



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de la vía Glucosa-ZmTOR en la
germinación de maíz.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA

Jesús Flores Sánchez

DIRECTOR DE TESIS

Jorge M. Vázquez Ramos



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2019



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:** Profesor: Vázquez Ramos Jorge Manuel
- VOCAL:** Profesor: Plasencia de la Parra Francisco Javier
- SECRETARIO:** Profesor: Pedraza Chaverri José
- SUPLENTE 1:** Profesor: Maldonado Jiménez perla Deyanira
- SUPLENTE 2:** Profesor: Lara Núñez Aurora

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química – UNAM. Conjunto E, Laboratorio 114.

Asesor del tema:

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos

Supervisor técnico:

Dra. Aurora Lara Núñez

SUSTENTANTE:

Jesús Flores Sánchez

Dedicado a mis padres: Teresita Sánchez González y Jesús Adán Flores Camargo. Los mejores padres que Dios pudo darme.

“El mejor legado de un padre a sus hijos es un poco de su tiempo cada día”

-León Battista Aberti

AGRADECIMIENTOS

A los apoyos económicos otorgados en los proyectos, sin los cuales no habría sido posible el desarrollo experimental realizado en este trabajo de tesis:

CONACYT CB220661

PAIP JVR 5000-9124

PAIP ALN 5000-9130

PAPIIT JVR IN215316

PAPIIT ALN IA204817

Contenido

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	2
1. Introducción	3
1.1 El maíz.....	3
1.1.1 Estructura de la semilla del maíz.....	5
1.2 Germinación.....	7
1.3 Ciclo celular	10
1.3.1 Ciclo celular de plantas	13
1.3.2 Regulación del ciclo celular de plantas.....	14
1.3.2.1 Regulación del ciclo celular por azúcares.....	18
1.4 Mecanismos de señalización por glucosa	20
1.5 Objetivo de la rapamicina (Target of rapamycin, TOR)	21
1.6 Inhibidores de TOR.....	24
2. Antecedentes	29
2.1 Azúcares y maíz.....	29
2.2 TOR en maíz.....	30
2.3 TOR en plantas y activación por glucosa	31
2.4 Inhibidores de mTOR probados en plantas.....	32
3. Justificación	35
4. Hipótesis	36
5. Objetivos.....	36
5.1 Objetivo general.....	36
5.1.2 Objetivos particulares.	37
6. Materiales y metodología.	37
6.1 Material biológico.	37
6.2 Imbibición.....	37
6.3 Análisis <i>in silico</i> del locus del gen <i>ZmTOR</i>.....	38
6.4 Análisis de la expresión de genes.....	38
6.4.1 Extracción de RNA.	38
6.4.2 Purificación/Tratamiento con ADNsa I.	39
6.4.3 Preparación de cDNA.....	39
6.4.4 Amplificación por RT-PCR.....	40

6.5 Análisis Microscópico e Histológico (tinción safranina-verde rápido)	41
6.6 Ensayo de incorporación de EdU (ADN de <i>novo</i>)	42
7. Resultados.....	43
7.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>ZmTOR</i>	43
7.2 Efecto del inhibidor de TOR (AZD-8850) en la morfología, peso y longitud de ejes embrionarios a las 24, 48, 72 h y 7 días de imbibición	48
7.3 Tamaño y número de células en el RAM de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR.	52
7.4.1 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen <i>ZmTOR</i>	55
7.4.2 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen <i>CYCD4;2</i>	56
7.4.4 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen <i>ZmKRP3</i> durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.	58
7.5 Síntesis <i>de novo</i> de ADN en ejes embebidos en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR en las regiones meristemáticas a las 24 h de germinación.	59
8. Discusión de resultados	62
8.1 Análisis <i>in silico</i> del gen <i>ZmTOR</i>	62
8.2 Efecto del inhibidor de TOR (AZD-8055) en la morfología, longitud y peso fresco en ejes embrionarios	63
8.3 Efecto del inhibidor de TOR en el tamaño, número de células por unidad de área y síntesis <i>de novo</i> de ADN en ejes embrionarios embebidos durante 24 h. ...	66
8.4 Efecto del inhibidor de TOR en la expresión de genes del ciclo celular y del gen <i>ZmTOR</i>	68
9. Conclusiones.....	71
10. Perspectivas.....	71
11. Referencias	72

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Complejo promotor de anafase
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
CYC	Ciclina
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CKS	Subunidad de CDK
ABA	Ácido abscísico
DP	Socio de dimerización (dimerization parther)
E2F	Factor de unión a promotor de adenovirus E2
KRP	Proteína relacionada con KIP
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBR	Retinoblastoma related protein
TSS	TPR-dominio Supresor de Stimpny
TOR	Objetivo de la rapamicina
Zm	Zea mays
h	horas
URI	Unidades relativas de incorporación

RESUMEN

Clásicamente, la germinación se define como el proceso que inicia con la entrada de agua a la semilla y termina con la protrusión de la radícula. En nuestro grupo de investigación definimos este proceso como la serie de eventos bioquímicos y moleculares desencadenados por la entrada de agua a la semilla seca, y que culminan con la primera ronda de ciclo celular exitosa. Uno de los factores que tiene influencia en el ciclo celular es el estatus nutrimental. Para que una célula en fase G1 decida pasar a la fase S, es necesario que perciba un ambiente con condiciones óptimas, entre estas, la concentración de nutrientes (como azúcares) y hormonas. Dentro de los nutrientes, los azúcares se han reconocido como moléculas duales: 1) como sustratos, donantes de carbono y energía, 2) como señalizadores, activando o inhibiendo procesos claves durante la vida de las plantas, y actúan desde la embriogénesis hasta la etapa de senescencia. En el maíz, ya se ha demostrado que la glucosa promueve la proliferación celular en ejes embrionarios, además modifica la expresión génica de algunos marcadores del ciclo celular como *CYCDs*, *CDKAs* (ciclinas tipo D y tipo A, respectivamente) y *KRPs* (proteínas relacionadas a Kip)

Una de las formas en que las plantas detectan su estatus nutrimental y la presencia de glucosa es mediante la proteína cinasa TOR (Target Of Rapamycin, objetivo de la rapamicina), la que se caracteriza como un regulador maestro en levaduras, plantas, y animales, e integra la señalización de nutrientes y energía para promover la proliferación, el crecimiento y desarrollo celular.

En este trabajo mediante el uso de un inhibidor específico de la cinasa TOR, el AZD-8055, químicamente nombrado como (5-{2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolina-4-yl]pirido[2,3-d]pirimidina-7-yl}-2-metoxifenil) metanol) se estudió la influencia de la señalización Glucosa-TOR a tres niveles: 1) a nivel macro mediante ensayos fisiológicos: los ejes en medio con glucosa se alargaron, tuvieron mayor ganancia de peso y presentaron una morfología enrollada; en presencia del azúcar más el inhibidor, los ejes no presentan aquella fisiología característica, sugiriendo la pérdida de la glucosa como señalizador, pero no como fuente de carbono, 2) a nivel celular mediante cortes histológicos: el tamaño celular, el número de células por unidad de área y la síntesis de ADN de *novo* se modificaron al inhibir la actividad de la cinasa TOR, y 3) a nivel molecular mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa): la expresión del gen *CYCD4;2* está regulada positivamente por la vía Glucosa-TOR, mientras que la expresión del gen *CDKA;1* se reguló negativamente por esta vía.

En el maíz, la inhibición de la vía de señalización Glucosa-TOR provoca una alteración en el metabolismo, crecimiento y proliferación celular, también modifica la morfogénesis y organización celular. La expresión del gen *ZmCYCD4;2* está regulada por la vía Glucosa-TOR, mientras que la del gen *ZmCDKA1;1* podría estar regulada negativamente. La expresión del gen *ZmKRP3* es estimulada por glucosa, pero es independiente de la actividad de la cinasa TOR.

1. Introducción

1.1 El maíz.

El maíz es una planta originaria de América, se considera como el cereal de los pueblos y culturas del Continente Americano. Las antiguas civilizaciones de América, desde los olmecas y teotihuacanos en Mesoamérica, hasta los incas y quechuas en la región andina de Sudamérica, estuvieron acompañadas en su desarrollo por esta planta (Serratos, 2009). Para los habitantes de las civilizaciones mesoamericanas antiguas tuvo gran importancia en la religión, representaba algunas de sus deidades y fue la base para un sin número de relatos míticos. Por ejemplo, el Popol Vuh, uno de los textos mayas más importantes que se conservan, narra la creación del hombre a partir del maíz (Saravia, 1965).

Aunque por décadas se han hecho estudios acerca del origen del maíz, no se han resuelto por completo todos los detalles que permitan explicar su origen y domesticación. Muchos investigadores están convencidos, por la considerable cantidad de datos moleculares, citológicos e isoenzimáticos acumulados en la ancestría del maíz, que probablemente descende de una especie anual de teocintle (*Zea mays ssp. Parviglumis*) nativa del Valle del río Balsas en las laderas del Pacífico de los estados de Michoacán, Guerrero, Estado de México (Piperno & Flannery, 2001).

Se ha propuesto la teoría de que los antiguos habitantes nómadas de la región del Valle de México realizaron una constante selección de plantas de teocintle con características deseadas, selección que produjo una nueva especie, que fenotípicamente difiere enormemente pero genéticamente es muy similar a su ancestro (Piperno et al., 2009; Vela, 2011).

El maíz, es una planta herbácea, monocotiledónea, de crecimiento anual (Raven et al., 1992), pertenece a la familia de las gramíneas o *Poaceae* (Tabla 1) y es la única especie cultivada de este género.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (Departamento de Agricultura, USA, (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ZEMA>))

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta (Plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (Plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (Plantas con flores)
Clase	Liliopsida (Monocotiledóneas)
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>

La planta del maíz ha sido usada por el hombre desde hace 10,000 años (Mangelsdorf, 1938). En este tiempo se ha convertido en uno de los tres cereales (junto con el arroz y el trigo) más cultivados del mundo. Se estima que en 2012 la producción mundial total de maíz fue 875, 226,630 toneladas, teniendo Estados Unidos, China y Brasil 31%, 24% y 8% de la producción total, respectivamente (FAO, La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2012). En México, el maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante, tanto desde el punto de vista alimentario, como industrial, político y social. En 2014, se estimó una producción de alrededor 23,273,257 toneladas, con un consumo promedio de 343 gramos diarios por persona (FOASTAT, La Base de Datos Estadísticos para la Agricultura y la Alimentación, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, consultado en diciembre 2018).

El maíz se utiliza principalmente como alimento, además es una materia prima básica en la industria con la que se producen gran variedad de productos alimentarios como aceites comestibles, almidón, jarabe, dextrosa, jarabe de alta fructosa, alcoholes, etc. (Paliwal et al., 2001). Además de su importancia cultural, como alimento y combustible, el maíz ha cobrado gran importancia en el ámbito científico, durante años se ha utilizado como modelo para estudios de biología, bioquímica y genética vegetal.

1.1.1 Estructura de la semilla del maíz.

La semilla de maíz madura (o cariopsis) pertenece a la categoría de “semillas ortodoxas”, término que se refiere a aquellas semillas que son producidas por plantas anuales o bienales. La semilla está compuesta por las siguientes estructuras (Figura 1):

El pericarpio, es la capa externa transparente que cubre la semilla y actúa como una protección para el embrión y el endospermo (MASISH, 2015). Se caracteriza por estar impregnado de ceras y grasas, así como de células mucilaginosas que revientan al contacto con el agua, actuando como una barrera que retiene el agua alrededor de la semilla. En el pericarpio se distingue el hilio, que es una inserción del funículo con la semilla, y el micrópilo, un orificio que permite el acceso del aire y agua al embrión, por este orificio emerge la radícula al germinar la semilla.

El endospermo, de color amarillo o blanco, contiene material de reserva en forma de almidón (87%), proteínas (8%) y grasas (menos del 1%), y es usado como la principal fuente de nutrientes por el embrión durante la germinación y formación de la plántula. En la parte externa del endospermo, se localiza la estructura denominada aleurona, que consiste en una capa de células vivas que rodean al endospermo, quienes sintetizan enzimas hidrolíticas (como la α -amilasa, entre otras) para degradar el almidón durante la post-germinación.

El escutelo, único en el maíz, es la estructura gruesa que se ubica entre el endospermo y el embrión. Está constituido por lípidos y proteínas, funciona como fuente de energía para la planta en su desarrollo.

El embrión contiene el eje embrionario, el cual cuenta con la información bioquímica y molecular para dar origen a una nueva planta de maíz. En el eje embrionario se encuentran distintas estructuras, en su extremo basal se localiza el meristemo radicular, que dará origen a la raíz primaria una vez rota la coleoriza (estructura que sirve de protección a la raíz primaria durante la germinación) y en el extremo apical, la plúmula, que dará origen a la parte aérea de la plántula (Vincent, 2002).

La plúmula se divide en 5 o 6 nodos, de los cuales surgirá una hoja de cada uno durante el desarrollo de la planta. Del primer nodo surge el escutelo (nodo

escutelar), del siguiente nodo (nodo coleoptilar) surge el coleoptilo, una estructura que sirve como cubierta protectora de la plúmula durante el brote de ésta. El espacio entre el nodo escutelar y el coleoptilar se denomina mesocotilo, el cual se alarga rápidamente durante la germinación para permitir que el coleoptilo emerja del suelo y junto con él, las hojas (Vincent, 2002). El pedicelo es la estructura que une a la semilla con la mazorca.

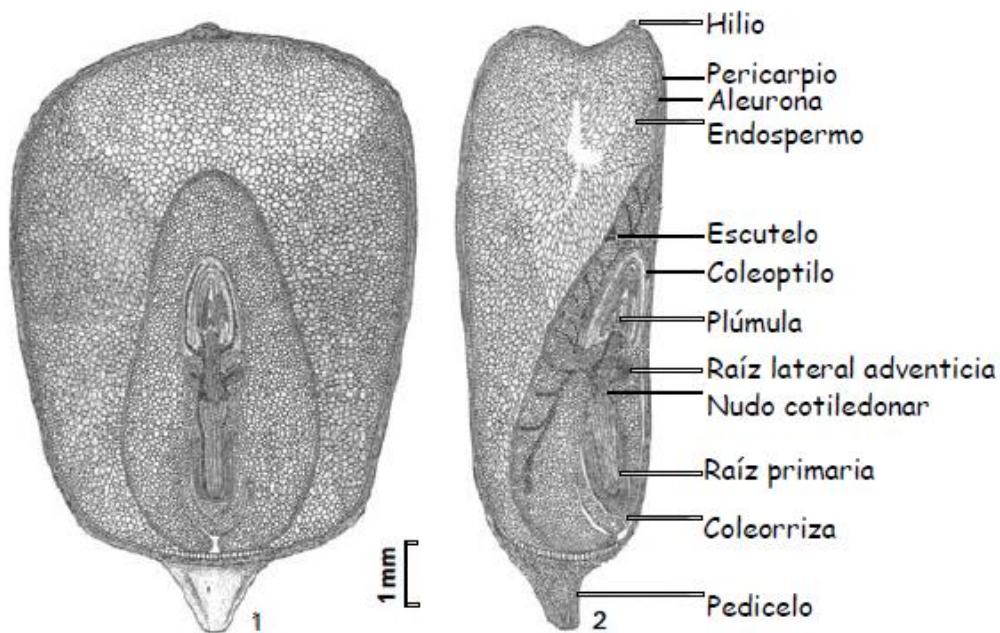


Figura 1. Estructura de una semilla de maíz. Secciones verticales de la semilla de maíz con los diferentes órganos y tejidos que la conforman. 1) vista de frente y 2) vista de perfil (Modificado de Vincent, 2002)

1.2 Germinación

El proceso de germinación involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de sus procesos de desarrollo, que dan lugar a la activación de la maquinaria bioquímica que convertirá un embrión en una planta. Esto implica que la semilla ya contiene, o adquirirá a la brevedad la memoria bioquímica del programa morfogenético que desarrolla una planta (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). Como consecuencia de la entrada de agua (imbibición) las células en los tejidos de la semilla se alargan y, finalmente se dividen, un proceso que es concomitante con, o seguido de la protrusión radicular, este evento se define como el final del proceso de la germinación fisiológica. En general, las células (meristemáticas) en la punta de la raíz son las primeras en ser activadas, para entrar a ciclo celular y proliferar (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Como ya se mencionó, el proceso de germinación inicia con la entrada de agua a la semilla madura, y termina con la protrusión de la radícula (Bewley & Black, 1994). En nuestro grupo de investigación hemos adoptado una definición molecular de la germinación basada en procesos bioquímicos, moleculares y celulares. Definimos a la germinación como la serie de eventos bioquímicos y moleculares desencadenados por la entrada de agua, que llevan a las células a la consecución exitosa del primer ciclo celular, esencial para la proliferación requerida para el establecimiento de la plántula (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

El proceso de toma de agua por una semilla es trifásico, relacionado en función del tiempo y la entrada de agua (Figura 2). En la Fase I hay una absorción rápida de agua (fase de imbibición), proceso principalmente físico que activa el metabolismo que permite la recuperación de daños estructurales (generados durante el proceso de maduración de la semilla). Después ocurre una entrada constante de agua, Fase II, donde la actividad metabólica incrementa con la transcripción sustancial de nuevos genes. En la Fase III, ocurre la protrusión de la radícula a través de estructuras circundantes, proceso que marca el fin de la germinación fisiológica. Durante esta última fase ocurre otra toma importante de agua a medida que se

establece la planta, junto con una mayor utilización de reservas nutricionales almacenadas (Bewley, 1990).

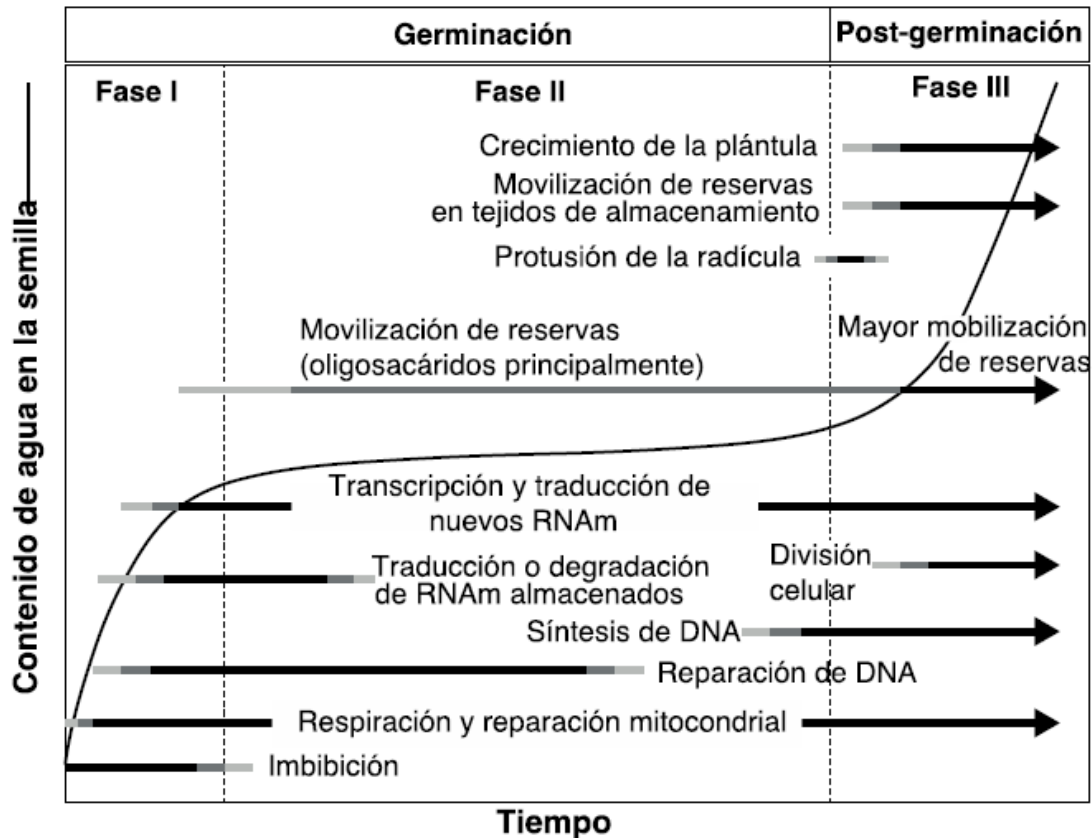


Figura 2. Curso temporal de la toma de agua y algunos eventos importantes asociados a la germinación. El esquema representa los procesos celulares que se llevan a cabo en la semilla durante la germinación en relación al tiempo y a la entrada de agua. Se observan flechas en escala de grises, siendo el color más claro un proceso menos representativo y el color negro un proceso más representativo en determinada fase (modificado de Black et al., 2006).

En la fase I, con el inicio de la absorción rápida de agua, un proceso meramente físico, se activa el metabolismo que permite la reparación de macromoléculas y estructuras dañadas durante el proceso de maduración de la semilla y oxidación (Bewley et al., 1990). Además, con la entrada de agua la semilla seca rápidamente reanuda la actividad respiratoria y las vías glucolíticas, la vía de las pentosas fosfato

y se activan las enzimas que participan en el ciclo de Krebs (Nicolás, 1979; Salón et al., 1988). Las mitocondrias en las células de los tejidos de la semilla seca contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs para proveer cantidades adecuadas de ATP para mantener el metabolismo activo por varias horas después de la imbibición (Ehrenshaft & Brambl, 1990; Attucci et al., 1991).

Además de a la reactivación del metabolismo energético durante la germinación, se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Todos los componentes necesarios para la reanudación de la síntesis de proteínas durante la imbibición están presentes dentro de las células de la semilla seca. Durante el almacenaje y maduración de la semilla se han encontrado ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNAs) almacenados o mensajeros remanentes que pueden ser utilizados en etapas tempranas de la germinación (Comai & Harada, 1990; Ishibashi & Minamikawa, 1990). En los primeros minutos de rehidratación por la imbibición, los ribosomas se juntan para formar el polisoma, complejo que sintetiza las proteínas utilizando los mRNAs existentes (Bewley & Black, 2006). A lo largo del proceso germinativo se transcriben también nuevos mRNAs que codifican proteínas esenciales para el metabolismo celular y el mantenimiento del crecimiento y la proliferación (Bewley & Marcus, 1990).

Aunque la germinación tiene un rápido efecto sobre los procesos de síntesis de proteínas y de RNAs, la síntesis replicativa de ADN comienza más tarde. A pesar de que las células del embrión se encuentran en fase G1, durante la imbibición, la entrada a ciclo celular no es inmediata. Muchas células de tejidos meristemáticos que pueden proliferar contienen ADN en fase G1, pero metabólicamente se encuentran en un estado especial denominado G0, el cual se caracteriza por la ausencia de señales que favorecen la proliferación (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003); por ello existe un retraso de varias horas antes de que la fase S se vuelva evidente (Osborne, 1983). Por otra parte, la fase M y la división celular ocurren después de la protrusión de la radícula (Black & Bewley, 2006), lo que posiblemente indica que solo las fases iniciales del ciclo celular son necesarias para completar la germinación, esto se observó en ensayos realizados en maíz donde se muestra que

hay protrusión de la radícula, aun cuando se inhibe la fase M con colchicina (Baiza et al., 1989). Estos resultados podrían sugerir que la protrusión de la radícula no es metabólicamente el final de la germinación sino un proceso meramente mecánico acontecido por la elongación celular.

Con la protrusión de la radícula finaliza la germinación y marca el inicio del crecimiento de la nueva planta. En las células de la radícula, durante la imbibición se presentan dos fases de síntesis de ADN (Figura 2). La primera ocurre posterior a la imbibición e implica la reparación del ADN dañado durante la maduración de la semilla seca y la rehidratación de la misma, así como la síntesis de ADN mitocondrial. La segunda fase está asociada a la síntesis durante la división celular en células germinativas (Zlatnova et al., 1987; Osborne, 1983).

En diferentes aproximaciones experimentales se ha indicado que, aunque no es necesario que la división celular ocurra de manera visible durante la germinación, el establecimiento del ciclo celular es un evento esencial para el crecimiento de la plántula y, por lo tanto, su estudio durante la germinación es fundamental. (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

1.3 Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso biológico muy complejo y tiene un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de los organismos multicelulares. Los mecanismos moleculares que lo definen todavía no son del todo claros y se ha visto que el proceso por el cual ocurre presenta características que se conservan entre plantas y animales (Meyerowitz, 2002), aunque existen procesos que varían en tiempo y forma en un organismo u otro.

El ciclo celular se ha definido como la progresión ordenada de eventos moleculares que culminan con la duplicación y segregación de los cromosomas en dos células hijas durante la mitosis, este proceso es regulado por cascadas de fosforilación y desfosforilación de proteínas (Magyar et al., 2013).

