

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

*“Caracterización del transporte de glucosa en tejido
embrionario de maíz”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOSÉ ARTURO RAYA SANDINO

ASESORA

SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

M É X I C O D F 2 0 1 1





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

▶

Jurado asignado

Presidente: Dra. Carmen Giral Barnés

Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri

Secretario: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

1er suplente: Dr. José Ignacio Páramo Ramírez

2do suplente: Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114, del Departamento de Bioquímica,
Edificio E, Facultad de Química, UNAM

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Asesor

José Arturo Raya Sandino

Alumno



*Con cariño para mamá por darme la
oportunidad de conocer el universo
bajo un enfoque científico.*



Agradecimientos

Se agradece a la Agrónomo María Teresa de Jesús Olivera Flores coordinadora del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM y a la Bióloga María de Jesús Jiménez Villalobos por su apoyo en la preparación de los cultivos de células en suspensión de embriones de maíz.

Se agradece al MVZ Atonatiú Edmundo Gómez, jefe del bioterio por su apoyo en el proceso de inmunización de conejos para la obtención de los anticuerpos contra los transportadores de carbohidratos de maíz.

Se agradece a la Q Laurel Fabila Ibarra, jefa responsable de la zona destinada al manejo de la radiactividad del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por sus aportaciones en el manejo del material radiactivo durante la realización de este proyecto.

Este trabajo se realizó con apoyos de

- PAPIIT IN203708, DGAPA, UNAM
- CONACYT 90021
- Beca para la realización de Tesis de licenciatura, otorgada por el Colegio de Profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 de la Asociación Autónoma del Personal Académico de la UNAM (AAPAUNAM), Cátedra **Jacobo Gómez Lara**.



Contenido.

Índice de figuras y Tabla.	6
Resumen.	7
Antecedentes.	8
Introducción.	10
Germinación.	10
Reservas de carbohidratos en las semillas.	15
Tipos de transporte membranal.	18
Protocolo general para la medición de la actividad de transporte por proteínas membranales.	21
1. Material membranal.	21
2. Detección del transporte mediante la incorporación de marca radiactiva.	23
3. Efecto de ionóforos en la actividad de transporte a través de la membrana.	23
Transportadores de carbohidratos en plantas.	25
Justificación.	30
Hipótesis.	32
Objetivos.	32
Materiales y Métodos.	33
Resultados.	44
Discusión.	55
Conclusiones.	60
Perspectivas.	61
Referencias.	62

Índice de figuras y Tabla.

Figura 1. Proceso germinativo de la semilla de maíz.	10
Figura 2. Semilla de maíz (<i>Zea mays</i>).	12
Figura 3. Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las fases de la germinación.	14
Figura 4. El almidón en los cereales.	17
Figura 5. Proteínas transportadoras de sustancias a través de la membrana celular.	20
Figura 6. Movimientos iónicos a través de la membrana en presencia de valinomicina (V) y CCCP (A-).	25
Figura 7. Modelo topológico de un transportador de monosacáridos de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	26
Figura 8. Curva patrón del número de células en suspensión de embriones de maíz.	37
Figura 9. Detección de la emisión de la radiación en un contador de centelleo líquido.	40
Figura 10. Estándares utilizados en la calibración del aparato detector de la emisión de la radiación.	40
Figura 11. Curva estándar de apagamiento de la radiactividad.	42
Figura 12. Detección del transportador de hexosas en inmunoréplica tipo Western.	44
Figura 13. Presencia del transportador de hexosas en una suspensión de células embrionarias de maíz (SCEM).	45
Figura 14. Curva temporal de la toma de glucosa en células de maíz en suspensión.	46
Figura 15. Curva temporal de toma de glucosa de células en suspensión a dos valores distintos de pH.	48
Figura 16. Curva temporal de transporte activo de glucosa por las células en suspensión de maíz.	49
Figura 17. Efecto del CCCP sobre curva temporal de actividad de transporte de glucosa.	50
Figura 18. Actividad de transporte de glucosa en presencia de un gradiente de pH y valinomicina.	51
Figura 19. Curva de saturación de la toma de glucosa por las células en suspensión de embriones de maíz.	53
Figura 20. Modelo del transporte de glucosa y sacarosa en tejido embrionario de maíz.	56
Tabla 1. Comparación de los valores de Km y Vmax de la toma de glucosa por las células en suspensión de embriones de maíz.	54

Resumen.

