



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Contribución de la subunidad LCB2a de la serina palmitoiltransferasa
al perfil de esfingolípidos de la membrana plasmática evaluado por
análisis informático.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:
DIEGO ANTONIO GUERRERO PÉREZ**

**Directora de tesis:
Dra. MARINA GAVILANES RUÍZ**



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2022



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: GAVILANES RUIZ MARINA

VOCAL: Profesor: MARTÍNEZ BARAJAS J. ELEAZAR

SECRETARIO: Profesor: ORTEGA MUÑOZ RAQUEL

1er. SUPLENTE: Profesor: ÁVILA CHAVEZ EUCLIDES

2° SUPLENTE: Profesor: PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARINA GAVILANES RUÍZ



SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. LAURA CARMONA SALAZAR



SUSTENTANTE (s): DIEGO ANTONIO GUERRERO PÉREZ



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA, UNAM (PAPIIT IN222621), y por la Facultad de Química (PAIP 50009115), a quienes se agradece su apoyo.

Reconocimientos

A mis queridos padres Beatriz y Leonardo quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo.

A mi hermano Jacobo por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mis amigos, con todos los que compartí dentro y fuera de las aulas.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz y a la Dra. Laura Carmona Salazar, quienes fueron mi principal apoyo durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo.

A mi querida Universidad gracias por darme la oportunidad de formar parte de ti.

Y finalmente agradezco a los miembros del jurado por la revisión realizada en el presente trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
Estructura de la membrana plasmática	6
Propiedades de la membrana	7
Composición membranal	11
Proteínas:	11
Carbohidratos	13
Lípidos	14
Esfingolípidos	19
Técnicas de análisis químico de lípidos	25
Análisis lipidómico	27
JUSTIFICACIÓN:	28
HIPÓTESIS:	28
OBJETIVOS GENERALES:	28
OBJETIVOS PARTICULARES:	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	63
REFERENCIAS	64

INTRODUCCIÓN

Estructura de la membrana plasmática.

La membrana plasmática es una estructura compleja que se encarga de aislar a las células del medio extracelular y protege y facilita el intercambio de información y sustancias entre la célula y el medio extracelular (Mathews 2002). La estructura básica de la membrana plasmática consiste en dos láminas (bicapa) de moléculas de lípidos de naturaleza anfipática, es decir, que contienen una porción hidrofóbica y otra hidrofílica. La bicapa lipídica aparece de forma espontánea cuando este tipo de moléculas se sitúa en un medio acuoso, debido a que es la disposición más estable que pueden adquirir desde el punto de vista energético. Los fosfolípidos (glicerofosfolípidos y esfingolípidos que contienen fosfato) son los principales constituyentes de las membranas y son moléculas que poseen una zona polar y dos colas apolares. Los lípidos de membrana son muy variados dependiendo, entre otras características, del tipo, longitud y grado de insaturación de los ácidos grasos y las bases esfingoideas, el tipo de esteroides y la estructura de las cabezas polares de todos los lípidos membranales. Esta composición puede variar bajo diferentes condiciones de nutrición o en condiciones patológicas (Luckey 2008).

En 1972, se postuló un modelo conocido como Modelo de Membrana de Mosaico Fluido por Singer y Nicolson (Figura 1). Este modelo describió a las membranas con una composición química de glicerofosfolípidos y proteínas que interactúan y se distribuyen aleatoriamente, dando como resultado una estructura homogénea y fluida. La palabra mosaico hace referencia a su composición, en la que diferentes lípidos, carbohidratos y proteínas coexisten en la misma estructura laminar y el término fluido corresponde a su dinámica, implicando que cada uno de sus constituyentes posee una distribución homogénea a lo largo de toda la membrana (Carmona 2018).

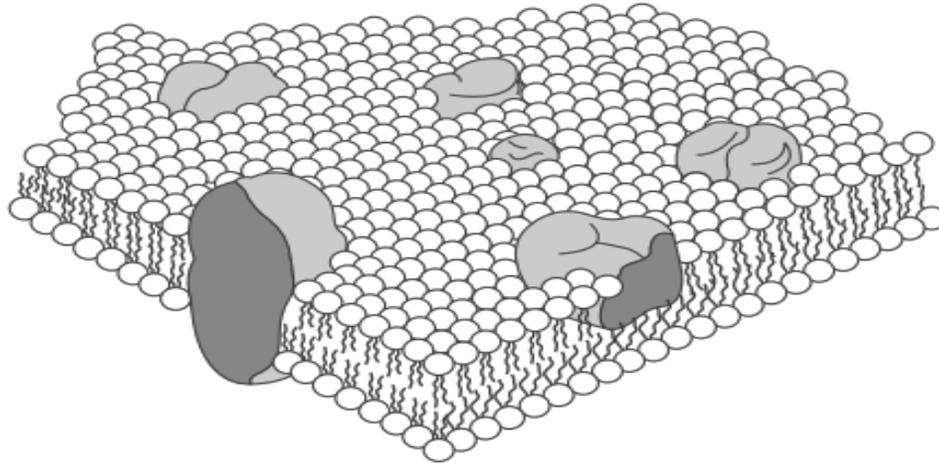


Figura 1: **Modelo de Mosaico Fluido propuesto por Singer y Nicolson.** La estructura básica de la membrana es una bicapa lipídica, con las cadenas de ácido graso de cada monocapa formando un interior apolar y un exterior polar. Los cuerpos sólidos representan proteínas distribuidas aleatoriamente en el plano de la membrana (Luckey 2008).

En general, la membrana es permeable a sustancias no polares y pequeñas, mientras que las sustancias hidrofílicas la penetran a través de las proteínas que forman bombas, canales y transportadores. Esta permeabilidad selectiva permite a las células mantener gradientes de concentración y carga eléctrica, críticos para el metabolismo de la célula (Luckey 2008).

Propiedades de la membrana

- **Movilidad y fluidez:** las fuerzas hidrofóbicas mantienen unidas las moléculas individuales de fosfolípidos y aun así éstas pueden desplazarse lateralmente unas respecto a otras cambiando de posición. Los lípidos también pueden tener movilidad individual de tipo rotacional, de flexión y de boya. Estas posibilidades de movimiento le da a las membranas la capacidad de ser fluidas. Los movimientos laterales de las moléculas son más frecuentes y rápidos que los cambios de localización entre la capa interna y externa de la membrana, denominado <<flip-flop>>. Estos movimientos (Figura 2) van a variar dependiendo de factores como la temperatura o la estructura de los lípidos que componen la membrana. La fluidez de las membranas no solo permite la difusión de los fosfolípidos, sino que también posibilita el desplazamiento de las proteínas de membrana (Luckey 2008, Voet y cols., 2016).

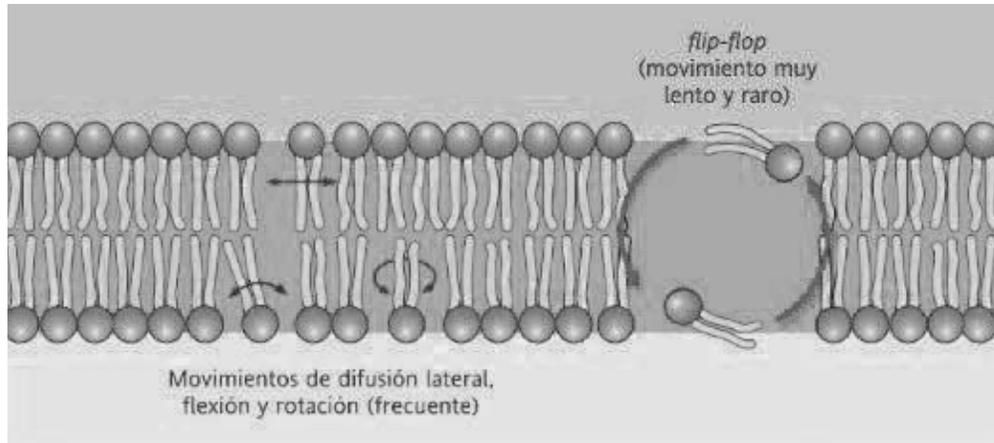


Figura 2: **Movimiento de los lípidos en la bicapa.** Los desplazamientos laterales y los de rotación son los más frecuentes y se define como el intercambio de pares de moléculas de lípidos vecinos en la misma monocapa. Sin embargo, la difusión transversal (flip-flop) se define como la transferencia de un lípido desde una monocapa a la otra (del lado citosólico al extracelular o viceversa). Este tipo de movimiento es raro y requiere acción enzimática (flipasas, flopasas o escramblasas) (Voet y cols., 2016).

- **Asimetría:** Los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y proteínas de la membrana se distribuyen asimétricamente entre las dos monocapas (Figura 3). De los glicerofosfolípidos, la fosfatidilcolina (PC) se encuentra principalmente en la capa externa (extracitosólica), al igual que los esfingolípidos como la esfingomielina (SM) y los glicoesfingolípidos. Los fosfolípidos como fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) son abundantes en la capa interna (citosólica) (Ikeda 2006, Cano 2014).

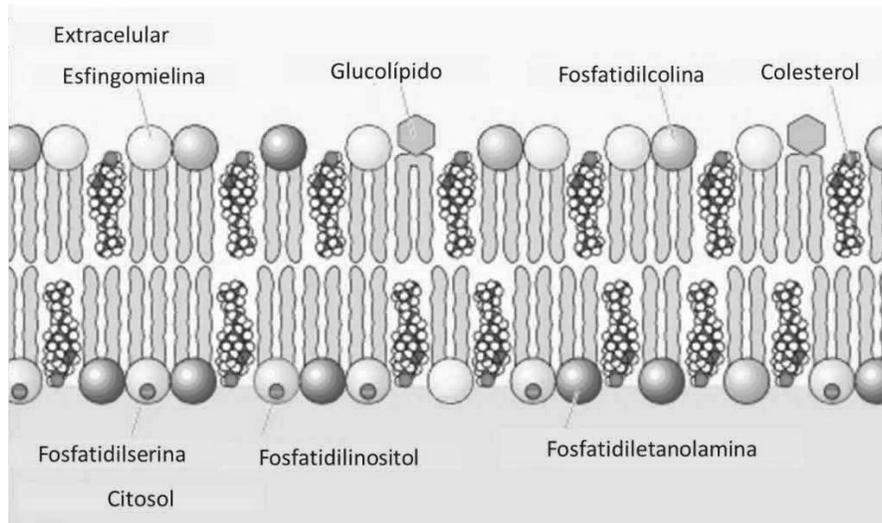


Figura 3: **Asimetría de la bicapa lipídica.** Los lípidos de la membrana plasmática (MP) se distribuyen asimétricamente entre las dos capas. (Tomado y modificado de Cooper 2000, Ikeda 2006).

- **Curvatura:** la asimetría en las capas de la membrana está directamente relacionada con la curvatura y forma de la membrana. La forma geométrica de los lípidos depende del tamaño relativo de su cabeza y las colas de ácidos grasos (Figura 4). Por lo tanto, si las partes hidrofóbicas e hidrofílicas tienen áreas transversales similares, la molécula adoptará una forma cilíndrica. Los lípidos con una cabeza polar pequeña tendrán una forma cónica. Y cuando la región hidrofóbica ocupa un área de superficie menor, la molécula tendrá una forma de cono invertido (Sprong y cols., 2021).

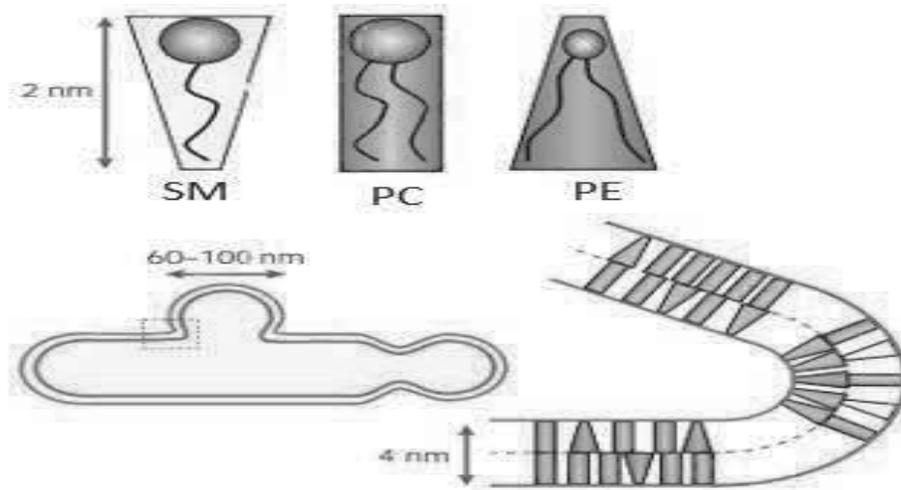


Figura 4: **Forma geométrica de los lípidos.** Se presentan como ejemplos esfingolípidos y dos glicerolípidos. SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina (Tomada y modificada de Sprong y cols., 2021).

- **Carga eléctrica:** En el caso de las membranas actúa un mecanismo de carga intrínseco, debido a la disociación eléctrica de los grupos químicos en la superficie de la membrana. A pH neutro, característico de la gran mayoría de los líquidos biológicos, la mayoría de los grupos químicos disociables generan principalmente cargas negativas (la contribución de los grupos positivos se ve superada por la de los grupos negativos). Por ejemplo, los grupos de cabeza de fosfolípidos se pueden disociar para generar H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , mientras que el ácido siálico, asociado a proteínas integrales, genera grupos COO^- (Raicu y Popescu 2008).
- **Grosor:** La longitud y el grado de insaturación de las colas hidrofóbicas de los lípidos que constituyen la membrana son los factores que determinarán el grosor de esta (Figura 5). Sin embargo, se ha visto que el factor determinante de esta propiedad es la localización y acomodo de las proteínas transmembranales (Mitra y cols., 2004).

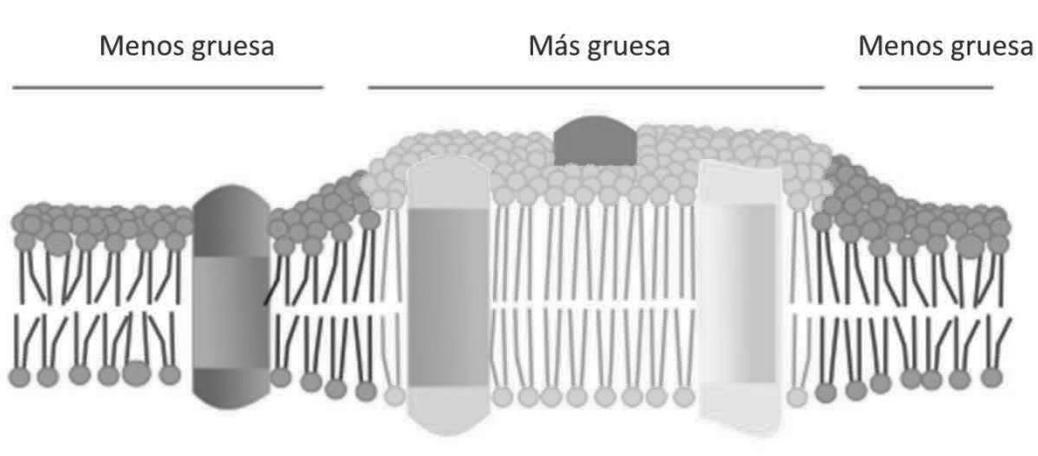


Figura 5: **Grosor de la membrana plasmática.** Existen proteínas transmembranales con regiones hidrofóbicas de diferentes longitudes. Los dominios hidrófobos de las proteínas se aíslan del medio acuático mediante lípidos con longitudes adecuadas de ácidos grasos. Por tanto, las proteínas con dominios hidrófobos largos están rodeadas por lípidos con cadenas largas de ácidos grasos (Tomado y modificado de Becker 2003).}

Composición membranar

Proteínas: las proteínas son polímeros de aminoácidos. Son grandes y complejas, por tanto, la gran variedad de secuencias de aminoácidos es muy importante ya que determina la estructura y función de las proteínas. Existe una amplia variedad de proteínas específicas que están embebidas en la membrana total o parcialmente o asociadas a su superficie (Figura 6) (Vázquez 2015).

Tipos de proteínas

- **Proteínas integrales:** Estas proteínas se insertan en la región hidrófoba de la bicapa lipídica. La mayoría de las proteínas integrales de la membrana tienen una o más regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la bicapa lipídica. Estas regiones transmembranales contienen sobre todo aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas que forman una hélice α e interactúan de manera no covalente con los lípidos circundantes. Unas pocas proteínas transmembranales atraviesan la membrana con una estructura formada por hebras β . Algunas proteínas integrales de la membrana no atraviesan la membrana, pero están asociadas a ella mediante un enlace covalente a un lípido de la membrana. Las proteínas integrales intervienen con frecuencia en la

transmisión de señales químicas hacia el interior de la célula (Mathews 2002, Hames y Hooper 2011).

- **Proteínas periféricas:** Ninguna parte de esta proteína interactúa con el interior hidrófobo de la bicapa. En su lugar, estas proteínas están asociadas a la superficie de la membrana por enlaces (no covalentes): iónicos y puentes de hidrógeno (Hames y Hooper 2011).

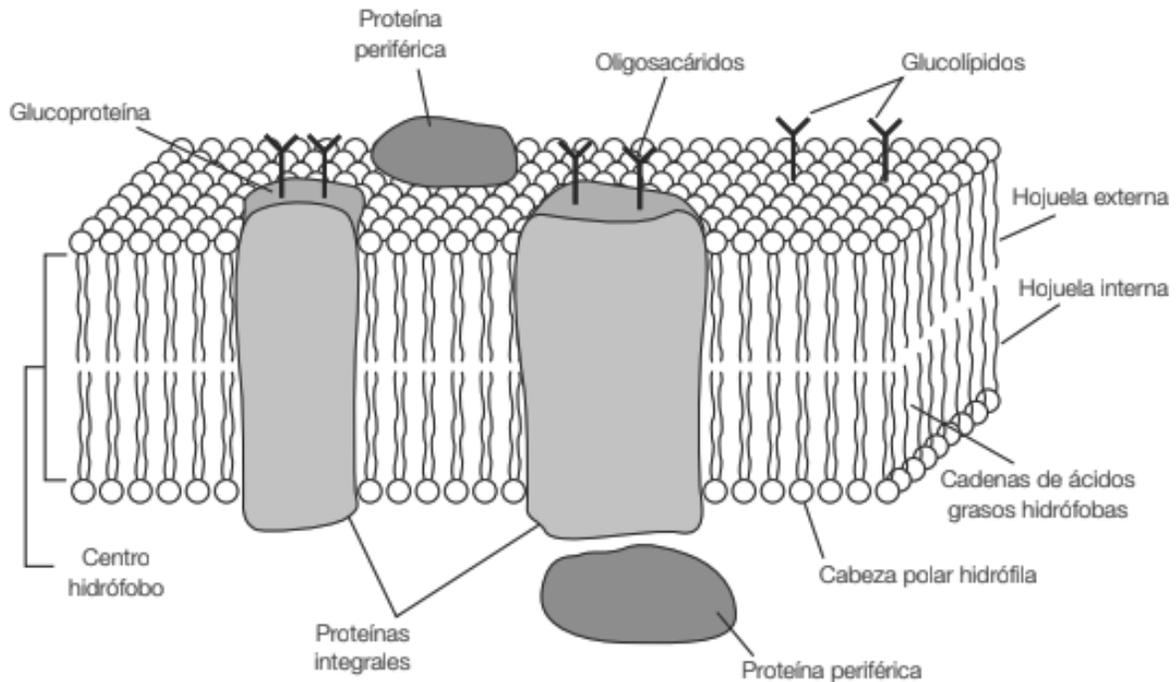


Figura 6: **Modelo de mosaico de la membrana.** Como los lípidos, las proteínas integrales de la membrana son anfipáticas y se distribuyen de manera asimétrica a través de la bicapa y están en general libres para moverse en el plano de la bicapa. La mayoría de las proteínas periféricas de la membrana suelen estar unidas a la superficie de proteínas integrales, ya sea en la cara citosólica de la membrana o en la cara extracelular. También, pueden asociarse a las cabezas polares de los lípidos de la bicapa (Hames y Hooper 2011).

Función:

Las proteínas de la membrana contribuyen a la interacción de la célula con su entorno. Por ejemplo, las proteínas de la membrana plasmática llevan a cabo funciones tan diversas como transportar nutrientes a través de la membrana plasmática, recibir señales químicas del exterior de la célula, traducir las señales químicas en acciones intracelulares y, a veces, anclar a la célula en una ubicación particular (Figura 7).

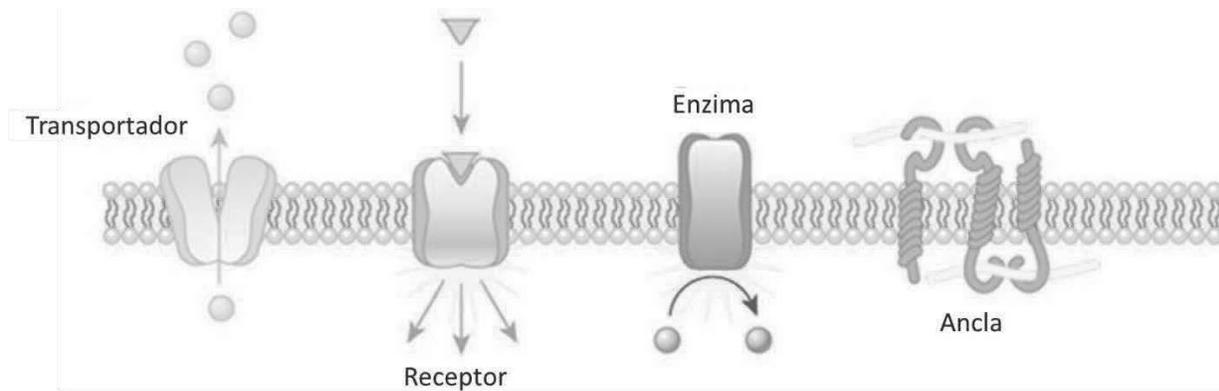


Figura 7: **Ejemplos de funciones de las proteínas.** Los transportadores llevan una molécula (como la glucosa) de un lado de la membrana plasmática al otro. Los receptores pueden unirse a una molécula extracelular y esto activa un proceso intracelular. Las enzimas de la membrana pueden hacer lo mismo que hacen en el citoplasma de una célula: transformar una molécula en otra forma. Las proteínas de anclaje pueden unir físicamente estructuras intracelulares con estructuras extracelulares (Tomado y modificado de O'Connor y Adams 2010).