El ciclo celular consiste en diversas fases (Figura 3). Las fases S y M son las fases activas y cada una es precedida por fases *gap* o interfases de preparación (G1 y

G2). En la primera fase (G1), la célula percibe las condiciones idóneas internas y externas (estatus nutrimental y fitohormonas) que activan la expresión de genes de CycD, lo que desencadena mecanismos de señalización y a su vez respuestas bioquímicas que marcan el inicio del ciclo celular.

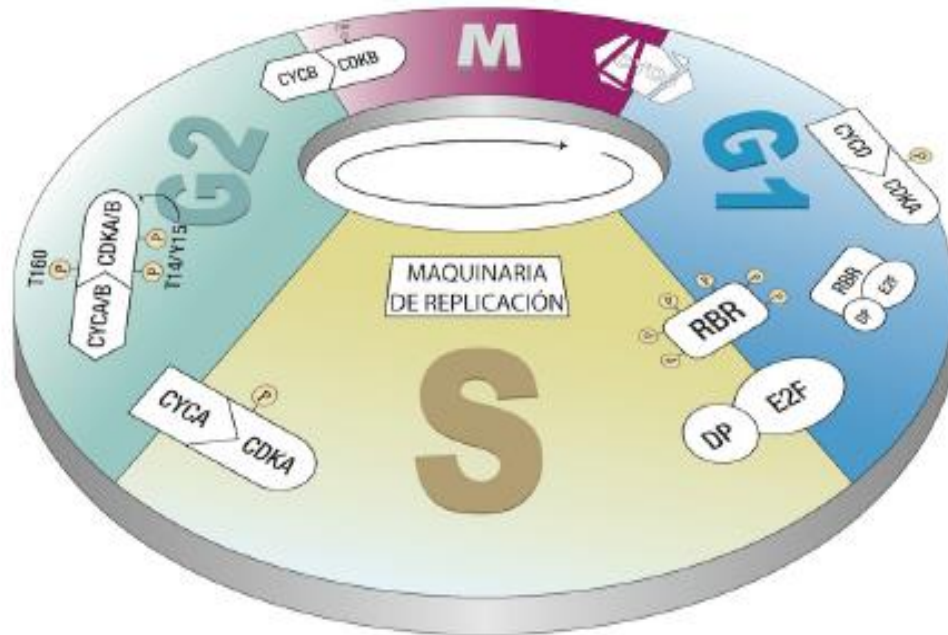


Figura 3. Esquema general de las fases del ciclo celular y principales componentes que participan en cada una de ellas. Convencionalmente el ciclo comprende cuatro fases: Gap1 (G1), S (fase de síntesis), Gap2 (G2) y M (mitosis). Las fases S y M se denominan fases activas y cada una es antecedida por fases de preparación o fases gap (G1 y G2). Modificado de Garza-Aguilar et al., 2014).

Si las condiciones percibidas por la célula son las idóneas, continúa la progresión a la fase S o fase de síntesis de ADN, donde la célula replica su material genético, el cual será repartido en dos nuevas células. Durante la siguiente fase (G2) se asegura que la duplicación del genoma se haya realizado de manera completa y exitosa, de no ser así se activan los mecanismos de reparación necesarios para poder continuar a la fase de segregación de las cromátidas, la Fase M o mitosis (Alberts et al., 1994, Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

La mitosis, a su vez se encuentra dividida en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. En la profase la membrana nuclear se desintegra, se

condensa la cromatina formándose los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En la anafase las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las nuevas envolturas nucleares rodean a todos y cada uno de los cromosomas separados, éstos se descondensan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis (Alberts et al., 1994; Magyar et al., 2013). Las fases deben llevarse a cabo ordenadamente y cada una debe completarse antes de que la siguiente fase inicie. Para eso, es esencial que las distintas fases del ciclo celular estén coordinadas con precisión.

El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células hijas, sino asegurar que la progresión del ciclo se realice en forma debida y con el control y regulación adecuados. Desde un punto de vista holístico, la maquinaria básica encargada del progreso y regulación del ciclo celular está conformada por proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que, junto con diferentes ciclinas (CYC), forman complejos heterodiméricos CYC/CDK encargados de fosforilar una gran variedad de proteínas blanco en los puntos de control G1/S, G2/M y en mitosis (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

Las CDKs son una familia de proteínas cinasas de serinas y treoninas (Ser/Thr), las cuales regulan las diferentes fases del ciclo celular por cambios en su actividad enzimática que conducen a la fosforilación de proteínas intracelulares que regulan los principales eventos del ciclo. Por definición, la concentración de las CDKs se mantiene constante a través del ciclo y su activación requiere de la unión de su subunidad Cyc, la cual fluctúa a lo largo del ciclo celular, permitiendo cambios en la actividad de las CDKs (Alberts et al., 1994; Morgan, 2007).

Durante el ciclo celular existen tres puntos principales de control: 1) la entrada a fase S (transición G1/S) representa generalmente el punto de compromiso con el proceso de división celular, 2) la entrada a mitosis (transición G2/M) y 3) en la salida de mitosis (transición de metafase a anafase, Alberts et al., 1994; Magyar et al., 2013).

1.3.1 Ciclo celular de plantas

El estudio del ciclo celular en plantas se ha incrementado exponencialmente en los últimos años y se ha demostrado que los principios básicos del ciclo celular están conservados. A pesar del hecho de haber diferencias claras entre plantas y animales en la forma en la cual las células están estructuradas y organizadas, el crecimiento, desarrollo y diferenciación, aspectos que pudieron haber producido diferencias importantes en la regulación del ciclo, son muy similares entre ellos, así como las proteínas y procesos involucrados (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

En contraste con los animales, el desarrollo de las plantas es principalmente post-embriónico. Nuevos órganos como raíces, tallos, hojas, flores, se originan por divisiones iteradas a lo largo de la vida de la planta seguidas por el crecimiento celular y su diferenciación. Tales divisiones celulares ocurren en zonas especializadas llamadas meristemos. Las hojas y flores se forman en los meristemos de brotes apicales y florales, respectivamente, mientras que los meristemos de raíz continuamente añaden nuevas células a la raíz en crecimiento. Las células del meristemo son pluripotentes de manera que su progenie puede ser encomendada a diversos fines durante el desarrollo. En principio, el meristemo apical de tallo produce hojas, pero bajo condiciones ambientales y de desarrollo adecuadas se puede convertir en un meristemo floral que producirá flores (Inzé, 2006).

A partir de la secuenciación del genoma del modelo de estudio en plantas, *Arabidopsis thaliana*, se sabe que la totalidad de los genes del ciclo celular es aún más compleja en plantas que en mamíferos. El número de genes que codifican para las proteínas reguladoras participantes en el ciclo celular como CDKs, ciclinas, inhibidores de CDKs es mayor a los encontrados en humanos (Vandepoele et al., 2002) debido a la vida sésil de las plantas.

Las plantas no pueden escapar de las condiciones adversas a las cuales se ven sujetas, deben adaptarse ajustando sus programas de desarrollo en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales que se presenten y así, tener un mayor número de genes de ciclo celular posibilita un ajuste preciso en su desarrollo

permitiendo a las plantas, además colonizar diferentes hábitats. Se ha demostrado que algunas ciclinas son afectadas diferencialmente por reguladores del ciclo vegetal como citoquininas, brasinosteroides y azúcares como la sacarosa (De Veylder et al., 1999; Riou-Khamichi et al., 2000)

1.3.2 Regulación del ciclo celular de plantas

El control del ciclo celular juega un papel esencial para el establecimiento exitoso de la germinación y la plántula. Diferentes y complejos niveles de regulación que convergen a lo largo de la germinación son orquestados por la actividad de complejos proteicos. Por ejemplo, la regulación transcripcional de los genes relacionados con el ciclo celular es esencial para coordinar la progresión del ciclo celular con el programa morfogénético, así como con los insumos ambientales y nutricionales (Sablowski & Dornelas, 2013).

Los mecanismos de control del ciclo celular están dados por la fosforilación reversible de proteínas, por interacciones proteicas y por la degradación específica de proteínas. El avance del ciclo celular es orquestado por la actividad de los complejos CYC/CDKs, los cuales pueden ser regulados a diferentes niveles como: la expresión de sus genes, síntesis y degradación de las correspondientes proteínas, modificaciones post-traduccionales, localización de los complejos, así como la interacción con otras proteínas (Garza et al., 2014)

Se han descrito varias proteínas que se asocian directamente al complejo CYC/CDK, y que están involucradas en su regulación: la proteína CKS (subunidad de CDK) que actúa como factor de acoplamiento del sustrato al complejo (Vandepoele et al., 2002); proteínas inhibidoras de CDKs, conocidas como KRPs en plantas (ICK en mamíferos), quienes se unen e inhiben a los complejos en respuesta a señales de desarrollo y antimitógenos (De Clerq & Inzé, 2006); proteínas cinasas que activan o inhiben CDKs como CAK (Cinasas activadoras de CDKs) y WEE1 respectivamente; entre otras (Pines, 1995).

En la transición G1/S (Figura 4), la presencia de factores de crecimiento y hormonas promueve la asociación de las ciclinas D (CYCD) con cinasas dependientes de ciclina tipo A (CDKA) formando el complejo CDKA-CYCD activado mediante la fosforilación de la treonina 160 de la CDK. En respuesta a estímulos antimitógenos como ácido abscísico (ABA) o bajas temperaturas, las proteínas KRPs (Proteínas relacionadas a Kip) pueden inhibir al complejo CDKA-CYCD. El complejo CDKA-CYCD puede activar la transición G1/S mediante dos vías, activando la destrucción del complejo represor de la transcripción E2F/DP/RBR por la vía del proteasoma (mediante la SCF E3 ubiquitin-ligasa) y, por otro lado, mediante la fosforilación de RBR (retinoblastoma Related), proteína que reprime la actividad de los factores de transcripción E2F/DP, provocando la pérdida de afinidad por el factor transcripcional E2F, lo que desencadena la activación de genes blanco de E2F y permite el avance del ciclo hacia la fase S, donde ocurre la replicación del ADN (Inzé et al, 2006). El concepto convencional de la regulación del ciclo celular se basa en la cascada conservada evolutivamente CYC-CDK-RBR-E2F.

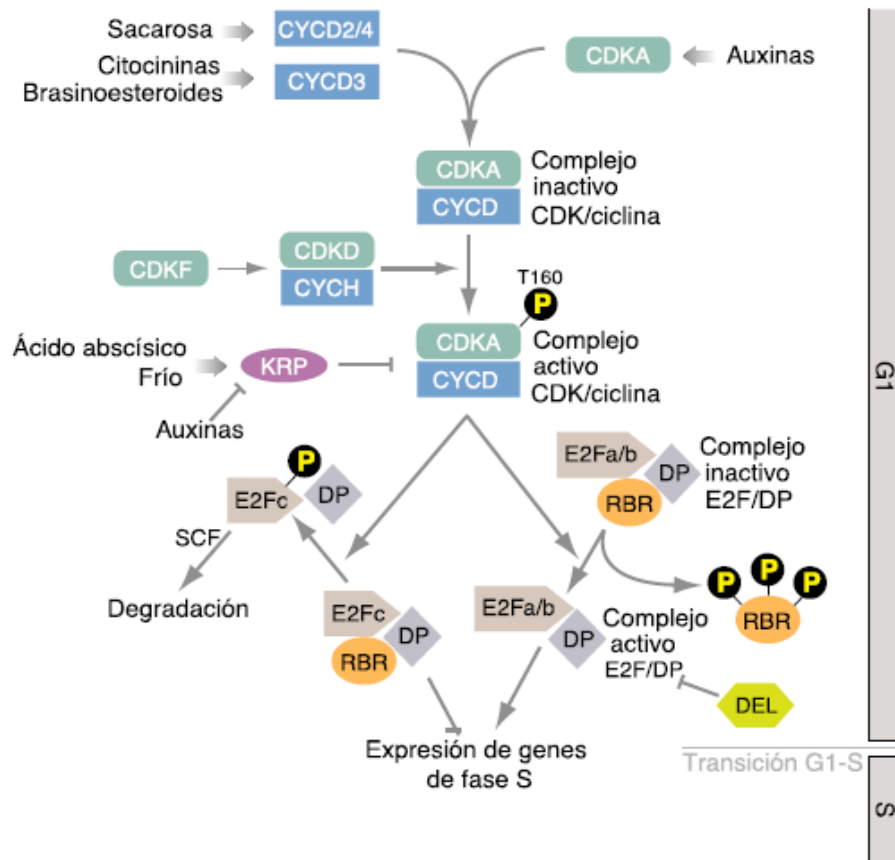


Figura 4. Transición G1/S del ciclo celular. Representación esquemática de la regulación del ciclo celular en las transiciones G1/S en plantas (Modificado de Inzé, 2006). Abreviaturas: CYC (ciclina), CDKs (cinasas dependientes de ciclina), KRP (proteínas relacionadas con Kip), E2F (factor de transcripción 2), DP (socio de dimerización de E2F), SCF (Skp1-Cullin-F-complejo proteico de caja F), RBR (proteína del retinoblastoma), DEL (DP-E2F-Like), P (fosforilación).

En la fase G2 (Figura 5) se verifica la integridad del genoma duplicado en la fase S, ciclina de los tipos A, B y probablemente D (CYCA, CYCB, CYCD) se asocian con CDKs tipo A y B (esta última proteína identificada solo en plantas ya que carece de homólogos en levaduras y mamíferos). Se ha encontrado que algunas CDKB están bajo el control transcripcional de la vía E2F enlazando así las transiciones G1/S y G2/M (Inzé et al., 2006; Magyar et al., 2013).

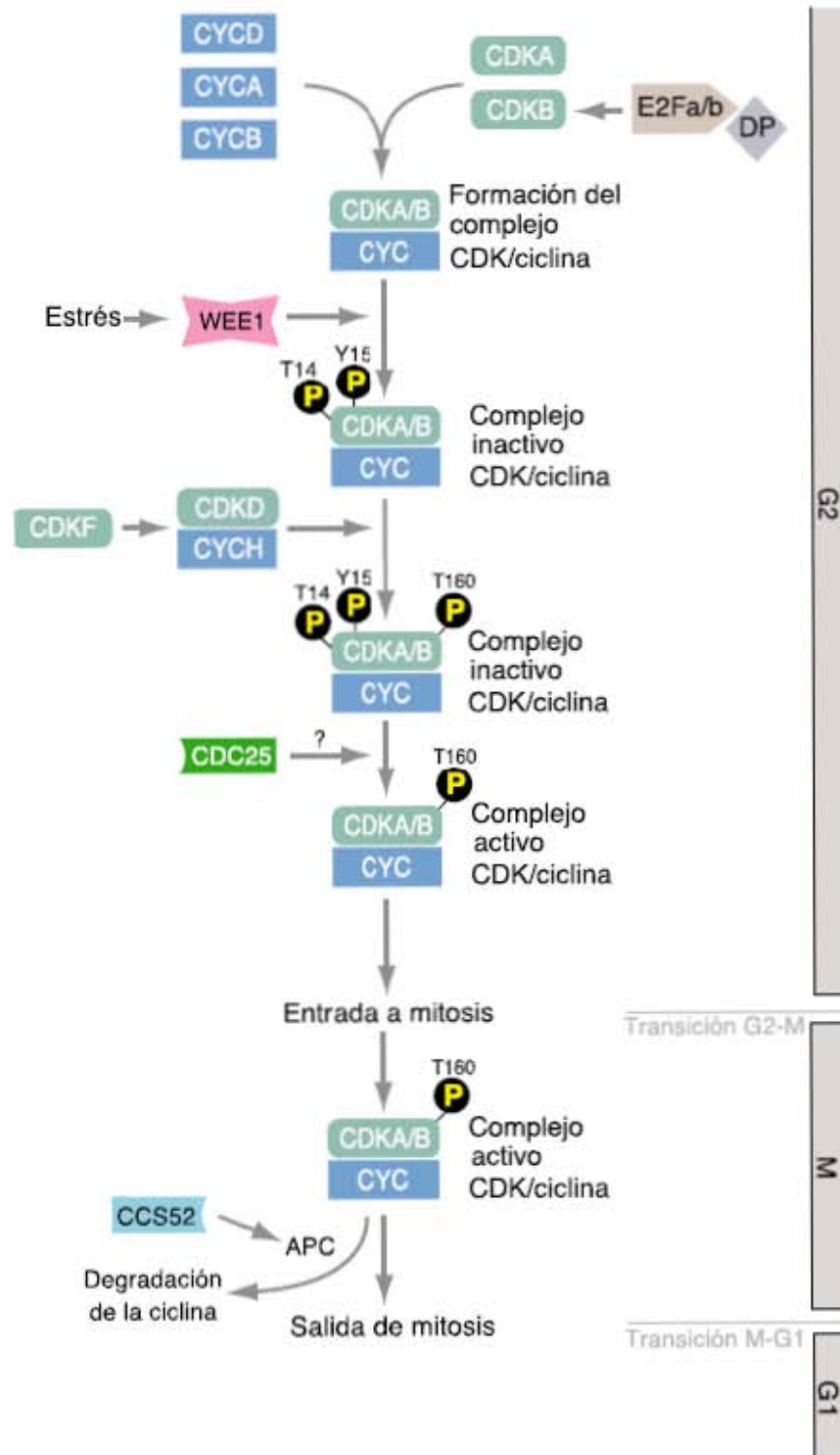


Figura 5. Transición G2/M del ciclo celular. Representación esquemática de la regulación del ciclo celular durante la transición G2/M en plantas. (Modificado de Inzé, 2006). Abreviaturas: CYC (ciclina), CDKs (cinasa dependiente de ciclina), E2F (factor de transcripción 2), DP (socio de dimerización de E2F), WEE1 (cinasa de punto de control G2), CDC25 (ciclo de división celular 25 homólogo A), APC (complejo promotor de anafase), P (fosforilación).

Durante la transición G2/M la actividad de las CDKs puede ser regulada negativamente por otra familia de cinasas llamada WEE, que son activadas por condiciones como la pérdida de la integridad del ADN, evitando así la entrada a mitosis hasta que las condiciones del genoma sean las adecuadas. Se sugiere que una fosfatasa tipo CDC25 remueve los grupos fosfato inhibidores presentes en las CDKs, pero tal fosfatasa aún no ha sido identificada en plantas. Una vez que los complejos CDK-CYC están activos, la célula entra a la fase M (mitosis) para segregar el material genético en dos células hijas y finalmente dividirse. La salida de mitosis requiere la destrucción proteolítica de las subunidades de ciclina iniciada por el complejo promotor de anafase (APC) mediante su asociación con la proteína CCS52 (Inzé, 2006).

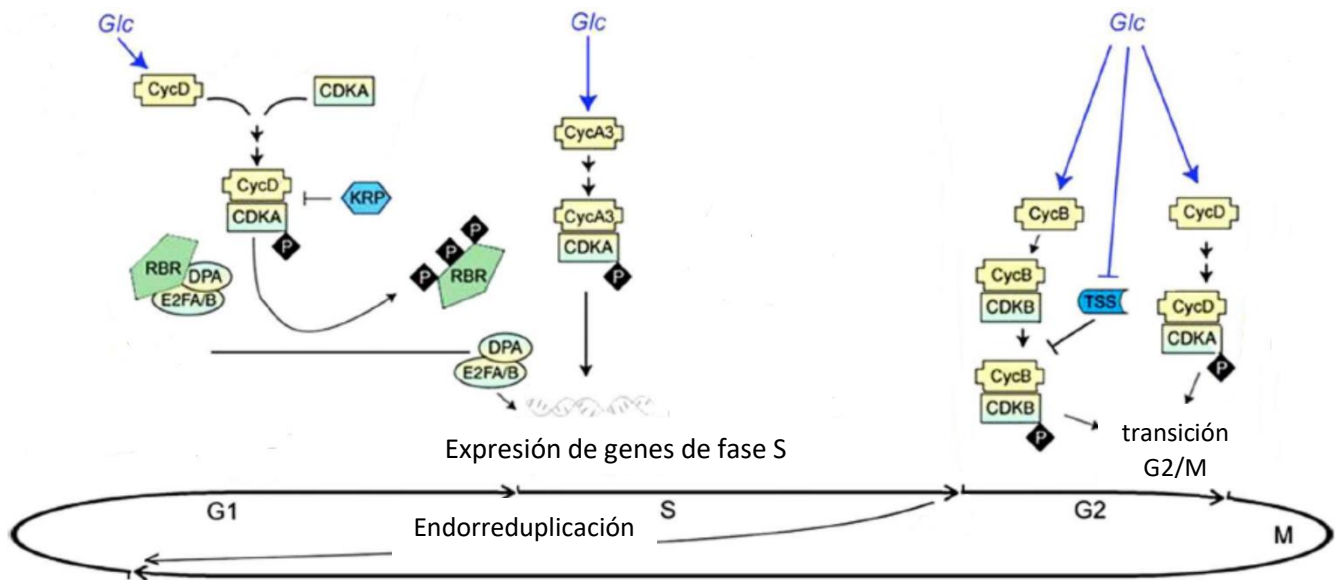
1.3.2.1 Regulación del ciclo celular por azúcares

El ciclo celular es esencial para la germinación, desarrollo y establecimiento de las plántulas. Para que una célula decida pasar a la fase S, es necesario que perciba un ambiente con condiciones óptimas, entre éstas, un estado nutricional adecuado, en el que la concentración de nutrientes (como azúcares) es un factor sustancial durante la vida de la planta. Una semilla no puede germinar sin el adecuado aporte de carbono y energía proveniente de los tejidos de almacenamiento. Por lo tanto, la regulación del metabolismo de carbohidratos tiene efectos importantes en el desarrollo de las plantas, especialmente durante la división, elongación y diferenciación celular. Además, los carbohidratos se han implicado en diversos procesos importantes para las plantas, desde la embriogénesis, germinación, elongación del hipocótilo, formación de raíces adventicias, floración, hasta la etapa de senescencia (Gibson, 2005).

Los azúcares se han reconocido como componentes duales: como sustratos metabólicos, donantes de carbono y energía, así como moléculas señalizadoras, activando o inhibiendo procesos claves durante la etapa de vida de las plantas (Rolland et al., 2006; Ramon et al., 2008)

Se ha propuesto que azúcares como glucosa y sacarosa son moléculas regulatorias clave en la fisiología celular, en el ciclo celular, crecimiento y la expresión de genes. En células en suspensión de *Arabidopsis*, algunos marcadores relacionados con el ciclo celular se modifican a diferentes niveles y en distintas fases del ciclo (Figura

6). La expresión de *CYCD2* y *CYCD3* es estimulada por glucosa y sacarosa, y en presencia de sacarosa, la actividad cinasa de los complejos *CYCD2* y *D3/CDK* aumenta hasta seis veces (Riou-Khamlichi et al., 2000). También, en *Nicotiana tabacum* se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de glucosa y la expresión de *CYCA3;2* y *CYCB1;2* (Hartig & Beck, 2006), ciclinas que se requieren para conducir las transiciones G1/S y G2/M, respectivamente (Menges et al., 2005). En un estudio en tejidos meristemáticos de *Arabidopsis* se ha demostrado que la señal por glucosa es capaz de iniciar la transición G2/M al reprimir la transcripción del regulador negativo TPR-dominio Supresor de Stimpy (TSS), activando la expresión de componentes clave requeridos para la transición G2/M, como *CYCB1;1* y *CDKB1,1* (Figura 6; Skylar et al., 2011).



regulada por la glucosa, ciclina requerida para conducir a las células desde la fase G1 a S. La señal por glucosa es capaz de iniciar la transición G2/M mediante la represión de la transcripción de TSS y la activación de la expresión de genes clave para la transición G2/M, como *CycB*, *CDKB* y *CycD*. Abreviaturas: CYC (ciclinas), CDKs (cinasas dependientes de ciclinas), KRP (proteínas relacionadas con Kip), E2F (factor de transcripción 2), DP (socio de dimerización de E2F), SCF (Skp1-Cullin-F-complejo proteico de caja F), RBR (proteína del retinoblastoma), P (fosforilación), Glc (glucosa), TSS (TPR-dominio Supresor de Stimpy). Modificado de Wang & Ruan, 2013.

En otros organismos como en *Vicia faba* se ha sugerido que la glucosa y la sacarosa actúan en formas casi opuestas durante el desarrollo de las semillas de leguminosas, la glucosa en los tejidos vegetales promueve la división celular, mientras que la sacarosa está asociada con la expansión celular y la síntesis de almidón (Borisjuk et al., 2003; Eveland & Jackson, 2011).