En todas las fases del desarrollo de las plantas el transporte de nutrientes a través de los transportadores membranales, es necesario para su crecimiento y desarrollo, incluso durante la germinación es de vital importancia. En nuestro laboratorio hemos encontrado que el eje embrionario, tejido que ya tiene presentes los primordios de hoja, así como la raíz primaria, denominada radícula, no contiene transportador de sacarosa, la inexistencia del transportador de disacáridos hace evidente la importancia de la necesidad de transportar hexosas desde los apoplastos hacia el interior celular, ya que depende para su sobrevivencia del carbono almacenado o metabolizado en los tejidos circundantes. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de transporte de glucosa de tejido embrionario de maíz. Para evidenciar que el transporte de hexosas ocurría en los embriones de maíz, se utilizaron células en suspensión de embriones de maíz, se produjo un anticuerpo específico contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática y se midió la actividad de transporte mediante la incorporación de [¹⁴C]-Glucosa por las células. El anticuerpo que se obtuvo es capaz de detectar una sola banda de aproximadamente 63 kDa de peso que corresponde al peso promedio de los transportadores de hexosas de la membrana plasmática y las células en suspensión presentan reacción al anticuerpo. La toma de glucosa por las células en suspensión es de dos tipos uno independiente de un gradiente de pH, es decir de tipo difusivo y un segundo tipo que fue dependiente de un gradiente y que fue de 3 a 6 veces más alto que el difusivo. El transporte dependiente de pH, se detuvo cuando se adicionó el protonóforo CCCP y se incrementó al añadir el ionóforo para K⁺, valinomicina. En conjunto estas características apuntan a que el transporte de glucosa es de tipo activo. Se determinaron los parámetros cinéticos del transporte activo Km y Vmax para el transporte de glucosa, obteniéndose una Km de 0.272 mM y una Vmax de 12,549 μmolGlu X10⁶ células min⁻¹. Este estudio, que en maíz no se había realizado con anterioridad, llevará al entendimiento fisiológico de la movilización y transporte de carbono entre tejidos durante una fase importante del desarrollo de las plantas, la germinación.

▶

Antecedentes.

Durante el proceso germinativo de las semillas ocurren mecanismos cruciales para la generación de una nueva planta como es la movilización de los carbohidratos. Cantidades insuficientes provocan una disminución en el desarrollo de las semillas, llegando incluso hasta la pérdida de su viabilidad.

La movilización de reservas por el embrión es un paso crucial en el desarrollo de la nueva plántula. Dentro de los componentes involucrados en la movilización se encuentran las enzimas degradativas, el transporte de los nutrimentos o también denominados metabolitos y el uso que se le dan a estos metabolitos en los diferentes tejidos y organelos del tejido en crecimiento. El transporte de carbohidratos es necesario para sostener el crecimiento del embrión y se logra con la ayuda de proteínas de membrana. Estas proteínas pueden estar presentes o bien sintetizarse *de novo* en un evento propiamente germinativo. Aunque los mecanismos de transporte de azúcares y en particular de glucosa que ocurren en células de maíz no se han caracterizado, otros sistemas sugieren que deben de estar presentes en las células embrionarias y que pueden ser de dos tipos, transportadores de tipo activo o pasivo.

Los transportadores de hexosas son proteínas inmersas en la bicapa lipídica que cruzan 12 veces la membrana, exponen su región amino y carboxilo terminal hacia el citoplasma. Los sustratos o metabolitos que principalmente transporta son glucosa, fructosa, galactosa y xilosa entre otros.

La célula vegetal posee en su citoplasma una concentración de H^+ alrededor de un 10^{-7} M a diferencia del medio extracelular, denominado apoplasto que presenta una concentración de alrededor de 10^{-5} M (Walker, Leigh, & Miller 1996). Se ha postulado que esta diferencia de carga eléctrica y de protones puede ser usada para la activación de enzimas propias de la pared celular que se encuentran involucradas en el ablandamiento de la pared celular, evento necesario para que ocurra la elongación celular. Además, los transportadores



membranales pueden utilizar el movimiento de protones al interior de las células a favor de su gradiente electroquímico para transportar otro tipo de moléculas como aminoácidos o carbohidratos. La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática se encuentra activa durante la germinación del tejido embrionario de maíz (Sánchez-Nieto et al., 1998), esto sugiere que la actividad de la ATPasa de H^+ es necesaria para el transporte adecuado de nutrimentos al interior celular.