Carbohidratos

Los carbohidratos de membrana se van a encontrar unidos covalentemente a las cabezas polares de los lípidos o a las porciones hidrofílicas de las proteínas membranales. Los carbohidratos realizan tres funciones principales: participan en la recepción, reconocimiento y la adhesión celular, ya sea en la señalización célula-célula o en las interacciones célula-patógeno, y tienen un papel estructural como barrera física (Sprovieri y Martino 2018).

Cuando se unen dos o más monosacáridos, forman cadenas de oligo o polisacáridos. Los enlaces entre las unidades de sacáridos pueden ser α o β y se establecen en diferentes posiciones. Si bien se pueden encontrar algunos carbohidratos asociados a las membranas intracelulares, la mayoría de ellos se localizan en la monocapa externa de la membrana plasmática (Figura 8).

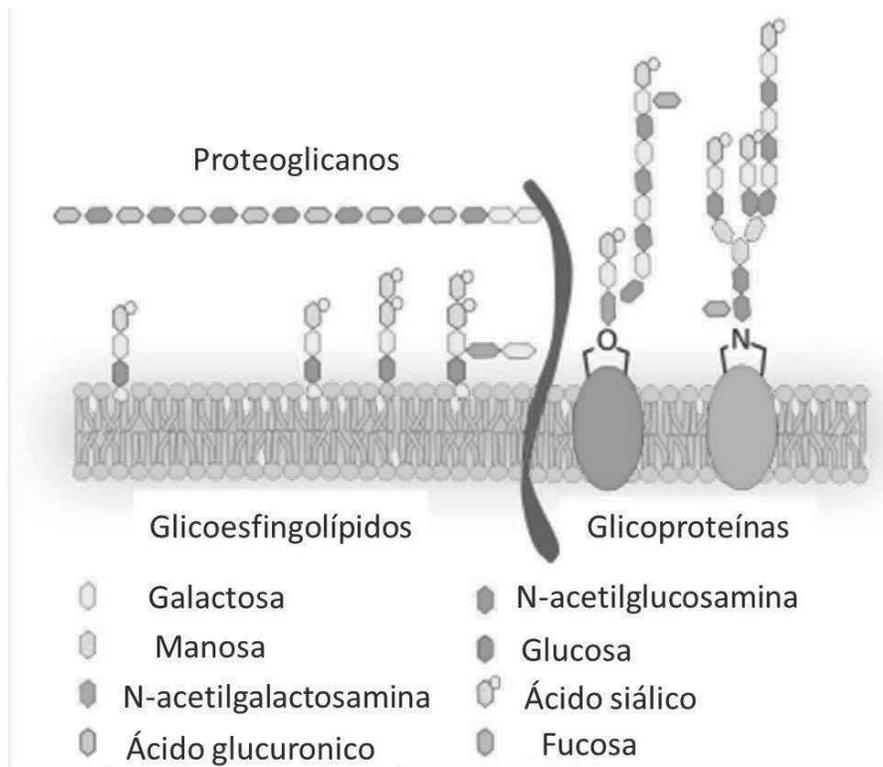


Figura 8: **Carbohidratos en la membrana.** Los carbohidratos se encuentran en la membrana en forma de mono u oligosacáridos unidos covalentemente a lípidos (glicolípidos) o a proteínas (glicoproteínas). Los sacáridos que forman estas estructuras pueden ser moléculas sencillas como la glucosa, galactosa, la manosa o azúcares más complejos (Tomado y modificado de Fuster y Esko 2005).

Lípidos.

Glicerofosfolípidos

Los principales componentes lipídicos de las membranas de eucariontes son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroides (Figura 9).

Los glicerofosfolípidos, también llamados fosfoglicéridos, son lípidos de membrana en los que se unen dos ácidos grasos mediante un enlace éster al primero y segundo carbono del glicerol en sus hidroxilos correspondientes. Todos los glicerofosfolípidos poseen dos colas no polares aportadas por los dos ácidos grasos de cadena larga (< 18 C) generalmente uno saturado y otro insaturado (Feduchi y cols., 2015; Nelson y Cox 2015).

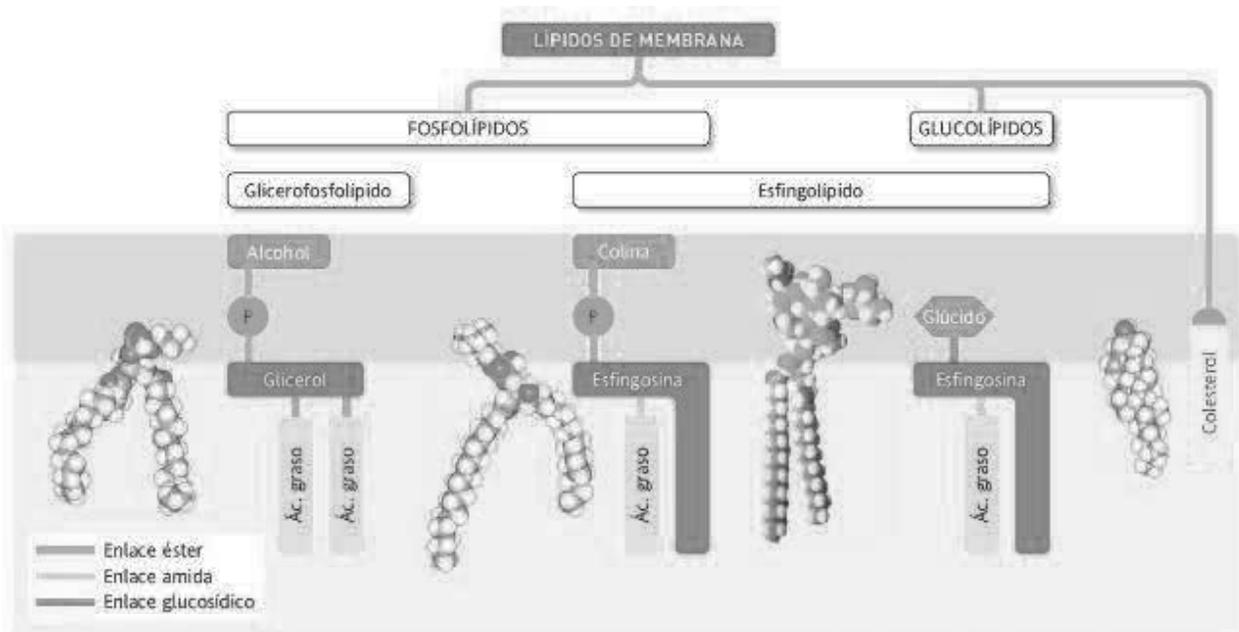
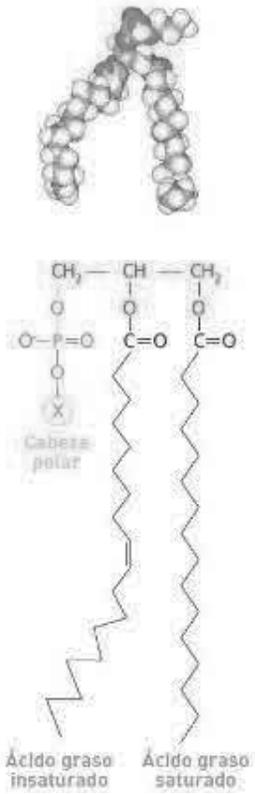


Figura 9: **Los tres principales tipos de lípidos presentes en las membranas celulares de eucariontes.** Se presentan los esqueletos básicos de los tres grupos de lípidos más abundantes en las membranas. En los fosfolípidos, el grupo de cabeza (un alcohol) se encuentra unido por un enlace fosfodiéster al glicerol mientras que los glucolípidos tienen una unión glucosídica directa entre el azúcar del grupo de cabeza y el esqueleto de esfingosina (Feduchi y cols., 2015).

Al hidroxilo del tercer carbono se une a través de un enlace fosfoéster un grupo altamente polar o cargado que es un alcohol fosforilado. El glicerofosfolípido más simple es el ácido fosfatídico, en el que $X=H$, lo cual corresponde a la cabeza polar (Figura 10). Los demás glicerolípidos se derivan de él y se forman por esterificación de diferentes compuestos, generalmente un alcohol al grupo fosfato. Los glicerofosfolípidos se nombran según el alcohol polar en el grupo cabeza. Por ejemplo, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina tienen colina y etanolamina, respectivamente, en sus grupos polares.

Fosfatidiletanolamina



	CABEZA POLAR	FOSFOLÍPIDOS
	- H	Ácido fosfatídico
Etanolamina	- CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Fosfatidiletanolamina
Colina	- CH ₂ -CH ₂ -N ⁺ (CH ₃) ₃	Fosfatidilcolina (lecitinas)
Serina	- CH ₂ -CH(NH ₂) C O ⁻	Fosfatidilserina
Glicerol	- CH ₂ -CH(OH)-CH ₂ -OH	Fosfatidilglicerol
Inositol		Fosfatidilinositol
Fosfatidilglicerol		Difosfatidilglicerol (cardiolipina)

Figura 10: **Glicerofosfolípidos**. Los glicerofosfolípidos están constituidos por una molécula de glicerol a la cual están esterificados dos ácidos grasos y un fosfato unido a un alcohol. El fosfato más el alcohol forman el grupo cabeza. Cada derivado se denomina según el alcohol del grupo de cabeza (X), con el prefijo <<fosfatidil- >> más el nombre del o los ácidos grasos (Lozano y cols. 2005, Feduchi y cols., 2015).

Terpenos

El término terpeno, propuesto por Dumas en 1866, proviene de las palabras *terpentin* (en alemán) o *turpentine* (en inglés) que es la fracción volátil obtenida de la oleorresina que exuda la superficie de un corte del pino resinero (Santos, 2008). Se clasifica dentro de los lípidos insaponificables como isoprenoides. Se forman a partir del isopreno, una unidad de cinco carbonos. Los terpenos pueden contener de una a ocho unidades de isopreno. Al unirse, forman moléculas lineales o con anillos (Figura 11). Las moléculas de isopreno se unen de acuerdo a la “regla biogenética del isopreno” mediante uniones cabeza-cola, esta regla es válida en la mayoría de los casos de los terpenos más comunes (Santos 2008; Herrera 2014). En su mayoría son de origen vegetal, fúngico y bacteriano. En los vegetales actúan como pigmentos, señales moleculares (hormonas

y feromonas) y agentes defensivos. Constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales, proporcionándoles aromas y sabores característicos. Según el número de isoprenos que tengan, se clasifican en:

- Monoterpenos: dos moléculas de isopreno, como el geraniol o el limoneno, que son aceites esenciales en los vegetales.
- Sesquiterpenos: con tres isoprenos como el farnesol.
- Diterpenos: con cuatro isoprenos (fitol, ácido giberélico)
- Triterpenos con seis isoprenos, como el escualeno; principalmente son alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos. Los triterpenos glicosilados, como las saponinas, protegen a las plantas contra microbios patógenos y plagas de insectos.
- Tetraterpenos: con ocho isoprenos, como licopeno y los carotenoides son producidos por plantas terrestres, algas y cianobacterias. (Figura 11). Algunos de estos terpenos se unen a proteínas, como las proteínas *Ras*, en un proceso llamado prenilación, que parece participar en el control del crecimiento celular (Lozano y cols., 2005).

Los terpenos se modifican químicamente por oxigenación, hidrogenación o deshidrogenación para formar terpenoides. Las moléculas terpenoides pueden tener actividad antifúngica, antimicrobiana, antiviral o antiparasitaria. Disuaden a los herbívoros que se alimentan y se utilizan como insecticidas para almacenar productos agrícolas (Ninkuu y cols., 2021).

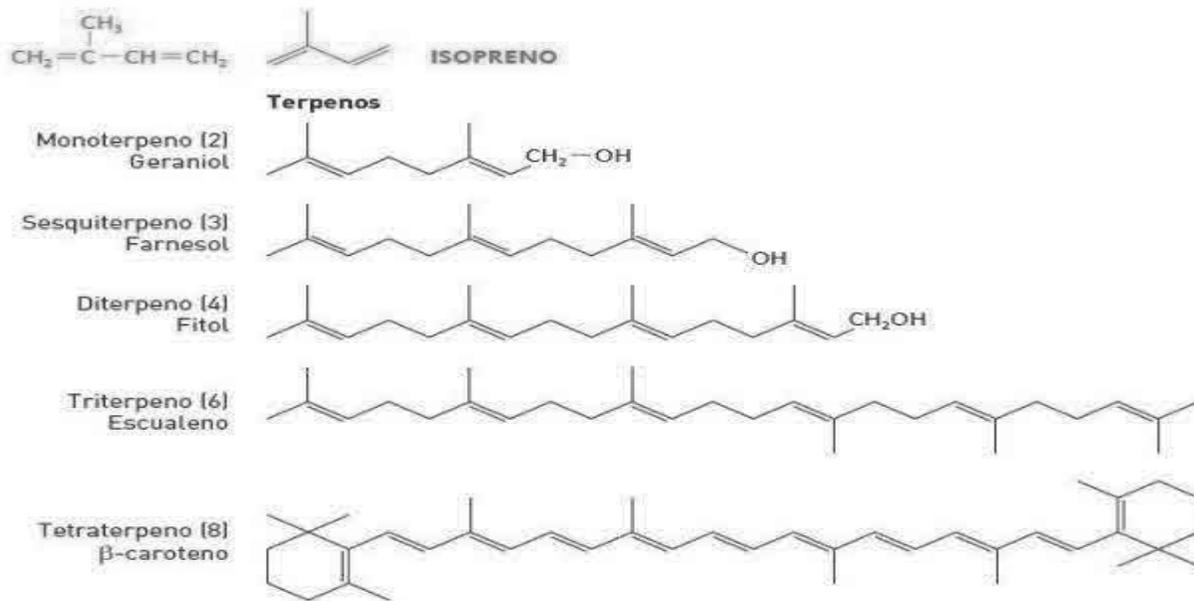


Figura 11: Estructura del isopreno y ejemplos de terpenos (Feduchi y cols., 2015).

Esteroles

Las membranas de plantas, animales y microorganismos contienen esteroides y se pueden denominar fitoesteroides, zoosteroides y microesteroides, respectivamente. El colesterol es el zoosteroides principal, pero los esteroides en las plantas se presentan comúnmente como mezclas con β -sitosterol, campesterol y estigmasterol, que representan tres de los principales fitoesteroides (Gordon 2003).

Los fitoesteroides se encuentran en los frutos, semillas, hojas y tallos de casi todos los vegetales conocidos, por lo que, normalmente, están presentes en la dieta humana. Sin embargo, a diferencia del colesterol, estos esteroides no son sintetizados por el organismo humano y son escasamente absorbidos por el intestino (López 2005).

Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Los esteroides vegetales comparten con el colesterol el núcleo central de la molécula: el ciclopentanoperhidrofenantreno, como se muestra en la Figura 12. Sin embargo, la diferencia estructural de los fitoesteroides con el colesterol y entre los diferentes fitoesteroides radica en la cadena hidrocarbonada lateral, que suele presentar sustituyentes de tipo metilo o etilo. Por tanto, en los fitoesteroides, la cadena hidrocarbonada lateral está formada por 9 o 10 carbonos y en algunos de ellos presenta un doble enlace (estigmasterol), mientras que en el colesterol esta cadena está formada por 8 carbonos y es saturada (López 2005).

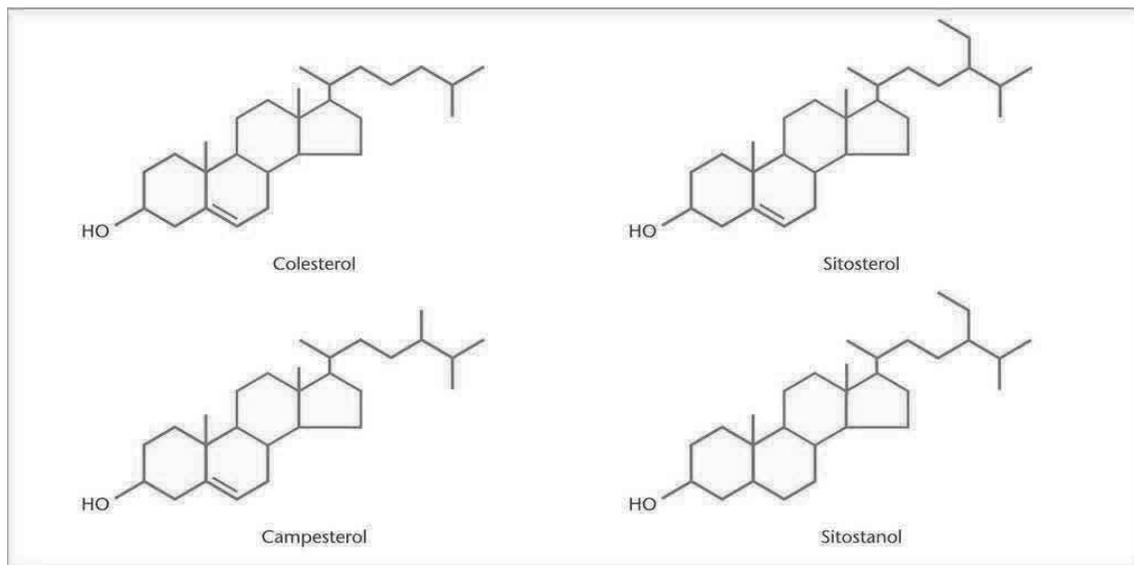


Figura 12: Estructura química del colesterol y de los principales fitoesteroides (López 2005).

Esfingolípidos.

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que contienen una cabeza con un grupo polar y dos cadenas acilo hidrofóbicas (Figura 13). La porción hidrófoba de los esfingolípidos está contenida en su esqueleto de ceramida, que está compuesto por un ácido graso unido a través de un enlace amida a una base de cadena larga (BCL). Las BCL son un componente único de esfingolípidos y metabolitos de esfingolípidos, que son producto de una reacción entre un aminoácido (serina) y un ácido graso (típicamente ácido palmítico, 16:0). En las plantas, las BCL contienen 18 átomos de carbono, posibles dobles enlaces en las posiciones 4 y 8, y se caracterizan por la presencia de dos o tres grupos hidroxilo, en los carbonos de las posiciones C1, C3 y C4. Con base en el número de hidroxilaciones, las BCL se clasifican en dihidroxiladas y trihidroxiladas. Los ácidos grasos de los esfingolípidos vegetales suelen tener una longitud de cadena de 16 a 26 átomos de carbono, estos últimos son considerados de cadena muy larga, y están saturados o monoinsaturados con un doble enlace *cis* (Lozano y cols., 2005). Dadas las diferentes especies de BCL, ácidos grasos y posibles grupos de cabeza presentes en los diversos esqueletos de ceramida, existen muchas combinaciones posibles que originan cientos de especies diferentes de esfingolípidos.

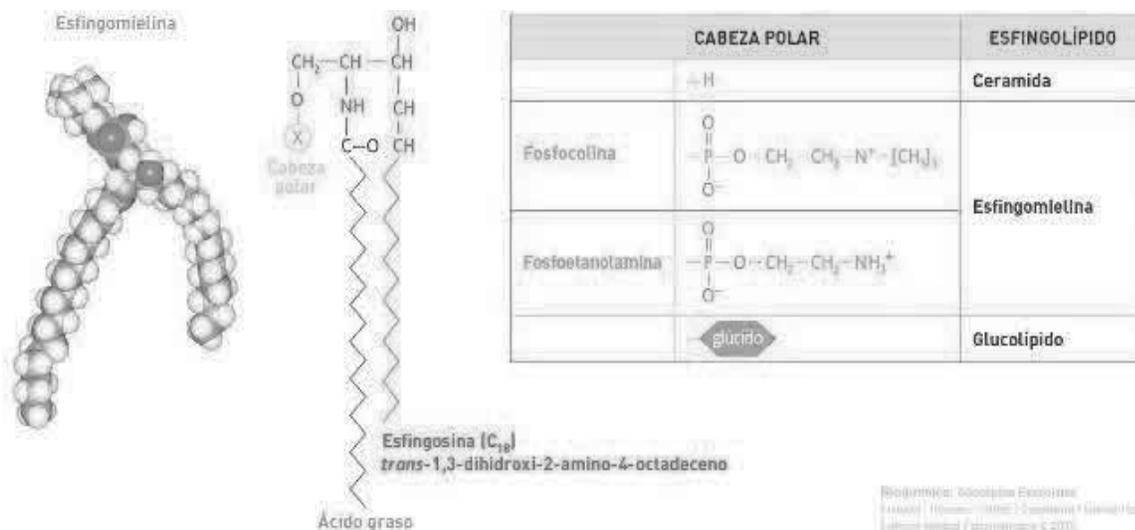


Figura 13: **Estructura general de los esfingolípidos complejos.** En los esfingolípidos, el grupo amino en el C-2 se une a un ácido graso mediante un enlace amida. Los distintos esfingolípidos difieren en el grupo de cabeza polar (X) unido al C-1 (Feduchi y cols., 2015).

En las plantas, los esfingolípidos complejos se clasifican en cuatro clases: ceramidas (Cers), hidroxiceramidas (hCers), glucosilceramidas (GlcCers) y glicosilinositolfosfoceramidas (GIPC) (Figura 14) que constituyen aproximadamente 4%, 3%, 37% y 56%, respectivamente, del total de esfingolípidos extraídos de hojas de *Arabidopsis thaliana* (Markham y cols., 2006, Carmona-Salazar y cols., 2021). A continuación se mencionan las características de cada una de estas.

- Ceramidas e hidroxiceramidas: estructuralmente son moléculas muy hidrófobas, ya que carecen de un grupo de cabeza voluminoso como los fosfolípidos o glucoesfingolípidos (Slotte y cols., 2017). El esqueleto de ceramida comprende un ácido graso unido a una base de cadena larga (C18) a través de un enlace amida. Aunque la gran mayoría de las BCL se encuentran en ceramidas, una cantidad pequeña pero detectable está presente en las células vegetales de forma libre o como un éster de fosfato (Chen y Cahoon 2009). Las hidroxiceramidas son una variación estructural de las ceramidas, la α -hidroxilación de la cadena de acilo produce hidroxí-ceramida o hCer. La ceramida y la hidroxiceramida representan solo 3 a 4% de los esfingolípidos totales de membrana, ya que sirven principalmente como intermediarios de biosíntesis o moléculas de señalización (Kota y Hama 2013; Michaelson y cols., 2016).
- Glucosilceramidas: el residuo de glucosa en las glucosilceramidas (GlcCers) está unido a la estructura de ceramida mediante un enlace 1,4 glucosídico. Las GlcCers, junto con las ceramidas libres, se denominan colectivamente esfingolípidos neutros. De las dos clases principales de esfingolípidos, los GlcCers se han caracterizado más ampliamente en plantas. Como se ha señalado antes, las ceramidas de GlcCers contienen mayores cantidades de ácidos grasos C16 y BCL dihidroxiladas (Chen y Cahoon 2009, Carmona-Salazar y cols., 2021).
- Glicosilinositolfosfoceramidas: los GIPC, por el contrario, son esfingolípidos cargados negativamente que contienen un grupo fosfoinositol unido al hidroxilo del C-1 del esqueleto de ceramida a través de un enlace fosfoéster. Las BCL trihidroxiladas son más abundantes en la parte de ceramida de las GIPCs (Cassim y cols., 2019). El fosfato les da su naturaleza de esfingolípidos ácidos, como también se les llama a los GIPCs. Al inositol se une otro carbohidrato por un enlace glucosídico unido a su vez de la misma manera a otro y este a otro, pudiendo ser varios de ellos y formar así la gran cabeza polar de los GIPCs, que es su característica excepcional. La estructura de los GIPCs puede variar dependiendo de los azúcares que se añadan a su cabeza polar. Recientemente se determinó que los GIPCs son la clase más abundante de esfingolípidos en las hojas de

Arabidopsis thaliana, lo que explica aproximadamente el 60% de esfingolípidos del total de lípidos de la membrana plasmática (Chen y Cahoon 2009).