En células en suspensión de tabaco se ha observado una correlación positiva entre los niveles de expresión de varias ciclinas (*CYCD2;1*, *D3;2*, *A3;2* y *B2;1*) y la concentración de glucosa, la duración de la fase S y G2 puede ser modificada al variar los niveles de glucosa (Hartig & Beck, 2006).

1.4 Mecanismos de señalización por glucosa

La investigación acerca de la señalización por glucosa ha sido bastante desafiante debido a las dificultades para separar el metabolismo de glucosa de los eventos de detección y señalización que provoca. Con el desarrollo de nuevas estrategias e innovadoras herramientas de biología molecular, el uso de análogos estructurales de distintos azúcares, inhibidores del metabolismo, se ha logrado dilucidar el papel de la glucosa como señalizador celular (Xiong et al., 2013; Xiong & Sheen, 2014)

En los últimos años, en el modelo de estudio *A. thaliana* se ha comenzado a averiguar una amplia gama de funciones y acciones de reguladores maestros modulados por la señalización de glucosa, conocidos también como 'sensores': entre ellos la Hexocinasa 1 (HXK1), la Subunidad Catalítica de la Proteína Cinasa Relacionada con SNF1 (KIN10/11), el Regulador de Señalización de Proteína G-1 (RGS1) y el Objetivo de la Rapamicina (TOR). Estos reguladores controlan la expresión de miles de genes implicados en muchas funciones celulares desde señalización, transcripción, anabolismo, catabolismo, transporte, hasta el crecimiento, desarrollo y adaptación al estrés en respuesta a señales de diferentes azúcares o metabolitos derivados (Rolland et al., 2006; Baena-González & Sheen 2007; Ramón et al., 2008; Smeeckens et al., 2010; Robaglia et al., 2012; Dobrenel et al., 2013; Xiong & Sheen, 2014).

Recientemente, se encontró que la proteína TOR funciona río arriba o en paralelo con la vía E2F-RBR1 en la estimulación de la entrada al ciclo celular. En plantas, la presencia de glucosa, vía TOR, desencadena la proliferación celular en los meristemos de raíz, siendo el factor E2F un blanco de la cinasa TOR, cuya fosforilación por la señalización de la vía Glucosa-TOR es un paso clave para la entrada a la fase S del ciclo celular (Xiong et al., 2013).

En este trabajo nos enfocaremos en uno de los reguladores maestros, la cinasa TOR.

1.5 Objetivo de la rapamicina (Target of rapamycin, TOR)

La proteína TOR es una cinasa altamente conservada en levaduras, plantas y humanos. Pertenece a la familia de cinasas de serina/treonina conocidas como PIKK (cinasas relacionadas a la fosfatidilinositol-3-cinasa; Engelman et al., 2006). TOR se identificó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman et al., 1991). Se han identificado dos genes en levaduras, mientras que estudios posteriores revelaron que solo existe un gen en *A. thaliana* al igual que en mamíferos (Wullschlegel et al., 2006; Robaglia et al., 2012).

Estructuralmente TOR se conserva entre mamíferos y plantas (Figura 7); en el extremo amino presenta múltiples repeticiones y dominios reguladores, las repeticiones HEAT (Huntingtin, Elongation factor 3, subunit of PP2A, TOR1), implicados en la mediación de interacciones proteína-proteína y asociaciones de membrana (Andrade y Bork, 1995; Salih et al., 2005; Kunz et al., 2000). La región C-terminal está compuesta por los dominios FAT/FACT, los cuales son característicos de la familia PIKK (Bosotti et al., 2000). El dominio FAT (FERAP, ATM, and IRRAP) consiste en repeticiones HEAT y TPR (repetición tetratricopéptido) y se encuentra poco conservado entre los distintos miembros de la familia PIKK, mientras que el dominio FATC (FERAP, ATM and IRRAP C-terminal) se encuentra altamente conservado. Ambos dominios contribuyen con las interacciones y activación de la proteína TOR (Hardt et al., 2011) y un dominio cinasa. Seguido al

dominio FAT se encuentra el dominio FRB (FKBP12–rapamycin-binding domain), una región específica de las proteínas TOR donde se une el complejo inhibitorio FKBP12-rapamicina (Figura 7).

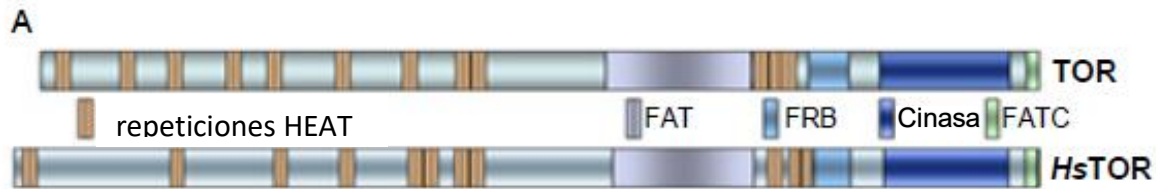


Figura 7. Dominios de TOR conservados entre humanos y Arabidopsis. (Modificado de Xiong & Sheen, 2012). Abreviaturas: HEAT (Huntingtin, factor de Elongación 3, subunidad de PP2A, TOR1), FAT (ERAP, ATM, and IRRAP), FRB (FKBP12–rapamycin-binding domain), FATC (ERAP, ATM and IRRAP C-terminal).

En levaduras y mamíferos, TOR forma al menos dos complejos estructural y funcionalmente distintos, TORC1 y TORC2. Cada complejo contiene subunidades compartidas y distintas, que regulan y reclutan diferencialmente diversos sustratos de la cinasa para controlar una gran variedad de procesos biológicos (Wullschleger et al., 2006; Laplante & Sabatini, 2012; Robaglia et al., 2012; Cornu et al., 2013; Kang et al., 2013; Yuan et al., 2013; Xiong & Sheen, 2014). En plantas no se ha identificado TORC2, lo que presumiblemente indicaría la existencia de un solo tipo de complejo de TOR.

No se ha caracterizado completamente la composición precisa de los complejos de la cinasa TOR en plantas. Sin embargo, algunos de los componentes de mTORC1 y efectores posteriores se han identificado en eucariotas fotosintéticos por la búsqueda de similitud de secuencia, entre los componente está RAPTOR1/2 (Regulatory Associate Protein Of TOR), LST8-1/2 (Lethal with Sec-13 Protein 8), y efectores como S6K1/2 (Ribosomal Protein S6 Kinase), RPS6a/b (Ribosome Protein Small Subunit 6) y TAP46 (Type 2A-phosphatase-Associated Protein 46 KD; Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005; Mahfouz et al., 2006; Ahn et al., 2011; Moreau et al., 2012; Ren et al., 2012; Xiong & Sheen, 2014).

La proteína TOR es excepcionalmente grande (2481 residuos de aminoácidos). Se ha descrito que TOR es un regulador maestro que se conserva evolutivamente entre levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), plantas, animales y humanos, integra la señalización de nutrientes y energía para promover la proliferación, el crecimiento y desarrollo celular. En plantas, la señalización por TOR tiene una importancia fundamental en la embriogénesis, activación de meristemos, crecimientos de raíces y hojas, floración, senescencia y esperanza de vida (Xiong & Sheen, 2014). En un estudio previo en *A. thaliana*, se demostró que pTOR:GUS se expresa en el embrión, endospermo, y todos los meristemos, incluidos los meristemos de las raíces primarias y laterales, así como los meristemos apicales y florales del tallo, pero no en células diferenciadas. Las mutantes con pérdida de función de TOR dejan de crecer en una etapa temprana del desarrollo del embrión, lo que indica que TOR es esencial para el crecimiento de las plantas (Menand et al., 2002). Recientemente se demostró con la construcción quimérica pTOR:GUS (proteína TOR fusionada a la β -glucoronidasa) que el promotor de TOR es activo en las plántulas y los tejidos de inflorescencia (Ren et al., 2012). El silenciamiento inducible de TOR disminuye el crecimiento postembriónico (Henriques et al., 2014). Otros estudios revelaron que TOR-GFP (proteína verde fluorescente) se detecta en el citosol y en el núcleo (Ren et al., 2011), por lo que las acciones de la proteína TOR no se limitan únicamente a embriones, meristemos y células en crecimiento, o al control transcripcional (Ma et al., 2009).

Otros procesos en los cuales se ha visto implicada esta proteína cinasa son en la biogénesis ribosomal (Ren et al., 2011), en la estimulación de la traducción de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular a través de las actividades de S6K1 y 4E-BP (Dowling et al., 2010; Ben-Sahra et al., 2013), en la regulación del metabolismo primario y secundario (Deprost et al., 2005; Moreau et al., 2012; Ren et al., 2012; Caldana et al., 2013), en la contribución a la integridad de la pared celular (Leiber et al., 2010) y como regulador negativo de la autofagia (Liu & Bassham, 2010; Pérez-Pérez, et al., 2010).

1.6 Inhibidores de TOR

El análisis de la función de TOR en plantas ha estado limitado debido a que éstas son muy poco o nada sensibles a la rapamicina. Varios autores han informado que la rapamicina no afecta el crecimiento en *A. thaliana* (WT), incluso a concentraciones de hasta decenas de micromolar en medio sólido (Sormani et al., 2007; Leiber et al., 2010; Ren et al., 2012). Esto ha hecho que se busquen nuevas alternativas farmacológicas para el estudio y disección de la vía de señalización de TOR en plantas.

Debido a las limitadas propiedades farmacológicas de la rapamicina, principalmente su escasa biodisponibilidad e insolubilidad acuosa, sus efectos adversos en el organismo y su incapacidad para inhibir al complejo mTORC2 (Laplante & Sabatini, 2012), se ha impulsado la generación de nuevos fármacos antineoplásicos sintéticos mucho más efectivos y específicos para los complejos de TOR, con un mecanismo de acción distinto al de la rapamicina. Estos nuevos fármacos se enfocan en atacar el sitio catalítico de la enzima que se conserva en ambos complejos de TOR, lo que ha constituido una alternativa más eficiente en el tratamiento contra el cáncer.

Los inhibidores de TOR pueden ser clasificados como:

1) Inhibidores alostéricos que incluyen a la rapamicina y todos sus derivados (rapálogos). La rapamicina es un fármaco originalmente aislado del actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus* (Schmelzle et al., 2000). A partir de la molécula molde, mediante síntesis surgieron los derivados de la rapamicina, entre ellos los fármacos Temsirolimus, Everolimus y Deforolimus. Este tipo de fármacos forman un complejo con una proteína intracelular denominada proteína de unión a FK506-12 (FKBP12); este complejo se une al dominio FRB de mTOR (Figura 8; Choi, et al., 1996) inhibiendo las funciones de la enzima (Huang, et al., 2004).

2) Inhibidores ATP-competitivos. Generalmente son pequeñas moléculas sintéticas cuyo blanco es el sitio catalítico de la enzima (Figura 8). En los últimos años se han descubierto varios inhibidores competitivos de ATP selectivos para mTOR,

destacan los derivados de pirazolopirimidinas, piridopirimidinas, tienopirimidinas, triazinas y imidazotriazinas, entre otros (Schenone, et al., 2011).

Uno de los primeros compuestos identificados (mediante un perfil bioquímico extensivo) como inhibidor selectivo de mTOR, al dirigirse al sitio de unión del ATP, fue el fármaco PP242, un derivado de pirazolopirimidina (Apsel et al., 2008).

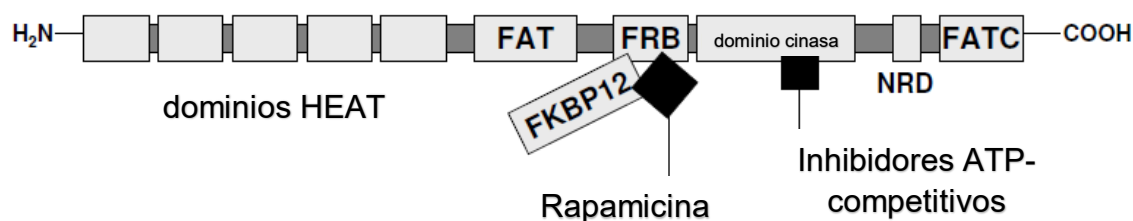


Figura 8. Estructura esquemática del sitio unión de los inhibidores alostéricos e inhibidores ATP-competitivos en mTOR. Abreviaturas: HEAT (Huntingtin, factor de Elongación 3, subunidad de PP2A, TOR1), FAT (FRAP, ATM, and IRRAP), FRB (FKBP12–rapamycin-binding domain), FATC (FRAP, ATM and IRRAP C-terminal), NRD (Dominio Regulatorio Negativo).

La molécula precursora de la cual surgen todos los derivados pirido-pirimidina (Figura 9A), fue identificada por un screening químico, la molécula resultó tener una buena selectividad para los complejos mTORC1 y mTORC2 (Malagu et al., 2009). Mediante la relación estructura-actividad investigadores de AstraZeneca lograron la optimización de la molécula precursora, lo que condujo al descubrimiento de nuevos y potentes fármacos, entre ellos el Ku-0063794 y su predecesor el AZD8055 con una Cl_{50} = 6 nM (García-Martínez, et al., 2009) y Cl_{50} =0.8 nM (Chresta et al., 2010) respectivamente, siendo este último más potente.

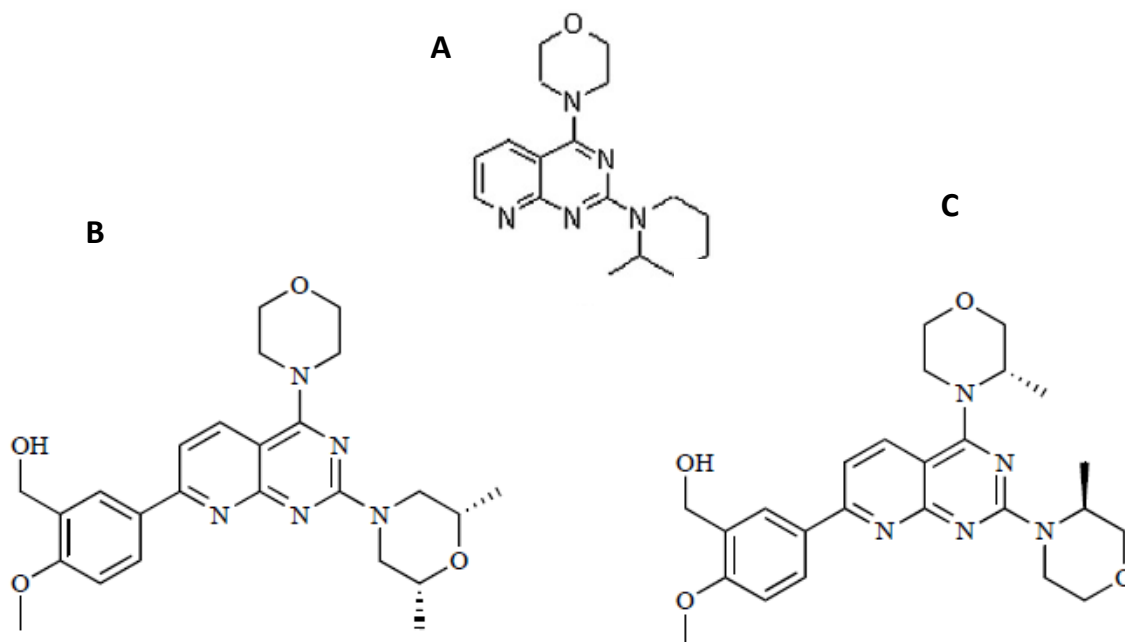


Figura 9. Inhibidores de mTOR ATP-competitivos: derivados de pirido-pirimidinas. A) Molécula madre; B) Ku-0063794 y C) AZD-8055 (Modificado de Schenone, et al., 2011).

Ku-0063794 tiene un núcleo central pirido [2,3-d] pirimidina y 3 apéndices: 4- [morfolina], 2- [dimetilmorfolina], y 7- [3-hidroximetil, 4-metoxifenil]. Estos últimos le confieren al fármaco una apariencia en forma de “Y”.

No se ha descrito ninguna estructura cristalina de mTOR, pero se ha construido un modelo de su región catalítica (desde el dominio FAT hasta casi el final del dominio FATC) basado en la estructura cristalina conocida de PI3K γ , mediante el alineamiento manual de las secuencias de aminoácidos de las dos cinasas, usando cinco TOR y dos PI3K γ (Sturgill & Hall, 2009). Los autores compararon las dos enzimas, señalando sus similitudes y diferencias e identificando cuatro residuos de aminoácidos de mTOR (Tyr2225, Asp2357, Lys2187 y Ser2165) que están implicados en la unión con ATP de forma tal que apoyan la estructura construida para mTOR a partir de la estructura conocida de PI3K γ .

En el mismo artículo, apoyándose del modelo construido de la región catalítica de mTOR, realizaron estudios de acoplamiento molecular para algunos fármacos ATP-competitivos (entre ellos Ku-0063794 y PP242), donde se predijo que Ku-0063794 es capaz de unirse, por uno de sus brazos (generado por su estructura en “Y”), al bolsillo de la adenina y con el otro brazo al sitio que correspondería el γ -fosfato del ATP. Además, predijeron algunos residuos del dominio catalítico con los que interactúan los apéndices de Ku-0063794 (Figura 10), 1) el anillo de morfolina se acopló cerca del residuo Val2240. Basado en una estructura de cocrystal de rayos X de PI3K γ , se reveló que la morfolina forma una interacción crítica con la región bisagra de la cinasa en el residuo Val882, que en mTOR corresponde al residuo Val2240 (Zask et al., 2009).

Anteriormente se había demostrado o propuesto que el grupo morfolina es el farmacóforo en otros inhibidores de mTOR/PI3K (Malagu et al., 2009; Walker et al., 2000; Knight et al., 2006), 2) el OH del 3-hidroximetilo de Ku-0063794 está unido por un hidrógeno a la cadena lateral del residuo Gln2161, 3) el OH del 4-metoxi está unido por el hidrógeno al nitrógeno de la Thr2164. En una conformación rotada $\sim 180^\circ$, menos favorecida termodinámicamente pero aun plausible, colocó el anillo de dimetilmorfolina en el bolsillo de la adenina, cerca de los residuos Ty2225, Ile2356, Ile2237 y Leu2318 (Figura 10). En esta conformación, Ku-0063794 retiene las interacciones de puente de Hidrógeno con los residuos Gln2161 y Thr2164 (Sturgill & Hall, 2009).

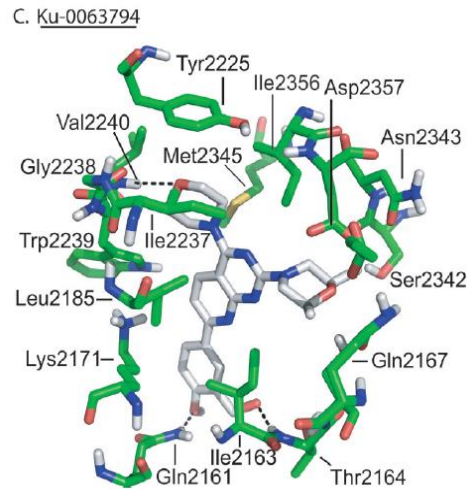


Figura 10. Modelo del acoplamiento molecular de Ku-0063794 en residuos del dominio catalítico de mTOR. El modelo fue definido con AutoDock4. Ligandos: átomos de carbono, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo. Líneas discontinuas, enlaces. (Modificado de Sturgill & Hall, 2009).

Un resultado también muy interesante que obtuvieron los autores mediante sus estudios de acoplamiento molecular (utilizando AutoDock4) con inhibidores de mTOR (PP242, NVP-BEZ235 y Ku-0063794), fue que los fármacos utilizan un espacio de farmacóforo (no identificado por otros autores) para lograr especificidad. Este espacio consiste en un canal que se extiende desde la superficie inferior de mTOR hacia adentro, hacia el bolsillo del ATP y del sustrato (Figura 11).

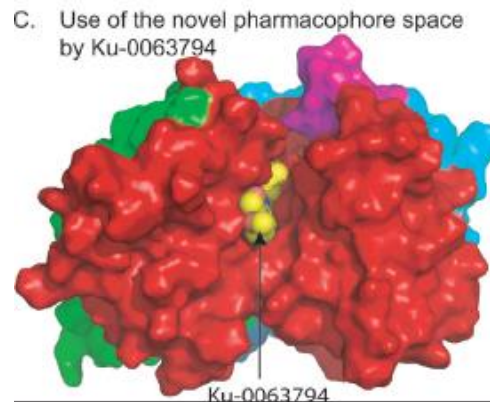


Figura 11. Vista de la superficie de mTOR generada por MacPymol (Delano Scientific). Un nuevo espacio del farmacóforo puede ser responsable de la especificidad Ku-0063794 por TOR. Además, Ku-0063794 tiene un anillo aproximadamente perpendicular a Tyr2225 similar al ATP. Los dominios de mTOR se representan en colores: FRB, verde; FAT, azul; FACT, magenta; CAT, rojo (Modificado de Sturgill & Hall, 2009).

2. Antecedentes

2.1 Azúcares y maíz

Nuestro grupo de investigación se ha dedicado el estudio del ciclo celular durante la germinación de maíz y la influencia de los azúcares. En maíz, recientemente se describió que azúcares como la glucosa y la sacarosa ocasionan un efecto diferencial en la morfología de ejes embrionarios de maíz a las 72 h y 7 días de imbibición. Los ejes embebidos en sacarosa desarrollaron pelos radiculares en la raíz primaria y raíces seminales, mientras que los ejes embebidos en glucosa tuvieron una morfología retorcida, no desarrollaron pelos radiculares, pero presentaron la formación de estructuras tipo callo en las raíces seminales y adventicias, sugiriendo que la glucosa promueve la proliferación mientras que la sacarosa la diferenciación (Figura 12).

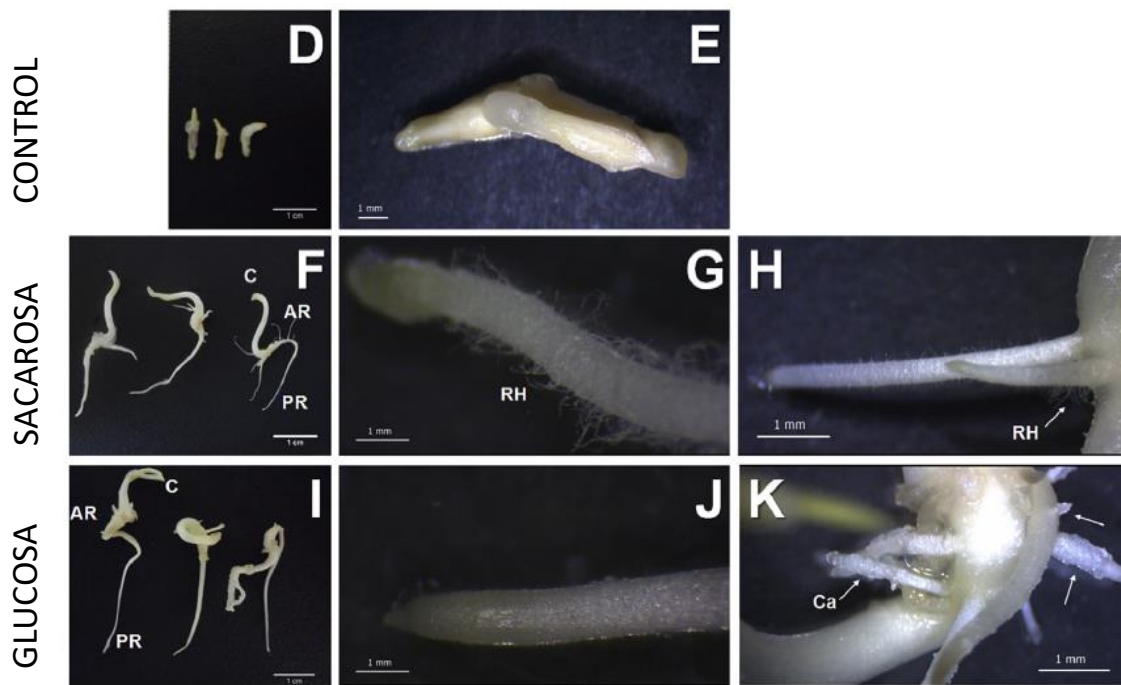


Figura 12. Morfología de ejes embrionarios de maíz embebidos a los 7 días. Los ejes en sacarosa mostraron una morfología alargada y constante, así como la acumulación de peso fresco, mientras que en Glucosa alrededor del 30% de los ejes presentaba una morfología retorcida, (D y E) Ejes de control, sin fuente de carbono. (F a H) Ejes embebidos con sacarosa 120 mM, (F e I) Vista de los ejes completos, (G) Amplificación de la raíz primaria que muestra el desarrollo de numerosos pelos radiculares, (H) Amplificación de la zona de la raíz adventicia que muestra la presencia de pelos radiculares. (I a K) Ejes embebidos con 120 mM de glucosa, (J) Amplificación de raíz primaria que carece de pelos de radiculares, (K) Amplificación de la raíz adventicia con estructuras similares a callos (Modificado de Lara Núñez et al., 2017).