En la semilla de maíz debe ocurrir el proceso de transporte masivo de glucosa sobre todo cuando comienza la movilización de las reservas de almidón localizadas en el endospermo, esto es justo después de que la raíz sale de la semilla, sin embargo, en el proceso previo, en la fase germinativa, las células del eje embrionario deben sustentar su crecimiento a través del carbono que se encuentra en el interior de sus células o bien del que proviene del tejido que le recubre, el escutelo. El escutelo almacena el carbono en dos tipos distintos de moléculas: los carbohidratos y los lípidos. En un trabajo previo en el laboratorio, se encontró que la sacarosa disminuye en las primeras 8 horas de la germinación alrededor de un 60% (Martínez-Marcelo 2008), de manera paralela también comienza la movilización de los lípidos de reserva (Luna-Löaiza 2010), todo ello ocurre en el escutelo, tejido que al final de la germinación muere mientras que el eje embrionario crece y se diferencia en una plántula. Sin embargo, antes de morir el escutelo cubre una función importante, donar esqueletos carbonados para la nutrición del eje embrionario.

Estudios adicionales en el laboratorio han demostrado que no hay presencia del transportador de sacarosa en el eje embrionario pero sí en el escutelo (Gómez-Calderas, 2008; Greaves-Fernández, 2001), lo cual sugiere que el eje embrionario debe de transportar el carbono en forma de hexosas.

Por otra parte, el escutelo debe ser capaz de transportar glucosa ya que recibirá un aporte de glucosa alto cuyo el almidón está siendo hidrolizado ya que es el tejido que se encuentra envuelto por el endospermo. Por lo anterior, la presencia de transportadores de hexosas

tanto en el escutelo como en el eje embrionario es necesaria para mantener el crecimiento activo del embrión para convertirse en plántula. Para evaluar la presencia de los transportadores de hexosas en este trabajo se obtuvo un anticuerpo que reconoce al transportador de hexosas de plantas, y con él se detectaron los transportadores de hexosas en las células en suspensión de los embriones de maíz y posteriormente se midió la actividad de transporte de las células del tejido embrionario.

Introducción.

Germinación.

Una vez que los primordios seminales de la flor son fecundados y maduran, dan lugar a la formación de semillas, cuya función es la de perpetuar la especie a la que pertenecen, posteriormente las semillas pasan por una fase de desecación que les permite sobrevivir por muchos años, tienen una actividad metabólica baja y para que ocurra la germinación necesitarán condiciones que favorezcan su metabolismo como una adecuada temperatura y la presencia de oxígeno (Angelovici et al. 2010). La germinación es un proceso que incorpora aquellos eventos que se inician por la absorción de agua por la semilla seca y terminan con la elongación del eje embrionario, esto es el instante en el que la radícula penetra y atraviesa las estructuras que rodean al embrión (Bewley 1997; Pua & Davey 2009) (Figura 1).

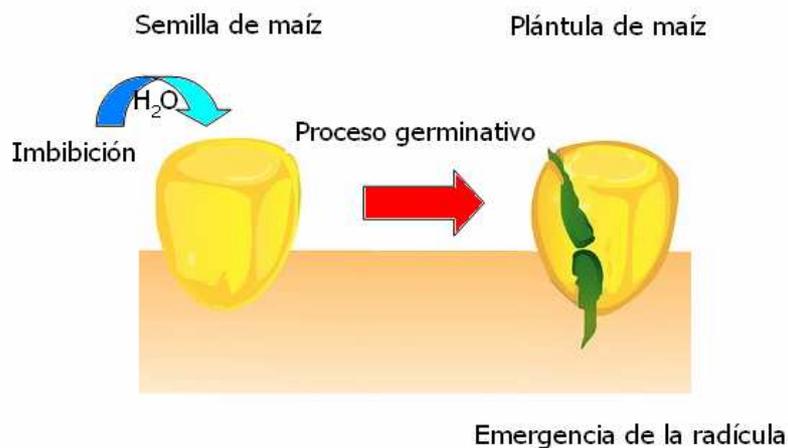


Figura 1. Proceso germinativo de la semilla de maíz. La germinación es un proceso que inicia con la entrada de agua por parte de la semilla y finaliza con la emergencia de la radícula.

▶

En esta investigación se utilizó como material biológico a los embriones de maíz por lo que se describirá brevemente la estructura de la semilla y después el proceso de la germinación.