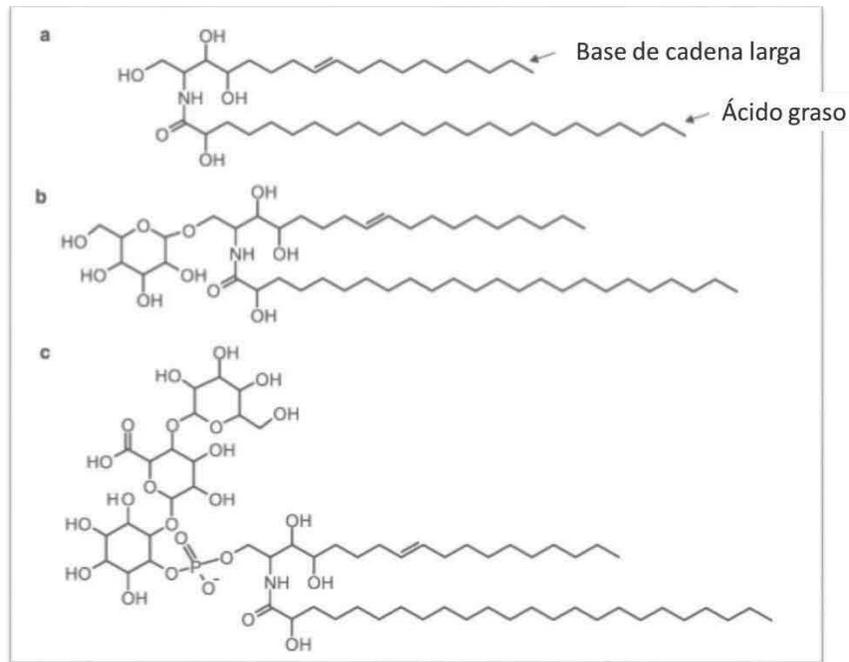


Figura 14: **Ejemplos de esfingolípidos complejos que se encuentran en plantas.** Los esfingolípidos complejos consisten en una ceramida hidrófoba a la que se le une un grupo de cabeza polar (a). El esqueleto de ceramida comprende un ácido graso unido a una BCL (C18) a través de un enlace amida. Las dos clases principales de esfingolípidos complejos en las plantas son las glucosilceramidas (GlcCers) y glicosil inositolfosfoceramidas (GIPCs), ejemplos de los cuales se muestran en (b) y (c). Las GlcCers contienen glucosa unida a través de un enlace 1,4 glicosídico al C1 de la ceramida (b). El GIPC mostrado en (c), una hexosa-ácido hexurónico-inositolfosfoceramida, es el principal GIPC en *Arabidopsis thaliana* (Tomado y modificado de: Chen y Cahoon 2009).

En humanos se han identificado al menos 60 esfingolípidos diferentes en las membranas celulares. Muchos desempeñan un papel importante en las membranas plasmáticas de neuronas y algunos actúan en procesos de reconocimiento en la superficie celular, pero sólo se ha descubierto la función específica de unos pocos. La porción glucídica de ciertos esfingolípidos define los grupos sanguíneos humanos (Figura 15) y determina el tipo de sangre que los individuos pueden recibir en transfusiones sanguíneas (Mckee 2009, Feduchi y cols., 2015).

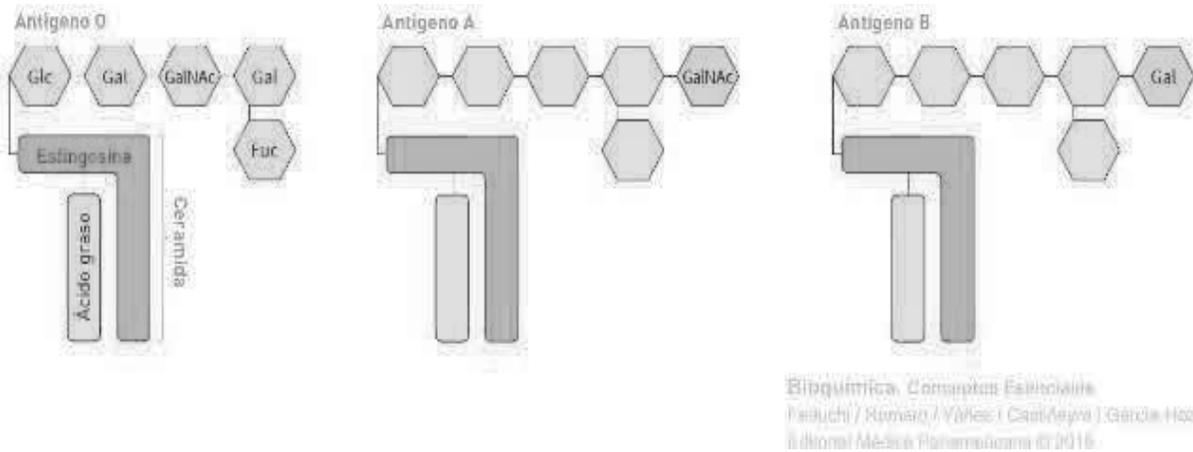


Figura 15: **Esfingolípidos o glucolípidos como determinantes de los grupos sanguíneos en humanos.** Glc: glucosa, Gal: galactosa, GalNAc: *N*-acetilgalactosamina, Fuc: fucosa (Feduchi y cols., 2015).

Funciones de los esfingolípidos en plantas.

Como molécula anfipática, los esfingolípidos se encuentran en las membranas celulares y desde allí constituyen el soporte estructural dinámico de la bicapa y actúan como mediadores fisiológicos del cierre estomático, muerte celular programada, interacciones planta-microbio y desarrollo de polen, frutos y semillas (Carmona-Salazar y cols., 2021).

Debido a su baja abundancia, las Cers y hCers se consideran intermediarios metabólicos o fuentes de moléculas de señalización. Las Cers han estado involucrados en el estrés por frío y la respuesta inmune de las plantas y las hCers han sido reportadas como transductores de señalización en estrés por hipoxia (Xie y cols., 2015).

Debido a su gran abundancia, las GlcCers y las GIPC se han identificado como componentes estructurales de la MP, la membrana de la vacuola, del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico. Además, las Cers y GIPC muestran funciones de señalización relacionadas con su asignación de membrana estructural. Por ejemplo, GlcCers están involucrados en el desarrollo de morfología y secreción de las membranas de Golgi, rendimiento a baja temperatura, organogénesis y diferenciación celular (Dietrich y cols., 2008). Los GIPC se han postulado como conectores de señalización estructural entre la MP y la pared celular, como elementos en varias formas que conducen a la defensa contra patógenos, en la viabilidad del polen y en la percepción de altos niveles de sal (Jiang y cols., 2019). Esta diversidad de funciones explica el carácter esencial de los esfingolípidos en las plantas (Chen et al., 2006).

Síntesis de esfingolípidos

La síntesis *de novo* de esfingolípidos (Figura 16) comienza con la condensación de *L*-serina y palmitoil-CoA, una reacción catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT) en el retículo endoplásmico, para formar un intermediario llamado 3-cetoesfinganina. La SPT es un heterodímero que comprende dos subunidades, la LCB1 y LCB2 y en el que la subunidad LCB2 es la única que posee el residuo de lisina catalítico, el cual está en el sitio activo que permite la actividad enzimática (Chen y cols., 2006). Sin embargo, es necesario que estén presentes las dos subunidades para su actividad. La subunidad LCB2 está en dos versiones: LCB2a y LCB2b. El heterodímero puede ser LCB1-LCB2a o bien LCB1-LCB2b, ambos son activos. Las subunidades LCB2 son reguladoras, pero los dos heterodímeros de la SPT, pueden requerir otras proteínas denominadas ORM y ssSPT, las cuales tienen una función reguladora, ya que al unirse en el centro del heterodímero disminuyen o incrementan, respectivamente, la actividad de la SPT (González-Solís et al., 2020).

El genoma de *Arabidopsis* contiene tres copias de genes que codifican a la proteína *LCB2*, At3g48780, At3g48790 y At5g23670 mejor conocidos como *LCB2a*, *LCB2b* y *LCB2c*, respectivamente (Teng y cols., 2008). Los análisis de estos mutantes con pérdida de función de *LCB2* han proporcionado nuevos conocimientos sobre el papel de los esfingolípidos en el crecimiento de las plantas y desarrollo, y han complementado los estudios de la función de los esfingolípidos en otros eucariotas, incluida la levadura y mamíferos (Dietrich y cols., 2008). Gracias al empleo de mutantes se sabe que por ejemplo, el gene *LCB2a* es esencial para la inducción de muerte celular programada, si bien tanto *LCB2a* como *LCB2b* son funcionalmente iguales (genes redundantes), cuando reaccionan con el monómero LCB1 para formar SPT (Dietrich y cols., 2008; Saucedo-García y cols., 2011). El hallazgo anterior, implica que el esfingolipidoma de las plantas mutantes que no expresan el gene *LCB2a* (línea de *Arabidopsis thaliana lcb2a-1*) puede ser diferente al de las plantas silvestres, si bien en términos totales, el contenido de esfingolípidos fue similar (Dietrich y cols., 2008). Toda la información anterior fue obtenida de la roseta total de la planta y no en la membrana plasmática de esta mutante *lcb2a-1*.

Es preciso mencionar que si bien el contenido total puede ser similar en la planta silvestre y en la mutante *lcb2a-1*, es posible que las distintas especies de esfingolípidos tengan una distribución diferencial en las diferentes membranas celulares, que son los sitios de ubicación de estos anfífilos. La posibilidad anterior surge del hecho de que las células tienen un sistema de envío de lípidos específicos a membranas especiales dentro del sistema endomembranal de la célula: la plasmática, vacuolar, nuclear, cloroplástica, del retículo endoplásmico, del Aparato de Golgi, etc.

Este sistema de envío se denomina en general tránsito vesicular, este tráfico parte del retículo endoplásmico y el Aparato de Golgi, que son los sitios celulares de síntesis de esfingolípidos y en donde estos lípidos son empaquetados en vesículas que recorren rutas específicas que los dirigen a membranas blanco.

El siguiente paso en la síntesis de esfingolípidos consiste en la reducción de la 3-cetoesfinganina se reduce mediante la 3-cetodihidroesfingosina reductasa (KSR) para formar esfinganina (d18:0). Posteriormente, el grupo amino de la esfinganina es acilado para producir finalmente ceramida. Una vez que la ceramida ha sido sintetizada, tanto a la base esfingoidea como al ácido graso se introducen enzimáticamente insaturaciones y/o hidroxilaciones para generar las distintas formas de esfingolípidos que se encuentran en las células.

Las ceramidas sufren otras modificaciones importantes para la formación de esfingolípidos complejos como las GIPCs Estas modificaciones se dan por la adición de grupos polares (generalmente carbohidratos), al C1 de la ceramida.

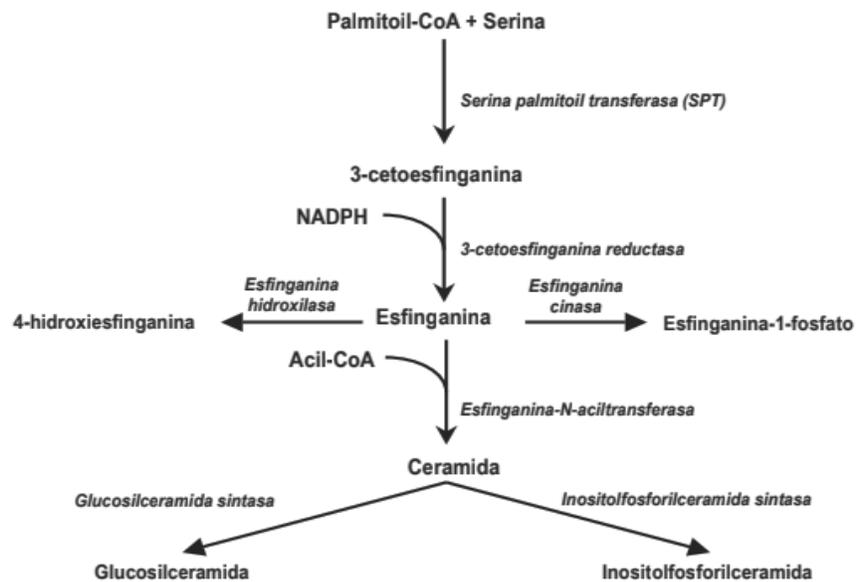


Figura 16: Síntesis *de novo* de esfingolípidos (Palacios 2008).

Distribución intracelular de lípidos a través del tráfico vesicular

La célula emplea dos mecanismos principales para movilizar la ceramida; ya sea a través del transporte vesicular o a través de la proteína proteína de transferencia de ceramida (CERT). CERT es una proteína citosólica que transfiere ceramida desde el RE, donde se genera, al

aparato de Golgi donde puede modificarse en esfingomielinas y posiblemente glicosfingolípidos. Esta es la principal vía responsable de entregar ceramida al cis-Golgi para la síntesis de glucoesfingolípidos. Claramente, nuestro conocimiento de cómo las especies de ceramidas pueden ser transportadas desde el RE al aparato de Golgi para la síntesis regulada de glicosfingolípidos es incompleto.

Técnicas de análisis químico de lípidos

- **Cromatografía en capa fina (CCF):** la cromatografía en capa fina es un método físico, analítico, utilizado para separar compuestos en una mezcla. La CCF es un método de separación muy versátil que se utiliza ampliamente para el análisis cualitativo de muestras. La CCF se puede utilizar para analizar prácticamente cualquier clase de sustancia, particularmente hidrofóbicas, como esteroides, alcaloides, lípidos, nucleótidos, carbohidratos, ácidos grasos, etc.

En la CCF, la fase estacionaria es una fina capa de material adsorbente, generalmente sílice gel, recubierta sobre una superficie de placa inerte, típicamente vidrio o metal. La muestra se coloca en un extremo de la placa y esta se coloca verticalmente en una cámara cerrada con un disolvente orgánico (fase móvil). La fase móvil sube por la placa mediante fuerzas capilares y los componentes de la muestra migran a distancias variables en función de sus afinidades diferenciales por las fases estacionaria y móvil. Cuando el solvente alcanza la parte superior de la placa, la placa se retira de la cámara de revelado y se seca. Los componentes separados aparecen como manchas en la placa y se evalúa el factor de retención (Fr) de cada componente. La limitante de este método es que no permite conocer la estructura química de la molécula que se está analizando (Santiago y Strobel 2013).

- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. Se ha empleado HPLC para la separación e identificación de bases esfingoides, ceramidas y esfingomielinas. La HPLC tiene la ventaja de ser relativamente económica al tiempo que proporciona resolución de esfingolípidos en función del grupo de cabeza (fase normal) o la longitud de la cadena de *N*-acilo (fase inversa). Sin embargo, la cuantificación precisa a menudo depende de la resolución definitiva de las especies de esfingolípidos, que la HPLC por sí sola no puede garantizar. Esta desventaja ejemplifica el requisito de técnicas más específicas de elucidación estructural (Gika y cols. 2016).
- **Espectrometría de masas (EM):** la EM se basa en la ionización y fragmentación de moléculas muestra en fase gaseosa. Dado que las moléculas se fragmentan de manera

única, el patrón específico de fragmentación de iones resultante puede utilizarse para obtener información estructural para una molécula determinada. En estos casos, el espectrómetro de masas normalmente está acoplado a un sistema de cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) y se utiliza como detector; es decir, la separación de la muestra se logra mediante cromatografía y los compuestos separados ingresan al espectrómetro de masas secuencialmente para la ionización, separación y detección de los iones generados y que tienen una masa y una carga eléctrica características. Al acoplar el sistema de cromatografía al espectrómetro de masas, se obtienen dos piezas de información para cada análisis: tiempo de retención e información espectral de masas para cada compuesto separado, ambos se pueden utilizar para compararlos con estándares de referencia adecuados.

Su limitante es que requiere de una muestra purificada para una interpretación más sencilla y, como ya se mencionó anteriormente, requiere estar acoplado a un cromatógrafo (Smith 2013).

- Valor del estándar interno en los análisis: un estándar interno en Química Analítica es una sustancia química de características estructurales muy similares a las de las moléculas problema, que no se encuentra en la muestra problema y que se agrega en una cantidad conocida a las muestras, el blanco y los estándares de calibración durante un análisis químico. El estándar interno por tanto es un compuesto que debe mostrar un comportamiento similar al del analito. Esta sustancia se puede utilizar para la calibración trazando la relación entre la señal del analito y la señal del patrón interno en función de la concentración del patrón del analito. Esto se hace para corregir las pérdidas de analito durante la preparación de la muestra. Esta relación para las muestras se usa luego para obtener las concentraciones de analito a partir de una curva de calibración. El patrón interno utilizado debe proporcionar una señal que sea similar a la señal del analito, pero lo suficientemente diferente para que las dos señales sean fácilmente distinguibles por el instrumento. Los estándares internos se utilizan a menudo en cromatografía, espectroscopía de masas y espectroscopía de emisión atómica (Oliveira y cols. 2021).

Análisis lipidómico

El objetivo de un análisis "ómico" es caracterizar de manera exhaustiva a todos los miembros de una categoría de biomoléculas, o al menos a los de una familia determinada y que proporciona una imagen completa de su composición, estructura y concentración en el sistema biológico pertinente. Por lo tanto, un esfingolipidoma que comprenda sólo la región hidrofóbica de estos compuestos, estará integrado por todas las bases esfingoideas y los ácidos grasos de todas las especies de la región ceramida de las ceramidas, las hidroxiceramidas, las glucosilceramidas y las glicosilinositolfosfoceramidas. Los esfingolípidos pueden analizarse mediante una variedad de métodos tradicionales, sin embargo, para el análisis de un gran número de variedades de esfingolípidos con un alto grado de precisión estructural, el método de elección es la espectrometría de masas (MS). La MS utiliza varios métodos de ionización [por ejemplo, Ionización por Electroaspersión (ESI)] combinados con el análisis de equipos analizadores de masa con trampa de iones lineales de cuadrupolo triple para MS / MS (Merril y cols., 2009). La gran ventaja de la esfingolipidómica es que puede identificar y cuantificar cada compuesto potencial en una muestra y así descubrir especies de lípidos desconocidas hasta ahora. Una de las limitantes es la extracción de lípidos, que inherentemente resulta en un sesgo, pues puede excluir inadvertidamente algunas especies dentro de una clase de lípidos o clases enteras de lípidos. Otra limitación en la esfingolipidómica es la disponibilidad de solo unos pocos estándares internos, ya que no hay disponibilidad comercial de especies semejantes a todas las especies naturales, lo que hace que la inclusión de estándares internos adecuados resulte crítica (Züllig y cols., 2020). Los análisis esfingolipidómicos son importantes, entre otras cosas, porque revelan cambios en las vías del flujo metabólico de los esfingolípidos por biosíntesis o por recambio en un sistema biológico ya sea en condiciones normales o de algún estrés o patología (Haynes y cols. 2009).

JUSTIFICACIÓN:

La primera enzima de la ruta de síntesis de esfingolípidos es la serina palmitoiltransferasa (SPT). Esta enzima es un heterodímero compuesto por dos subunidades, LCB1 y LCB2. La subunidad LCB2 puede existir como las isoformas LCB2a y LCB2b, ambas isoformas presentan redundancia funcional, pero no tienen los mismos niveles de expresión. Los niveles totales de esfingolípidos en la mutante que no expresa funcionalmente el gen *LCB2a* no parecen tener diferencias con respecto a los de las demás plantas silvestres (Dietrich y cols., 2008). Ya que se sabe que los esfingolípidos tienen una distribución diferencial en las membranas celulares, es posible que la composición relativa de los esfingolípidos de la membrana plasmática sea diferente entre las plantas silvestres y la mutante *lcb2a-1*.

HIPÓTESIS:

El contenido de especies de esfingolípidos de la membrana plasmática depende de la participación de los heterodímeros de la enzima serina palmitoiltransferasa (SPT) que inicia las reacciones de la vía de síntesis de esfingolípidos complejos.

OBJETIVOS GENERALES:

1. Describir los esfingolipidomas de las membranas plasmáticas silvestres y de la mutante *lcb2a-1*.
2. Hacer un análisis comparativo entre los esfingolipidomas membranales obtenidos de las plantas silvestres (wt) y de la planta mutante *lcb2a-1* para determinar la influencia del gen *LCB2a* en la composición de lípidos membranales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar el marco teórico de la estructura de membranas, esfingolípidos, clasificación y funciones en las plantas.
2. Conocer los fundamentos del análisis químico de lípidos por HPLC-MS/MS.
3. Introducirse al estudio y manejo de lipidomas.
4. Organizar en una base de datos, los resultados existentes en el laboratorio y que constan de determinaciones experimentales de ceramidas, hidroxiceramidas, glucosilceramidas y glicosilinositofosfoceramidas de las membranas plasmáticas de plantas silvestres y de la línea mutante en el gen codificante de la subunidad LCB2a de la SPT.
5. Las membranas plasmáticas que se analizarán serán las plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y de las plantas de la línea *lcb2a-1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para analizar los esfingolipidomas de las membranas plasmáticas obtenidas de las hojas de *Arabidopsis thaliana* se siguió la estrategia mostrada en la Figura 17.