Además, la presencia de sacarosa y glucosa altera diferencialmente la expresión de marcadores clave del ciclo celular: CDKAs, CYCDs y KRP3 (Figura 13; Lara Núñez, et al., 2017).

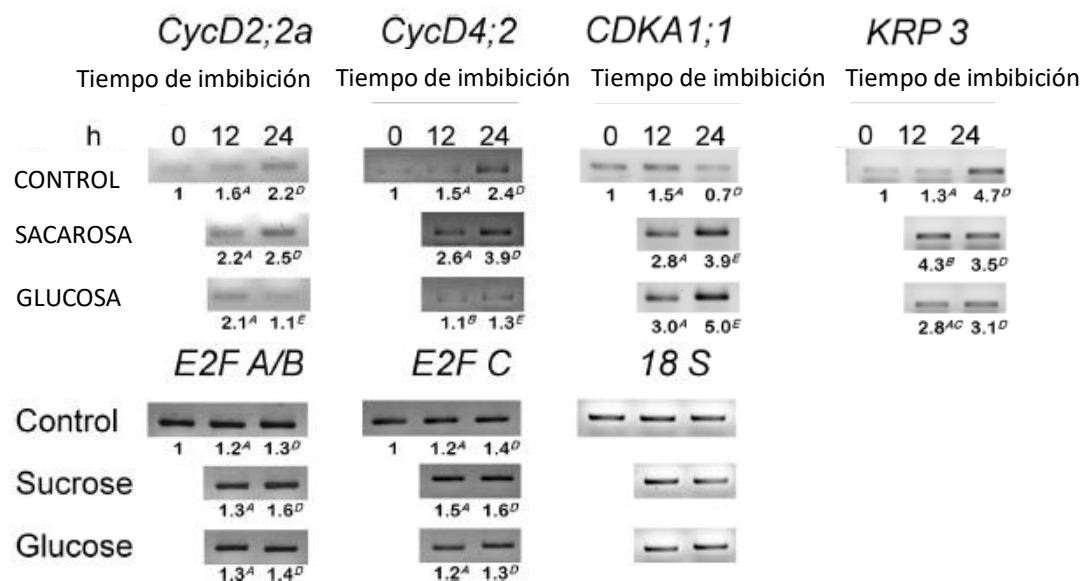


Figura 13. Patrón de expresión génica de marcadores del ciclo celular en ejes embrionarios de maíz. Ejes embebidos sin fuente de carbono (Control), sacarosa 120 mM o glucosa embebidos a 0, 12 y 24 h. La expresión de los genes se analizó mediante RT-PCR. La glucosa y sacarosa afectan positiva o negativamente la expresión de algunos marcadores del ciclo celular. Como control de expresión se utilizó el gen *18S* (Modificado de Lara Núñez et al., 2017).

Específicamente, la glucosa parece actuar como una señal mitogénica importante durante la germinación y postgerminación, al aumentar el número de células por unidad de área, al promover la síntesis de ADN de *novo* y al alterar el programa morfológico al inducir la formación de estructuras tipo callo (Lara Núñez, et al., 2017).

2.2 TOR en maíz

Mediante RT-PCR, usando cebadores diseñados a partir de la secuencia teórica de cDNA de *Oryza sativa* (OsTOR), Agredano-Moreno et al., 2017, obtuvieron experimentalmente el cDNA completo de TOR de maíz (ZmTOR). Para ello se utilizó

la técnica RACE (Rapid amplification of cDNA ends), la secuencia final del extremo 3' de ZmTOR se obtuvo mediante PCR usando una biblioteca de cDNAs. La secuencia de cDNA deducida contiene 2,464 aminoácidos con una masa molecular predicha de 277 kDa. Usando Pfam se identificaron regiones funcionales presentes en todas las PIKKs: dominios FAT, PI3K-PI4K cinasa, FRB y FACT. Además, se identificaron los motivos HEAT repeats, característicos de los miembros de TOR y la subfamilia PIKK. En el mismo artículo se analizó la expresión de *ZmTOR*, la cual está altamente regulada durante la germinación, un periodo crítico en el desarrollo de la planta, pero no en otros tejidos con características fisiológicas contrastantes (Agredano-Moreno et al., 2007).

2.3 TOR en plantas y activación por glucosa

Con la integración de análisis celulares, químicos (uso de inhibidores específicos), genéticos, genómicos y metabolómicos se ha demostrado que, en plantas la glucosa activa la vía TOR (Xiong et al., 2013).

En *Arabidopsis*, TOR detecta y transduce las señales provenientes de glucosa derivada de la fotosíntesis a través de la glicólisis y la retransmisión de la energía de las mitocondrias, para activar la proliferación en los meristemos radiculares. Otros azúcares (fructosa, xilosa y galactosa), aminoácidos (glutamina) u hormonas de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides) no pueden sustituir a la glucosa en la señalización TOR, reforzando el papel de la glucosa como principal mediador de nutrientes derivado de la fotosíntesis de la hoja en la regulación genética sistemática y el crecimiento de la raíz (Xiong et al., 2013).

La señalización Glucosa-TOR orquesta rápidamente la reprogramación transcriptómica, 1,318 genes se regularon positivamente y 1,050 se regularon negativamente por glucosa en *A. thaliana*. Esta reprogramación transcripcional inducida por glucosa fue completamente bloqueada en el mutante *tor-es* (estradiol inducible). Dentro de los genes regulados positivamente, 105 se encuentran relacionados con el ciclo celular y síntesis de ADN, y 100 relacionados con la transcripción, síntesis y procesamiento de RNA. Entre los demás genes regulados

positivamente, se encuentran los involucrados en la glicólisis, el TCA, funciones mitocondriales, la cadena de transporte de electrones, síntesis de nucleótidos y la vía de las pentosas fosfato (Xiong et al., 2013), lo que sugiere una regulación del metabolismo por TOR.

Muchos de los genes activados por la señalización desencadenada por glucosa vía TOR, corresponden a genes típicos de las fases G1 y S, los cuales a su vez son genes blancos del factor E2Fa de *Arabidopsis*, entre ellos *ORC2/6*, *MCM3/5/7*, *ETG1* y *PCNA1* (Vandepoele et al., 2005; de Jager et al., 2009; Naouar et al., 2009; Xiong et al., 2013). Se ha descubierto que el factor E2Fa es un sustrato de TOR; en respuesta a la señalización por glucosa, la cinasa fosforila sitios en la región N-terminal de E2Fa, lo cual es un paso clave para la entrada a la fase S del ciclo celular. Este hallazgo rompe el concepto convencional de la regulación del ciclo celular basado en la cascada conservada evolutivamente CYC-CDK-RBR-E2F (Xiong et al., 2013) y proporciona un mecanismo novedoso sobre cómo la señalización Glucosa-TOR controla la transcripción de genes de fase S y el ciclo celular para promover la activación y crecimiento del meristemo radicular.

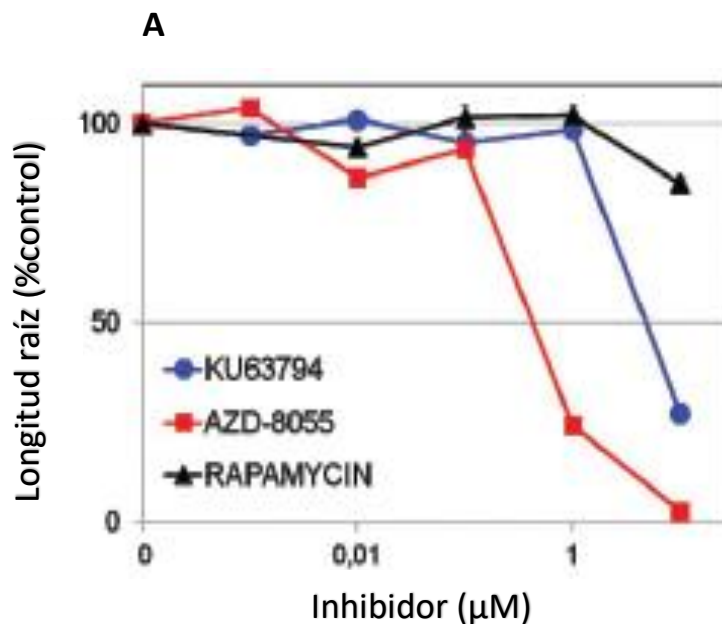
Se ha demostrado que TOR también fosforila directamente y activa E2Fb y otros factores de transcripción para promover el ciclo celular, la señalización TOR no está restringida al meristemo primario de la raíz y puede realizar funciones clave en la regulación del ciclo celular en el meristemo apical del tallo y otros tejidos y órganos vegetales (Xiong & Sheen, 2013). La señalización por Glucosa-TOR también activa genes que codifican péptidos de crecimiento de raíz y la vía de asimilación de azufre, necesarios para promover el ciclo celular, pero reprime el factor de transcripción UPBEAT1 (UPB1), un regulador negativo de la proliferación celular mediante procesos redox (Xiong et al., 2013; Tsukagoshi et al., 2010).

2.4 Inhibidores de mTOR probados en plantas

El análisis de la función de TOR en el crecimiento y desarrollo de las plantas ha estado limitado por el hecho de que las plantas son muy poco sensibles a la rapamicina. Se ha optado por el uso de inhibidores específicos de la enzima

desarrollados para mTOR, los cuales, como ya se mencionó antes, se unen al sitio de unión al ATP.

En *A. thaliana* se probaron varios Inhibidores de TOR y se hizo una comparación dosis-respuesta: 1) el inhibidor alostérico convencional de TOR, la rapamicina, 2) un inhibidor ATP-competitivo de primera generación como Ku-0063794 y 3) el inhibidor ATP-competitivo de segunda generación AZD-8055. La curva dosis-respuesta para el efecto de estos fármacos en la longitud de la raíz primaria reveló que el crecimiento de la raíz se inhibió principalmente por el fármaco de segunda generación. El fármaco AZD-8055 fue diez veces más eficiente que el inhibidor de primera generación (Figura 14A, Montané & Menand, 2013). Concomitantemente con el acortamiento de la raíz, los cotiledones y las hojas se mantuvieron verdes y su desarrollo se retrasó severamente por el inhibidor AZD-8055, lo que sugiere que el retraso en el crecimiento a nivel de toda la planta podría deberse a una disminución de la actividad meristemática y posiblemente al tamaño reducido de las células diferenciadas (Figura 14B).



(la Figura continúa en la siguiente página)

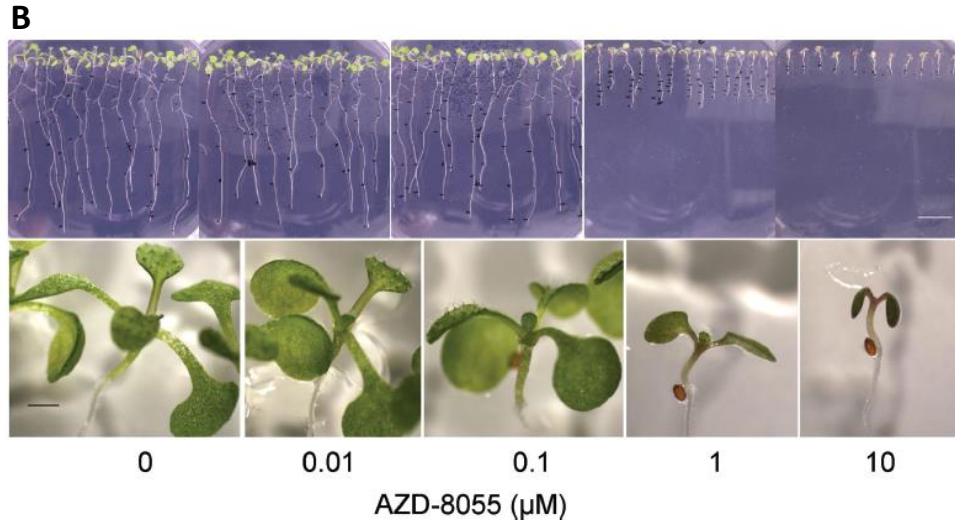


Figura 14. Inhibición del crecimiento de la raíz de *A. thaliana* por inhibidores competitivos de ATP de TOR. A) Efecto dosis-dependiente de tres inhibidores de TOR en el crecimiento de la raíz primaria: Ku-0063794, inhibidor de primera generación (azul); AZD-8055, inhibidor de segunda generación (rojo); rapamicina, inhibidor convencional (negro). B) Imagen de las plantas enteras (panel superior) y partes aéreas (panel inferior) después del crecimiento en diferentes concentraciones de AZD-8055 (Modificado de Montané & Menand, 2013)

La raíz primaria de *A. thaliana* está espacialmente dividida en tres zonas de desarrollo; la zona meristemática (MZ) donde se producen nuevas células por proliferación activa, y aumentan de tamaño progresivamente hasta que alcanzan la zona de elongación (EZ), donde las células se alargan rápidamente, y la zona de diferenciación (DZ), donde los pelos radiculares se desarrollan por el crecimiento de la punta desde células epidérmicas (Dolan & Davies, 2004). El AZD-8055 redujo de manera dosis-dependiente el tamaño de la MZ, esta disminución se debió a una reducción tanto en el número de células en división como en crecimiento (Figura 15A, Montané & Menand, 2013). CYCB1; 1 es un marcador de la fase G2/mitótica del ciclo celular y se expresa dentro de la MZ, en la zona de alta actividad mitótica, CYCB1;1 se acumula cuando el ciclo celular se bloquea (Colon-Carmona et al., 1999). Se midió la tasa mitótica utilizando como marcador de mitosis a la CYCB1;1 acoplada el reportero GUS. El inhibidor AZD-8055 inhibe la capacidad de proliferación celular del meristemo, al aumentar la dosis de AZD-8055 se redujo la zona de alta actividad mitótica, al disminuir la presencia de CYCB1;1:GUS (Figura 15B).

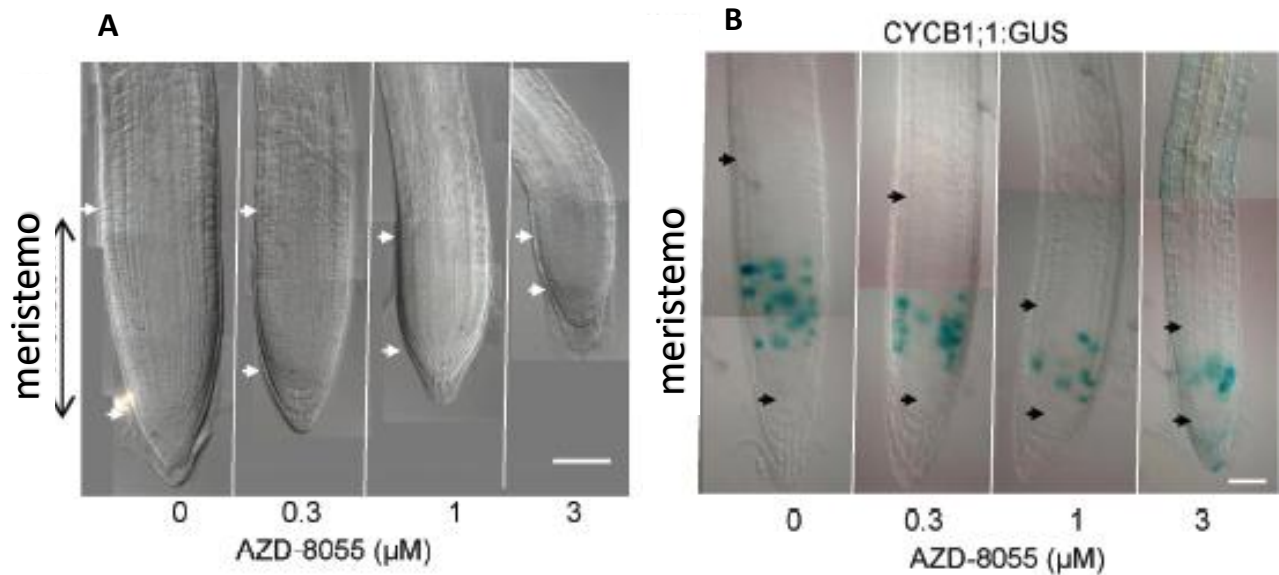


Figura 15. Efecto del AZD-8055 en la raíz primaria de *A. thaliana*. El inhibidor reduce el tamaño de la zona meristemática y la capacidad de proliferación celular. A) Imagen de Microscopía de Contraste Diferencial interferencial, la ZM está delimitada por las flechas. B) Expresión del marcador mitótico CYCB1;1:GUS (Modificado de Montané & Menand, 2013).

3. Justificación

Debido a la vida sésil de las plantas, éstas deben ser capaces de modular su crecimiento y desarrollo en base a todas las condiciones ambientales a las cuales están expuestas, entre las cuales se encuentran la disponibilidad de nutrientes y azúcares, estado energético, estrés, crecimiento celular, temperatura y otras. Uno de los mecanismos por el cual la célula percibe las señales generadas debido a estas condiciones es a través de la proteína cinasa TOR, quien a su vez coordina la disponibilidad de nutrientes y energía, así como las señales ambientales con el crecimiento, desarrollo y la supervivencia.

Los azúcares juegan un papel importante en la vida de las plantas, están implicados en diferentes etapas del desarrollo de las plantas, desde la embriogénesis hasta la senescencia. Además de ser la fuente de carbono más importante para la célula, indispensables para la división celular, los azúcares también funcionan como

moléculas señalizadoras, activando cascadas de señalización dando lugar a diversas respuestas celulares (como la expresión de genes, entre otras). Se ha visto en *A. thaliana* que señales generadas por azúcares, específicamente glucosa, activan la vía TOR, la que a su vez puede fosforilar directamente al factor de transcripción E2F, el cual puede iniciar la transcripción de genes implicados en la fase S del ciclo celular.

En nuestro grupo de laboratorio, uno de los temas de estudio es la influencia de los azúcares en el ciclo celular durante la germinación de maíz. Ya se ha demostrado que la glucosa promueve la proliferación celular en ejes embrionarios de maíz, además modifica la expresión génica de algunos marcadores del ciclo celular como *CYCDs*, *CDKAs* y *KRPs*. En maíz, no se han descrito datos acerca de la vía de señalización Glucosa-TOR y el ciclo celular, por ello es importante determinar si el efecto de la glucosa en la expresión de algunos marcadores que respondieron positivamente a este azúcar se ejerce a través de la vía TOR durante la germinación de maíz. Para ello se propone el uso de un inhibidor específico de la cinasa, el AZD-8055, el cual se une al sitio de unión al ATP, impidiendo la fosforilación de TOR sobre E2F.

4. Hipótesis

Si la glucosa afecta la proliferación celular por la vía de ZmTOR, al utilizar un inhibidor específico (AZD-8850) de la actividad de cinasa de esta proteína, se afectará la expresión de genes implicados en el ciclo celular que conllevan a la proliferación.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar si el efecto de la glucosa en la expresión de los genes de ciclo celular se ejerce a través de la vía Glucosa-ZmTOR durante la germinación de maíz.

5.1.2 Objetivos particulares.

- a) Realizar un análisis *in silico* para determinar el *locus* y los posibles parálogos del gen de *TOR* en maíz.
- b) Determinar el efecto del inhibidor de TOR (AZD-8850) en la morfología, longitud y peso fresco de ejes embrionarios a las 24, 48 y 72 h de germinación.
- c) Determinar el tamaño y número de células en el RAM de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR mediante cortes histológicos a las 24 h de germinación.
- d) Analizar el efecto de la glucosa en la expresión del gen *ZmTOR* y genes del ciclo celular.
- e) Analizar la síntesis *de novo* de ADN en ejes embebidos en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR en las regiones meristemáticas a las 24 h de germinación.

6. Materiales y metodología.

6.1 Material biológico.

Se usaron semillas secas y maduras de maíz variedad Chalqueño cosecha 2017 almacenadas a 4°C a las que se les extrajo el eje embrionario.

6.2 Imbibición.

De las semillas secas se extrajeron los ejes embrionarios, estos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, en agitación durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se lavaron con agua destilada estéril hasta perderse el olor del desinfectante. Una vez terminado este proceso, se embebieron en cajas Petri

estériles sobre un papel filtro Whatman estéril en medio de imbibición con diferentes adiciones: 1) Medio de imbibición enriquecido con sacarosa, 2) Medio de imbibición sin ningún azúcar, 3) Medio de imbibición sin ningún azúcar más AZD-8055 30 μ M, 4) Medio de imbibición enriquecido con glucosa 90 mM, 5) Medio de imbibición enriquecido con glucosa 90 mM más AZD-8055 30 μ M. Se incubaron el tiempo necesario (6,12 y 24 h) a 25°C en oscuridad.

Debido a la naturaleza química del compuesto AZD-8055 se empleó vacío para introducirlo dentro del eje embrionario. Para mantener consistencia en el experimento, a todos los tratamientos se les aplicó vacío.

Para determinar el peso fresco y la longitud, se utilizaron muestras de 45 ejes embrionarios por tiempo y por tratamiento. Se determinó el peso fresco de cada eje embrionario utilizando una balanza analítica aeADAM PW214. Para la longitud se utilizó el software ImageJ usando como referencia una escalera milimétrica al momento de calibrar la escala digital.

6.3 Análisis *in silico* del locus del gen *ZmTOR*

A partir de la secuencia genómica de TOR de maíz descrita por Agredano-Moreno et al., (2007) se hizo la búsqueda (TBLASTN) para determinar el *locus* del gen *ZmTOR* en el genoma de maíz (B73 RefGen_v4) utilizando la herramienta BLAST del servidor EnsemblPlants. Se utilizó el software Geneious para determinar la ubicación y tamaño de los exones.

6.4 Análisis de la expresión de genes.

6.4.1 Extracción de RNA.

Los ejes embrionarios se extrajeron de semillas secas, desinfectados y embebidos en los diferentes medios previamente descritos. Se extrajo RNA de 10 ejes embrionarios por tiempo y por tratamiento (aproximadamente 100 mg de tejido) utilizando el protocolo para extracción de RNA con RIBOZOL™ Reagent (AMRESCO). Después de la extracción se purificó el RNA resuspendido (100-200 μ L) con el estuche comercial FAVOR® (BIOTECH CORP) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Se cuantificó el RNA total purificado en el equipo BioDrops. A partir de la concentración obtenida se prepararon alícuotas con una concentración de 200 ng/ μ L. Para monitorear la integridad del RNA purificado se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa 2%, TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 2 μ L de RNA (400 ng aprox.) con 2 μ L de formamida. Las condiciones de electroforesis fueron 35 min a 60V en amortiguador TAE 1X. El gel fue observado bajo luz UV empleando un transiluminador, se documentó la imagen utilizando el equipo ChemiDoc, las densitometrías fueron determinadas usando el software ImageLab.

6.4.2 Purificación/Tratamiento con ADNsa I.

Previo a la preparación de cDNA se realizó la calibración del RNA (previamente cuantificado) cargando 400 ng. Con ayuda del programa *ImageLab*® se realizó la densitometría del gel, considerando ambas bandas de las subunidades ribosomales. El volumen se ajustó hasta presentar una variación del 10% entre los valores de densitometría.

Para evitar la contaminación con ADN genómico, el RNA purificado se sometió a un tratamiento con ADNsa RQ1. Para cada reacción se ocupó 1 μ L de ADNsa I por μ g de RNA. En cada reacción se utilizaron 2 μ g RNA, 1 μ L *Reaction Amortiguador 10X*, se llevó a un volumen final de 15 μ L con agua DEPC 0.1%. Se dejó incubar 30 min a 37°C. Una vez terminada la incubación se adicionaron 2 μ L de *ADNse stop solution*.

6.4.3 Preparación de cDNA

Una vez calibrado el RNA tratado, se sintetizó cDNA utilizando 2 μ g de RNA total mediante el kit M-MLV RT (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. El volumen final de reacción fue de 50 μ L, quedando una concentración de ~20 ng/ μ L.

6.4.4 Amplificación por RT-PCR

Las reacciones de PCR se realizaron a partir de 1 µL (~20 ng) del cDNA previamente sintetizado siguiendo las instrucciones del fabricante (JumpStart, Sigma-Aldrich), las reacciones se optimizaron a un volumen final de 10 µL.

La reacción de PCR para el análisis de los genes *CYCD4;2* y *CDKA1;1* se realizó con cebadores específicos, utilizando las condiciones de reacción descritas por Buendía-Monreal et al. (2011) y para *KRP3* lo correspondiente reportado por Rosas-Bringas (2015).