La semilla de maíz consta esencialmente de un embrión, formado por un eje embrionario y un cotiledón modificado llamado escutelo, una provisión de reservas nutritivas, que pueden almacenarse en un tejido especializado como el endospermo o en el propio embrión, y una cubierta seminal que recubre y protege a ambos tejidos (Figura 2).

El eje embrionario contiene las estructuras que darán lugar a la nueva plántula como son:

Coleóptilo. Parte de la plántula en forma de una vaina puntiaguda endurecida en su extremo superior, que cubre el epicótilo. Es en realidad una primera hoja modificada de tal modo que forma una cobertura cerrada sobre las hojas siguientes.

Coleorriza. Estructura característica del embrión de las gramíneas que cubre la radícula.

Endospermo. Es la capa más íntima de la semilla, en contacto directo con el embrión. Las reservas del endospermo (carbohidratos insolubles y proteínas) disminuyen a partir del tercer día y a lo largo de 5 días de iniciado el proceso germinativo. La principal reserva almacenada es almidón contribuyendo con un 80% del peso del tejido (Ingle, Beevers, & Hageman 1964).

Embrión. Tejido formado por el cotiledón modificado (escutelo) y el eje embrionario o embrional. Se encuentra envuelto por el endospermo.

Escutelo. Estructura que forma parte del embrión de las gramíneas. Probablemente es el cotiledón del embrión. Su función es movilizar los azúcares y los aminoácidos del endospermo adyacente y nutrir al embrión en el período de germinación. El contenido de grasas del escutelo disminuye a partir del segundo día con un incremento de azúcares solubles y de compuestos nitrogenados solubles, con un peso constante a lo largo de los ensayos (Ingle et al. 1964).

Eje embrionario. Planta en miniatura de la semilla, está formado por el epicótilo y el hipocótilo. Recibe nutrientes del endospermo y del escutelo (Ingle et al. 1964).

Epicótilo. Parte del eje embrionario que queda arriba de su punto de unión con los cotiledones. Contiene células meristemáticas que crecen para formar el tallo cuyo brota o germina la semilla.

Hipocótilo. Esta parte del eje embrionario queda debajo de su punto de unión con los cotiledones. Al germinar la semilla; las células meristemáticas del hipocótilo se desarrollan para formar la raíz primaria. La punta del hipocótilo en crecimiento es la radícula.