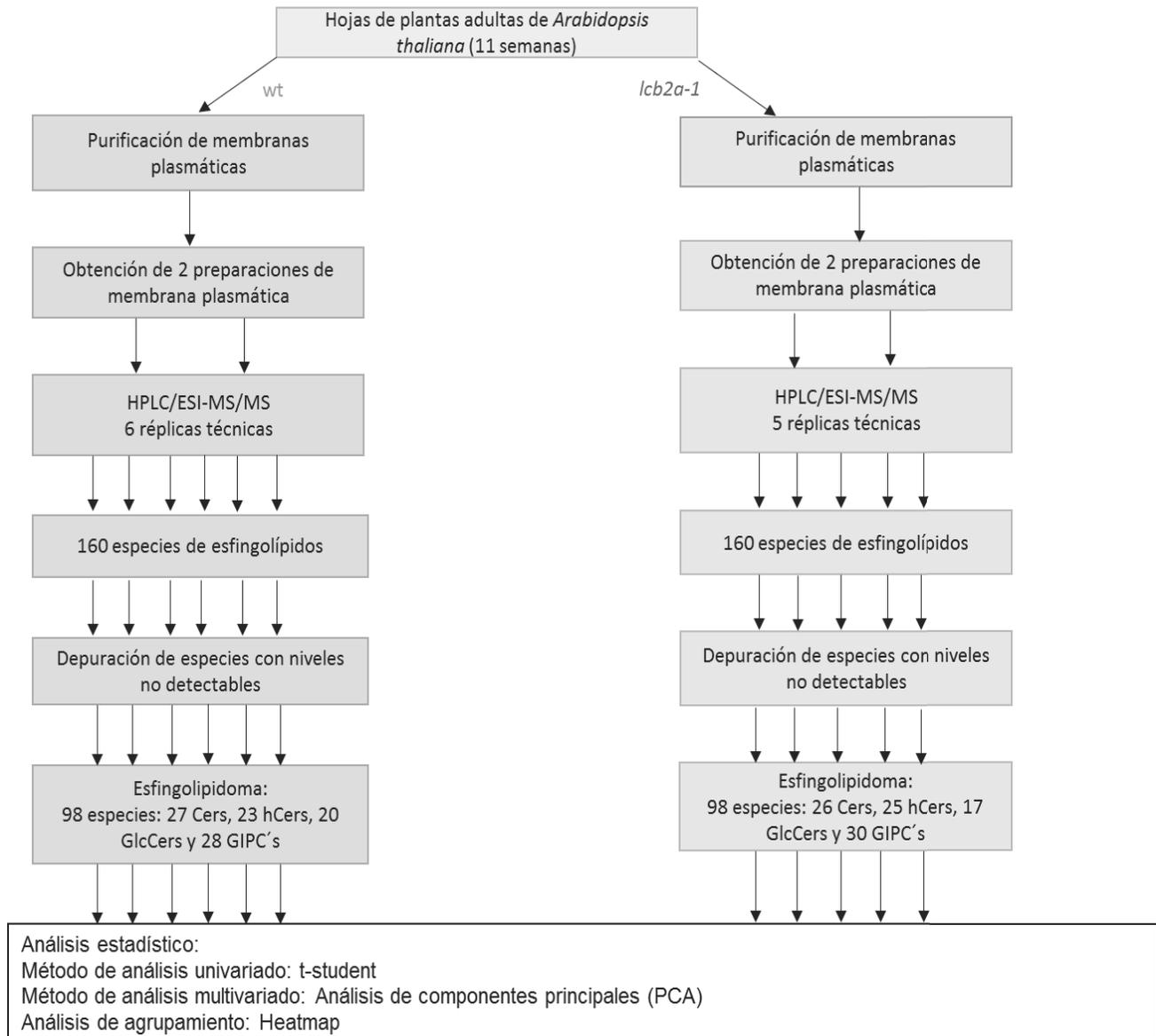


Figura 17: **Enfoque experimental seguido para el análisis de los esfingolipidomas de las membranas plasmáticas de hojas de plantas wt y lcb2a-1.** Se utilizaron hojas de plantas de 11 semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y a partir de estas, se purificaron las membranas plasmáticas. Cada preparación de membrana se trató y extrajo de forma independiente para el análisis de esfingolípidos mediante HPLC / ESI-MS / MS. Se indican las diferentes pruebas estadísticas aplicadas a los valores obtenidos de las determinaciones experimentales.

I. Crecimiento de plantas.

Las plantas utilizadas en este proyecto se encuentran descritas en la Tabla 1. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 y la mutante *lcb2a-1* (proporcionadas por el grupo del Dr. Cahoon de USDA-ARS Plant Genetics Research Unit, Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis Missouri, E.U.). Las semillas se sembraron en macetas con una mezcla de sustrato MetroMix400, agrolita y vermiculita en una relación 3:1:1, en condiciones de fotoperiodo natural a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Fueron crecidas en invernadero y se cosecharon después de 11 semanas. Para la obtención de las hojas, se seleccionaron las de mayor tamaño y con un aspecto saludable, se limpiaron con agua destilada. Posteriormente las hojas fueron cortadas y envueltas en papel aluminio para congelarse con N_2 líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso (Carmona 2018, Carmona-Salazar y cols., 2021).

Tabla 1. Plantas utilizadas para realizar este estudio. Se indican los genotipos utilizados, su origen y sus contenidos de esfingolípidos determinado para la roseta completa.

Genotipo	Fenotipo	Modificaciones genotípicas	Referencia
wt		Sin modificación genética. Su genoma está intacto. Contenido normal de esfingolípidos.	
<i>lcb2a-1</i>		Modificada en la subunidad LCB2a de la enzima palmitoiltransferasa (SPT), sin cambios en el contenido de esfingolípidos al compararse con el genotipo silvestre en extractos totales de hojas.	Dietrich y cols., 2008

II. Obtención de membranas plasmáticas a través de la técnica de reparto en un sistema de dos fases de polímeros acuosos dextran/polietilenglicol.

Una vez colectado el material biológico de cada genotipo se procedió a la obtención de sus fracciones microsomales. Para ello, se procedió a moler las hojas en un amortiguador de homogenización y por centrifugación diferencial se recuperó la fracción que integra una mezcla de membrana plasmática y endomembranas.

Las membranas fueron purificadas mediante un sistema de dos fases de polímeros acuosos dextran/polietilenglicol. En este método las membranas plasmáticas se separan del resto de las membranas celulares debido a sus propiedades de carga de superficie y su afinidad selectiva hacia la fase del polietilenglicol (Carmona 2018).

El método se basó en realizar primeramente una mezcla de fases con los dos polímeros, el dextrán y polietilenglicol a una concentración de 6.2%/6.2% (p/p). A esta mezcla se le añadió la fracción microsomal y las membranas plasmáticas se recuperaron de la fracción superior de la mezcla de fases. Esta fracción de membranas purificadas se almacenó a -70 °C (Carmona 2018).

III. Determinación del contenido de esfingolípidos

La preparación de la membrana plasmática que previamente se había congelado a -70°C, se descongeló y liofilizó para su posterior tratamiento de extracción, separación, identificación y cuantificación de esfingolípidos, que se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa con ionización por electro aspersion acoplado a espectrometría de masas (HPLC ESI-MS) (Markham y cols. 2006, Carmona-Salazar y cols. 2021).

IV. Análisis bioinformático de datos

Para el análisis del contenido de esfingolípidos del genotipo silvestre se obtuvieron 2 preparaciones de membrana plasmática independientes (2 réplicas biológicas), provenientes de las hojas de *Arabidopsis thaliana*, de las cuales se realizaron seis réplicas técnicas independientes. Para el caso de la mutante *lcb2a-1* se purificaron 2 preparaciones de membrana plasmática (2 réplicas biológicas) y se llevaron a cabo 5 réplicas técnicas independientes. Con la base de datos obtenida, se calcularon los promedios y error estándar para posteriormente realizar gráficos y de esta forma visualizar la información más claramente.

El análisis de componentes principales (PCA) se obtuvo utilizando el paquete de software MetaboAnalyst (v.5.0) (Pang y cols. 2021) y se utilizó para representar la varianza que hay en el contenido de esfingolípidos entre los grupos de membrana plasmática estudiados.

También se construyeron mapas de calor (Heatmaps) elaborando un agrupamiento jerárquico para visualizar las diferencias del contenido de esfingolípidos en términos de su abundancia, entre las membranas de wt y *lcb2a-1*. Se utilizaron pruebas de t-student para determinar la significancia estadística con una $p < 0.05$ (Excel 2013).

RESULTADOS

Las determinaciones experimentales de esfingolípidos de preparaciones de membranas plasmáticas aisladas de hojas de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*, integraron un número de réplicas técnicas para wt de 6 a partir de 2 réplicas biológicas, mientras que para la mutante *lcb2a-1* fue de 5 réplicas técnicas a partir de 2 réplicas biológicas. Inicialmente, se organizaron todos los valores de las especies individuales de esfingolípidos separándolos y clasificándolos por clases: Cers, hCers, GlcCers y GIPCs. Los valores se promediaron y se calculó el error estándar para cada especie. A continuación, se hace una descripción ordenada de los valores de especies de esfingolípidos para cada clase.

Los contenidos de esfingolípidos se expresaron en términos absolutos (nmoles/mg de proteína, Tabla 2), o en contenidos relativos (% de esfingolípidos en relación al 100% de esfingolípidos, mol%, Tabla 3). Se procedió a seleccionar aquellas especies que presentaron valores no detectables dentro de las réplicas de cada genotipo y se excluyeron de la base de datos, reportándose los números finales en la Tabla 4 y que corresponden a las especies con valores positivos dentro de cada genotipo.

Tabla 2. Contenido de esfingolípidos de las membranas plasmáticas de hojas de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre (wt) y mutante (*lcb2a-1*) expresado en nmol/mg proteína. Las membranas plasmáticas de las hojas de las plantas de los genotipos indicados fueron analizados según se describe en Materiales y Métodos. Se presenta el contenido de especies para cada clase de esfingolípido (ceramidas, hidroxiceramidas, glucosilceramidas y glicosilinositolfosfoceramidas). El número de réplicas técnicas para wt fue de 6 a partir de 2 réplicas biológicas, mientras que para la mutante *lcb2a-1*, las réplicas técnicas fueron 5 a partir de 2 réplicas biológicas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

ESPECIE	CONTENIDO DE ESFINGOLÍPIDOS (nmol/mg proteína)							
	CERAMIDAS		HIDROXICERAMIDAS		GLUCOSILCERAMIDAS		GIPCs	
	wt	<i>lcb2a-1</i>	wt	<i>lcb2a-1</i>	wt	<i>lcb2a-1</i>	wt	<i>lcb2a-1</i>
d18:0c16:0	0.19 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.16 \pm 0.07	0.005 \pm 0.003	0.002 \pm 0.002	1.19 \pm 0.05	3.95 \pm 0.11
d18:0c18:0	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.006 \pm 0.006	0.02 \pm 0.007
d18:0c20:0	0.0005 \pm 0.0003	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.14 \pm 0.005	0.67 \pm 0.06
d18:0c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.12 \pm 0.12
d18:0c22:0	0.0004 \pm 0.0004	0.0005 \pm 0.0005	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.90 \pm 0.03	3.66 \pm 0.17
d18:0c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:0c24:0	0.003 \pm 0.002	0.007 \pm 0.003	0.005 \pm 0.002	0.008 \pm 0.002	0.0007 \pm 0.0007	0.004 \pm 0.004	0.33 \pm 0.03	0.88 \pm 0.1
d18:0c24:1	0.001 \pm 0.0008	0.005 \pm 0.002	0.0008 \pm 0.0008	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.2 \pm 0.08	0.31 \pm 0.07
d18:0c26:0	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.17 \pm 0.10	0.42 \pm 0.42
d18:0c26:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c16:0	0.26 \pm 0.05	0.31 \pm 0.04	0.26 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	3.38 \pm 0.14	3.11 \pm 0.14	4.59 \pm 0.23	16.45 \pm 1.06
d18:1c18:0	0.012 \pm 0.005	0.01 \pm 0.006	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.02 \pm 0.02
d18:1c20:0	0.015 \pm 0.006	0.005 \pm 0.002	0.006 \pm 0.004	0.002 \pm 0.002	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c22:0	0.015 \pm 0.005	0.011 \pm 0.005	0.011 \pm 0.004	0.005 \pm 0.003	0.089 \pm 0.005	0.064 \pm 0.007	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c24:0	0.08 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.033 \pm 0.005	0.026 \pm 0.005	0.22 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	1.35 \pm 0.45	4.36 \pm 0.66
d18:1c24:1	0.006 \pm 0.003	0.006 \pm 0.004	0.003 \pm 0.002	0.006 \pm 0.004	0.53 \pm 0.027	0.58 \pm 0.07	0.68 \pm 0.12	3.2 \pm 0.25
d18:1c26:0	0.05 \pm 0.02	0.032 \pm 0.007	0.019 \pm 0.005	0.023 \pm 0.004	0.039 \pm 0.008	0.044 \pm 0.002	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c26:1	0.006 \pm 0.003	0 \pm 0.	0.004 \pm 0.002	0 \pm 0.	0.034 \pm 0.001	0.04 \pm 0.01	0 \pm 0.	0 \pm 0.
t18:0c16:0	0.81 \pm 0.1	0.91 \pm 0.07	0.62 \pm 0.04	0.71 \pm 0.04	0.028 \pm 0.003	0.04 \pm 0.01	3.47 \pm 0.20	11.12 \pm 0.50
t18:0c18:0	0.004 \pm 0.001	0.005 \pm 0.002	0 \pm 0.	0.003 \pm 0.002	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.018 \pm 0.006	0.1 \pm 0.006
t18:0c20:0	0.023 \pm 0.005	0.033 \pm 0.005	0.02 \pm 0.003	0.027 \pm 0.003	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.142 \pm 0.007	0.42 \pm 0.04
t18:0c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.13 \pm 0.13	0.78 \pm 0.48
t18:0c22:0	0.24 \pm 0.04	0.28 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.007 \pm 0.003	0 \pm 0.	2.01 \pm 0.08	5.49 \pm 0.24
t18:0c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.56 \pm 0.10	0.92 \pm 0.06
t18:0c24:0	0.76 \pm 0.09	1.11 \pm 0.13	0.57 \pm 0.04	0.68 \pm 0.05	0.025 \pm 0.006	0.02 \pm 0.01	6.68 \pm 0.08	17.01 \pm 0.91
t18:0c24:1	0.28 \pm 0.03	0.48 \pm 0.07	0.21 \pm 0.01	0.31 \pm 0.03	0.03 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	1.93 \pm 0.12	8.06 \pm 0.30
t18:0c26:0	0.21 \pm 0.03	0.32 \pm 0.04	0.16 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	0 \pm 0.	0.002 \pm 0.002	1.07 \pm 0.14	3.18 \pm 0.23

t18:0c26:1	0.021 ± 0.007	0.057±0.007	0.024 ± 0.004	0.043±0.005	0.003 ± 0.003	0.±0.	0.19 ± 0.03	0.76±0.08
t18:1c16:0	1.49 ± 0.14	1.88±0.12	1.3 ± 0.06	1.51±0.09	1.88 ± 0.09	1.89±0.12	7.62 ± 0.26	22.95±1.08
t18:1c18:0	0.015 ± 0.005	0.016±0.005	0.002 ± 0.002	0.019±0.003	0.051 ± 0.007	0.05±0.01	0.067 ± 0.004	0.24±0.019
t18:1c20:0	0.1 ± 0.01	0.101±0.009	0.064 ± 0.005	0.076±0.004	0.139 ± 0.006	0.10±0.01	0.51 ± 0.016	1.35±0.07
t18:1c20:1	0. ± 0.	0.±0.	0. ± 0.	0.±0.	0. ± 0.	0.±0.	0.009 ± 0.003	0.041±0.001
t18:1c22:0	0.54 ± 0.07	0.6±0.06	0.39 ± 0.03	0.42±0.04	1.28 ± 0.05	1.10±0.12	11.41 ± 0.45	23.6±1
t18:1c22:1	0. ± 0.	0.±0.	0. ± 0.	0.±0.	0.007 ± 0.003	0.002±0.002	0.49 ± 0.01	1.03±0.09
t18:1c24:0	2.25 ± 0.19	2.71±0.34	1.74 ± 0.15	1.75±0.14	5.1 ± 0.14	4.11±0.46	44.97± 1.03	89.79±2.85
t18:1c24:1	0.87 ± 0.12	1.24±0.12	0.59 ± 0.06	0.82±0.06	9.31 ± 0.26	10.82±0.87	26.98 ± 0.58	80.03±2.88
t18:1c26:0	1.18 ± 0.11	1.36±0.17	0.88 ± 0.08	0.95±0.1	1.4 ± 0.03	1.29±0.14	9.75 ± 0.41	24.07±0.98
t18:1c26:1	0.3 ± 0.04	0.47±0.05	0.20 ± 0.01	0.32±0.03	1 ± 0.03	1.19±0.14	2.91 ± 0.15	9.76±0.38

Tabla 3. Contenido de esfingolípidos de las membranas plasmáticas de hojas de *Arabidopsis* de los genotipos silvestre (wt) y mutante (*lcb2a-1*) expresado en % mol. Las membranas plasmáticas de las hojas de las plantas de los genotipos indicados fueron analizados según se describe en Materiales y Métodos. Se presenta el contenido de especies para cada clase de esfingolípidos (Ceramidas, hidroxiceramidas, glucosilceramidas y glicosilinositolfosfoceramidas). El número de réplicas técnicas para wt fue de 6 a partir de 2 réplicas biológicas, mientras que para la mutante *lcb2a-1*, las réplicas técnicas fueron 5 a partir de 2 réplicas biológicas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar.

ESPECIE	CONTENIDO DE ESFINGOLÍPIDO (%mol)							
	CERAMIDAS		HIDROXICERAMIDAS		GLUCOSILCERAMIDAS		GIPCs	
	wt	<i>lcb2a-1</i>	wt	<i>lcb2a-1 sbh1-1</i>	wt	<i>lcb2a-1</i>	wt	<i>lcb2a-1</i>
d18:0c16:0	0.11 \pm 0.013	0.05 \pm 0.006	0.085 \pm 0.005	0.041 \pm 0.002	0.003 \pm 0.002	0.0005 \pm 0.0005	0.69 \pm 0.03	1.04 \pm 0.02
d18:0c18:0	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.003 \pm 0.003	0.005 \pm 0.002
d18:0c20:0	0.0003 \pm 0.0002	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.083 \pm 0.003	0.17 \pm 0.01
d18:0c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.03 \pm 0.03
d18:0c22:0	0.0003 \pm 0.0003	0 \pm 0.0001	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.53 \pm 0.01	0.96 \pm 0.02
d18:0c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:0c24:0	0.002 \pm 0.001	0.002 \pm 0.0008	0.003 \pm 0.001	0.0021 \pm 0.0006	0.0004 \pm 0.0004	0.0009 \pm 0.0009	0.19 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
d18:0c24:1	0.0007 \pm 0.0004	0.001 \pm 0.0006	0.0005 \pm 0.0005	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.11 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02
d18:0c26:0	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.1 \pm 0.06	0.11 \pm 0.11
d18:0c26:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c16:0	0.15 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.095 \pm 0.004	1.97 \pm 0.08	0.82 \pm 0.04	2.68 \pm 0.16	4.31 \pm 0.19
d18:1c18:0	0.007 \pm 0.003	0.003 \pm 0.001	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.006 \pm 0.006
d18:1c20:0	0.009 \pm 0.003	0.001 \pm 0.0006	0.003 \pm 0.002	0.0006 \pm 0.0006	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c22:0	0.009 \pm 0.003	0.003 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002	0.001 \pm 0.001	0.052 \pm 0.004	0.017 \pm 0.002	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c24:0	0.05 \pm 0.02	0.009 \pm 0.003	0.019 \pm 0.003	0.007 \pm 0.001	0.13 \pm 0.01	0.042 \pm 0.006	0.79 \pm 0.26	1.15 \pm 0.19
d18:1c24:1	0.003 \pm 0.002	0.002 \pm 0.001	0.001 \pm 0.001	0.002 \pm 0.001	0.31 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.39 \pm 0.07	0.85 \pm 0.08
d18:1c26:0	0.03 \pm 0.01	0.009 \pm 0.002	0.01 \pm 0.003	0.006 \pm 0.001	0.023 \pm 0.005	0.0116 \pm 0.0007	0 \pm 0.	0 \pm 0.
d18:1c26:1	0.003 \pm 0.002	0 \pm 0.	0.002 \pm 0.001	0 \pm 0.	0.02 \pm 0.0007	0.0117 \pm 0.003	0 \pm 0.	0 \pm 0.
t18:0c16:0	0.47 \pm 0.05	0.24 \pm 0.02	0.36 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01	0.016 \pm 0.001	0.011 \pm 0.003	2.01 \pm 0.1	2.92 \pm 0.09
t18:0c18:0	0.0022 \pm 0.0008	0.001 \pm 0.0005	0 \pm 0.	0.0007 \pm 0.0005	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.01 \pm 0.003	0.026 \pm 0.001
t18:0c20:0	0.013 \pm 0.003	0.009 \pm 0.001	0.012 \pm 0.001	0.0072 \pm 0.0007	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.082 \pm 0.004	0.11 \pm 0.009
t18:0c20:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.08 \pm 0.08	0.21 \pm 0.13
t18:0c22:0	0.14 \pm 0.02	0.074 \pm 0.007	0.09 \pm 0.01	0.049 \pm 0.005	0.004 \pm 0.002	0 \pm 0.	1.17 \pm 0.04	1.44 \pm 0.03
t18:0c22:1	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0 \pm 0.	0.33 \pm 0.06	0.242 \pm 0.009
t18:0c24:0	0.44 \pm 0.05	0.29 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03	0.18 \pm 0.02	0.015 \pm 0.003	0.007 \pm 0.003	3.88 \pm 0.07	4.47 \pm 0.14
t18:0c24:1	0.16 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.008	0.08 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.013 \pm 0.005	1.12 \pm 0.06	2.13 \pm 0.09
t18:0c26:0	0.13 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.093 \pm 0.009	0.057 \pm 0.006	0 \pm 0.	0.0005 \pm 0.0005	0.62 \pm 0.08	0.84 \pm 0.06
t18:0c26:1	0.012 \pm 0.004	0.015 \pm 0.002	0.014 \pm 0.002	0.011 \pm 0.002	0.002 \pm 0.002	0 \pm 0.	0.11 \pm 0.02	0.2 \pm 0.02

t18:1c16:0	0.86±0.08	0.5±0.03	0.75±0.04	0.4±0.03	1.1±0.05	0.5±0.04	4.43±0.15	6.03±0.21
t18:1c18:0	0.008±0.003	0.004±0.001	0.001±0.001	0.005±0.0008	0.029±0.004	0.014±0.003	0.039±0.002	0.062±0.004
t18:1c20:0	0.056±0.007	0.027±0.002	0.04±0.003	0.02±0.001	0.081±0.004	0.027±0.003	0.295±0.008	0.35±0.01
t18:1c20:1	0±0.	0±0.	0±0.	0±0.	0±0.	0±0.	0.005±0.002	0.011±0.0004
t18:1c22:0	0.31±0.04	0.16±0.01	0.23±0.022	0.11±0.01	0.74±0.03	0.29±0.03	6.62±0.17	6.2±0.1
t18:1c22:1	0±0.	0±0.	0±0.	0±0.	0.004±0.002	0.0006±0.0006	0.285±0.006	0.27±0.02
t18:1c24:0	1.3±0.1	0.71±0.08	1.02±0.09	0.46±0.04	2.96±0.08	1.08±0.11	26.12±0.18	23.61±0.13
t18:1c24:1	0.50±0.06	0.33±0.03	0.34±0.03	0.22±0.02	5.42±0.16	2.85±0.21	15.67±0.10	21.03±0.11
t18:1c26:0	0.68±0.06	0.36±0.04	0.51±0.05	0.25±0.03	0.81±0.02	0.34±0.03	5.65±0.14	6.33±0.12
t18:1c26:1	0.17±0.02	0.12±0.01	0.12±0.007	0.08±0.008	0.56±0.02	0.31±0.03	1.68±0.06	2.56±0.03

Con respecto a la proporción porcentual del número de especies de esfingolípidos por cada clase, tanto en el genotipo silvestre como en el mutante, las proporciones fueron parecidas (Figura 18 A, B; Tabla 4). Se puede observar que la distribución del número de especies por clase fue muy similar dentro del genotipo silvestre, encontrándose 28 especies de GIPCs como las más abundantes y 20 especies de GlcCers como las menos abundantes. Sin embargo, aunque la distribución de especies dentro del genotipo *lcb2a-1* fue parecida, las especies más abundantes fueron más, pues el número de GIPCs fue de 30 y el número de especies menos abundantes fue menor, o sea 17 especies de GlcCers. Se determinó el número de especies por cada clase de esfingolípidos en cada uno de los genotipos (Figura 18 C, D; Tabla 4). Se puede observar en la Tabla 4 que, tanto en las plantas silvestres como en las mutantes, el número de especies totales fue el mismo, o sea, 98 especies que estuvieron distribuidas en las 4 clases. La distribución del número absoluto de especies en cada clase fue muy similar entre las clases y también muy similar entre las membranas plasmáticas de las plantas silvestres y las de la línea *lcb2a-1*.

