chen, Ming, Gongshe Han, Charles R. Dietrich, Teresa M. Dunn, y Edgar B. Cahoon. 2006. «The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase.» *The Plant Cell* 18 (December): 3576-93.

- doi:10.1105/tpc.105.040774.
- Chen, Ming, Jonathan E. Markham, y Edgar B. Cahoon. 2012. «**Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in *Arabidopsis***». *The Plant Journal* 69 (5): 769-81. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04829.x.
- Chen, Ming, Jonathan E. Markham, Charles R. Dietrich, Jan G. Jaworski, y Edgar B. Cahoon. 2008. «Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*.» *The Plant Cell* 20 (7): 1862-78. doi:10.1105/tpc.107.057851.
- Chen, Mingjie, y Jay J. Thelen. 2013. «Acyl-lipid desaturase2 is required for chilling and freezing tolerance in *Arabidopsis*.» *The Plant Cell* 25 (4): 1430-44. doi:10.1105/tpc.113.111179.
- Dietrich, Charles R., Gongshe Han, Ming Chen, R. Howard Berg, Teresa M. Dunn, y Edgar B. Cahoon. 2008. «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 Journal* 54 (2): 284-98. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03420.x.
- Dutilleul, Christelle, Ghouziel Benhassaine-Kesri, Chantal Demandre, Nathalie Rézé, Alban Launay, Sandra Pelletier, Jean Pierre Renou, Alain Zachowski, Emmanuel Baudouin, y Isabelle Guillas. 2012. «Phytosphingosine-phosphate is a signal for AtMPK6 activation and *Arabidopsis* response to chilling». *New Phytologist* 194 (1): 181-91. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.04017.x.
- Fleury, Delphine, y John M. Walker. 2014. *Plant Cold Acclimation*. Editado por Dirk K. Hincha y Ellen Zuther. Vol. 1166. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-0844-8.
- Furt, Fabienne, Francois Simon-Plas, y Sébastien Mongrand. 2010. «The plant plasma membrane». En , editado por Angus S Murphy, Wendy Peer, y Burkhard Schulz, 11:494. Springer Science & Business Media.
- Gómez Fernández, Juan C. 1996. «Biofísica y fisiología celular». En , editado por Ramón Latorre, José López-Barneo, Francisco Bezanilla, y Rodolfo Llinás, 708. Universidad de Sevilla.
- González-Solís, Ariadna, Dora L. Cano-Ramírez, Francisco Morales-Cedillo, Cinthya Tapia de Aquino, y Marina Gavilanes-Ruiz. 2014. «*Arabidopsis* mutants in sphingolipid synthesis as tools to understand the structure and function of membrane microdomains in plasmodesmata.» *Frontiers in Plant Science* 5 (January): 3. doi:10.3389/fpls.2014.00003.
- Gül, Muhammet Kemal, y Samija Amar. 2006. «Sterols and the

- phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L .)», 71-79.
- Hauser, Helmut, y Guy Poupart. 2004. «The structure of biological membranes, Second Edition». En , editado por Philip L. Yeagle, 552. CRC Press.
- Hong, Yueyun, Jian Zhao, Liang Guo, Sang-Chul Kim, Xianjun Deng, Geliang Wang, Gaoyang Zhang, Maoyin Li, y Xuemin Wang. 2016. «Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses». *Progress in Lipid Research* 62. Elsevier B.V.: 55-74. doi: 10.1016/j.plipres.2016.01.002.
- Jouhet, Juliette. 2013. «Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization.» *Frontiers in Plant Science* 4 (December): 494. doi: 10.3389/fpls.2013.00494.
- Key, Jeffrey R., John B. Collins, Charles Fowler, y Robert S. Stone. 1997. «High-latitude surface temperature estimates from thermal satellite data». *Remote Sensing of Environment* 61 (2). Elsevier: 302-9. doi: 10.1016/S0034-4257(97)89497-7.
- Kuwabara, Chikako, Donghui Wang, Jun Kasuga, Yukiharu Fukushi, Keita Arakawa, Toshie Koyama, Takaaki Inada, y Seizo Fujikawa. 2012. «Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators». *Cryobiology* 64 (3): 279-85. doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.02.012.
- Luckey, Mary. 2014. *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*. Cambridge University Press.
- Lynch, Daniel V., y Peter L. Steponkus. 1987. «Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma).» *Plant Physiology* 83 (4): 761-67.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1056446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mahajan, Shilpi, y Narendra Tuteja. 2005. «Cold, salinity and drought stresses: an overview.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444 (2): 139-58. doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018.
- Markham, Jonathan E., Daniel V. Lynch, Johnathan A. Napier, Teresa M. Dunn, y Edgar B. Cahoon. 2013. «Plant sphingolipids: function follows form». *Current Opinion in Plant Biology* 16 (3). Elsevier Ltd: 350-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.009>.
- Medina, J., M. Bagues, J. Terol, M. Pérez-Alonso, y J. Salinas. 1999. «The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration». *Plant Physiology* 119 (2): 463-70. doi: 10.1104/pp.119.2.463.
- Michaelson, Louise V., Johnathan A. Napier, Diana Molino, y Jean Denis Faure. 2016. «Plant sphingolipids: Their importance in