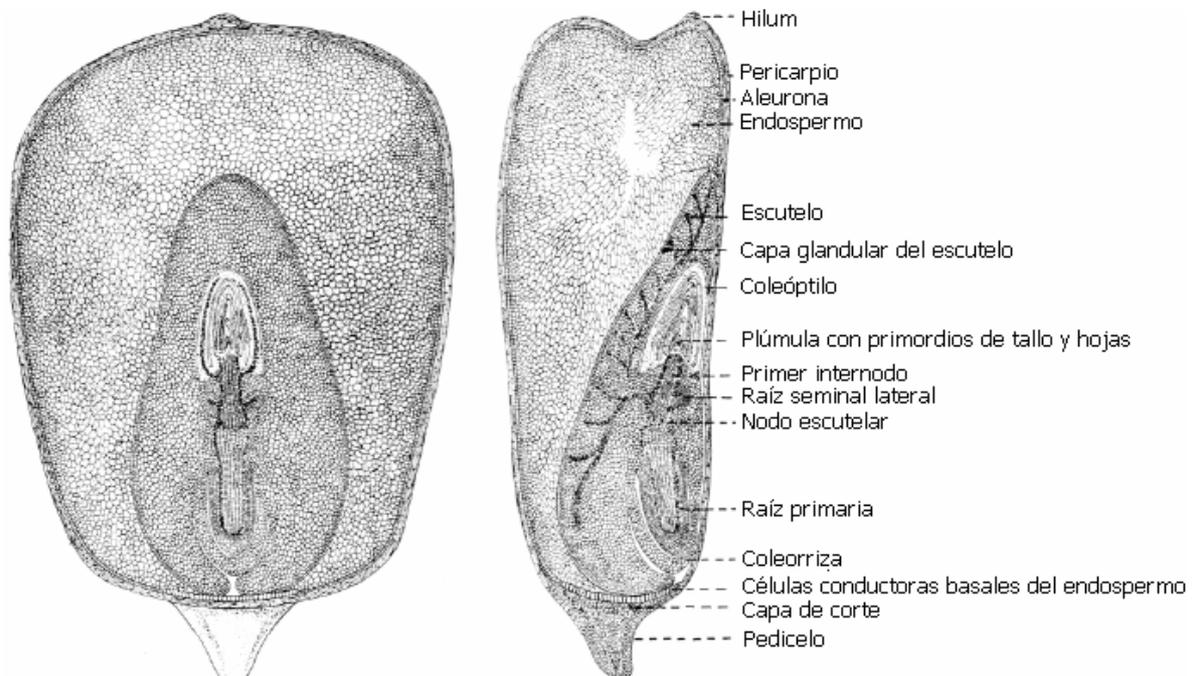


Figura 2. Secciones verticales en dos planos de una semilla de maíz *Zea mays* que muestran el arreglo de tejidos. La semilla contiene un único cotiledón también llamado escutelo, que posee una estructura que absorbe los nutrimentos que le llegan del endospermo, a su vez el escutelo rodea al eje embrionario, que es el tejido que propiamente crece y se desarrolla en una nueva planta. Figura modificada de (Coe, Jr. 2001).

Durante el proceso de embriogénesis de la semilla ocurre la fase de maduración en donde esencialmente la semilla pierde agua, hasta llegar a contenidos de alrededor del 8-15%, con lo que la actividad metabólica disminuye enormemente. Para que tenga lugar la recuperación de la actividad biológica por parte de la semilla, es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada

▶

para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula. En ausencia de algunos de estos factores, la mayoría de las semillas se mantendrían en un estado quiescente o de reposo (Hartmann & Kester 1998). Los cultivos de cereales mantienen su capacidad de germinación por un período de 10 años, sin embargo esta disminuye cada año.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas debido a que el agua favorece la rehidratación de proteínas y organelos celulares así como el transporte y para que ocurran reacciones hidrolíticas. Posteriormente se produce la activación del metabolismo en donde se da la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas incrementándose las actividades enzimáticas, así como la degradación inicial de las reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la ruptura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula, el final de la germinación. Después de la toma de agua por parte de la semilla, ocurre la síntesis de RNA y el ácido giberélico es sintetizado y transportado hacia el escutelo, hormona que estimula la síntesis de α -amilasa y la síntesis de otras enzimas hidrolíticas sobre todo aquellas localizadas en las paredes celulares que rodean a la radícula, posiblemente para facilitar la salida del tejido.

Sin embargo, las semillas de muchas especies son incapaces de germinar, incluso cuando las condiciones para hacerlo son favorables. Esto se debe a que las semillas se encuentran en estado de latencia, que puede deberse a la inmadurez del embrión, a la acumulación de compuestos inhibitorios de la germinación o a la presencia de una testa dura, entre otros.

Al germinar una semilla, la primera estructura que emerge, en la mayoría de las especies, después de la rehidratación de los diferentes tejidos es la radícula (Khan 1982; Kigel & Galili 1995; Labouriau 1983; Mayer & Poljakof-Mayber 1989; Pua et al. 2009). En aquellas semillas, en las que la radícula no es el primer acontecimiento morfológico, se consideran otros criterios para definir la germinación como: la emergencia del coleóptilo en granos de

cereales; la obtención de plantas normales; o el aumento de la actividad enzimática, tras la rehidratación de los tejidos.

En el proceso de germinación podemos distinguir tres fases según propuso (Herrera et al. 2006;Srivastava 2002) (Figura 3).