Tabla 4. **Número de especies de esfingolípidos por clase cuantificados con valores positivos.** El número se obtuvo a partir del conteo de especies cuyos niveles fueron detectables dentro de las réplicas del mismo genotipo.

Clase de esfingolípidos	<i>Número de especies de esfingolípidos</i>	
	<i>wt</i>	<i>lcb2a-1</i>
Cer	27	26
hCer	23	25
GlcCer	20	17
GIPC	28	30
Total	98	98

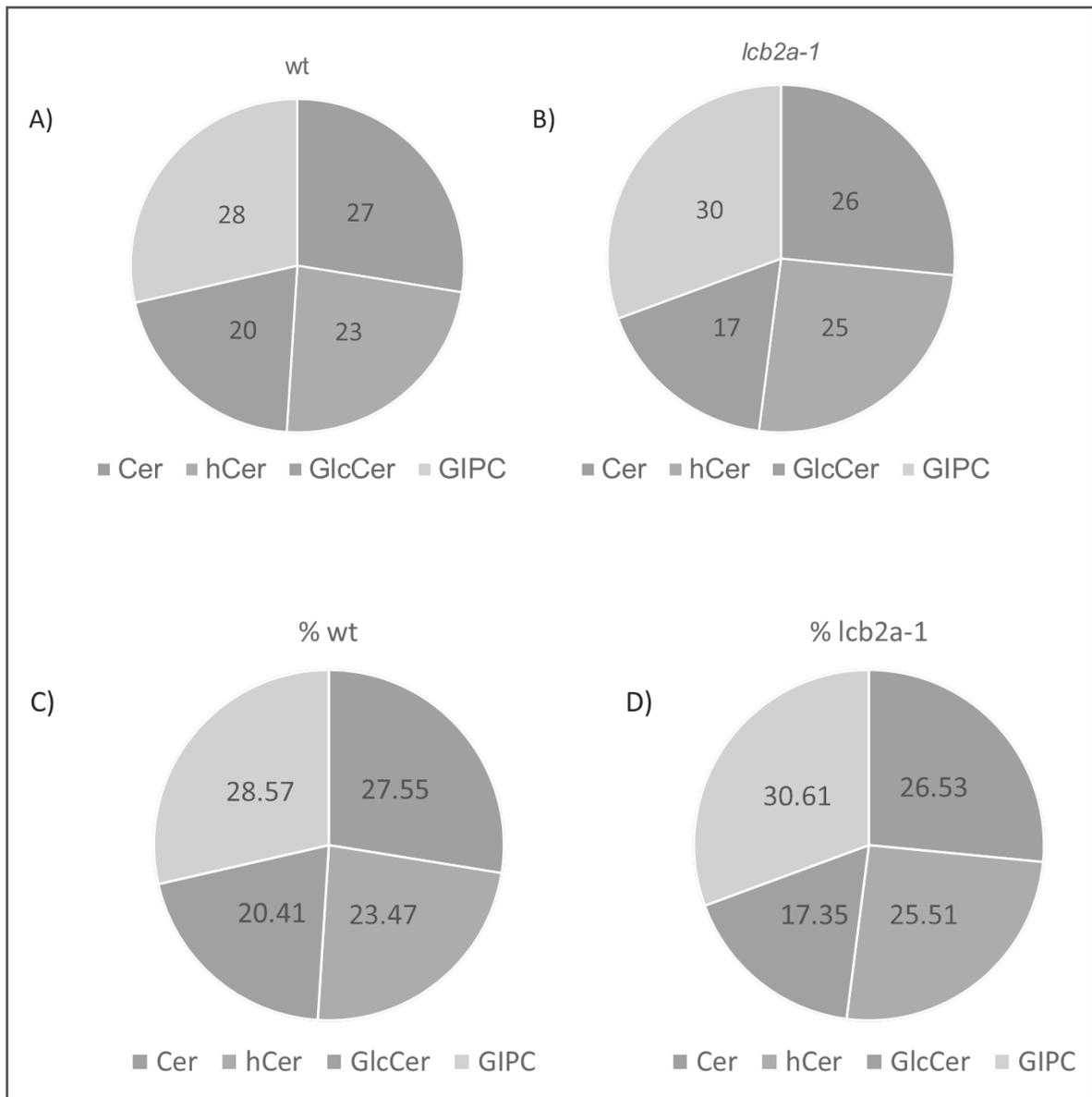


Figura 18. **Proporción y número de especies por clase de esfingolípidos en las membranas plasmáticas de las plantas wt y lcb2a-1.** **A, B** Se presenta la proporción de especies presentes en cada clase en los genotipos wt y lcb2a-1. **C, D** se presenta el número de especies de esfingolípidos determinadas en cada clase. Los valores se obtuvieron y calcularon de acuerdo a los Materiales y Métodos. Cer: ceramidas; hCer: hidroxiceramidas; GlcCers: glucosilceramidas; GIPCs: glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores a partir de las especies detectadas en 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la lcb2a-1.

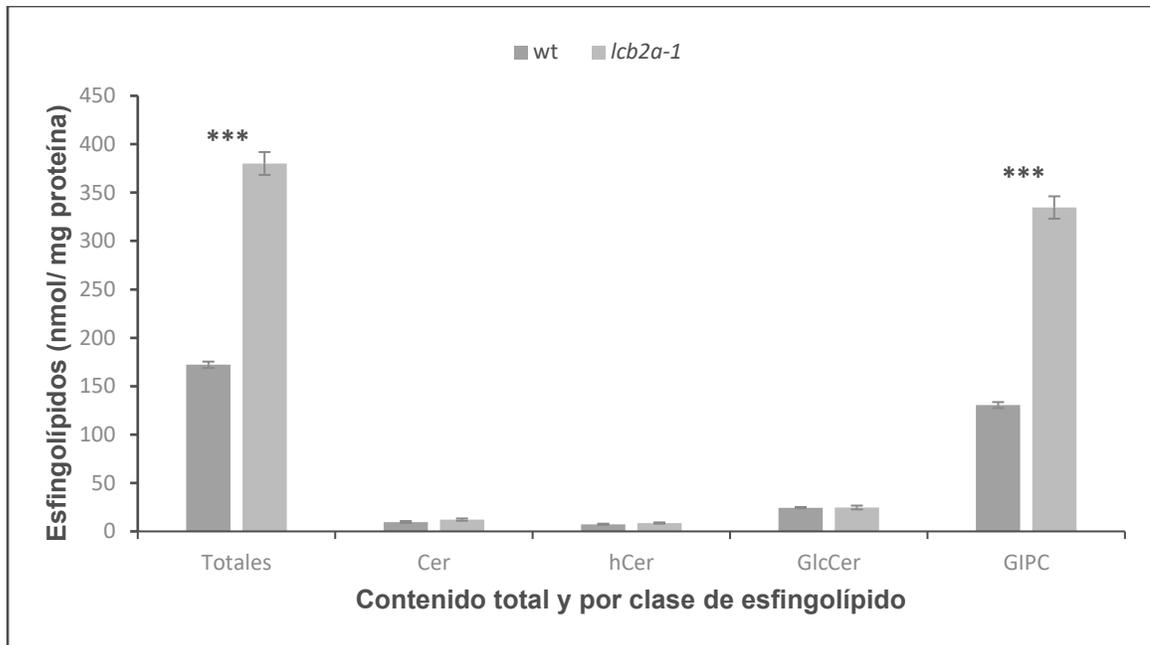


Figura 19. **Contenido total y por clase de esfingolípidos expresados en cantidades absolutas (nmol/mg proteína) de las membranas plasmáticas de los genotipos wt y *lcb2a-1*.** Se presentan los contenidos totales y por clases en los genotipos wt y *lcb2a-1* obtenidos de acuerdo al apartado Materiales y Métodos. Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$).

Se determinó el contenido de esfingolípidos expresados en cantidades absolutas (nmol/mg proteína), tanto totales como por clase para cada uno de los dos genotipos (Figura 19; Tabla 2). Se observó que el contenido total de esfingolípidos fue de más del doble en las membranas plasmáticas de las mutantes con respecto a la silvestre con una confianza del 99.999%. Los contenidos de Cer y hCer fueron bajos en ambos genotipos, mayores en GlcCer y muy altos en GIPC. En estas últimas el contenido en las membranas de la mutante fue de 334.60 comparado con el de la silvestre que fue de 130.48.

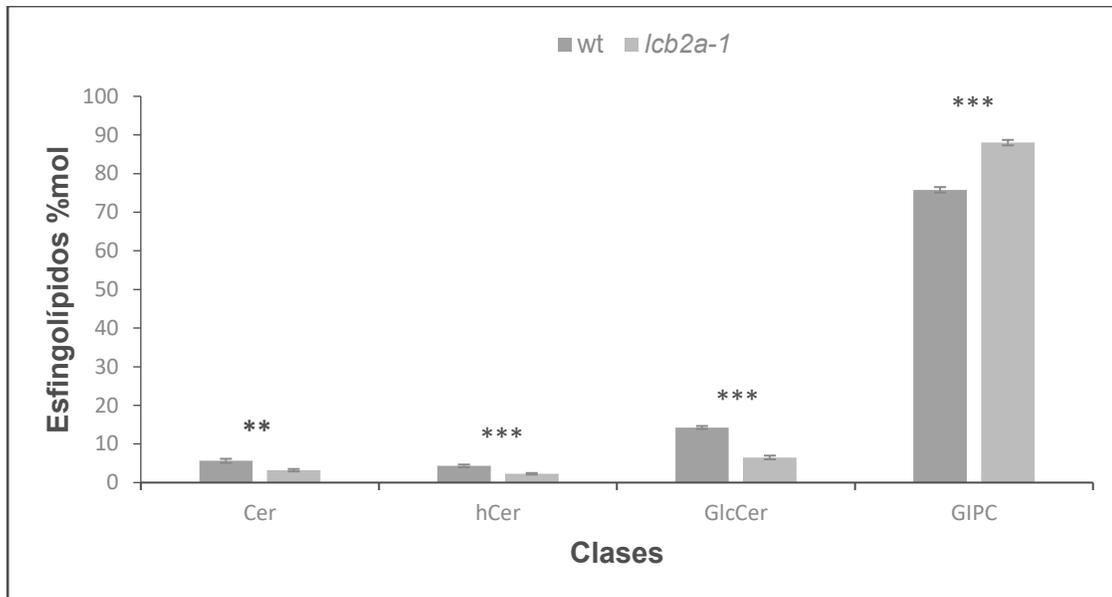


Figura 20. **Contenido de esfingolípidos por clases en las membranas plasmáticas de las plantas wt y *lcb2a-1*.** Las membranas y los contenidos de esfingolípidos fueron obtenidos de acuerdo al apartado de Materiales y Métodos. Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$).

Se determinó el contenido de esfingolípidos expresados en % mol, para cada uno de los dos genotipos (Figura 20; Tabla 3). Se observó que los contenidos de Cer e hCer fueron bajos en ambos genotipos, mayores en GlcCer y muy altos en GIPC. Tanto en Cer, hCer y GlcCer se observó que el contenido en el genotipo wt fue mayor respecto al contenido del genotipo *lcb2a-1*. En cambio, en el caso de los GIPC, el contenido del genotipo *lcb2a-1* fue mayor al del genotipo wt con 88 y 75.78% respectivamente. Como puede observarse en la Figura 20, estas diferencias fueron significativas estadísticamente. Podemos afirmar que los contenidos de los genotipos de hCers, GlcCers y GIPCs fueron diferentes entre sí con una confianza del 99.999%. Mientras que en el caso de las Cers fueron distintos con un 99.99% de confianza.

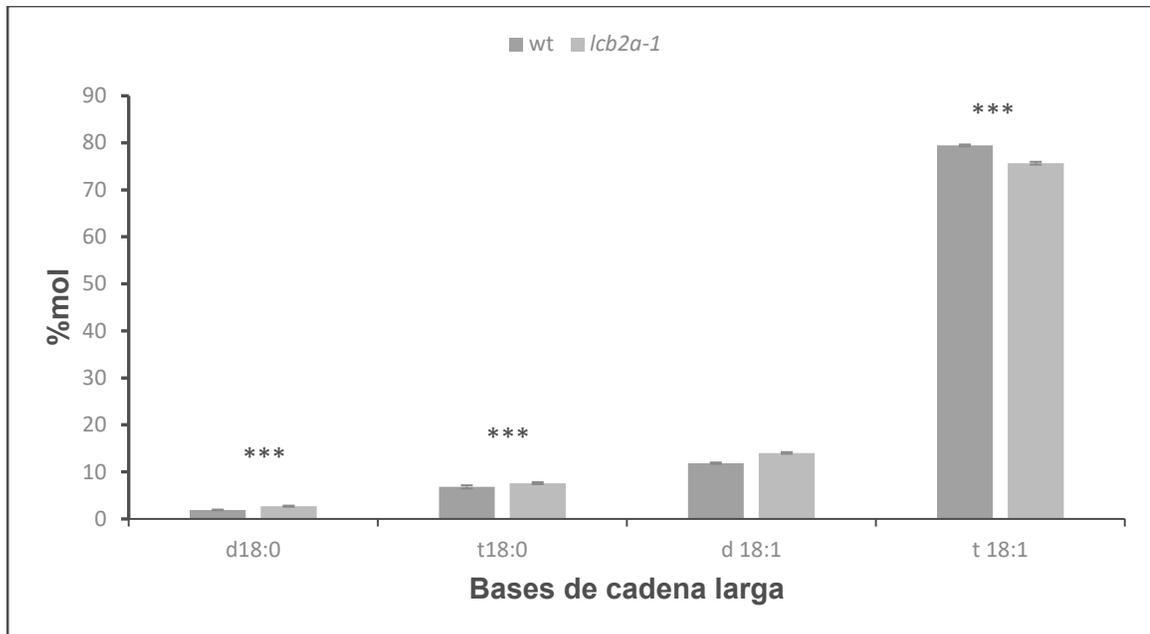


Figura 21. **Contenido de bases de cadena larga en las membranas plasmáticas de los genotipos wt y *lcb2a-1*.** Se presentan los contenidos de bases de cadena larga en WT y *lcb2a-1* obtenidos de acuerdo al apartado Materiales y métodos. Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$).

Se analizó también el contenido de las bases de cadena larga totales expresado en % mol, para cada genotipo (Figura 21). Se observó que los contenidos de d18:0 fueron bajos en ambos genotipos, mayores en t18:0, luego en d18:1 y muy altos en t18:1, aunque no hubo diferencia significativa entre la membrana plasmática de la mutante con respecto a la silvestre en t18:0 y sí fueron diferentes en las otras tres bases de cadena larga con un 99.999% de confianza. Se observó que en d18:0, d18:1 y t18:0 el genotipo *lcb2a-1* tuvo un contenido mayor que el genotipo wt. Mientras que en t18:1 el genotipo wt presentó un mayor contenido con respecto al genotipo *lcb2a-1*, 79.43% y 75.66 %mol respectivamente.

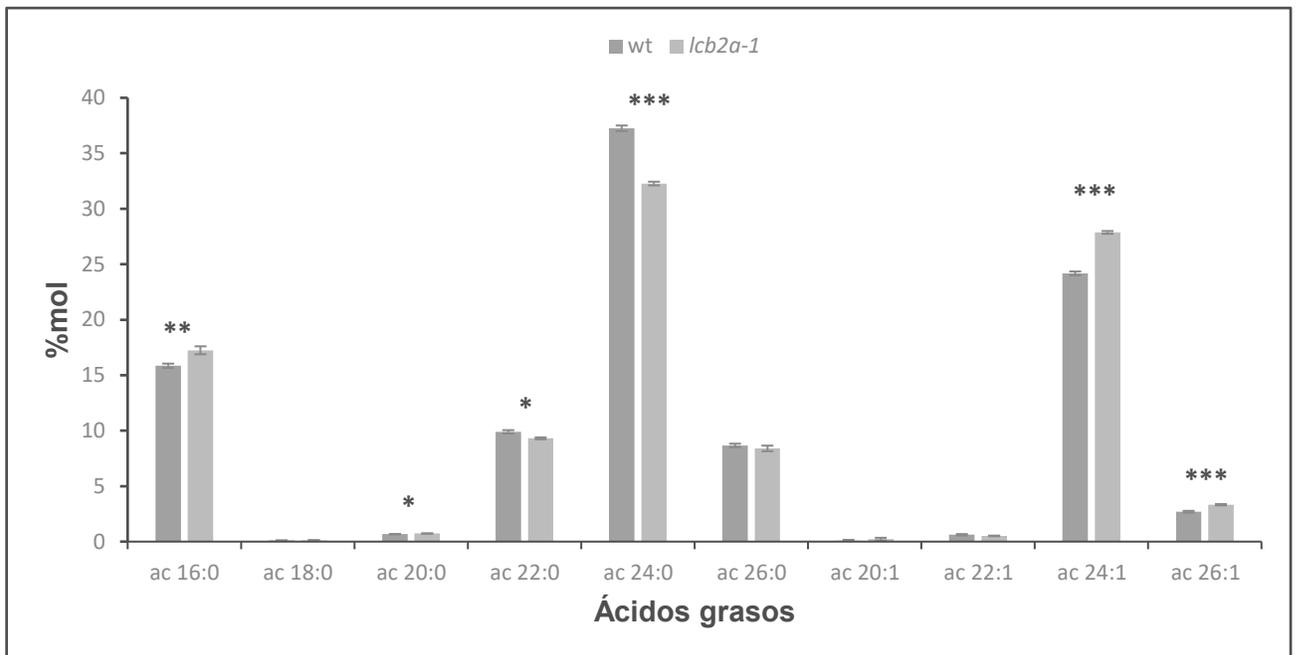


Figura 22. **Contenido de ácidos grasos en las membranas plasmáticas de los genotipos wt y *lcb2a-1***. Se presentan los contenidos de ácidos grasos en wt y *lcb2a-1* obtenidos de acuerdo al apartado Materiales y métodos. Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$).

Con respecto a los contenidos de los ácidos grasos totales expresados en % mol en ambos genotipos, los resultados de la Figura 22. Los contenidos de ácidos grasos 18:0, 20:0, 20:1 y 22:1 fueron muy bajos en ambos genotipos. En los ácidos grasos 26:0 se muestra que hubo un contenido similar en ambos genotipos. En el caso de los ácidos grasos 16:0, 24:1 y 26:1 el contenido en el genotipo *lcb2a-1* fue mayor respecto al contenido del genotipo silvestre. Finalmente, en el caso del contenido del ácido graso 24:0, el genotipo *lcb2a-1* tuvo un contenido menor al del silvestre, 32.27 y 37.25 respectivamente. Se puede afirmar que los contenidos en los genotipos de ácidos grasos 20:0 y 22:0 fueron diferentes entre sí con una confianza del 95%, el contenido en ambos genotipos de ácidos grasos 16:0 es diferente entre sí con una confianza del 99.99% y finalmente los contenidos de ácidos grasos 24:0, 24:1 y 26:1 fueron distintos entre sí con una confianza del 99.999%.