A partir de la secuencia genómica de maíz informada por Agredano-Moreno et al. (2007) y de la corroboración de esta con el genoma de maíz utilizando la herramienta BLAST del servidor EnsamblPlants, se diseñaron primers (Exon-junction) para el análisis de la expresión del gen *ZmTOR*. Las condiciones para el PCR se encuentran descritas a continuación:

Gen	Secuencia del primer (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>ZmTOR</i>	FW AGC TAA CTA AGG CCT GGG	468
	AT	
	RV CAC GGA TCA GAG CAT GAA	
	GT	

Desnaturalización inicial 94°C/2min, 32 ciclos (desnaturalización 94°C/50seg, alineamiento 58°C/50seg, extensión 72°C/50seg, extensión final 72°/10min).

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% (p/v), utilizando bromuro de etidio (0.5 µg/mL) para la visualización del cDNA. Los geles se escanearon en un Chemidoc (Bio-Rad) y analizados con el software ImageLab (Bio-Rad).

6.5 Análisis Microscópico e Histológico (tinción safranina-verde rápido)

Después de los diferentes períodos de germinación de los distintos tratamientos antes descritos, los ejes embebidos se fijaron en formaldehído al 37% durante 2 horas, seguidos de tres lavados con PBS durante 10 minutos. Después el tejido se deshidrató con alcohol a concentraciones crecientes (30, 50, 70, 85, 96 y 100%) durante una hora por cada concentración de alcohol, seguido de la parafinación del tejido en Paraplast. Se hicieron cortes longitudinales de 7-9 micras de grosor, usando un microtomo rotatorio. Las secciones obtenidas se teñieron con safranina al 1% (w/v) disuelta en etanol más 2-metoxietanol (metil cellosolve), se enjuagaron con agua destilada y se deshidrataron durante 10 s en etanol al 95% más 0.5% ácido pícrico, 10 s en etanol al 95% más cuatro gotas de hidróxido de amonio y 10 s en etanol al 100%. Luego fueron teñidas con una solución de verde rápido al 0.05% (colorante de contraste) y enjuagadas con aceite de clavo para remover el exceso de colorante. El tejido fue montado usando Entellan (Ruzin, 1999), observado bajo un microscopio (Leica ICC50 hD) y las imágenes se tomaron usando una cámara digital. Para la estimación del tamaño celular y número de células, 2000 células en total se analizaron aleatoriamente (por tratamiento) en la región del meristemo apical radicular (RAM). Los criterios para la selección fueron, 1) células por encima del centro quiescente en el área correspondiente al meristemo proximal de acuerdo a Jiang et al., (2010), y 2) células isodiamétricas (Baluska et al., 1990). Para la estimación del tamaño celular las células fueron medidas usando el software Leica Application Suite 3.0.0. El número de células por unidad de área se estimó utilizando el Software ImageJ. Este parámetro nos indica la cantidad de células que están en 100 micrómetros cuadrados en la zona previamente definida.

6.6 Ensayo de incorporación de EdU (ADN de *novo*)

Para el análisis de síntesis de ADN de *novo*, los ejes se embebieron durante 22 h, momento en el cual se les introdujo por vacío durante 5 minutos (30 segundos de vacío con 30 segundos de recuperación) una solución de EdU 10 μ M (Invitrogen, Click-iT Alexa Fluor 488 HCS assay, lote C10350), después de esto se incubaron durante 2 h. Terminado el tiempo de incubación los ejes fueron fijados utilizando formaldehído al 3.7% durante 2 h, se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0.01% en PBS durante 30 minutos. Después se deshidrataron los ejes y se parafinaron (anteriormente descrito). Se hicieron cortes de 10 micras. Las secciones de tejido se trataron de acuerdo a las especificaciones del estuche del fabricante para visualizar núcleos (Hoechst 33, 342) y síntesis de ADN de *novo* a través de la incorporación de EdU (5-etinil-20 desoxiuridina marcada con Alexa Fluor 488). Las muestras se observaron bajo un microscopio confocal Olympus™ FV 1000. Para la síntesis de ADN de *novo* (incorporación de Alexa Fluor 488) la excitación se ajustó a 495 nm, detectándose una emisión entre 500-600 nm; para la tinción de ADN total (Hoeschst 33, 342) la excitación se ajustó a 350 nm y la emisión entre 400-500 nm, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las especificaciones de las imágenes se basaron en Kotogany et al., (2010).

Para la cuantificación relativa de EdU se utilizó el programa ImageJ, en donde con ayuda de la herramienta "Paintbrush" (Figura suplementaria 1) se contabilizaron los focos o manchas verdes (incorporación de EdU) en todos los tratamientos. Para obtener las unidades de incorporación relativa de EdU se empleó la relación entre el control con sacarosa y los demás tratamientos. Siendo el control igual a 1 unidad relativa de EdU.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba ANOVA de una vía y la prueba Tukey, donde la probabilidad ($P < 0.05$). Se realizó por triplicado cada experimento.

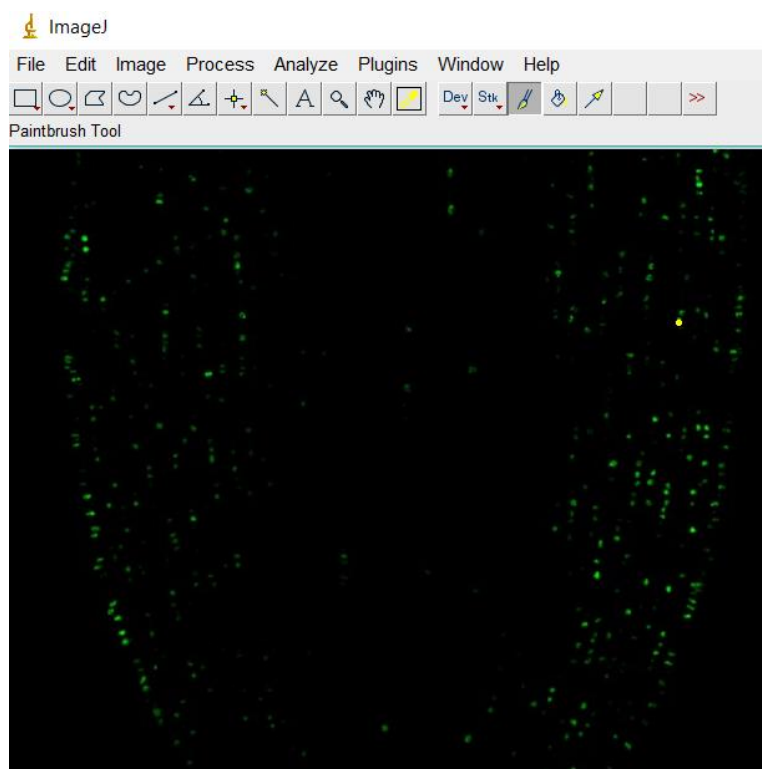


Figura suplementaria 1. Contabilización de la incorporación de EdU utilizando las herramientas del programa ImageJ.

7. Resultados

7.1 Análisis *in silico* del gen *ZmTOR*

A partir de la secuencia de cDNA para *ZmTOR* descrita por Agredano-Moreno et.al., 2007, con número de acceso AAW78347 (NCBI GenBank) se hizo la búsqueda TBLASTN en el genoma de maíz (B73 RefGen_v4, marzo 2016) informada por Schnable *et al.*, 2009. Utilizando el servidor EnsemblPlants Release 39 (<https://plants.ensembl.org/index.html>, consultado en enero 2018), se determinó el *locus* y estructura (exones e intrones) del gen *ZmTOR*.

El gen *ZmTOR* se localiza en el cromosoma 6: 143, 352,592-143, 301,915 (-), contiene 59 exones y 2464 aminoácidos (mismo número de residuos reportados anteriormente por Agredano-Moreno et al., 2007). En la tabla 2 se presenta la ubicación genómica y tamaño de cada exón.

Tabla 2. Análisis *in silico* del gen *ZmTOR*. Ubicación y tamaño (pb y a.a.) de los 59 exones encontrados de acuerdo al cDNA de *ZmTOR* reportada.

N° Exón	Localización genómica	tamaño (pb)	Residuos (a.a)	E-value
1	6:143,352,548-143,352,592 (-)	45	15	0.0035
2	6:143,352,408-143,352,464 (-)	57	19	1.00E-04
3	6:143,351,446-143,351,787 (-)	339	113	2.50E-57
4	6:143,351,301-143,351,378 (-)	75	25	1.70E-09
5	6:143,350,330-143,350,512 (-)	174	58	3.60E-34
6	6:143,349,016-143,349,114 (-)	99	33	3.60E-15
7	6:143,348,661-143,348,759 (-)	159	53	2.30E-30
8	6:143,348,333-143,348,476 (-)	144	48	3.50E-26
9	6:143,348,080-143,348,250 (-)	171	57	4.00E-31
10	6:143,347,803-143,348,000 (-)	198	66	1.20E-36
11	6:143,347,534-143,347,731 (-)	198	66	1.40E-29
12	6 143,343,437-143,343,589 (-)	153	51	4.30E-26
13	6:143,342,374-143,342,493 (-)	120	40	4.60E-19
14	6:143,338,107-143,338,208 (-)	102	34	8.70E-17
15	6:143,337,940-143,338,036 (-)	93	31	3.30E-22
16	6:143,337,723-143,337,857 (-)	135	45	1.20E-36
17	6:143,333,278-143,333,380 (-)	99	33	0
18	6:143,333,102-143,333,191 (-)	90	30	1.20E-14
19	6:143,333,011-143,333,100 (-)	90	30	2.90E-06
20	6:143,332,845-143,332,934 (-)	90	30	9.20E-15
21	6:143,332,680-143,332,719 (-)	39	13	9.20E-15
22	6:143,324,766-143,324,861 (-)	96	32	0
23	6:143,324,558-143,324,674 (-)	117	39	6.40E-19
24	6:143,322,886-143,323,047 (-)	162	54	1.60E-33
25	6:143,322,667-143,322,792 (-)	126	42	4.20E-21
26	6:143,322,501-143,322,548 (-)	48	16	0.0038
27	6:143,315,436-143,315,559 (-)	123	41	1.10E-08
28	6:143,315,074-143,315,260 (-)	186	62	1.00E-20
29	6:143,314,392-143,314,541 (-)	150	50	5.10E-27

30	6:143,314,175-143,314,327 (-)	153	51	3.20E-26
31	6:143,314,023-143,314,094 (-)	72	24	0
32	6:143,313,810-143,313,944 (-)	135	45	1.40E-24
33	6:143,313,672-143,313,737 (-)	66	22	1.50E-06
34	6:143,313,476-143,313,574 (-)	99	33	0.00E+00
35	6:143,313,290-143,313,397 (-)	108	36	1.30E-18
36	6:143,312,917-143,313,090 (-)	174	58	0
37	6:143,312,764-143,312,832 (-)	69	23	4.80E-08
38	6:143,310,481-143,310,549 (-)	69	23	1.70E-06
39	6:143,310,294-143,310,404 (-)	111	37	4.70E-19
40	6:143,310,078-143,310,215 (-)	138	46	1.40E-25
41	6:143,309,861-143,309,989 (-)	129	43	1.30E-22
42	6:143,309,600-143,309,764 (-)	165	55	4.30E-29
43	6:143,309,306-143,309,521 (-)	216	72	0
44	6:143,306,961-143,307,167 (-)	207	69	0
45	6:143,306,240-143,306,353 (-)	114	38	9.50E-18
46	6:143,305,978-143,306,169 (-)	192	64	2.50E-37
47	6:143,305,630-143,305,710 (-)	81	27	7.40E-12
48	6:143,305,472-143,305,546 (-)	75	25	0
49	6:143,305,324-143,305,389 (-)	66	22	1.30E-06
50	6:143,305,014-143,305,175 (-)	162	54	2.40E-30
51	6:143,304,261-143,304,434 (-)	174	58	5.20E-33
52	6:143,304,042-143,304,176 (-)	135	45	2.80E-24
53	6:143,303,876-143,303,956 (-)	81	27	9.10E-11
54	6:143,303,747-143,303,803 (-)	57	19	3.30E-06
55	6:143,303,582-143,303,659 (-)	78	26	4.10E-11
56	6:143,303,049-143,303,180 (-)	132	44	1.00E-22
57	6:143,302,393-143,302,566 (-)	174	58	1.60E-33
58	6:143,302,038-143,302,304 (-)	267	89	4.00E-42
59	6:143,301,915-143,301,930 (-)	15	5	9.50E-18

De acuerdo a lo reportado por Agredano-Morano et al, 2007, y el uso del servidor Pfam, se corroboró la secuencia de residuos de aminoácidos de los motivos presentes en la proteína TOR (Figura 16).

Adicionalmente, de acuerdo a previos reportes (Walker, et al 1999; Sturgill & Hall, 2009; Yang H., et al., 2013), mediante los alineamientos de las secuencias proteicas

de mTOR (*Mus musculus*, número de acceso NP_064393.2, NCBI), *A. thaliana* TOR (*AthTOR*, número de acceso NP_175425.2, NCBI) y *Zea mays* TOR (ZmTOR, número de acceso AAW78347, NCBI) todos los residuos se encontraron conservados en maíz (y *A. thaliana*, Figura 16, color morado).

Basado en una estructura del cocrystal de rayos X de PI3Ky con un inhibidor de mTOR/PI3K, se reveló que la morfolina es el farmacóforo de varios inhibidores de esta vía de señalización (Malagu et al., 2009; Walker et al., 2000; Knight et al., 2006), este grupo funcional interactúan con el residuo Val882 de PI3Ky, en mTOR corresponde al residuo Val2240 (Zask et al., 2009). Además, estudios de modelado molecular hechos por Sturgill & Hall, 2009, han descrito residuos de aminoácidos en el sitio catalítico de mTOR que interaccionan con ciertos grupos funcionales del inhibidor de mTOR, Ku-0063794 (predecesor del AZD-8055), entre los residuos están Val2240, Gln2161, Thr2164, Tyr2225, Ile2356 e Ile2237. De acuerdo a lo anterior, se identificaron estos aminoácidos correspondientes en la secuencia de ZmTOR (Tabla 3). Cinco de los seis residuos del sitio catalítico de mTOR que interactúan con el inhibidor se encuentran conservados en maíz (Figura 17, color naranja). Sólo el residuo Gln2161 no está conservado.

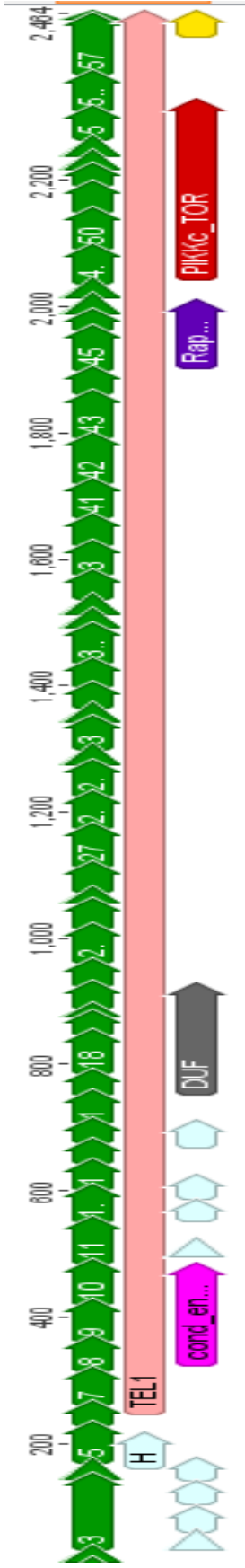


Figura 16. Estructura del cDNA de ZmTOR. Se observan los exones (verde), motivos: TEL1 (Fosfatidilinositol cinasa o proteína cinasa, familia PI-3, rosa claro), PIKKc_TOR (Dominio catalítico de TOR, rojo), Dominio de unión a rapamicina (morado), HEAT repeats (azul claro), motivo con función desconocida (DUF, gris), Dominio FATC (amarillo), Dominio Enzimas de condensación (fucsia).

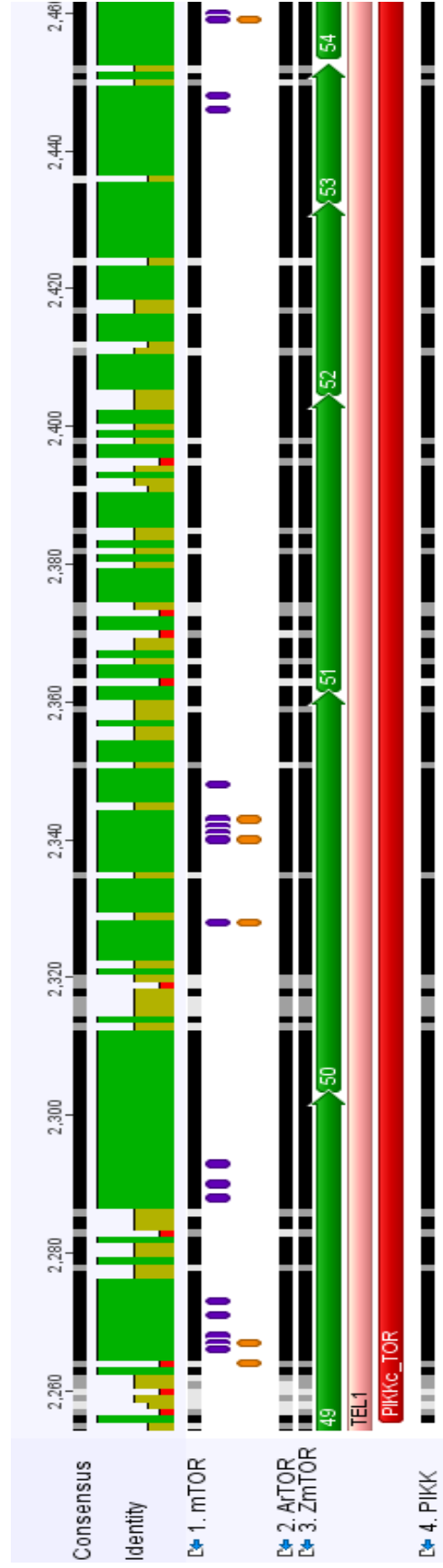


Figura 17. Alineamiento de las secuencias de las proteínas de mTOR, ArTOR y ZmTOR. Se presentan los residuos implicados con la unión del ATP (color morado) y los residuos que interactúan con el inhibidor Ku-0063794 (predecesor del AZD-8055, color naranja). El alineamiento se hizo utilizando el software Geneious 4.8.4.

Tabla 3. Residuos de aminoácidos de mTOR que interactúan con el inhibidor Ku-0063794 y sus correspondientes en ZmTOR. El residuo Gln2161 no se encuentra conservado en maíz. El alineamiento se hizo utilizando el software Geneious 4.8.4.

Residuo en mTOR	Correspondiente en ZmTOR
Val2240	Val2133
Gln2161	-
Thr2164	Thr2057
Tyr2225	Tyr2118
Ile2237	Ile2130
Ile2356	Ile2249

7.2 Efecto del inhibidor de TOR (AZD-8850) en la morfología, peso y longitud de ejes embrionarios a las 24, 48, 72 h y 7 días de imbibición

Se analizó el efecto del inhibidor AZD-8055 en los ejes embrionarios embebidos durante 24, 48, 72 h y 7 días. Se analizaron y determinaron 3 parámetros: la morfología, la longitud y el peso.

En las primeras 24 h de imbibición los ejes embrionarios embebidos en los diferentes medios (en presencia o ausencia de azúcares y/o inhibidor AZD-8055), no presentaron diferencias en su morfología. Fue hasta las 72 h donde se observó una morfología contrastante (Figura 18A): los ejes sin alguna fuente de carbono y con o sin inhibidor de TOR, respectivamente, no crecen ni se desarrollan; los ejes embrionarios en un medio con sacarosa (60 mM), control interno, presentan cierto crecimiento y desarrollan raíces seminales; los ejes en un medio con glucosa crecen presentando una morfología de manera enrollada (morfología típica con este azúcar), se alargan más en comparación con los demás tratamientos; los ejes embebidos en un medio con glucosa más el inhibidor AZD-8055 son menos alargados y no presentaron el fenómeno de enrollamiento, lo que sugiere que la señalización por glucosa se está perdiendo al inhibir la cinasa TOR.

A los 7 días de imbibición, los ejes embebidos con sacarosa se alargaron y presentaron raíces seminales; los ejes embebidos con glucosa siguieron presentando el efecto de enrollamiento y fueron más largos en comparación con el tratamiento anterior; los ejes en medio con glucosa más inhibidor continuaron alargándose (pero no lo suficiente en comparación con los ejes sin inhibidor) y no presentaron la morfología enrollada, lo que sugiere que, al utilizar el inhibidor de la cinasa, el efecto de enrollamiento generado por la señalización Glucosa-TOR se ha perdido (Figura 18B).

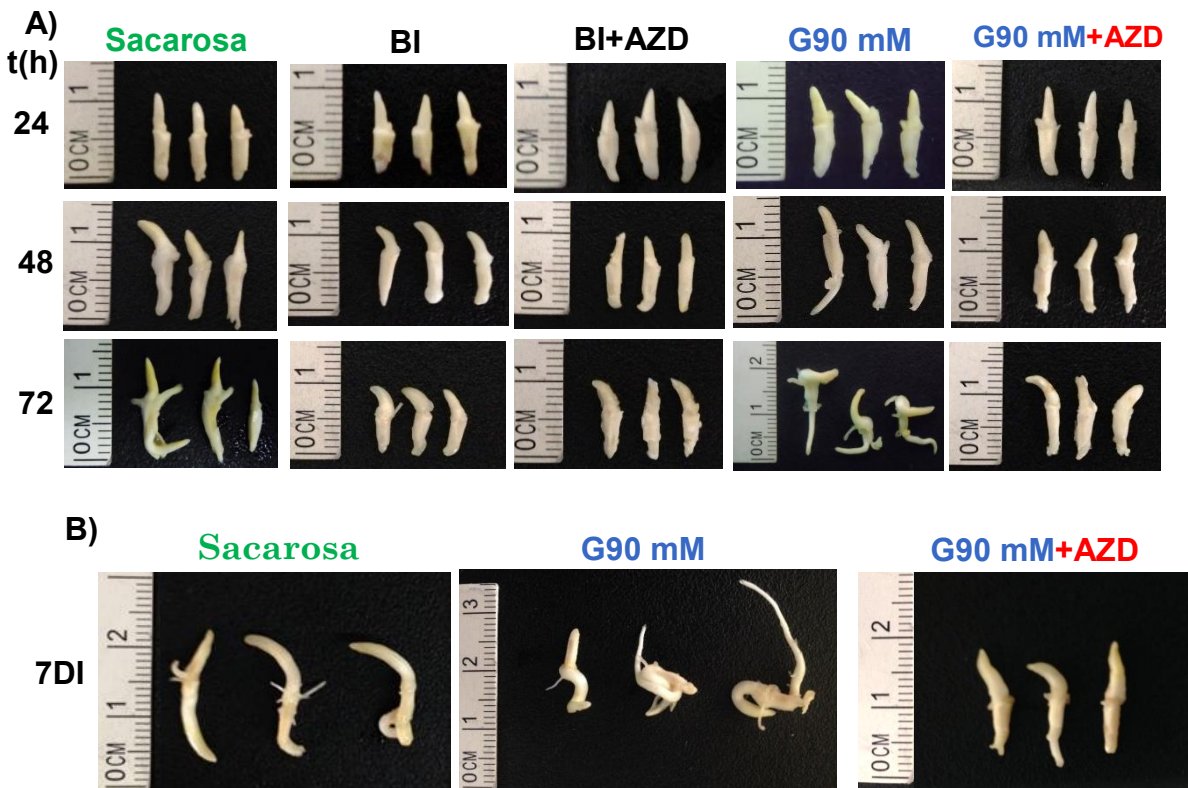


Figura 18. Efecto del inhibidor AZD-8055 en la morfología de ejes embrionarios. A) Ejes embebidos en sacarosa (60 mM, control interno), amortiguador de imbibición sin azúcares (BI), amortiguador de imbibición sin azúcares + AZD-8055 30 μ M (B+AZD), amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM (G90 mM) y amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM + AZD-8055 30 μ M (G90 mM+AZD). B) Ejes embrionarios embebidos durante 7 días en sacarosa, G90 mM y G90 mM+AZD. A los 7 días de imbibición los ejes en medio con glucosa conservan la morfología enrollada, mientras que los ejes en presencia del inhibidor han perdido dicho efecto. El experimento se realizó con 15 ejes por tratamiento, por tiempo y por triplicado

Se utilizó el programa ImageJ para determinar la longitud de los ejes embrionarios de maíz (Figura 19). A las 24 h de imbibición solo se encontró diferencia significativa en el tratamiento sin fuente de carbono en presencia de inhibidor (BI+AZD), respecto a los demás tratamientos, estos ejes incluso se alargan menos que el tratamiento sin inhibidor (BI, Figura 19). A las 48 h los ejes embrionarios en glucosa (G90 mM) presentaron mayor longitud en comparación con los demás tratamientos, en presencia del inhibidor más el azúcar (G90+AZD) los ejes se alargaron en menor proporción. A las 72 h de imbibición los ejes sin fuente de carbono en ausencia o presencia de inhibidor son incapaces de crecer; en glucosa los ejes siguieron presentando la mayor longitud; en presencia de glucosa más inhibidor se alargan en menor proporción respecto al tratamiento con glucosa. No hubo diferencia estadística entre la longitud de los ejes en medio con sacarosa (Sac) y el tratamiento con glucosa más AZD.