- cellular organization and adaption». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V.
doi: 10.1016/j.bbalip.2016.04.003.
- Minami, Anzu, Masayuki Fujiwara, Akari Furuto, Yoichiro Fukao, Tetsuro Yamashita, Masaharu Kamo, Yukio Kawamura, y Matsuo Uemura. 2009. «Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation». *Plant and Cell Physiology* 50 (2): 341-59.
doi: 10.1093/pcp/pcn202.
- Minami, Anzu, Akari Furuto, y Matsuo Uemura. 2010. «Dynamic compositional changes of detergent-resistant plasma membrane microdomains during plant cold acclimation.» *Plant Signaling and Behavior* 5 (9): 1115-18. doi:10.4161/psb.5.9.12478.
- Mouritsen, Ole G., y Luis A. Bagatolli. 2015. *LIFE - AS A MATTER OF FAT: Lipids in a Membrane Biophysics Perspective*. Segunda Ed. Springer.
- Murata, Norio, y Dmitry A. Los. 1997. «Membrane fluidity and temperature perception.» *Plant Physiology* 115 (3): 875-79.
doi: 10.1104/pp.115.3.875.
- Nagano, M., K. Takahara, M. Fujimoto, N. Tsutsumi, H. Uchimiya, y M. Kawai-Yamada. 2012. «*Arabidopsis* sphingolipid fatty acid 2-hydroxylases (AtFAH1 and AtFAH2) are functionally differentiated in fatty acid 2-hydroxylation and stress responses». *Plant Physiology* 159 (3): 1138-48. doi: 10.1104/pp.112.199547.
- Noshiro, Masao, y Sakai Akira. 1979. «Freezing resistance of herbaceous Plants».
- Ouellet, Francois. 2007. «Cold acclimation and freezing tolerance in plants». *Encyclopedia of Life Sciences*.
doi: 10.1002/9780470015902.a0020093.
- Palta, Jiwan P., Bruce D. Whitaker, y Laurie S. Weiss. 1993. «Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species.» *Plant Physiology* 103 (1 993): 793-803. doi:10.1104/pp.103.3.793.
- Pata, Mickael O., Yusuf A. Hannun, y Carl K.-Y Ng. 2010. «Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx». *New Phytologist*. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x.
- Ruelland, Eric, Catherine Cantrel, Myriam Gawer, Jean-Claude Kader, y Alain Zachowski. 2002. «Activation of phospholipases C and D is an early response to a cold exposure in *Arabidopsis* suspension cells». *Plant Physiology* 130 (2): 999-1007.
doi: 10.1104/pp.006080.
- Sanghera, Gulzar S., Shabir H. Wani, Wasim Hussain, y N B. Singh. 2011. «Engineering cold stress tolerance in crop plants.» *Current Genomics* 12 (1): 30-43. doi:10.2174/138920211794520178.

- Sprong, Hein, Peter van der Sluijs, y Gerrit van Meer. 2001. «How proteins move lipids and lipids move proteins.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (7): 504-13. doi:10.1038/35080071.
- Stillwell, William. 2013. *An Introduction to Biological Membranes: From Bilayers to Rafts*. Editado por Elsevier. Academic Press.
- Thomashow, Michael F. 2010. «Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway.» *Plant Physiology* 154 (2): 571-77. doi:10.1104/pp.110.161794.
- Torrecillas Sánchez, Alejandro. 2003. «Estudio de las proteínas quinasas C clásicas y su interacción con ligandos y membranas». Universidad de Murcia.
- Uemura, Matsuo, Raymond A. Joseph, y Peter L. Steponkus. 1995. «Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions).» *Plant Physiology* 109 (1): 15-30. doi:10.1104/pp.109.1.15.
- Uemura, Matsuo, y Peter L. Steponkus. 1994. «A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance.» *Plant Physiology* 104 (2): 479-96. doi:10.1104/pp.104.2.479.
- Uemura, Matsuo, y Peter L. Steponkus. 1999. «Cold acclimation in plants: Relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane». *Journal of Plant Research* 112 (2): 245-54. doi:10.1007/PL00013882.
- US Department of Commerce, NOAA, Earth System Research Laboratory. 2016. «Earth System Research Laboratory: Physical Sciences Division : PSD Map Room». Accedido enero 1. <http://www.esrl.noaa.gov/psd/map/>.
- van Meer, Gerrit, Dennis R. Voelker, y Gerald W. Feigenson. 2008. «Membrane lipids: where they are and how they behave». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2): 112-24. doi:10.1038/nrm2330.
- Voet, Donald, y Judith G. Voet. 2006. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.
- Wang, Geliang, Stephen Ryu, y Xuemin Wang. 2012. «Lipases and phospholipases: An overview». En *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, editado por G Sandoval, 861: 3-30. New York, NY: Springer. doi:10.1007/978-1-61779-600-5.
- Walti, Ruth, Weiqi Li, Maoyin Li, Yongming Sang, Homigol Biesiada, Han- E Zhou, C B Rajashekar, Todd D Williams, y Xuemin Wang. 2002. «Profiling membrane lipids in plant stress responses». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31994-2. doi:10.1074/jbc.M205375200.

- Yoshida, Shizuo, y Matsuo Uemura. 1986. «Lipid composition of plasma membranes and tonoplasts isolated from etiolated seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.).» *Plant Physiology* 82 (3): 807-12.
- Zeiger, Eduardo. 2006. *Fisiología Vegetal*. Universitat Jaume I.
- Zhao, Chunzhao, Zhaobo Lang, y Jian-Kang Zhu. 2015. «Cold responsive gene transcription becomes more complex». *Trends in Plant Science* 20 (Figure 1). Elsevier Ltd: 1-3.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138515001478>.