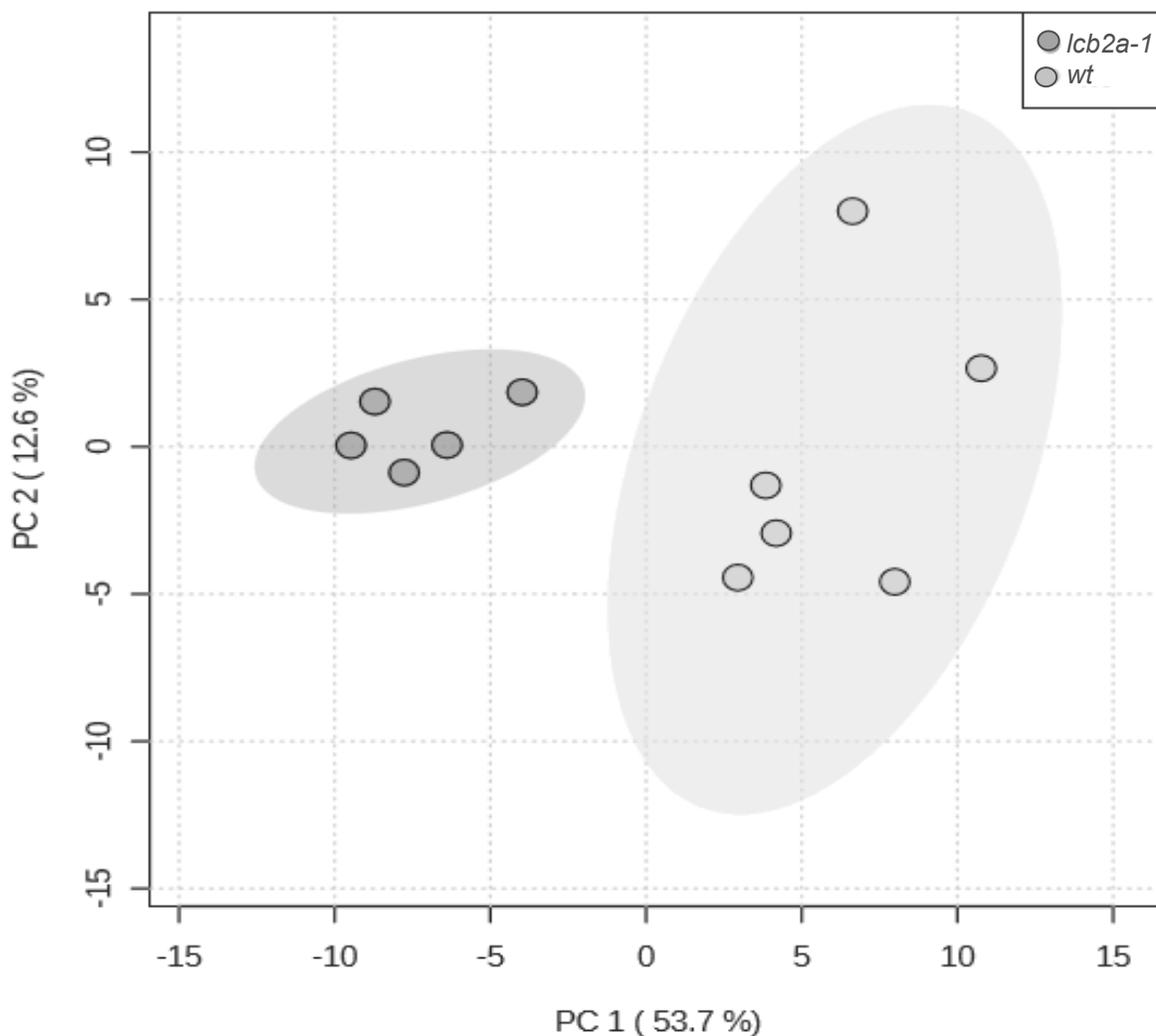
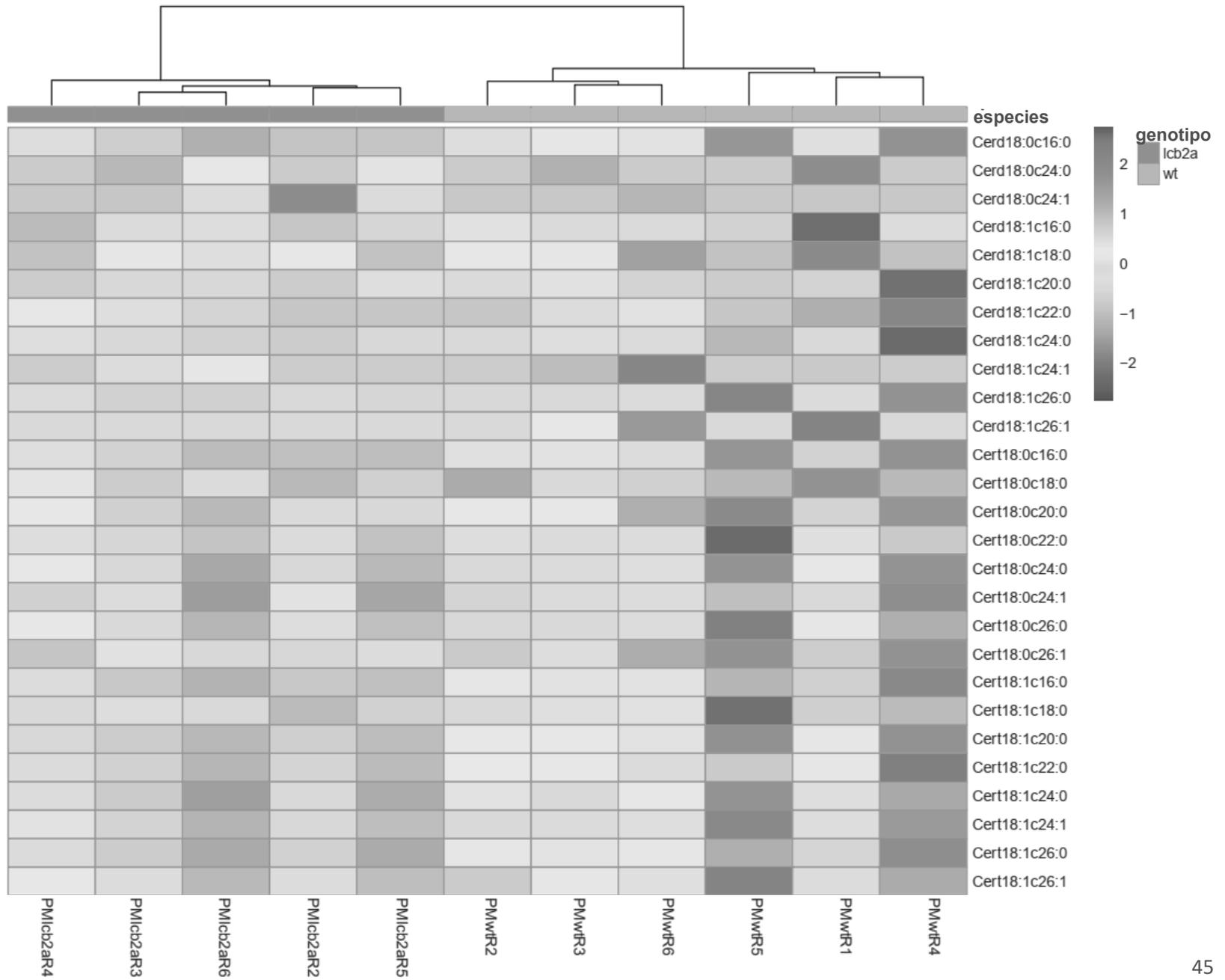


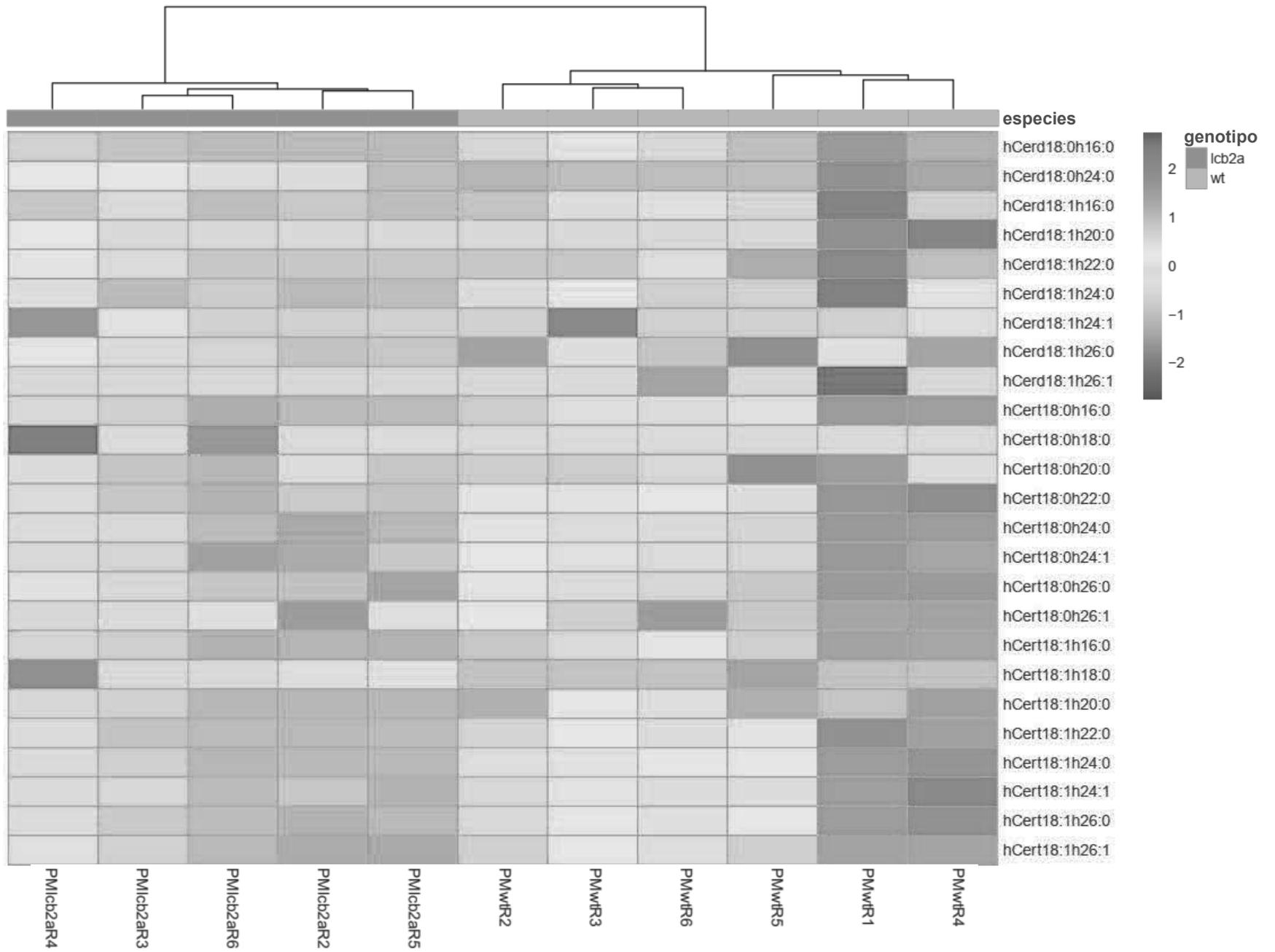
Figura 23. **Análisis multivariado del contenido de esfingolípidos de membrana plasmática de hojas de las plantas wt y *lcb2a-1*.** El análisis multivariado se realizó de acuerdo a Materiales y Métodos. PCA: análisis de componentes principales. Se presentan la agrupación de los valores de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*.

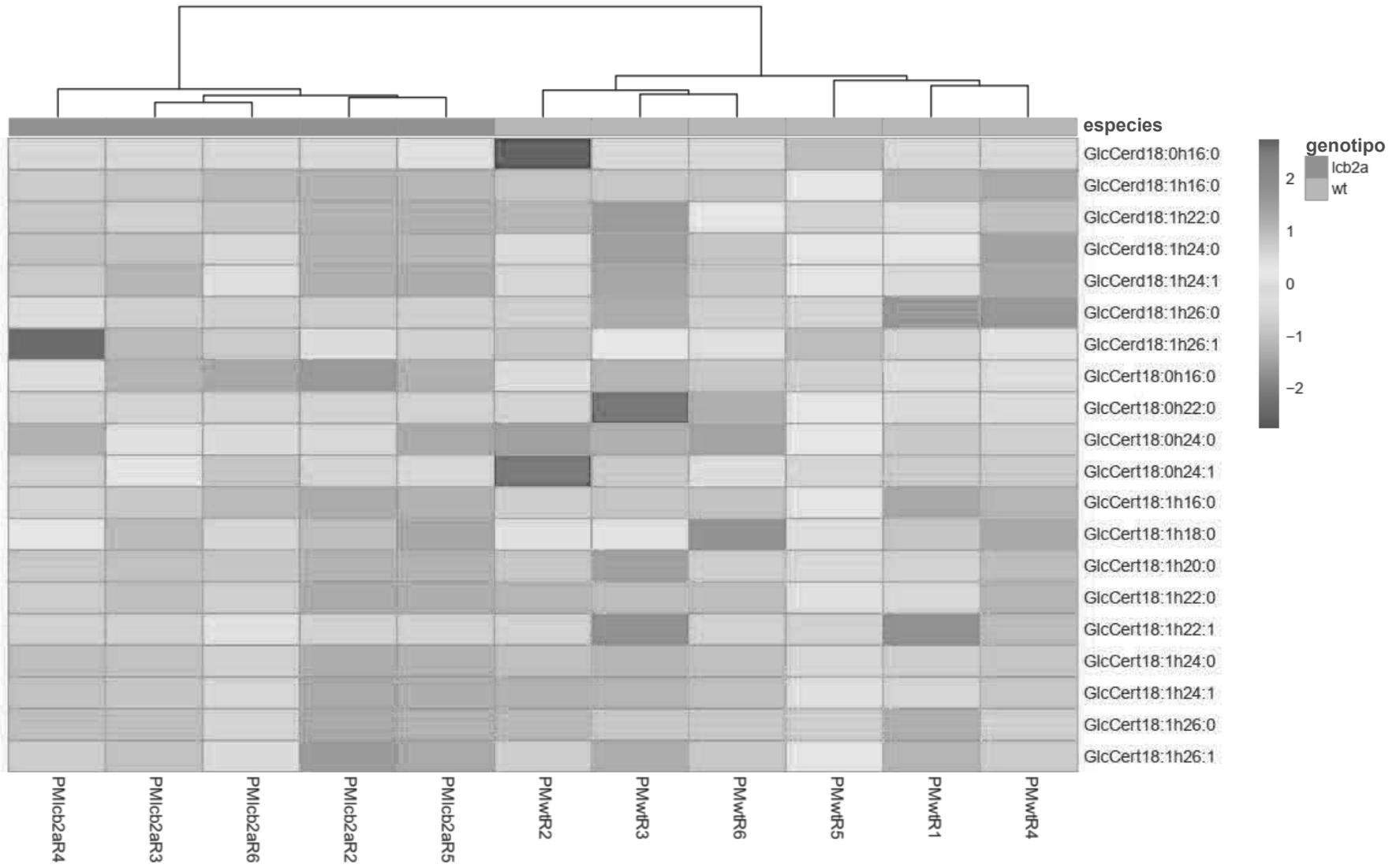
Con objeto de poder visualizar el comportamiento de todas las especies de esfingolípidos identificadas en la membrana plasmática de la silvestre y de la mutante procedimos a realizar un análisis de componentes principales (PCA) el cual se muestra en la Figura 23. El PCA es un método que utiliza la regresión multivariada para evaluar la varianza entre las membranas estudiadas, silvestres y mutantes, dándonos información acerca de la similitud que puede darse entre las poblaciones de las membranas de ambos genotipos y entre sus réplicas, pero considerando el contenido de las especies de esfingolípidos. El análisis del contenido de

esfingolípidos mostró que las membranas plasmáticas de ambos genotipos fueron diferentes entre sí, mientras que las réplicas técnicas dentro de cada genotipo fueron similares.

Con objeto de evaluar la diversidad y distribución de las especies de las membranas entre las réplicas de cada uno de los dos genotipos y entre los dos genotipos se llevó a cabo un análisis de agrupamiento considerando las 98 especies de esfingolípidos identificados (Figura 24). El mapa de calor reveló un perfil diferencial entre las réplicas de los dos genotipos, si bien hubo diferencias individuales entre las réplicas de cada genotipo para cada membrana para cada una de las 4 clases de esfingolípidos identificados en las membranas plasmáticas de las hojas de *Arabidopsis*. Se puede observar que la especie más abundante de la mutante con respecto a las de la silvestre fueron las GIPC, lo cual es consistente a lo observado en la Figura 20, en donde se graficaron las especies en %mol. Estos resultados indican que las membranas estudiadas están caracterizadas por un perfil diferencial de esfingolípidos específico cuantitativa y cualitativamente.







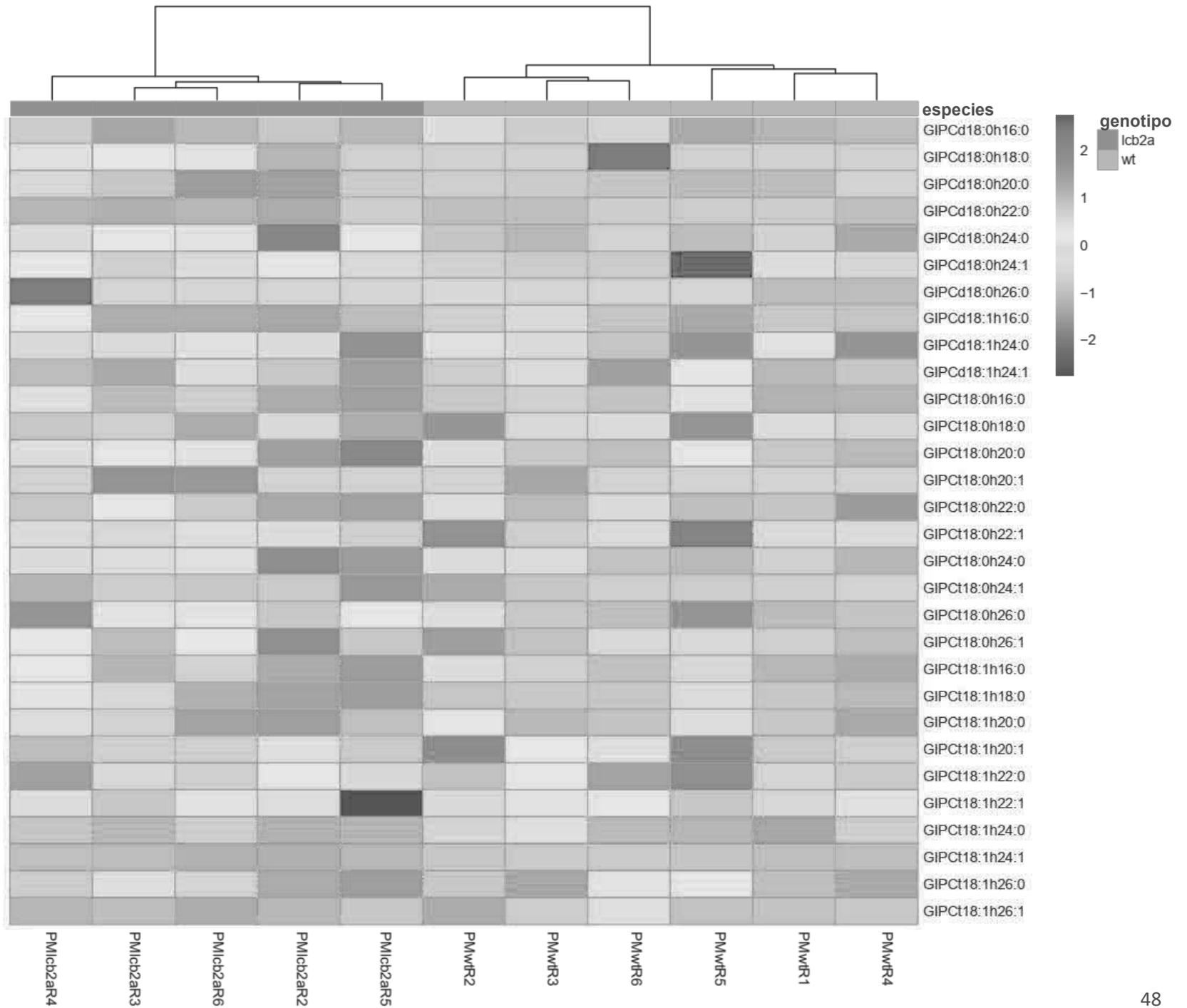


Figura 24: **Mapa de calor de los perfiles del esfingolipidoma de membrana plasmática de hojas de *Arabidopsis thaliana*.** Para evaluar la diversidad y distribución de clases en los 2 tipos de membrana, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico en las 98 especies de esfingolípidos complejos, para cada una de las réplicas de los dos genotipos. El color azul muestra los valores más pequeños con un valor directamente proporcional a la intensidad del azul. Los valores en rojo son los valores más altos y directamente proporcionales a la intensidad del rojo. Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*.

El PCA y el mapa de calor son representaciones que indican diferencias comparativas entre especies químicas y genotipos. Sin embargo, si bien en el mapa de calor están representadas todas las especies químicas de esfingolípidos encontradas en las plantas de los genotipos wt y *lcb2a-1*, sus cantidades están expresadas solo con la intensidad del color, lo cual resulta poco cuantitativo y no da información sobre diferencias estadísticamente significativas. Con el fin de evaluar de manera muy cuantitativa los datos arrojados por el mapa de calor y además hacer gráficas que permitieran conocer las diferencias cuantitativas significativas entre especies de una misma clase de esfingolípidos, se realizó un análisis bioestadístico (una t-student). Con estos datos se realizaron gráficos por separado de cada una de las clases para de esta forma evaluar cuales especies resultaron significativamente diferentes entre las membranas plasmáticas de las plantas wt y las *lcb2a-1* (figuras 25-28).

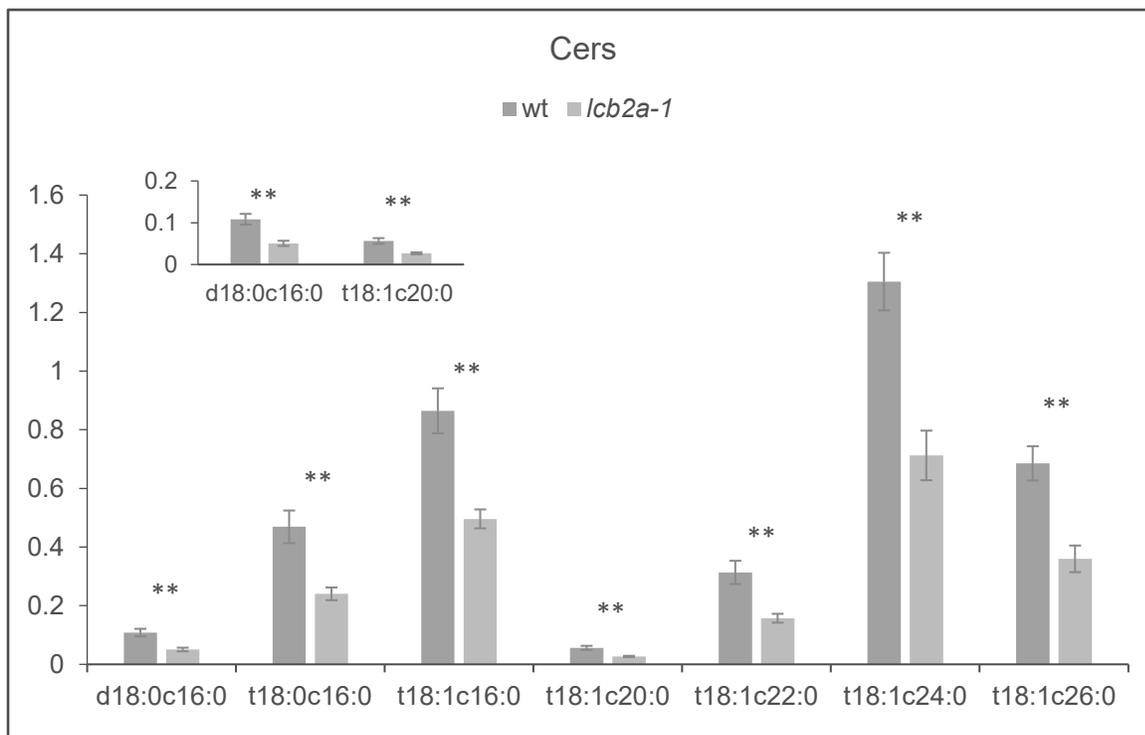


Figura 25: **Especies de Cers significativamente diferentes entre las membranas plasmáticas de las plantas wt y *lcb2a-1*.** A partir de la base de datos indicada en la Tabla 3, se confrontaron las 27 especies de Cers de las membranas plasmáticas de las plantas wt con las 26 de las *lcb2a-1*, se hizo un análisis bioestadístico a través del programa Metaboanalyst (versión 5.0). Las especies que se indican en la gráfica son aquellas que resultaron significativamente diferentes entre los genotipos estudiados. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$). Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfoceramidas.