También se determinó el peso (Figura 20) utilizando una balanza analítica. A las 24, 48 y 72 h los ejes en medio sin fuente de carbono en presencia o ausencia del inhibidor no tuvieron ganancia de peso. Durante las horas analizadas, los ejes en un medio con glucosa ganaron la mayor cantidad de peso, en comparación con los demás tratamientos; en contraste, en un medio con glucosa más inhibidor AZD-8055 los ejes ganaron peso en menor proporción. Estadísticamente no hubo diferencia significativa a lo largo del tiempo analizado entre los tratamientos sacarosa y glucosa más inhibidor (G90+AZD). Los ejes en este último tratamiento, presentaron un comportamiento similar (en la longitud y peso) a los ejes embebidos en medio con sacarosa, perdiéndose el efecto que provoca la glucosa de mayor ganancia de peso y tamaño.

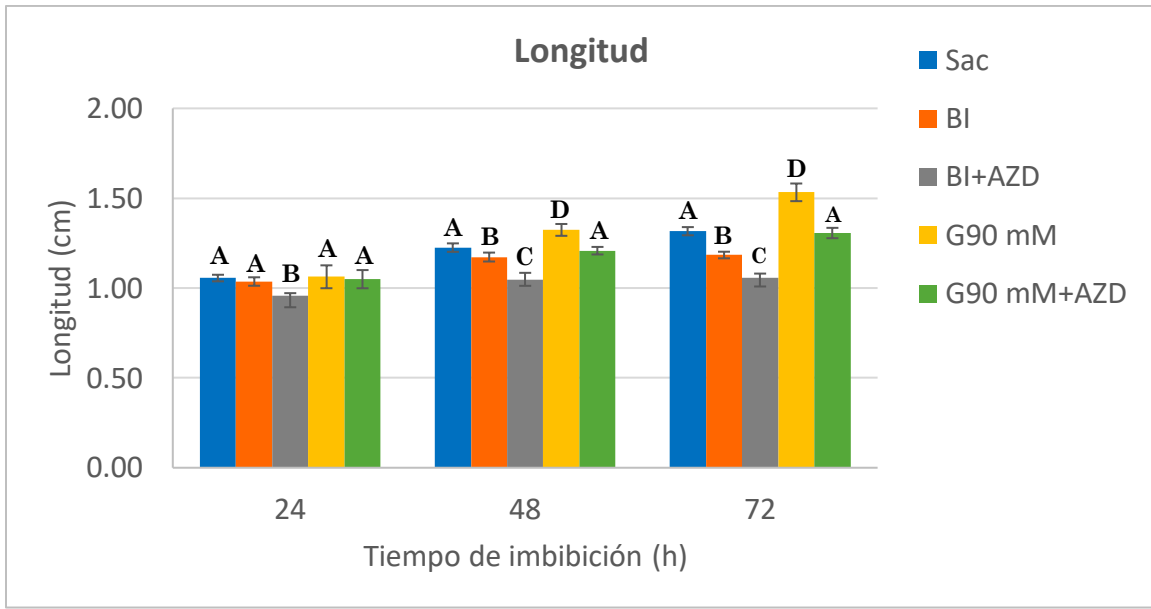


Figura 19. Efecto del inhibidor AZD-8055 en la longitud de ejes embrionarios. En amortiguador de imbibición sin algún azúcar en presencia o ausencia de inhibidor (BI y BI+AZD, color naranja y gris, respectivamente). En glucosa (G90 mM, color amarillo). En presencia de glucosa e inhibidor (G90 mM+AZD, color verde), en medio con sacarosa (Sac, color azul). A, B, C y D indican diferencia significativa para ANOVA de una vía y Tukey ($P < 0.05$). Se utilizaron 15 ejes por tratamiento y por tiempo en cada réplica

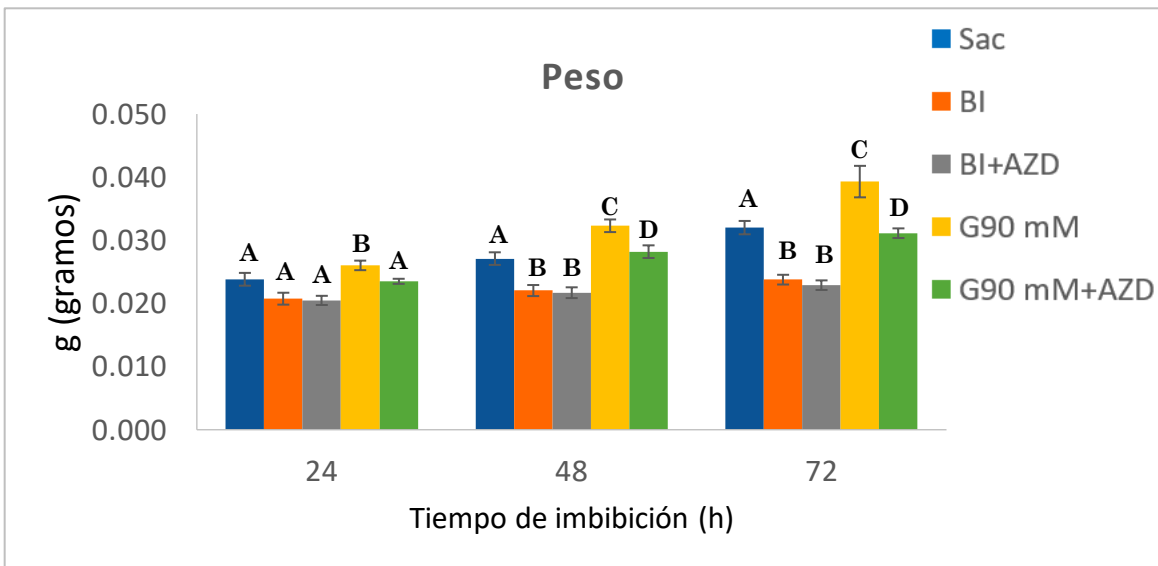


Figura 20. Efecto del inhibidor AZD-8055 en el peso de ejes embrionarios. Las abreviaciones y colores se mencionan anteriormente. A, B, C y D indican diferencia significativa para ANOVA de una vía y Tukey ($P < 0.05$). Se utilizaron 15 ejes por tratamiento y por tiempo en cada réplica. Se muestra el peso promedio de 45 unidades en cada Intervalo de tiempo.

7.3 Tamaño y número de células en el RAM de ejes embrionarios de maíz en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR.

Anteriormente se encontró en nuestro grupo de investigación que la glucosa afecta la morfología y organización celular, así como el número de células por unidad de área en las regiones meristemáticas (Lara-Núñez et al., 2017). Mediante cortes histológicos teñidos con safranina-verde rápido (tinción de núcleos y citoplasma más paredes secundarias, respectivamente) analizamos el efecto del inhibidor de TOR en la morfología, el tamaño y la organización celular, así como el número de células por unidad de área en el RAM de los ejes embrionarios a las 24 h de imbibición.

En el tratamiento con sacarosa (Figura 21) la organización celular fue ordenada, las células se aprecian delimitadas entre sí, y tienden a ser rectangulares y alargadas sagitalmente. En los ejes en amortiguador de imbibición sin fuente de carbono en presencia o ausencia de inhibidor (BI y BI+AZD) la organización celular fue desordenada. Además analizando las fotomicrográficas, muestran que en presencia de AZD-8055 las paredes celulares entre una célula y otra, no se aprecian definidas; el tamaño celular en estos tratamientos fue mayor, 10 % comparado con el control y 60 % con glucosa (Figura 22). Así mismo, el número de células por unidad de área (Figura 23) para BI y BI+AZD fue menor en comparación con los otros tratamientos, lo que indicaría menos densidad celular o menor proliferación.

En los ejes embebidos con glucosa (G90 mM, Figura 21), se observó que la organización celular fue ordenada; en comparación con sacarosa, las células tienden a ser compactas y no alargadas sagitalmente sino axialmente; el tamaño celular (Figura 22) resultó un 60 % más pequeño (respecto al tratamiento con inhibidor) y como consecuencia el número de células por unidad de área (Figura 23) fue mayor, debido quizás a que hubo mayor proliferación. Al analizar el tratamiento con glucosa más inhibidor (G90+AZD), las células perdieron su organización, las paredes celulares no se aprecian definidas; el tamaño celular fue un 45% mayor (respecto al tratamiento sin inhibidor) y el número por unidad de área fue menor, comparado con el tratamiento con glucosa sin inhibidor. Esto denota que el efecto

que provoca la glucosa en el tamaño, morfología, organización y número de células por unidad de área se ha perdido al inhibir la actividad de TOR. No hubo diferencia significativa en el tamaño y número de células por unidad de área entre G90+AZD y sacarosa. Interesantemente, en ambos tratamientos con inhibidor (BI+AZD y G90+AZD), las paredes celulares no se apreciaron definidas, posiblemente esta fisiología sea resultado de un desequilibrio generalizado por la inhibición de la actividad de TOR.

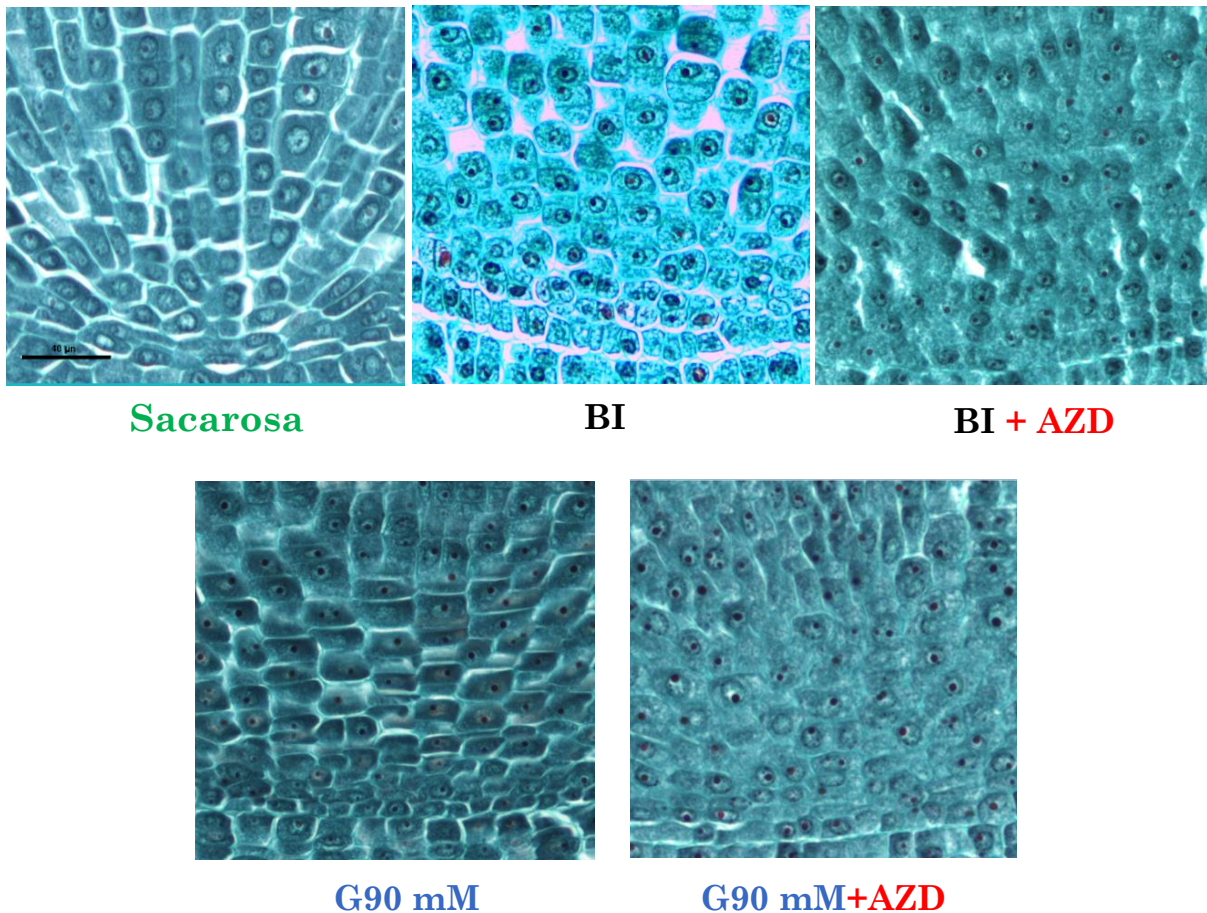


Figura 21. Fotomicrografía, efecto del inhibidor AZD-8055 en la región meristemática de ejes embrionarios embebidos a las 24 h. Se muestra el patrón celular de los ejes embebidos en sacarosa (60 mM, control interno), amortiguador de imbibición sin azúcares (BI), amortiguador de imbibición sin azúcares + AZD-8055 30 µM (B+AZD), amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM (G90 mM) y amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM + AZD-8055 30 µM (G90 mM+AZD). Aumento 100x. Las imágenes son representativas de 9 réplicas biológicamente independientes de cada tiempo y tratamiento. Las barras de escala indica 0.04 mm para todas las imágenes.

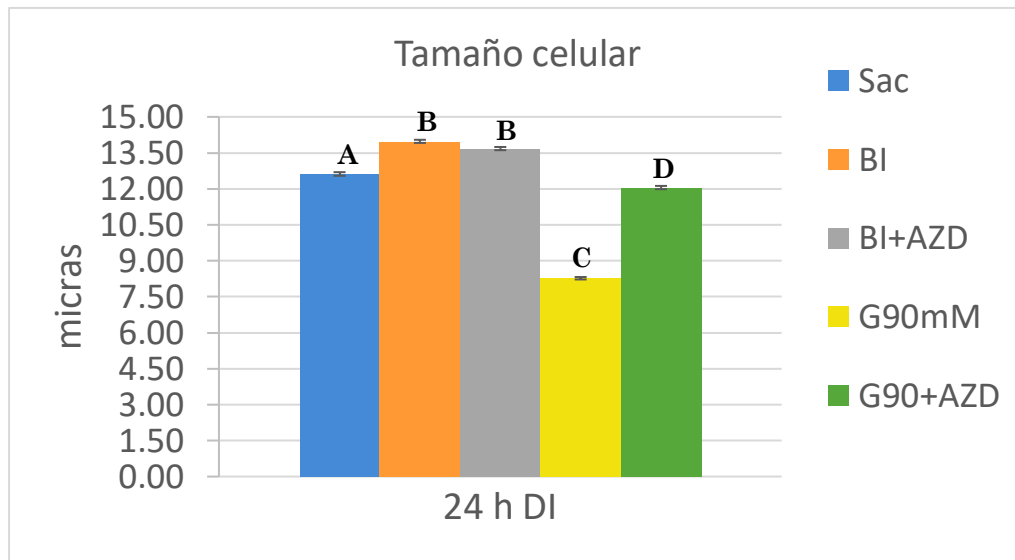


Figura 22. Efecto del inhibidor en el tamaño celular en la región meristemática de ejes embebidos a las 24 h. Se muestra la media del tamaño celular más error estándar medio (EEM). Las abreviaciones y colores se mencionan anteriormente. A, B, C y D indican diferencia significativa para ANOVA de una vía y Tukey ($P < 0.05$). Se contabilizaron 2000 células por tratamiento y réplica.

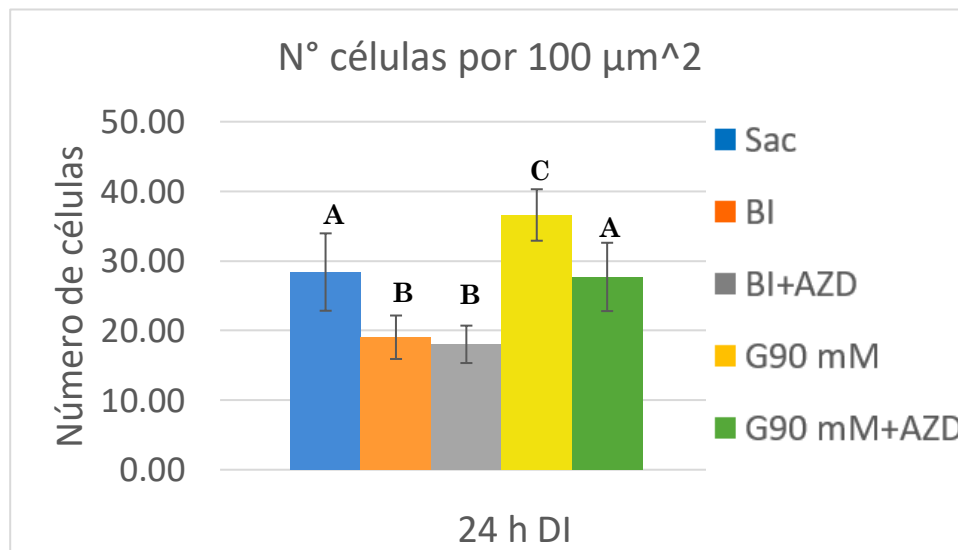


Figura 23. Efecto del inhibidor en el número de células por unidad de área en la región meristemática de ejes embebidos a las 24 h. En el tratamiento con glucosa hubo un mayor número de células por unidad de área, debido a que hubo mayor tasa de proliferación celular; en los ejes en medio con glucosa más inhibidor el número de células fue menor en comparación con el tratamiento anterior. Las abreviaciones y colores se mencionan anteriormente. A, B y C indican diferencia significativa para ANOVA de una vía y Tukey ($P < 0.05$). Se midieron 2,000 células por tratamiento y réplica.

7.4 Efecto de la glucosa e inhibidor AZD-8055 en la expresión del gen *ZmTOR* y genes del ciclo celular.

7.4.1 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen *ZmTOR*

Aunque ya se ha descrito la expresión del gen TOR en semillas de maíz germinadas (Agredano-Moreno et al., 2007), no se conoce su patrón de expresión en ejes embrionarios de maíz. Se analizó así el patrón de expresión en ejes embebidos en diferentes medios durante 6, 12 y 24 h (Figura 24), el cual fue diferencial entre los tratamientos. Con glucosa la expresión del gen *ZmTOR* aumenta desde las 6 h en comparación con sacarosa y amortiguador de imbibición sin fuente de carbono en presencia o ausencia del inhibidor. Lo anterior podría indicar que la presencia y el tipo de azúcar estimulan diferencialmente la expresión del gen. Respecto al tratamiento con glucosa más inhibidor, no hubo diferencia significativa en la expresión del gen *ZmTOR* en comparación con solo glucosa, lo cual podría sugerir que la actividad de *ZmTOR* no regula la propia expresión del gen.

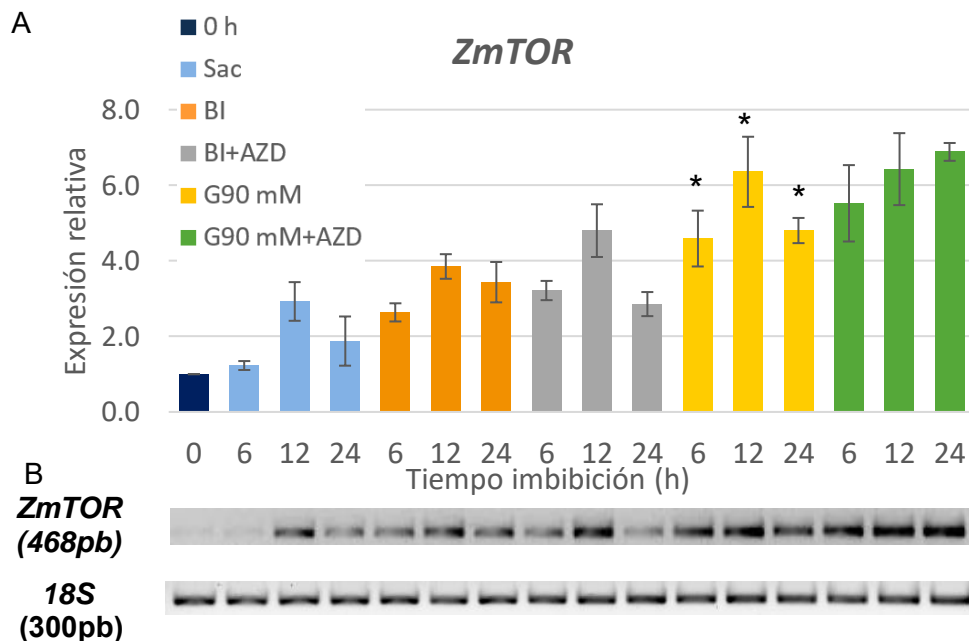


Figura 24. Expresión del gen *ZmTOR* durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. A) Densitometría en unidades relativas respecto a 0 h (n=3), las barras representan el EEM. Los asteriscos indican diferencia significativa en la prueba de ANOVA y Tukey ($P < 0.05$) entre los tratamientos Sac, BI y G90 mM. B) Patrón de expresión del gen *ZmTOR* en ejes embebidos en diferentes medios, los colores indican los medios de imbibición: Azul marino, ejes embrionarios secos; azul claro sacarosa 60 mM (Sac); naranja, amortiguador de imbibición sin fuente de carbono (BI); gris, Amortiguador de imbibición sin fuente de carbono más inhibidor de TOR AZD-8055 30 μ M

(BI+AZD); amarillo, medio enriquecido con glucosa 90 mM (G90 mM); verde, medio enriquecido con glucosa 90 mM más más inhibidor AZD-8055 30 μ M (G90+AZD). Como control de expresión se utilizó el gen *18S*. Se presenta la imagen representativa de tres réplicas biológicas independientes.

7.4.2 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen *CYCD4;2*

Al analizar el patrón de expresión del gen *CYCD4;2* (Figura 25), los niveles de transcrito se estimulan desde las 6 h por la presencia de glucosa, respecto a los otros tratamientos: sacarosa (control interno), amortiguador de imbibición sin fuente de carbono en presencia o ausencia de inhibidor AZD-8055. En presencia de glucosa más el inhibidor la expresión del gen *CYCD4;2* disminuye significativamente desde las 6 h, lo que sugiere que la actividad de TOR regula positivamente la expresión de este gen, es decir, la expresión del gen *CYCD4;2* podría estar regulada por la vía Glucosa-ZmTOR.

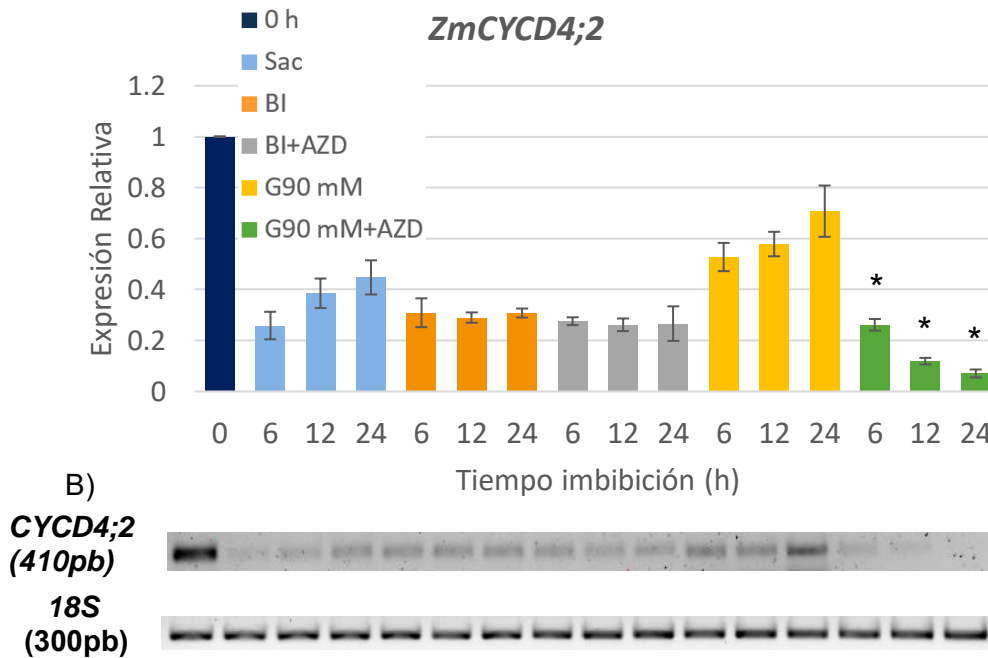


Figura 25. Expresión del gen *ZmCYCD4;2* durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. A) Densitometría en unidades relativas respecto a 0 h (n=3), las barras representan el EEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en la prueba de ANOVA y Tukey (P<0.05) B) Patrón de expresión del gen *ZmCYCD4;2* en ejes embebidos en diferentes medios, los colores y abreviaciones son como en la Figura 21. Como control de expresión se utilizó el gen *18S*. Se muestra la imagen representativa de tres réplicas biológicas independientes.