En la Fig. 25 se observan 7 especies que resultaron significativamente diferentes de las 27 especies de Cers que se tenían en las wt y de las 26 en la línea *lcb2a-1*. En las 7 especies presentadas, todas se encuentran en menor cantidad en el genotipo mutante con respecto al silvestre. También se puede observar que las concentraciones más altas se dan en las especies con la BCL t18:1, como se esperaba de acuerdo a la figura 21. Al igual, podemos observar que los ácidos grasos que se encuentran más abundantemente en 4 de las 7 especies fueron los ácidos grasos 16:0 y 24:0, si bien los ácidos grasos c20:0, 22:0 y 26:0, también se encuentran expresados. Es interesante que todos estos ácidos grasos son saturados.

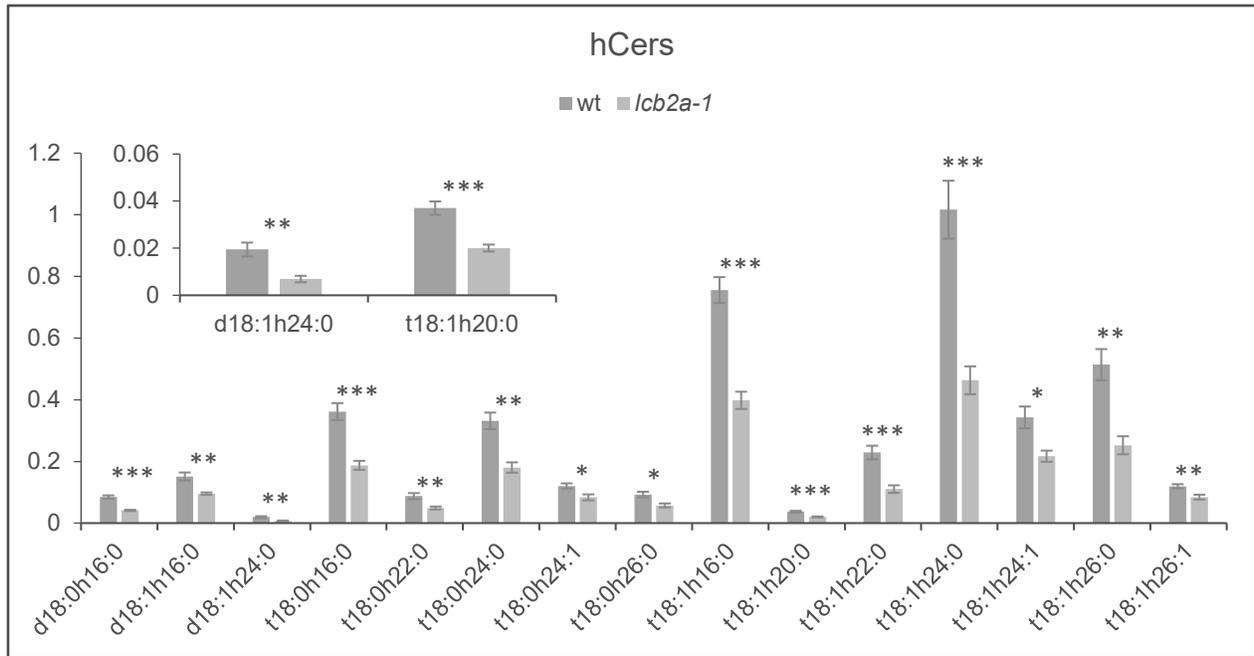


Figura 26: **Especies de hCer significativamente diferentes entre wt y *lcb2a-1***. A partir de la base de datos indicada en la Tabla 3, se confrontaron las 23 especies de hCers de las membranas plasmáticas de las plantas wt con las 25 de las *lcb2a-1*, se hizo un análisis bioestadístico a través del programa Metaboanalyst (versión 5.0). Las especies que se indican en la gráfica son aquellas que resultaron significativamente diferentes entre los genotipos estudiados. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$). Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas.

Para el caso de las hCers (Fig. 26), se consideró el número de especies indicadas en la Tabla 4, donde el total fue de 23 especies para wt y 25 especies para *lcb2a-1*. Se observó que las cantidades de 15 de ellas fueron significativamente diferentes entre ambos genotipos y que son las 15 especies graficadas en la Fig. 26. Se observa que, de las 15 especies, 2 de ellas contienen ácidos grasos insaturados (t18:0h24:1 y t18:1h26:1). En todas las especies hay menor concentración en el genotipo mutante con respecto al silvestre y que las especies que tienen unidos ácidos grasos 16:0 y 24:0 a la BCL t18:1 principalmente, son las que mayor concentración presentan.

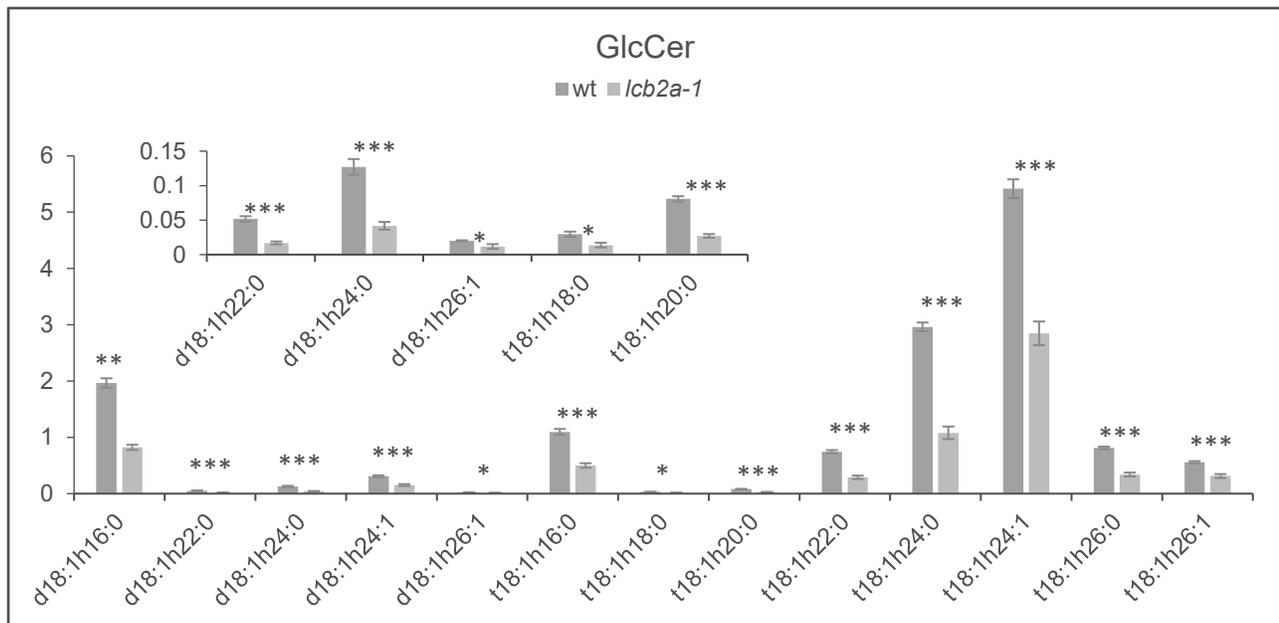


Figura 27: **Especies de GlcCer significativamente diferentes entre wt y *lcb2a-1***. A partir de la base de datos indicada en la Tabla 3, se confrontaron las 20 especies de GlcCers de las membranas plasmáticas de las plantas wt con las 17 de las *lcb2a-1*, se hizo un análisis bioestadístico a través del programa Metaboanalyst (versión 5.0). Las especies que se indican en la gráfica son aquellas que resultaron significativamente diferentes entre los genotipos estudiados. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$). Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas.

En el perfil de las GlcCers (Fig. 27), inicialmente, de manera total, se tenían 20 especies en la wt y 17 en la *lcb2a-1*, pero después del análisis se encontró que 13 de ellas fueron significativamente diferentes. Se puede observar que hay menor concentración de todas las especies en el genotipo mutante con respecto al silvestre. Nuevamente se observa que las especies que mayor concentración tienen unidos ácidos grasos 16:0, 24:0, y para esta clase c24:1, unidos a la BCL t18:1, principalmente. Si bien la gran parte de las especies contienen ácidos grasos saturados, cabe resaltar que 4 de estas especies contienen ácidos grasos insaturados (d18:1h24:1, d18:1h26:1, t18:1h24:1, t18:1h26:1).

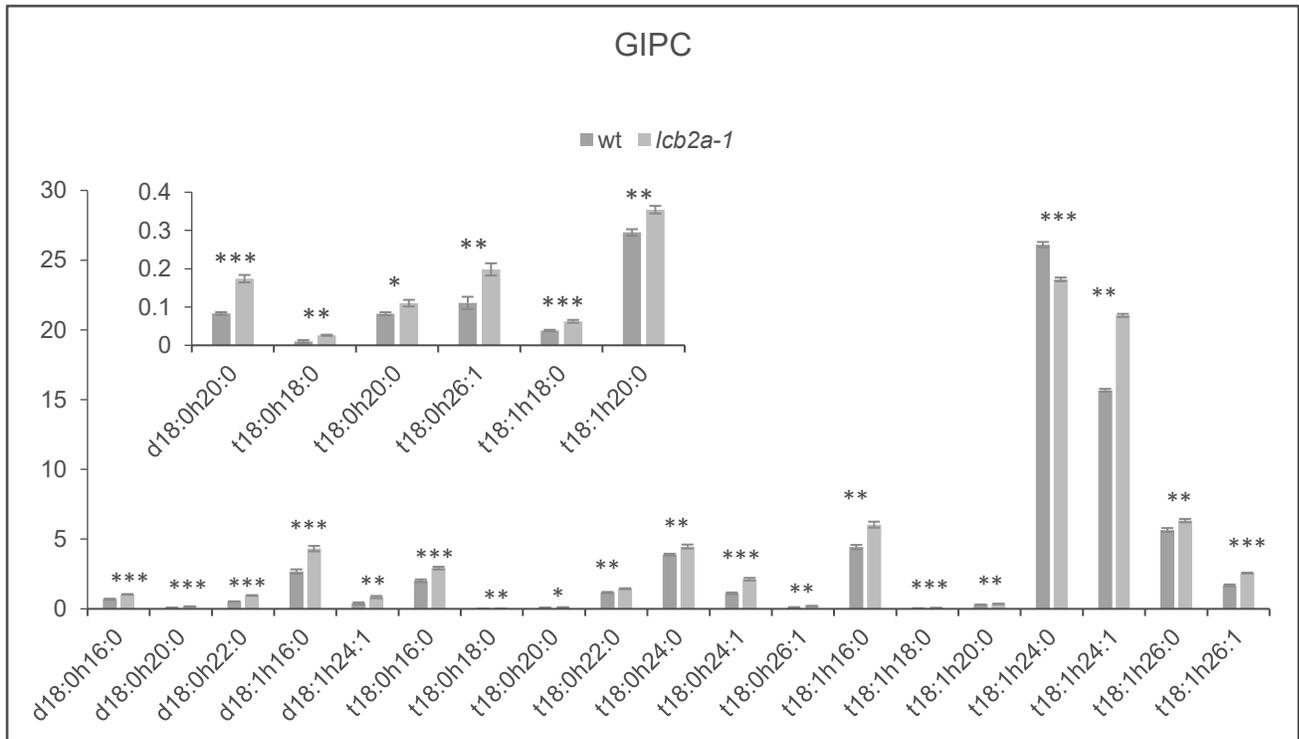


Figura 28: **Especies de GIPCs significativamente diferentes entre wt y *lcb2a-1***. A partir de la base de datos indicada en la Tabla 3, se confrontaron las 28 especies de Cers de las membranas plasmáticas de las plantas wt con las 30 de las *lcb2a-1*, se hizo un análisis bioestadístico a través del programa Metaboanalyst (versión 5.0). Las especies que se indican en la gráfica son aquellas que resultaron significativamente diferentes entre los genotipos estudiados. Se presentan los valores promedio \pm error estándar, de 2 réplicas biológicas y 6 réplicas técnicas para la wt; y 2 réplicas biológicas y 5 réplicas técnicas para la *lcb2a-1*. Los datos se analizaron estadísticamente a través de una t-student ($p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$). Cer, ceramidas; hCer, hidroxiceramidas; GlcCer, glucosilceramidas; GIPC, glicosilinositolfosfoceramidas.

Para la clase de las GIPCS (Fig. 28), se identificaron 28 especies totales en la wt y 30 especies en la *lcb2a-1*, de ellas, 19 resultaron significativamente diferentes en cuanto a contenidos. En esta clase, se puede observar que la abundancia de las especies de GIPCs en el genotipo mutante es mayor comparándola con las del genotipo silvestre, excepto para una especie (t18:1h24:0). Se observa que las especies que se encuentran en mayor concentración tienen unidos ácidos grasos 16:0, 24:0 y 24:1 a la BCL t18:1 principalmente.

Se pudo observar cuantitativamente que la especie t18:1h24:1 fue la más abundante del genotipo mutante con respecto al de la silvestre, lo cual es consistente con lo observado en la Figura 24.

Pero también se observa que la especie t181h24:0 fue la más abundante de todas las especies de GIPCs diferentes y que además estuvo en mayor cantidad en la silvestre con respecto a la mutante. Además, se puede apreciar que se tienen 5 especies con ácidos grasos insaturados (d18:1h24:1, t18:0h24:1, t18:0h26:1, t18:1h24:1, t18:1h26:1). Un dato interesante es que dos de las especies antes mencionadas que presentan ácidos grasos insaturados (t18:1h24:1, t18:1h26:1) se observan tanto en hCer como en GlcCer.

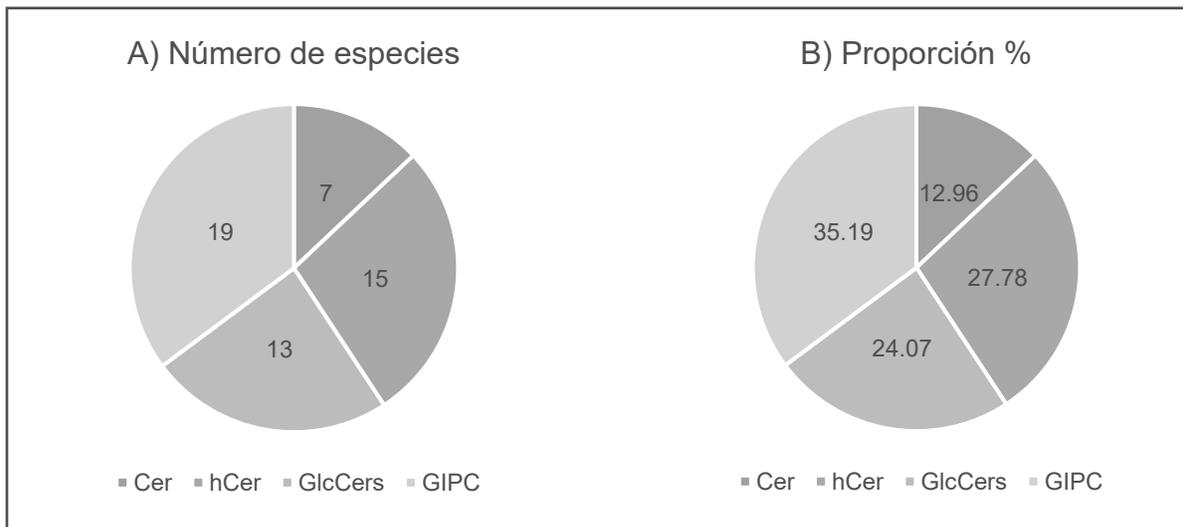


Figura 29: **Distribución absoluta de las especies de esfingolípidos por cada clase y proporción por clase de esfingolípidos en las membranas plasmáticas de los genotipos wt y *lcb2a-1*.** A-B, Se presenta la proporción de especies significativamente diferentes dentro de cada clase en los genotipos wt y *lcb2a-1*. Cer: ceramidas; hCer: hidroxiceramidas; GlcCer: glucosilceramida; GIPC: glicosilinositolfosfoceramidas. Se presentan los valores a partir de las especies detectadas en 6 réplicas biológicas independientes para la wt y 5 réplicas para *lcb2a-1*.

En la figura 29-A se resume la distribución de las 54 especies en las cuatro diferentes clases de esfingolípidos. Estas fueron las especies que resultaron significativamente diferentes entre los genotipos mutante y silvestre, comparándolos con las 102 especies que se tenían al inicio. Se tienen 7 de 27 especies diferentes para Cers, 15 de 25 para hCers, 13 de 20 para GlcCers y 19 de 30 para GIPCs.

De las 102 especies que teníamos inicialmente, el 52.94% de las especies fueron significativamente diferentes y cabe señalar que en su mayoría fueron las especies trihidroxiladas. En la figura 29-B se muestra la proporción en la que se encuentran las especies significativamente diferentes de los cuales 35.19% pertenece a los GIPCs, seguido de las hCers con 27.78%, 24.07% GlcCers y 12.96% Cers.

DISCUSIÓN

Se sabe que los esfingolípidos son esenciales para las plantas pues se ha ido reportando en la literatura que estos lípidos contribuyen a la estructura y la función celular de diferentes maneras: como lípidos estructurales o como lípidos señalizadores en diferentes estados de desarrollo de la planta (Chen y cols., 2006). Los resultados de este trabajo indican que los mayores contenidos de esfingolípidos totales en las plantas de la línea mutante *lcb2a-1*, se pueden interpretar como una respuesta de las plantas ante un defecto en algún paso de la síntesis de esfingolípidos. En este caso, de la ausencia de la subunidad LCB2a de la SPT. Esta respuesta se expresa como una sobreproducción de esfingolípidos. Probablemente esto se deba a un efecto de regulación positiva en uno o varios pasos de la síntesis de esfingolípidos. Recientemente se ha encontrado que hay proteínas que regulan a la SPT y que se llaman proteínas ORM y proteínas ssSPT (González Solís y cols. 2020).

La ausencia del dímero de la SPT, LCB1-LCB2a, no cambió las proporciones en los niveles de Cers, hCers o de GlcCers en la mutante. En cambio, sí se expresó como un aumento muy grande de GIPCs. De lo anterior se deduce que el aumento total del contenido de esfingolípidos es a expensas de un aumento de GIPCs, lo que implica que el dímero LCB1-LCB2b, que sí está presente en la línea mutante, es muy activo en la formación de GIPCs, con lo que está sustituyendo la actividad del dímero LCB1-LCB2a ausente. Estos datos están de acuerdo con el papel redundante de las subunidades LCB2a y LCB2b en el sentido de que ambos dímeros están capacitados para llevar a cabo la síntesis de cetoesfinganina (Dietrich y cols. 2008). Sin embargo, nuestros datos implican que la síntesis sufre una desregulación cuantitativa que genera proporciones diferentes de clases de esfingolípidos. También estos resultados abren la posibilidad de que durante la síntesis de esfingolípidos en la mutante hay un flujo de todas las Cers hacia la ruta de los GIPCs o bien que los GIPCs sintetizados se van en mayor proporción por tráfico vesicular a la membrana plasmática. De alguna manera, la falta de la subunidad LCB2a o bien los mayores niveles de esfingolípidos totales regulan a la SPT y/o a alguna enzima corriente abajo de la SPT.

Cuando los esfingolípidos por clase fueron cuantificados en % mol, se encontró que efectivamente, la clase de esfingolípidos que contribuye con el 88% es la de GIPCs, lo cual está de acuerdo con reportes anteriores de la literatura en los que había evidencias de que las GIPCs son muy abundantes en la membrana plasmática de plantas (Cacas y cols. 2016, Carmona-Salazar y cols. 2021). De acuerdo con lo anterior, los contenidos de las otras 3 clases de esfingolípidos suman alrededor del 12%, de los cuales el mayor contribuyente fue la clase de

GlcCers (Bohn y cols. 2001, Carmona-Salazar y cols. 2021). Lo anterior coincide con que estas dos clases de esfingolípidos más abundantes, es decir, las GlcCer y GIPCs, tienden a localizarse en la membrana plasmática, y es muy probable que se encuentren particularmente en la monocapa externa de la membrana (Cacas y cols. P 2016). Esta distribución es consistente con el papel que las grandes cabezas hidrofílicas de los esfingolípidos pueden tener en la superficie externa de la membrana. Por ello se les han asignado funciones de reconocimiento molecular. Algunas de estas funciones han sido, en el caso de las especies de GIPCs, la de ser sensores para altas concentraciones de sodio en el ambiente y por tanto ser detectores importantes en el estrés por salinidad (Jiang y cols. 2019).

De acuerdo a la línea mutante de *Arabidopsis lcb2a-1*, la ausencia del dímero LCB1-LCB2a los resultados del análisis del esfingolipidoma de sus membranas plasmáticas, indican que esta mutante tuvo dos tipos de diferencias, una en donde las GIPCs aumentaron en la mutante y otra en donde las otras tres clases de esfingolípidos disminuyeron, siempre en comparación con las membranas plasmáticas de las plantas silvestres. Si se suman la disminución del % mol de esfingolípidos de cada clase en la mutante respecto a la silvestre, la suma da -12.22 %. Que corresponde al aumento de GIPCs en la mutante con respecto a la silvestre. La comparación entre estas dos cifras sugiere que aún en la mutante que tiene más del doble del contenido absoluto de esfingolípidos, se tiende a mantener una proporción constante de cada una de las cuatro clases. Esto sugeriría que el dímero de la SPT LCB1-LCB2b es regulado de manera que su actividad le permita generar las suficientes BCL precursoras para mantener la proporción total de las cuatro clases de esfingolípidos en la membrana plasmática. Esto depende de las enzimas corriente debajo de la SPT y que son las encargadas de catalizar el resto de reacciones que conducen a la producción de las cuatro clases de esfingolípidos. La capacidad de síntesis de cetoesfingánina por el dímero LCB1-LCB2b parece ser muy alta puesto, que el número y tipo de especies que desaparecen de la mutante son solo 3 con respecto a las de la silvestre (Cer d18:1c26:1, hCer d18:1h26:1, GlcCer t18:0h22:0). Este número también indica que el resto del flujo de la vía de síntesis de esfingolípidos se altera muy poco.

Los datos de esfingolípidos totales tanto en contenidos absolutos como en % mol en la mutante *lcb2a-1* indican que las membranas plasmáticas de esta mutante tienen un contenido de esfingolípidos que no es idéntico al de la silvestre, considerado tanto en términos de esfingolípidos totales como en la distribución de esfingolípidos por clase. Estos resultados contrastan con los valores reportados para los esfingolípidos totales de la roseta, en los que la

mutante *lcb2a-1* no presentó diferencias cuantitativas en el contenido de esfingolípidos totales ni en su contenido y composición de BCL (Dietrich y cols. 2008).

El perfil de las cuatro BCL identificadas en los esfingolipidomas de las membranas plasmáticas de las plantas silvestres y de la mutante *lcb2a-1* fue muy similar, pero no idéntico. Hubo diferencias muy discretas que consistieron en ligeros aumentos para la d18:0 y d18:1 en la mutante y una disminución discreta para la t18:1 en la mutante. Hay que considerar que en números absolutos (contenidos en nmol/mg proteína), las cantidades de BCL en la mutante son prácticamente del doble, comparadas con la silvestre, lo cual implica que aunque el contenido total de BCL haya aumentado al doble, la distribución de cada una de las cuatro especies sigue siendo en las mismas proporciones en la mutante. Lo anterior implica que el dímero LCB1-LCB2b sigue produciendo eficientemente su producto que es la cetoesfinganina, pero que las enzimas corriente abajo son también igualmente eficientes en catalizar sus conversiones correspondientes. Por enzimas corriente abajo se entenderían múltiples enzimas como la trihidroxilasa de BCL (SBH1 y SBH2) y la desaturasa de BCL (SLD1 y SLD2) (Chen y cols. 2008; Chen y cols. 2012).

Al igual que los contenidos de BCL, los contenidos de ácidos grasos totales en las membranas plasmáticas de la mutante *lcb2a-1* presentaron pocas diferencias con respecto a los de las plantas silvestres. En algunos casos hubo incrementos en las proporciones de ácidos grasos y en otros casos hubo decrementos, todos fueron pequeños, pero significativos estadísticamente. Estos datos confirman la interpretación de que el dímero LCB1-LCB2b es muy eficiente en proveer el primer producto de las reacciones de síntesis de esfingolípidos que lleva a la formación de BCL dihidroxiladas y trihidroxiladas. Estas BCLs son sustrato de las ceramida sintasas (CSI y CSII) que amidan los ácidos grasos a las BCL. El hecho de que el contenido de esfingolípidos totales sea mayor en la mutante que en la silvestre, implica que este mayor contenido crece con las mismas proporciones de ácidos grasos en la mutante que en la silvestre. Se podría inferir entonces que en esta mutante las dos ceramidas sintasas no limitan el flujo de la vía. Sin embargo, es importante mencionar que el análisis informático de los ácidos grasos presentados hasta este punto en este trabajo, no precisan su pertenencia a alguna de las cuatro clases de esfingolípidos en particular, ya que se ha reportado que las dos ceramidas sintasas existentes tienen diferente afinidad por el tipo de ácido graso y por lo tanto el tipo de ceramida resultante define si se va a la síntesis de GlcCers o de GIPCs (Luttgeharm y cols. 2016).

El PCA fue construido a partir de todos los valores crudos experimentales obtenidos de cada esfingolípidos y su análisis reveló un muy buen agrupamiento entre las réplicas de cada genotipo,

y, además, que las réplicas fueron diferentes entre los dos genotipos. En otras palabras, los contenidos de esfingolípidos de las 6 réplicas de la silvestre por una parte y de las 5 réplicas de la mutante por otra, mostraron un muy buen agrupamiento entre las réplicas dentro de cada genotipo, y también que las réplicas fueron diferentes entre la silvestre y la mutante. Por tanto, este PCA indica que técnicamente los grupos experimentales tienen consistencia entre sí y también indican que cada uno de los dos genotipos arroja diferencias muy claras entre sus contenidos de esfingolípidos. Hay que tomar en cuenta que para este análisis se consideraron 98 especies para la silvestre y 98 especies para la mutante. Con todo lo anterior, se puede decir que los datos experimentales presentaron reproducibilidad y que por lo tanto son confiables y su análisis puede dar información valiosa (Martínez-González y cols. 2008).

El mapa de calor o heatmap es una representación global de los datos experimentales, expresando el número de especies y los niveles de cada una, pero con una apreciación semicuantitativa, ya que revela la concentración de cada especie según una escala basada en intensidad de color sin un valor numérico exacto. Sin embargo, el mapa permite hacer una rápida comparación de las 98 especies de la silvestre y las 98 especies de la mutante, tanto en términos de su presencia en cada réplica dentro de cada genotipo, como entre los dos genotipos, como se describió previamente. En particular, las diferencias se hicieron muy claras entre las clases de esfingolípidos prevalientes en cada uno de los dos genotipos, siendo las GIPCs preponderantes en la mutante y las otras tres clases en la silvestre.

El análisis realizado a lo largo de este trabajo abarcó características de los aspectos generales de los esfingolipidomas y de los componentes básicos de los esfingolípidos analizados, es decir de las BCL y los ácidos grasos de las 4 clases. Sin embargo, se pueden realizar estudios más detallados, como la distribución de ácidos grasos y BCL dependiendo cada clase de esfingolípidos y sus niveles cuantitativos para saber cuáles son las especies que aumentan o disminuyen en cada clase y en cada genotipo. Hasta esta parte del trabajo, el análisis evidenciaba diferencias entre las membranas plasmáticas de los dos genotipos en la composición a nivel de clase de esfingolípidos. Sin embargo, ya que disponíamos del acervo de contenido a nivel de especies de BCLs y de ácidos grasos y de su apareamiento formando el esqueleto hidrofóbico de las especies pertenecientes a cada clase de esfingolípidos, nos propusimos identificar aquellas especies que eran significativamente diferentes entre los genotipos *wt* y *lcb2a-1*. Para ello, se realizó un análisis bioestadístico sometiendo los valores de la base de datos a una t-student usando el programa Metabanalyst 5.0. Este análisis reveló que de las 98 especies que se tienen, 54 de ellas fueron significativamente diferentes, o sea que globalmente, aproximadamente la mitad de las especies

de esfingolípidos de las cuatro clases están en las mismas cantidades en las membranas plasmáticas de las plantas wt y *lcb2a-1*. Sin embargo, la otra mitad de las especies están en contenido diferente (entre el 35 y el 13%), dependiendo de la clase de esfingolípidos, en cada genotipo. De las cuatro clases, la clase que contribuye a una mayor diferencia entre contenidos cuantitativos es la de GIPCs, seguida por las hCers, luego las GlcCers y al final están las Cers. En general, las especies de GIPCs de la línea *lcb2a-1* GIPCs se encontraron en mayor cantidad que en las plantas wt (figura 28). Para las demás clases se mostró un comportamiento distinto, ya que las especies que fueron significativamente diferentes fueron las que estaban en mayoría en la línea wt con respecto a la línea *lcb2a-1* (figura 25-27). Estos resultados indican que la falta de la subunidad LCB2a dentro del dímero LCB1-LCB2b influye en el perfil de esfingolípidos incorporados a la membrana plasmática. La falta de subunidad LCB2a tienen un impacto a nivel de especies dentro de las cuatro clases de esfingolípidos, particularmente en las GIPCs. Esto implica que GIPCs durante la síntesis de esfingolípidos por la forma LCB1-LCB2b de la SPT en la mutante, hay un flujo preferencial de Cers hacia la ruta de los GIPCs y/o de su incorporación de la membrana plasmática.

Las proteínas tipo orosomucoide (ORM) interactúan con la serina palmitoiltransferasa (SPT) para regular negativamente la biosíntesis de esfingolípidos, un proceso reversible crítico para equilibrar los niveles de esfingolípidos intracelulares necesarios para el crecimiento y la muerte celular programada (González Solís y cols. 2020).

La actividad de SPT está altamente regulada en eucariotas para modular el requerimiento de esfingolípidos para el crecimiento y la función de la membrana al tiempo que limita la acumulación de BCL y ceramidas hasta que sea necesario para desencadenar funciones celulares específicas, como la muerte celular programada mediada, en la defensa contra patógenos en las plantas. La SPT está compuesta por las subunidades LCB1 y LCB2 y la proteína accesoria conocida como subunidad pequeña de SPT (ssSPT). No está claro si los polipéptidos ssSPT son esenciales en eucariotas o si la alteración en su expresión puede afectar la actividad de SPT *in vivo* y alterar las propiedades fisiológicas de las células (Kimberlin y cols. 2013).

La SPT está regulada principalmente por mecanismos postraduccionales para responder rápidamente a las perturbaciones en las concentraciones de esfingolípidos intracelulares. Las ORM o proteínas similares a orosomucoide, ahora se reconocen como proteínas no catalíticas que regulan negativamente la SPT. Orm1p y Orm2p suprimen la actividad de SPT en respuesta a niveles elevados de esfingolípidos a través de una interacción física que requiere el primer dominio transmembrana de LCB1 (Kimberlin y cols. 2016).

Explicar cómo es que una forma de la SPT, que es la primera enzima de la vía de síntesis de esfingolípidos promueve la expresión preferencial de ciertas especies que se forman al final de la vía, no es simple. Lo anterior es porque no se conoce mucho de la regulación de la vía de síntesis de esfingolípidos (Luttgeharm y cols. 2016). Además, hay que considerar que la composición de los lípidos que se encuentran en la membrana plasmática no solo depende de la síntesis de estas moléculas, sino de los mecanismos de tráfico desde el sitio en donde se sintetizan (Retículo Endoplásmico y Aparato de Golgi), hasta el sitio de destino, en este caso, la membrana plasmática (Ning y cols. 2021). Se ha visto que los lípidos que se sintetizan son entregados de manera diferencial a las diferentes membranas celulares (Hurlock y cols. 2014). Es posible que cada uno de los dímeros de la SPT (LCB1-LCB2a y LCB1-LCB2b) influya de manera diferente en el tipo de especies de esfingolípidos que llegan a la membrana plasmática, no solo por un efecto en la vía de síntesis, sino también en su tránsito a la membrana.

CONCLUSIONES

1. La diversidad de especies de esfingolípidos pertenecientes a las cuatro clases fue la misma en las membranas plasmáticas de las plantas que no expresaron a la subunidad LCB2a y en las silvestres, ya que el número absoluto de especies de esfingolípidos y su proporción no variaron.
2. El contenido absoluto de esfingolípidos totales aumentó al doble en la línea que no expresa a la subunidad LCB2a de la SPT en comparación con la silvestre. Este aumento ocurrió a expensas de un incremento de las GIPC.
3. El contenido relativo, o sea las proporciones de cada una de las clases de esfingolípidos varió en la mutante carente de LCB2a. Las Cers, hCers y GlcCers disminuyeron ligeramente y las GIPCs aumentaron con respecto a las membranas plasmáticas de las plantas silvestres.
4. El contenido relativo de las 4 BCLs y el de los 12 ácidos grasos fue muy similar en las membranas plasmáticas de las plantas silvestres y de las mutantes.
5. Si bien las especies de BCL y ácidos grasos son las mismas (aunque en cantidades ligeramente diferentes) en las membranas plasmáticas de ambos genotipos, la amidación entre BCL y ácido graso resultó en la generación de especies pareadas diferentes entre los genotipos. Estas resultaron ser 19 especies de GIPC, 15 especies de hCer, 13 especies de GlcCer y 7 especies de Cer.

Estos resultados implican que si bien el dímero LCB1-LCB2b es funcionalmente redundante al LCB1-LCB2a en la formación de cetoesfinganina, ante la falta de la subunidad LCB2a hay una respuesta de sobre expresión de síntesis de esfingolípidos. Es probable que este efecto esté relacionado con:

- a) Una regulación positiva de la SPT en su versión LCB1-LCB2b.
- b) Una diferencia en la actividad de alguna(s) de la(s) enzima(s) de los pasos posteriores a la síntesis de BCL.
- c) Una diferencia en el tránsito de esfingolípidos a la membrana plasmática.

Nuestros resultados no permiten apoyar alguna de estas posibilidades.

PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios en las membranas plasmáticas aisladas de ambos genotipos que permitan ver si hay una incidencia de la composición de esfingolípidos en las propiedades membranales.
2. Hacer experimentos de tráfico vesicular que permitan comprender por qué la línea *lcb2a-1* está enriquecida en GIPCs.
3. Someter a las plantas de ambos genotipos a pruebas de estrés como bajas o altas temperaturas para ver si sus membranas plasmáticas varían su composición de esfingolípidos y presentan diferentes propiedades ante estos cambios de temperatura.

REFERENCIAS

1. Aguirre U. (2017) Respuesta a bajas temperaturas de cultivos celulares de una línea de *Arabidopsis thaliana* deficiente en la síntesis de esfingolípidos. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
2. Becker W., Kleinsmith L., Hardin J., Raasch J. (2003) *The World of the Cell*, 6th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco, Pp 169-180.
3. Bohn M., Heinz E., Lüthje S. (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Archives of Biochemistry Biophysics* 387: 35-40.
4. Cacas J., Buré C., Grosjean K., Gerbeau-Pissot P., Lherminier J., Rombouts Y., Maes E., Bossard C., Gronnier J., Furt F., Fouillen L., Germain V., Bayer E., Cluzet S., Robert F., Schmitter J., Deleu M., Lins L., Simon-Plas F., Mongrand S. (2016) Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids. *Plant Physiology* 170:367-384.
5. Cano D. (2014) Contribución de los esfingolípidos a la fluidez de la membrana plasmática de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
6. Carmona-Salazar L. (2018) Estudio de nanodominios membranales en tres modelos fisiológicos de especies vegetales. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
7. Carmona-Salazar L., Cahoon R., Gasca-Pineda J., González-Solís A., Vera-Estrella R., Treviño V., Cahoon E., Gavilanes-Ruiz M. (2021) Plasma and vacuolar membrane sphingolipidomes: composition and insights on the role of main molecular species. *Plant Physiology*, 186: 624–639.
8. Cassim A., Gouguet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M., Mongrand S. (2019). Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Progress in Lipid Research*, 73: 1-27.
9. Chen M., Cahoon E. (2009) Chapter 5 Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function. En: *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*. (Wada H. and Murata N. Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Springer, Dordrecht Vol. 30 pp. 77–115
10. Chen M., Han G., Dietrich C., Dunn T., Cahoon, E. (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *The Plant Cell*, 18: 3576–3593.

11. Chen M., Markham J., Cahoon E. (2012) Sphingolipid $\Delta 8$ unsaturation is important for glucosylceramide biosynthesis and low-temperature performance in Arabidopsis. *Plant Journal*, 69: 769-781.
12. Chen M., Markham J., Dietrich C., Jaworski J., Cahoon E. (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important growth and regulation of sphingolipid content and composition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20: 1862-1878.
13. Cooper G. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates, Washington. Pp. 120-165.
14. Cullis P., Hope M. (1991). Chapter 1 Physical properties and functional roles of lipids in membranes. *New Comprehensive Biochemistry*, 20: 1–41.
15. Dietrich C., Han G., Chen M., Berg H., Dunn M., Cahoon, E. (2008). Loss of function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis *LCB2* genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal*, 54: 284–298.
16. Feduchi E., Romero C., Yáñez E., Blasco I., García-Hoz C. (2015) *Bioquímica. Conceptos Esenciales*, 2da edición, Madrid, Editorial Panamericana. Pp. 55-57.
17. Gika H., Kaklamanos G., Manesiotis P., Theodoridis G. (2016). *Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography*. *Encyclopedia of Food and Health*, Pp 93–99.
18. Gonzalez-Solis A., Han G., Gan L., Liu Y., Markham J., Cahoon R., Dunn T., Cahoon E. (2020) Unregulated sphingolipid biosynthesis in gene-edited Arabidopsis ORM mutants results in nonviable seeds with strongly reduced oil content. *Plant Cell* tpc.00015.2020.
19. Gordon M. (2003) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Fats – Classification*, 2nd edition, Academic Press, Pp 2287-2292.
20. Haynes C., Allegood J., Park H., Sullards M. (2009). Sphingolipidomics: methods for the comprehensive analysis of sphingolipids. *Journal of Chromatography. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877: 2696–2708.
21. Hurlock A., Roston R., Wang K., Benning C. (2014) Lipid trafficking in plant cells. *Traffic*, 2014; 15(9): 915-932.
22. Ikeda M., Kihara A. (2006). Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29: 1542–1546.
23. Jiang Z., Zhou X., Tao M., Yuan F., Liu L., Wu F., Wu X., Xiang Y., Niu Y., Liu F. FALTAN PUNTOS (2019) Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca^{2+} influx. *Nature*, 572: 341–346.

24. Kimberlin A., Han G., Luttgeharm K., Chen M., Cahoon R., Stone J., Markham J., Dunn T. (2016) ORM expression alters sphingolipid homeostasis and differentially affects ceramide synthase activity. *Plant Physiology*. 172: 889-900.
25. Kimberlin A., Majumder S., Han G., Chen M., Cahoon R., Stone J., Dunn T., Cahoon E. (2013) Arabidopsis 56-amino acid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid synthesis, are essential and affect mycotoxin sensitivity. *Plant Cell*,. 25(11): 4627-39.
26. Kota V., Hama H. (2013). 2'-Hydroxy ceramide in membrane homeostasis and cell signaling. *Advances in Biological Regulation*, 54: 223–230.
27. López L. (2005) Fitoesteroles y fitoesteranos. Su papel en la prevención cardiovascular. *Ámbito Farmacéutico, Fitoterapia* 24, 90-94.
28. Lozano J., Galindo J., García-Borrón J., Martínez-Liarte J., Peñafiel R., Solano F. (2005) *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*, 3a Edición, Mc-Graw Hill Interamericana, España. Pp 83-85.
29. Luckey M. (2008) *Membrane Structural Biology: with Biochemical and Biophysical Foundations*. Cambridge University Press, San Francisco, Pp 13-20.
30. Luttgeharm K., Cahoon E., Markham J. (2016) Substrate specificity, kinetic properties and inhibition by fumonisin B1 of ceramide synthase isoforms from Arabidopsis. *Biochemical Journal*, 473: 593-603.
31. Markham J., Li J., Cahoon E., Jaworski J. (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 22684-22694.
32. Martínez-González M., Sánchez-Villegas A., Faulin J. (2008) *Bioestadística Amigable*, 2a edición, Editorial Diaz de Santos, España.
33. Mathews C. (2002) *Bioquímica*. 3a Edición. Pearson Hispano América, México, Pp: 364, 368.
34. Mckee T., Mckee J. (2009) *Bioquímica: Las Bases Moleculares de la Vida*, 4a edición, McGraw-Hill Interamericana, D.F., ppPp. 383-385.
35. Merrill A., Stokes T., Momin A., Park H., Portz, B., Kelly S., Wang E., Sullards M., Wang M. (2009). Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease. *Journal of Lipid Research*, 50: 97–102.
36. Michaelson L., Napier J., Molino D., Faure J. (2016). Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaption. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861: 1329–1335.

37. Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T., Warren G., Engelman D. (2004) Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 4083-4088.
38. Nelson D., Cox M. (2015) *Lehninger. Principles of Biochemistry*, 6th edition, New York, W.H. Freeman and Company. Pp 363-365.
39. Ning J., Li-Pan H., Jing J., Ling-Jian W., Xiao-Ya C. (2021) Sphingolipid metabolism, transport, and functions in plants: Recent progress and future perspectives. *Plant Communications*, 2: 100214.
40. Ninkuu V., Zhang L., Yan J., Fu Z., Yang T., Zeng H. (2021). *Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 5710.
41. O'Connor C., Adams, J. (2010) *Essentials of Cell Biology*, 5th edition, MA: NPG Education, Cambridge, Pp 41 y 42.
42. Oliveira E., Muller E., Abad F., Dallarosa J., Adriano C. (2010) Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Química Nova*, 33: 984-987.
43. Palacios S. (2008) Participación de esfingolípidos membranales en respuesta de defensa de plantas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
44. Raicu V., Popescu A. (2008) Chapter: Cell Membrane: Structure and Physical Properties. En: *Integrated Molecular and Cellular Biophysics*, Springer, New York, Pp 73-99.
45. Santiago M., Strobel S. (2013). *Thin Layer Chromatography*. (Jon Lorsch Ed.) *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*, Vol. 533: Pp 303–324.
46. Santos J. (2008) Identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas, Posgrado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Pp 12-16.
47. Slotte J., Yasuda T., Engberg O., Hautala V., Nyholm T., Murata M. (2017) Bilayer interactions among unsaturated phospholipids, sterols and ceramide. *Biophysical Journal*, 112: 1673-1681.
48. Smith R. (2013) *Mass Spectrometry*. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier, Michigan, Pp 603–608.
49. Sprong H., Sluijs P., Van-Meer G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 504-513.

50. Sprovieri P., Martino G. (2018) The role of the carbohydrates in plasmatic membrane. *Physiological Research* 67: 1-11.
51. Teng C., Dong H., Shi L., Deng Y., Mu J., Zhang J., Yang X., & Zuo, J. (2008). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146: 1322–1332.
52. Van Meer G., Voelker D., Feigenson, G. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,. 9: 112-124.
53. Vázquez C. (2015) Interacción de la ATPasa de H⁺ con la región lipídica de la membrana plasmática. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
54. Voet D., Voet J., Pratt C. (2016) Fundamentos de Bioquímica: La Vida a Nivel Molecular, 4a edición, Editorial Médica Panamericana, España, Pp 267-270.
55. Xie L., Chen Q., Chen M., Yu L., Huang L., Chen L., Wang F., Xia F., Zhu T., Wu J. (2015) Unsaturation of very long chain ceramides protects plant from hypoxia-induced damages by modulating ethylene signaling in Arabidopsis. *Plos Genetics*, 11: 1005143.
56. Yeagle P. (2009) Cell Membrane Features. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, New Jersey. Pp 1-8.
57. Züllig T., Trötz Müller M., Köfeler H. (2020). Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412: 2191–2209.