7.4.3 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen *ZmCDKA1;1*

Para el gen *ZmCDKA1;1* (Figura 26), se observa un patrón de expresión diferencial entre los tratamientos. Estadísticamente no hay diferencia en los niveles de transcrito entre los tratamientos sacarosa y glucosa. En presencia de glucosa más inhibidor, la expresión de *ZmCDKA1;1* aumenta significativamente desde las 6 h respecto al tratamiento con glucosa sin AZD-8055. Lo anterior podría sugerir que la actividad de ZmTOR está regulando negativamente la expresión de *ZmCDKA1;1*, este efecto, aunque en menor nivel, se observó también en el tratamiento con amortiguador de inhibición sin fuente de carbono en presencia de AZD-8055.

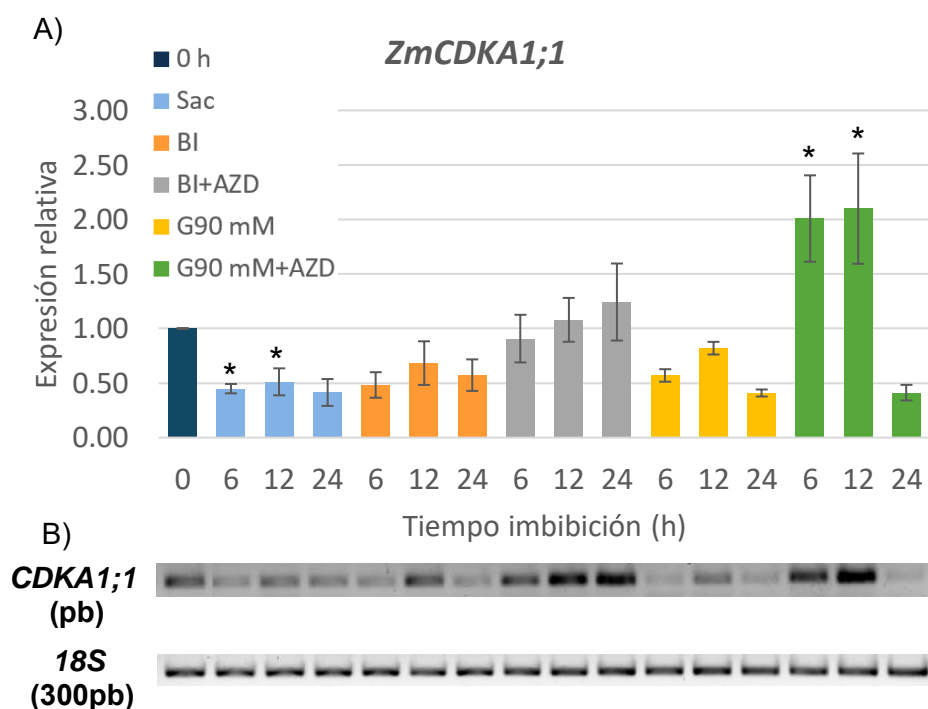


Figura 26. Expresión del gen *ZmCDKA1;1* durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. A) Densitometría en unidades relativas respecto a 0 h (n=3), las barras representan el EEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa en la prueba de ANOVA y Tukey ($P < 0.05$). B) Patrón de expresión del gen *ZmCDKA1;1* en ejes embebidos en diferentes medios, los colores y abreviaciones se indican anteriormente. Como control de expresión se utilizó el gen *18S*. Se muestra la imagen representativa de tres réplicas biológicas independientes.

7.4.4 Efecto de la glucosa e inhibidor de TOR (AZD-8055) en la expresión del gen *ZmKRP3* durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.

Al analizar el patrón de expresión del gen *ZmKRP3* entre los tratamientos glucosa y glucosa más inhibidor, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con glucosa en ausencia o presencia del inhibidor AZD-8055, lo que podría sugerir que el incremento de la expresión de *ZmKRP3* por glucosa es independiente de la actividad de ZmTOR.

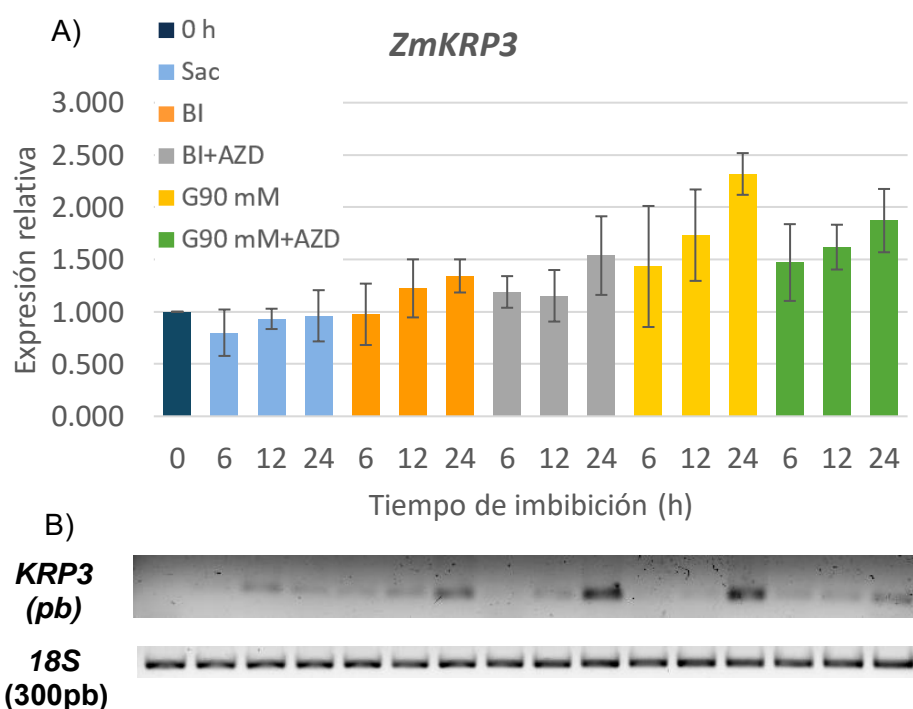


Figura 27. Expresión del gen *ZmKRP3* durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. A) Densitometría en unidades relativas respecto a 0 h (n=3), las barras representan el EEM. Prueba de ANOVA y Tukey (P<0.05). B) Patrón de expresión del gen *ZmKRP3* en ejes embebidos en diferentes medios, los colores y abreviaciones se indican anteriormente. Como control de expresión se utilizó el gen *18S*. Se muestra la imagen representativa de tres réplicas biológicas independientes.

7.5 Síntesis *de novo* de ADN en ejes embebidos en presencia y ausencia de glucosa e inhibidor de TOR en las regiones meristemáticas a las 24 h de germinación.

Teniendo en cuenta primero que: la glucosa podría actuar como una señal mitogénica importante durante la germinación (y postgerminación) al aumentar el número de células por unidad de área y al promover la síntesis de ADN *de novo* (Lara-Núñez et al., 2017), y segundo, específicamente la glucosa puede activar la vía TOR. Esta cinasa a su vez puede fosforilar directamente al factor de transcripción E2F, el cual puede iniciar la transcripción de genes implicados en la fase S del ciclo celular (Xiong et al., 2013). Por ello evaluamos el efecto del inhibidor AZD-8055 en la síntesis de ADN *de novo* (como una estimación indirecta de las células en fase S). Para realizar esto, los ejes embrionarios se expusieron a EdU (5-etinil-20-desoxiuridina), un análogo de timidina. La incorporación del análogo (Figura 28) se visualizó mediante microscopía confocal como manchas verdes (Reacción de Click-EdU) en un campo azul (núcleos teñidos con Hoechst 33,342). Utilizando el programa ImageJ se midió la incorporación relativa de EdU (Tabla 4).

Tabla 4. Unidades relativas de Incorporación (URI) de EdU en las zonas meristemáticas de ejes embrionarios de maíz embebidos durante 24 h (n=3). A, B, C y D indican diferencia estadísticamente significativa en la prueba de ANOVA y Tukey (P<0.05).

Tratamiento	URI de EdU
Sacarosa	1
BI	0.51 ± 0.09 ^A
BI + AZD 30 µM	0.17 ± 0.04 ^B
G90 mM	2.35 ± 0.21 ^C
G90 mM+AZD 30 µM	1.08 ± 0.18 ^D

A las 24 h de imbibición, los ejes sin fuente de carbono en ausencia del inhibidor (BI) mostraron pocos núcleos marcados con EdU (0.51); en presencia de AZD-8055 (BI+AZD) fue casi indetectable la incorporación (0.17). Los ejes en medio con glucosa presentaron mayor señal de incorporación de EdU (2.35) en comparación con los demás tratamientos, lo que confirma el papel de la glucosa como mitógeno, al aumentar la síntesis de ADN de *novo*. Para el caso con glucosa más inhibidor (G90+AZD), la incorporación (1.08) fue menor en comparación con su ausencia, lo que sugeriría que el efecto mitogénico ocasionado por glucosa se ha perdido y la inhibición de la actividad de TOR está afectando la síntesis de ADN de *novo* en las zonas meristemáticas del eje embrionario de maíz, a las 24 horas de imbibición.

(Figura 28 se encuentra en la página siguiente)

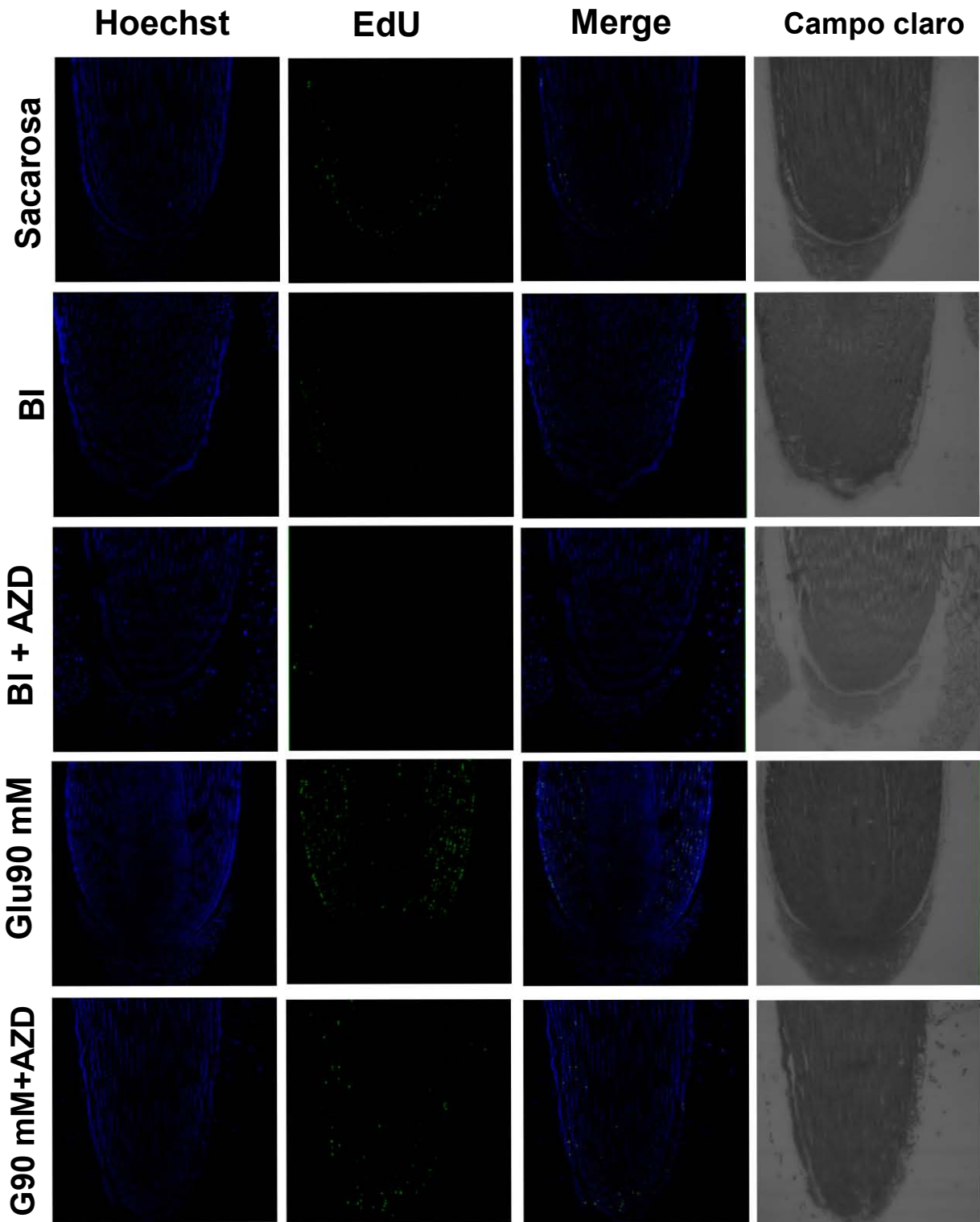


Figura 28. Efecto del AZD-8055 en la síntesis de ADN de novo en el RAM de ejes embrionarios de maíz. Se muestra la incorporación de EdU en ejes embebidos 24 h en sacarosa (60 mM, control interno), amortiguador de imbibición sin azúcares (BI), amortiguador de imbibición sin azúcares + AZD-8055 30 μ M (B+AZD), amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM (G90 mM) y amortiguador de imbibición suplementado con glucosa 90 mM + AZD-8055 30 μ M (G90 mM+AZD). Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33,342; la síntesis de ADN de novo se visualizó a través de la incorporación de EdU (5-etinil-20-desoxiuridina marcada con Alexa Fluor 488). Aumento 40x para todas las imágenes.

8. Discusión de resultados

8.1 Análisis *in silico* del gen ZmTOR

Mediante la técnica RACE 3'-5', Agredano-Moreno et al., (2007), obtuvieron experimentalmente el cDNA completo de TOR de maíz (ZmTOR). La secuencia de cDNA que ellos deducen codifica 2464 aminoácidos con una masa molecular predicha de 277 kDa. Es hasta el año de 2009 cuando Schnable y colaboradores, publican el genoma de maíz (B76). Durante todo este tiempo se desconocía la estructura y ubicación del gen *ZmTOR* en el genoma de maíz. Mediante el servidor EnsemblPlants Release 39 y el software Genious versión 4.8.4, con base en la secuencia de cDNA reportada para ZmTOR (Agredano-Moreno et al., 2007) se determinó la ubicación genómica, así como el tamaño del gen en pares de bases (pb) y residuos de aminoácidos (a.a.) de la proteína que codifica para cada exón (Tabla 2). Toda la secuencia (2,464 residuos de aminoácidos.) descrita por Agredano-Moreno empató en la búsqueda TBLASTN con el genoma de maíz. También se hizo la búsqueda de posibles parálogos de *ZmTOR* en maíz, pero en el genoma se encontró un solo gen ubicado en el cromosoma 6 que codifica para la cinasa TOR, descartando así la existencia de posibles genes parálogos de TOR en maíz.

Los inhibidores ATP-competitivos generalmente son pequeñas moléculas sintéticas cuyo blanco es el sitio catalítico de la enzima. Estos inhibidores interactúan con residuos de aminoácidos dentro del dominio catalítico, impidiendo la actividad mediante un cambio conformacional (Schenone et al., 2011). Se han identificado, por medio de cristalografía, los residuos implicados con la unión de ATP (Walker et al., 1999; Zask et al., 2009; Sturgill & Hall, 2009; Yang H et al., 2013) y con la obtención de co-cristales se han identificado los residuos implicados en la unión de ATP que interaccionan con los grupos funcionales de los inhibidores de mTOR (Malagu et al., 2009; Walker et al., 2000; Knight et al., 2006; Zask et al., 2009; Sturgill & Hall, 2009; García-Martínez et al., 2009). Dentro de los residuos importantes que interaccionan con el grupo morfolina de los inhibidores ATP-competitivos (derivados de pirazolopirimidina y piridopirimidinas) se encuentra la Val2240, que forma una

unión crítica con la región bisagra del sitio catalítico (Walker et al., 2000; Knight et al., 2006). Sturgill & Hall (2009), basándose en su modelo construido de la región catalítica de mTOR, realizaron estudios de acoplamiento molecular para los fármacos Ku-0063794 (precursor del AZD-8055) y PP242, en los que se predijeron los residuos de la región catalítica que interaccionan con los grupos funcionales de la molécula, para el caso del inhibidor Ku-0063794 los residuos fueron Val2240, Gln2161, Thr2164, Tyr2225, Ile2356 e Ile2237.

Los residuos implicados en la unión con el ATP reportados para la cinasa mTOR se identificaron en la secuencia de ZmTOR, los 18 residuos analizados se encontraron conservados en la secuencia de la cinasa de maíz (Figura 17, color morado). Adicionalmente, cinco de los seis residuos de mTOR que interaccionan con el inhibidor Ku-0063794 se encontraron conservados en maíz (Figura 17, color naranja). Aunque no se ha descrito algún mecanismo de acción de los inhibidores ATP-competitivos en plantas, tomando en cuenta la gran similitud de secuencias (87%, Geneious 4.8.4) de los dominios catalíticos de mTOR y ZmTOR podrían aplicarse las aseveraciones descritas acerca del mecanismo de acción de estos fármacos en mamíferos para plantas, teniéndose así un mecanismo de acción farmacológico conservado entre ambas cinasas.

8.2 Efecto del inhibidor de TOR (AZD-8055) en la morfología, longitud y peso fresco en ejes embrionarios

Como ya se mencionó, los azúcares tienen efecto en casi todas las fases del ciclo de vida de las plantas, se han reconocido como componentes duales: como sustratos metabólicos, donantes de carbono y energía, y también como moléculas señalizadoras, activando o inhibiendo procesos claves durante las etapas de vida de las plantas (Gibson 2005; Rolland et al., 2006; Ramón et al., 2008).

Al analizar el efecto del inhibidor AZD-8055 en los ejes embrionarios de maíz embebidos en los tiempos estudiados, no se encontró diferencia morfológica durante las primeras 24 h de imbibición (Figura 18A), pero sí hubo diferencia

estadísticamente significativa en la longitud y peso fresco (Figura 19 y 20). A este tiempo, los ejes en medio de imbibición sin azúcar en presencia de AZD-8859 (BI+AZD) mostraron menor longitud respecto a los demás tratamientos (Figura 19), incluso estos ejes se alargaron en menor proporción en comparación a los que se encontraban sin fuente de carbono en ausencia del inhibidor (BI). Curiosamente no hubo diferencia en el peso entre estos dos tratamientos. Adicionalmente, a las 24 h los ejes en medio de imbibición suplementado con glucosa 90 mM (G90 mM) presentaron mayor ganancia de peso (Figura 20) frente a los demás tratamientos. Esto pudo deberse a una mayor proliferación, en consecuencia, mayor número de células. En el tratamiento con glucosa más inhibidor (G90+AZD), con respecto al tratamiento con sólo glucosa, hubo menor ganancia de peso, pero no hubo diferencia en la longitud. Lo anterior podría indicar que el inhibidor está afectando desde horas tempranas el crecimiento de los ejes embrionarios (ya sea en la división o la elongación) y, además, estos últimos dependen de una fuente externa de carbono metabolizable y de la actividad de TOR para sostener su crecimiento.

Es a las 48 y 72 h en que las diferencias tanto en morfología, longitud y peso son más contrastantes. Durante estas horas, los ejes sin fuente de carbono en ausencia y presencia del inhibidor son incapaces de alargarse y ganar peso. Los ejes en medio con sacarosa (control interno) se alargan y ganan biomasa. A diferencia de los otros tratamientos, con glucosa tienden a alargarse más y tener mayor ganancia de peso, esto debido a que hubo mayor proliferación celular, además los ejes presentan una morfología enrollada (fenómeno ya reportado por Lara Núñez et al., 2017). Se ha demostrado que en *A. thaliana* la glucosa no solo controla el crecimiento y desarrollo de la raíz, también puede modular la dirección del crecimiento de la misma a través de la modulación de la vía de respuesta a auxinas y brasinosteroides (Mishra et al., 2009; Singh et al., 2014). Posiblemente en maíz, el efecto de enrollamiento en la morfología se deba a este mismo fenómeno.

En presencia de glucosa más inhibidor, el efecto del azúcar se perdió; los ejes se alargaron en menor proporción y tuvieron menor ganancia de peso. Lo anterior podría sugerirnos que la inhibición de la actividad de la cinasa afectó el metabolismo

y crecimiento en los ejes embrionarios de maíz. TOR se ha descrito como un regulador maestro que integra la señalización de nutrientes y energía con otras señales ambientales para coordinar la proliferación, crecimiento, desarrollo y supervivencia (Baena-González & Sheen, 2007; Laplante et al., 2012). En *A. thaliana* se ha demostrado que la glucosa es capaz de activar la vía de la cinasa y que esta señalización Glucosa-TOR regula positivamente genes involucrados en el metabolismo central (Xiong et al., 2013). Las mutantes con pérdida de función de TOR dejan de crecer en una etapa temprana del desarrollo del embrión, lo que indica que la actividad de esta proteína es esencial para el crecimiento de las plantas (Menand et al., 2002). En plantas se ha probado el fármaco AZD-8055, este compuesto provoca la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y órganos aéreos (Montané & Menand, 2013).

Además, la señalización por glucosa también se afectó pues los ejes no presentaron la morfología enrollada que ocasiona el azúcar. En la literatura existen varios informes sobre la interacción entre azúcares y auxinas, se ha visto una serie de respuestas comunes que están reguladas por estas dos moléculas (Yuan et al., 2013; Arenas-Huertero et al., 2000; Dekkers et al., 2008). Existe evidencia que demuestra que TOR actúa (downstream) como un factor esencial para la transducción de señales de auxinas en *Arabidopsis* (Schepetilnikov et al., 2013; Dong et al., 2015; Deng et al., 2016). Posiblemente en maíz, la morfología de enrollamiento resultada de la señalización generada por la glucosa en conjunto con las hormonas, sea afectada por la inhibición de la cinasa TOR.

Lara Núñez y colaboradores (2017) demostraron que a los 7 días de imbibición los ejes embrionarios de maíz son capaces de seguir respondiendo a glucosa, mantuvieron la morfología enrollada y además presentaron la formación de estructuras tipo callo en las raíces seminales y adventicias, sugiriendo así, que la glucosa es un agente mitogénico importante durante la germinación y postgerminación. Caso contrario a lo reportado en *A. thaliana*, en la que la glucosa a los 7 días de exposición presentó un efecto negativo, retrasándose la germinación de las semillas y desarrollo temprano de las plántulas (Arenas-Huertero et al., 2000;

Gibson, 2005). Ya se ha mencionado que TOR es un regulador maestro que coordina con diversas señales la proliferación, crecimiento y desarrollo de los organismos. Analizamos el efecto del inhibidor AZD-8055 en ejes embrionarios a los 7 días de imbibición (post-germinación, Figura 18B). Los ejes con glucosa se alargaron más respecto a los demás tratamientos y conservaron la morfología enrollada. Curiosamente, los ejes en presencia de glucosa más AZD-8055 crecieron en menor proporción y no presentaron la morfología retorcida, lo anterior podría indicarnos que el papel de la glucosa como señalizador (pero no como fuente de carbono) se ha perdido debido a la inhibición de la actividad de TOR. Los ejes sin fuente de carbono en ausencia o presencia de inhibidor fueron incapaces de crecer.

8.3 Efecto del inhibidor de TOR en el tamaño, número de células por unidad de área y síntesis *de novo* de ADN en ejes embrionarios embebidos durante 24 h.

En las plantas, la división celular se lleva a cabo en los meristemas. En *Arabidopsis*, se ha propuesto que la señalización Glucosa-TOR controla la transcripción de genes de fase S y el ciclo celular para promover la activación y crecimiento del meristemo radicular. La presencia de glucosa desencadena la proliferación celular en el RAM, lo cual depende de la energía producida en la mitocondria y de la actividad de la cinasa TOR, ya que las plantas con mitocondrias bloqueadas o deficientes en TOR son incapaces de llevar a cabo la entrada al ciclo celular (Xiong et al., 2013). Anteriormente se demostró que en maíz la glucosa actúa como un agente mitogénico modificando el tamaño y número de células por unidad de área en las regiones meristemáticas del eje embrionario (Lara-Núñez et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó a nivel celular y molecular el efecto del inhibidor AZD-8055 en las regiones meristemáticas radiculares del eje embrionario de maíz a las 24 h de imbibición.

A nivel celular, mediante cortes histológicos teñidos con safranina-verde rápido, se analizó la organización y tamaño celular (Figura 22 y Figura 22, respectivamente), así como el número de células por unidad de área ($100 \mu\text{m}^2$) en las regiones

meristemáticas radiculares (Figura 23). En el tratamiento con glucosa, las células presentaron una morfología compactada, la organización celular fue desordenada y las células fueron pequeñas. Además, hubo mayor cantidad por unidad de área, respecto a los demás tratamientos, posiblemente debido a que hubo mayor proliferación. En el caso del inhibidor más glucosa; las células fueron desordenadas, el tamaño celular fue mayor (en comparación con ausencia del inhibidor) y, por ende, el número de células por unidad de área fue menor. Montané & Menand, en 2013 reportaron que en la raíz primaria de *A. thaliana*, el inhibidor AZD-8055 acorta el tamaño de la zona meristemática, al reducirse el número de células. Los resultados sugieren que, en maíz, la señalización Glucosa-TOR está relacionada con la proliferación celular (número de células) y con el programa morfogénico.

Curiosamente, en el tratamiento con sacarosa, las células fueron más alargadas y hubo un acomodo celular más ordenado, y el número de células por unidad de área fue menor, en comparación con glucosa. Lo anterior sugiere que maíz es capaz de responder diferencialmente a dos azúcares, y que el programa morfogénico y organización celular es diferente dependiendo del azúcar presente en el medio.

Anteriormente, Lara-Núñez et al., 2017, mediante un ensayo con EdU (5-etinil-20-desoxiuridina), un análogo de la timidina (que se incorpora en el ADN durante su síntesis activa) demostraron que en las regiones meristemáticas de maíz la síntesis *de novo* de ADN aumenta en presencia de glucosa. Teniendo la hipótesis de que la glucosa activa la vía TOR y ésta funciona como un factor mitogénico al aumentar el número de células por unidad de área en el RAM, se evaluó el efecto del inhibidor AZD-8055 en la síntesis *de novo* de ADN en las regiones meristemática radiculares a las 24 h de imbibición. En *A. thaliana*, se ha reportado que la activación de TOR por la señalización generada por la glucosa, controla la activación de los meristemas radiculares y la entrada a fase S (Xiong et al., 2013).

La síntesis de ADN *de novo* se visualizó mediante microscopia confocal realizando una reacción de *Click* catalizada por el cobre entre un alquino presente en el EdU y una azida que se encuentra en el colorante Alexa Flour para formar un triazol. Donde hubo incorporación de EdU se visualizaron manchas verdes en un campo

azul (los núcleos fueron tenidos con Hoechst 333,42). Mediante densitometría utilizando el programa ImageJ, se obtuvo la incorporación relativa de EdU (Tabla 4). En la Figura 28 se muestran las imágenes de la incorporación de EdU en la zona meristemática radicular del eje embrionario a las 24 h de imbibición. En medio con glucosa la síntesis *de novo* de ADN fue más evidente (2.35 URI mayor, respecto al control) en comparación con los demás tratamientos. En el caso del inhibidor más glucosa, la síntesis de ADN *de novo* disminuyó casi un 50% en comparación al tratamiento sin inhibidor. En ausencia de glucosa las células mostraron poca incorporación de EdU (0.51 URI), en presencia del inhibidor sin azúcar, la incorporación de EdU fue mucho menor en comparación al tratamiento anterior. Utilizando el marcador mitótico CYCB1;1: GUS, Montané & Menand, 2013, reportaron que en la raíz primaria de *A. thaliana* el inhibidor AZD-8055 reduce la capacidad de proliferación celular. Los resultados anteriores sugieren que, en maíz, la señalización Glucosa-TOR está implicada en la síntesis *de novo* de ADN, la glucosa actúa bajo la vía TOR como un agente mitogénico al promover la proliferación celular en el RAM.

8.4 Efecto del inhibidor de TOR en la expresión de genes del ciclo celular y del gen *ZmTOR*.

A lo largo de los años, se ha encontrado que una gran cantidad de genes de plantas están regulados transcripcionalmente por la señalización de azúcares, incluidos los genes implicados en la fotosíntesis, el metabolismo de carbono y nitrógeno, el ciclo celular, las respuestas a estrés y el metabolismo secundario (Sheen, 1990; 1999).

En *A. thaliana*, específicamente la señalización Glucosa-TOR orquesta rápidamente la reprogramación transcriptómica, regulando positivamente más de 1300 genes, dentro de los cuales se hallaron 105 involucrados en el ciclo celular (*CYCDs*, *CYCA*s y *CDKB1;2*) y síntesis de ADN, y 100 involucrados con la transcripción, síntesis y procesamiento de RNA. Además, la expresión de genes que son activados por glucosa, se superponen con la expresión de los genes diana del factor de transcripción E2F (Xiong et al., 2013). Ya se mencionó que la presencia de glucosa,

vía TOR, desencadena la proliferación celular en los meristemos de raíz, siendo el factor E2F un blanco de la cinasa TOR, cuya fosforilación por la señalización por la vía Glucosa-TOR es un paso clave para la entrada a la fase S del ciclo celular (Xiong et al., 2013). En maíz, se ha reportado que la glucosa altera diferencialmente la expresión de marcadores clave del ciclo celular, entre ellos *CDKAs*, *CYCDs* y *KRP3* (Lara Núñez, et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó el efecto del inhibidor AZD-8055 en la expresión del gen *ZmTOR* y genes implicados en el ciclo celular, cuya expresión se vio previamente incrementada en presencia de glucosa.

No se encontró diferencia significativa en la expresión del gen *ZmTOR* (Figura 24) en presencia de glucosa, y ausencia o presencia del inhibidor AZD-8055. Lo anterior sugiere que TOR no es capaz de regular su propia expresión. Curiosamente hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión del gen *ZmTOR* entre el tratamiento con sacarosa y glucosa, viéndose incrementada en este último azúcar. Lo que podría sugerirnos una regulación diferencial del gen *ZmTOR* y de los procesos de proliferación y diferenciación celular por azúcares, viéndose incrementada la expresión de este gen con glucosa, favoreciendo la proliferación celular.

Al analizar el patrón de expresión del gen *ZmCYCD4;2* (Figura 25), los niveles de transcrito se incrementan desde las 6 h, respecto a los otros tratamientos, teniendo un pico máximo a las 24 h (resultado similar al reportado por Lara-Núñez, et al., 2017). En presencia del inhibidor, la expresión del gen disminuye significativamente desde las 6 h de imbibición, lo que sugiere que la actividad de TOR regula positivamente la expresión de este gen, es decir, la expresión del gen *ZmCYCD4;2* está regulada por la vía de señalización Glucosa-TOR. En un análisis de transcriptoma en *A. thaliana*, se demostró que la señalización por glucosa vía TOR es capaz de activar genes del ciclo celular, entre ellos los de la familia de *CYCDs* (Xiong et al., 2013). Posiblemente esta regulación transcriptómica por la vía de señalización Glucosa-TOR está conservada en maíz.

Para el caso del gen *ZmCDKA1;1*, se observó un patrón de expresión diferencial entre los tratamientos (Figura 26). Al analizar la expresión de este gen en medio con

glucosa versus glucosa más el inhibidor, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tiempos de análisis 6 h y 12 h. En presencia del inhibidor AZD-8055, la expresión del gen *ZmCDKA1;1* aumenta de manera considerable respecto al tratamiento con glucosa sin inhibidor. De manera similar, en ausencia de fuente de carbono y presencia del inhibidor, la expresión del gen aumenta. Lo anterior sugiere que la actividad de ZmTOR está regulando negativamente la expresión del gen *ZmCDKA1;1* en los tiempos tempranos de imbibición. Recientemente se reportó que la cinasa TOR puede fosforilar al factor de transcripción E2F, quien a su vez activa la expresión de genes necesarios en la transición G1/S (Xiong et al., 2013), función ampliamente descrita para complejos CYCDs/CDKAs (Magyar et al., 2013; Inzé & De Veylder, 2006). En este trabajo, observamos que la presencia de AZD-8055, un inhibidor específico de la cinasa ZmTOR, provocó un incremento de la expresión del gen *ZmCDKA1;1*, sugiriendo que la baja actividad de ZmTOR provoca un desequilibrio celular y el incremento de la expresión del gen *ZmCDKA1;1* puede ser un mecanismo de compensación celular para mantener complejos de cinasas activas. Tampoco se puede descartar si ambas cinasas tienen sustratos comunes, lo cual podría ocurrir y sería importante estudiar.

Anteriormente, Lara-Núñez et al., (2017) describieron que la expresión del gen *ZmKRP3* fue inducida desde las 12 h por glucosa. Se analizó el efecto del AZD-8055 en la expresión del gen *ZmKRP3* (Figura 27). Aunque la expresión del gen se indujo en presencia de glucosa y ausencia o presencia del inhibidor, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, sugiriendo que la regulación transcripcional del gen *ZmKRP3* por glucosa es independiente de la actividad de TOR. Molnar y colaboradores en 2014 demostraron que la inhibición de la vía mTOR por rapamicina no tuvo un efecto negativo en la expresión de p21 (un análogo funcional de KRP3), lo cual podría sugerirnos que no hay una interconexión entre la vía TOR y los inhibidores de CDKs, en este caso KRP3.

9. Conclusiones

La inhibición de la actividad de la cinasa TOR provocó una alteración en la expresión de genes implicados en el ciclo celular. La expresión del gen *ZmCYCD4;2* es regulada por la vía Glucosa-TOR, mientras que la actividad de TOR podría estar regulando negativamente la expresión de *ZmCDKA1;1*.

La expresión del gen *ZmTOR* no está regulada por la propia actividad de TOR.

La expresión del *ZmKRP3* es estimulada por glucosa y la regulación del gen es independiente de la actividad de TOR.

La inhibición de la actividad de la cinasa TOR provocó una alteración en el metabolismo y crecimiento de ejes embrionario de maíz en germinación a las 72 h de imbibición.

La inhibición de la actividad de TOR sugiere la pérdida de la señalización por glucosa, en los ejes embrionarios embebidos a las 72 h y 7 días.

La vía de señalización Glucosa-TOR podría estar relacionada con la morfogénesis y organización celular. Además la inhibición de esta vía afectó la proliferación celular, al disminuir el número de células por unidad de área y la síntesis de ADN *de novo* en las zonas meristemáticas radiculares.

10. Perspectivas

Analizar la expresión de los genes *ZmTOR*, *CYCD4;2*, *CDKA1;1* Y *KRP3* mediante qRT-PCR.

Estudiar la influencia de la vía Glucosa-TOR en el patrón de las proteínas *ZmTOR*, *CYCD4;2* Y *KRP;3*.

Demostrar la fosforilación del factor de transcripción *ZmE2F* por *ZmTOR*.

Estudiar la influencia de la vía Glucosa-TOR en genes de fase M (*ZmCYCB2;1* y *ZmCYCB1:2*).

11. Referencias

- Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla LP, Sánchez de Jiménez E** (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays L.*) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems*. 3:794-802.
- Apsel, B, Blair JA, Gonzalez B, Nazif T M, Feldman ME, Aizenstein B** (2008). Targeted polypharmacology: discovery of dual inhibitors of tyrosine and phosphoinositide kinases. *Nature Chemical Biology*. 4, 691–699.
- Ahn CS, Han JA, Lee HS, Lee S, Pai HS** (2011). The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *Plant Cell*. 23:185–209.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD** (1994). In *Molecular Biology of the Cell: The Cell-Division Cycle* 3rd edition, Garland pp 863-910.
- Anderson GH, Veit B, Hanson MR** (2005). The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology*. 3:12.
- Andrade, MA and Bork, P** (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature. Genetics*. 11: 115–116.
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P** (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes & Development*. 14: 2085-2096.
- Attucci S, Carde JP, Raymond P, Saint Gès V, Spiteri A, Pradet A** (1991). Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiology*. 95:390-398.
- Baíza AM, Vázquez-Ramos JM, Sánchez de Jiménez E** (1989). ADN Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Journal of Plant Physiology*. 135:416-421.

Baena-González E, Rolland F, Thevelein J, Sheen J (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*. 448:938–942.

Baluska F, Kubica S, Hauskrecht M, (1990). Postmitotic “isodiametric” cell growth in the maize root apex. *Planta*. 181, 69e274.

Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, & Manning BD (2013). Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science*. 339, 1323–1328.

Bewley JD, Marcus, A (1990). Gene expression in seed development and germination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 38: 165-193.

Black M, Bewley JD, Halmer P (2006). The Encyclopedia of Seeds: Technology and Uses. UK: Cromwell Press. *Annals of Botany*. 100(6): 1379

Borisjuk L, Rolletschek H, Wobus U, Weber H (2003). Differentiation of legume cotyledon as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *Journal of Experimental Botany*. 54, 503e512.

R. Bosotti, A. Isacchi EL (2000) Sonnhammer Fat: a novel domain in pik-related kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 25 pp. 225-227.

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

Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P (2013). Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 73:897–909.

Choi J, Chen J, Schreiber SL, & Clardy J (1996). Structure of the FKBP12–rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*. 273: 239–242.

Chresta CM, Davies BR, Hickson I (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Research*. 70, 288–298.

Colon-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *The Plant Journal*. 20, 503–508.

Comai L, Harada JJ (1990). Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of transition from embryogeny to germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87:2671-2674.

Cornu M, Albert V, Hall MN (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. 23:53–62.

Dekkers B, Schuurmans J, Smeekens S (2008). Interaction between sugar and abscisic acid signalling during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*. 67: 151-167.

Deng K, Yu L, Zheng X, Zhang K, Wang W, Dong P, et al. (2016). Target of rapamycin is a key player for auxin signaling transduction in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 7:291.

Deprost D, Truong HN, Robaglia C, Meyer C (2005). An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 326:844–850.

De Clerck A & Inzé D (2006). Cyclin-dependent Kinase inhibitors in yeast, animals and plants: a functional comparison. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 41(5):293-313.

De Jager SM, et al., (2009). Dissecting regulatory pathways of G1/S control in *Arabidopsis*: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Molecular Biology*. 71, 345–365

De Veylder L, De Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, LEsucle, B, Van Montagu M, Engler G, Inzé D (1999). A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta*. 208: 453-462.

Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clement G, Moreau M, Sormani R, Robaglia C, Meyer C (2013). Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Frontier in Plant Science*. 4:93.

Dolan L, Davies J (2004) Cell expansion in roots. *Current Opinion in Plant Biology*. 7, 33–39.

Dong P, Xiong F, Que Y, Wang K, Yu L, Li Z, et al (2015). Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in *Arabidopsis*. *Frontier in Plant Science*. 6:677.

Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. (2010;). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 328:1172–1176.

Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A (2014). Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com>

Ehrenshaft M, Brambl R, (1990). Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology*. 93: 295-304.

Engelman JA, Luo J, & Cantley LC (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 7, 606–61.

Eveland AL, Jackson DP (2011). Sugars, signaling and development. *Journal of Experimental Botany*. 63 (9).

FAO (2012). FAOSTAT, Production. Consultado el 6 Diciembre de 2018. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochemistry Journal*. 421, 29–42.

Garza-Aguilar S, Lara-Núñez A (2014). Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas. *Revista de Educación Bioquímica*. 32, 39-47.

Gibson SI (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 8: 93-102.

Hardt M, N Chantaravisoot & F Tamanoi, (2011). Activating mutations of TOR (target of rapamycin). *Genes Cells*. 16:141– 151.

Hartig K, Beck E (2006). Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*. 8, 389e396.

Heitman J, Movva NR & Hall MN (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 253, 905–909.

Henriques R, Bögre L, Horváth B, Magyar Z (2014). Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway. *Journal of Experimental Botany*. 65, pp. 2691-2701

Huang J, Zhu H, Haggarty SJ, Spring DR, Hwang H, Jin F, Snyder M, & Schreiber SL (2004). Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signalling network through chemical genetics and proteome chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(47), 16594–16599.

Inzé D, De Veylder L (2006). Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Reviews*. 40:77- 105.

Ishibashi N, Minamikawa T (1990). Molecular cloning and characterization of stored mRNA in cotyledons of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiology*. 31:39-44.

Jiang K, Zhu T, Diao Z, Huang H (2010). The maize root stem cell niche: a partnership between two sister cell populations. *Planta*. 231, 411e424.

Kang SA, Pacold ME, Cervantes CL, Lim D, Lou HJ, Ottina K, Gray NS, Turk BE, Yaffe MB, Sabatini DM (2013). mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*. 341 1236566-1-9.

Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, et al (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*. 125, 733-747.

Kotogány E, Dudits D, Horvath GV, Ayaydin F, (2010). A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods*. 6, 5.

Kunz J, Schneider U, Howald I, Schmidt AMN (2000). Hall HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 275 pp. 37011-37020

Lara-Núñez A, García-Ayala BB, Garza-Aguilar SM, Flores-Sánchez J., et al. (2017). Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiology & Biochemistry*. 113:20-31.

Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signalling in growth control and disease. *Cell*. 149:274-293.

Leiber RM, John F, Verhertbruggen Y, Diet A, Knox JP, Ringli C (2010). The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 22: 1898–1908.

Liu Y, Bassham DC (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*. 5:e11883.

Ma XM, Blenis J (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10: 307–318.

Magyar Z, Ito M, Binarová P, Mohamed B, Laszlo B (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis. *Plant Genome Diversity*. 2: 77-92.

Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DP (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*. 18:477–49.

Malagu K, Duggan H, Menear K, Hummersone M, Gomez S, Bailey C, Edwards P, et al., (2009). The discovery and optimisation of pyrido[2,3-d]pyrimidine-2,4-diamines as potent and selective inhibitors of mTOR kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 19:5950–5953.

Mangelsdorf PC, Reeves RG (1938) The origin of maize. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 24: 303–312.

MASISH: Maize Seed *In Situ* Hybridization Database (<http://uab.cat/masish/>)
Consultado: 4 Diciembre 2018.

Menand B, T Desnos, L Nussaume, F Berger, D Bouchez, C Meyer, & C. Robaglia (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of National Academy of Sciences*. USA 99:6422–6427.

Menges M, De Jager SM, Gruissem W, Murray JAH (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal*. 41: 546–566.

Meyerowitz EM (2002). Plants compared to animals: the broader comparative study of development. *Science*. 295: 1482-1485.

Mishra BS, Singh M, Aggrawal P & Laxmi A. (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling Arabidopsis thaliana seedlings root growth and development. *PLoS One*. 4, e4502.

Molnar Z, Millward AB, Tse W & Demaine AG (2014). “p21 (WAF1/CIP1) expression is differentially regulated by metformin and rapamycin,” *International Journal of Chronic Diseases*, vol. 2014.

Montané MH, Menand B (2013). ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *Journal of Experimental Botany*. 64, 4361–4374

Moreau M, Azzopardi M, Clement G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Taconnat L, Renou JP, Robaglia C, Meyer C (2012). Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GbetaL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell*. 24:463–481.

Morgan DO (2007). The cell cycle principles of control. *New Science Press Ltd*. pp. 28-31.

Naouar N et al., (2009). Quantitative RNA expression analysis with Affymetrix Tiling 1.0R arrays identifies new E2F target genes. *The Plant Journal*. 57, 184–194.

Nicolás G, Aldasoro JJ (1979). Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum*. *Journal of Experimental Botany*. 30:1163-1170.

Osborne DJ, (1983). Biochemical control systems operating in the early hours of germination. *Canadian Journal Botany*, 61: 3568-3577.

Paliwal RL, Granados G, Lafitte HR (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal. 28.

Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2010). Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. 152: 1874–1888.

Pines J (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal*. 308: 697–711.

Piperno D & Flannery KV (2001). The earliest archaeological maize (*Zea mays L.*) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 98, 2101–2103.

Piperno DR, et al (2009). Starch grain phytolith Evidence for early ninth millennium B.P. Maize from central Balsas River Valley, México. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13); 5019-24.

Ramon M, Rolland F & Sheen J. (2008). Sugar Sensing and Signaling. The *Arabidopsis* Book Rockville, MD: *American Society of Plant Biologists*.

Raven, PH, Evert RF, Eichhorn SE (1992). Biology of plants. Worth Publishers, Inc. N.Y, 545- 562.

Ren M, Qiu S, Venglat P, Xiang D, Feng L, Selvaraj G, Datla R. (2011). Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in Arabidopsis. *Plant Physiology*.155:1367–1382.

Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, Logan D, Mattoo A, Selvaraj G, Datla R (2012). Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell*. 24:4850–4874.

Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JHA (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 20:4513-4521.

Robaglia C, Thomas M, Meyer C (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:301-307.

Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 675–709.

Rosas-Bringas F (2015). Caracterización génica de la familia ICK/KRP de maíz. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.

Ruzin SE, (1999) Plant Microtechnique and Microscopy. Oxford University Press, New York, pp. 154e155.

Sablowski R & Dornelas M. (2013). Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany*. 65, 2703–2714.

Salih C, Clement G, Dobrenel T, Marchive (2005) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genetics*. 11: 115–116.

Salon C, Raymond P, Pradet A. (1988). Quantification of carbon fluxes through the tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 12278-12287.

Saravia A (1965). Popol Vuh: Antiguas historias de los indios Quiché de Guatemala. Editorial Porrúa, México.

Schenone S, Brullo C, Musumeci, F, Radi, M & Botta M. (2011). ATP competitive inhibitors of mTOR: an update. *Current Medicinal Chemistry*. 18, 2995–3014.

Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M & Ryabova, LA (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO Journal*. 32, 1087–1102.

Schmelzle T. & Hall MN (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*. 103, 253–262.

Serratos-Hernández JA (2012) El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. Greenpeace.

<https://www.greenpeace.org/archivemexico/Global/mexico/report/2009/3/el-origen-y-la-diversidad-del.pdf>. Consultado el 8 de Diciembre de 2018.

Sheen J (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell*. 2, 1027–1038.

Sheen J (1999). C4 gene expression. *Annual Review of Plant Biology*. Plant Mol. Biol. 50, 187–217.

Singh M, Gupta A & Laxmi A (2014). Glucose and phytohormone interplay in controlling root directional growth in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*. 9(7).

Skylar A, Wu X (2011). Regulation of meristem size by cytokinin signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*. 53: 446–454.

Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology*. 13:274–279.

Sormani R, Yao L, Menand B, Ennar N, Lecampion C, Meyer C, Robaglia C (2007). *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biology*. 7: 26.

Sturgill TW, Hall MN (2009). Activating mutations in TOR are in similar structures as oncogenic mutations in PI3K α . *ACS Chemical Biology*. 4, 999-1015.

Tsukagoshi H, Busch W & Benfey PN (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*. 143, 606–616.

Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 14: 903-916.

Vandepoele K, Raes J, et al (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiology*. 139, 316–328

Vázquez-Ramos, J & Sánchez MP (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*. 13: 113-130.

Vela E (2011). El maíz. *Arqueología Mexicana*. 38: 10-26.

Vincent PLD (2002) *Zea mays* (Maize, Corn). Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, et al. (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell*. 6:909–19.

Wang L, Ruan YL (2013) Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science*. 4, 163.

Wullschleger S, Loewith R & Hall MN (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124: 471–484.

Xiong Y, Sheen J (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 287:2836–2842.

Xiong Y, Sheen J (2013). Moving beyond translation: glucose TOR signalling in the transcriptional control of the cell cycle. *Cell cycle*.12:1989-1990.

Xiong Y, Sheen J (2014). The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology*. 164:499-512.

Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*. 496: 181-186.

Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ & Pavletich, NP (2013). mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 497, 217–223.

Yuan H, Xiong Y, Guan KL (2013). Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. *Molecular Cell*. 49:379–387.

Zask A, Verheijen JC, Curran K, Kaplan J, Richard DJ, Nowak P, Malwitz DJ, Brooijmans N, Bard et al. (2009). ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin: design and synthesis of highly potent and selective pyrazolopyrimidines. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52, 5013-5016.

Zlatanova JS, Ivanov PV, Stoilov LM, Chimshirova KV, Stanchev BS (1987) ADN repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Molecular Biology*, 10:139-144.