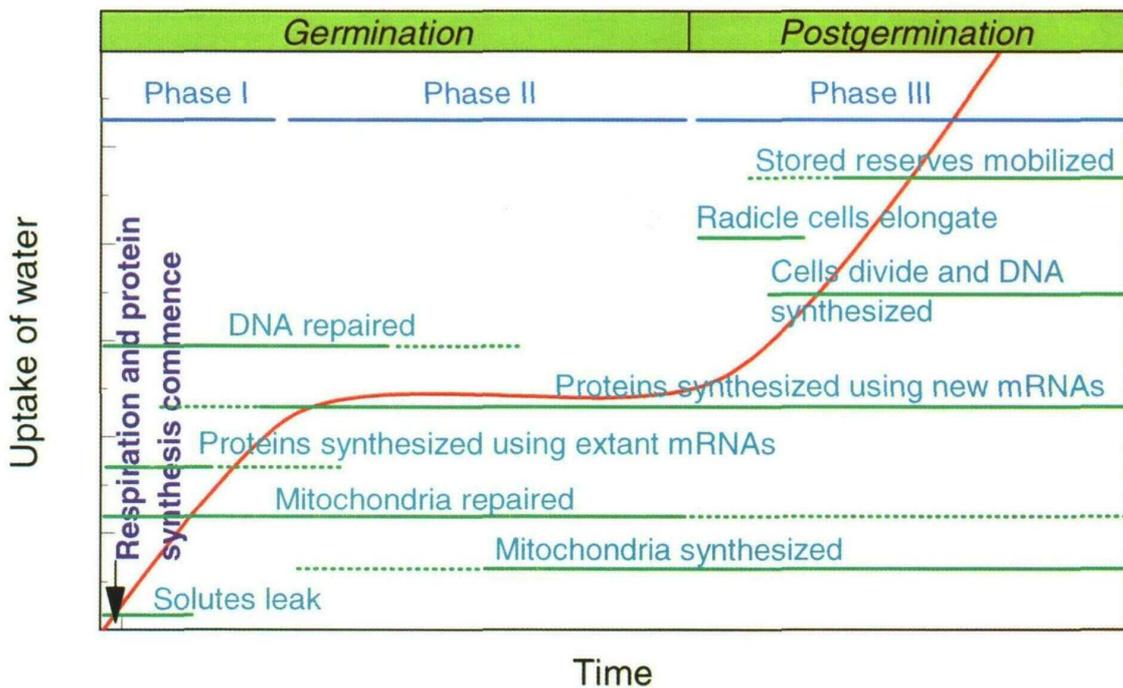


Figura 3. Curva de absorción de agua de las semillas y las actividades metabólicas asociadas con las fases de la germinación. Fase I: imbibición, Fase II: De alta actividad metabólica, Fase III: Crecimiento de la radícula. Modificado y adaptado de (Bewley & Black 1994;Bewley 1997;Mayer et al. 1989).

Fase de hidratación. La absorción de agua es el primer paso de la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla (imbibición). Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria.

Fase de germinación o lag. Representa el verdadero proceso de la germinación. En ella se producen la mayor parte de las transformaciones metabólicas necesarias para el correcto

▶

desarrollo de la plántula. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse.

Fase de crecimiento o postgerminativa. Inicia con la emergencia de la radícula (cambio morfológico visible). Esta fase se caracteriza porque la absorción de agua vuelve a aumentar, así como la actividad respiratoria debido a la aparición de nuevas estructuras.

La duración de cada una de estas fases depende de ciertas propiedades de las semillas, como su contenido en compuestos hidratables y la permeabilidad de las cubiertas al agua y al oxígeno. Estas fases también están afectadas por las condiciones del medio, como el nivel de humedad, las características y composición del sustrato, la temperatura, etc.

La primera fase se produce tanto en semillas vivas y muertas y, por tanto, es independiente de la actividad metabólica de la semilla. Sin embargo, en las semillas viables, su metabolismo se activa por la hidratación. La segunda fase constituye un período de metabolismo activo previo a la finalización de la germinación, en esta fase se prepara a la semilla para la emergencia de la radícula y la utilización de los componentes carbonados en el embrión comienzan en esta fase (Ramírez-Sóstenes 2008). La tercera fase se produce sólo en las semillas que germinan y obviamente se asocia a una fuerte actividad metabólica que comprende el inicio del crecimiento de la plántula y la movilización de las reservas almacenadas en el endospermo. La semilla que haya superado la fase de germinación tendrá que pasar a la fase de crecimiento y originar una plántula, o por el contrario morir.

Reservas de carbohidratos en las semillas.

Los carbohidratos son la mayor fuente de reserva de la mayoría de las semillas cultivadas como fuente de alimento: Cebada 76%, maíz 80%, avena, 66%, centeno 76%, trigo 75% (Bewley et al. 1994). Entre ellos los principales carbohidratos son el almidón, los oligo y polisacáridos propios de la pared celular además de los carbohidratos solubles como la glucosa y sacarosa.

▶

Los monosacáridos representan la principal fuente de carbono y energía en tejidos de las plantas. Moléculas como la glucosa y la fructosa representan las unidades fundamentales para el anabolismo/catabolismo, almacenaje y transporte. A menudo es necesario transformarlos en metabolitos osmóticamente menos activos o de difícil acceso a enzimas expresadas de forma regular en la célula, con la finalidad de almacenarlos y transportarlos a tejidos que requieren de ellos (tejido demanda) (Buttner & Sauer 2000). Esos metabolitos son el almidón, la sacarosa y los azúcares reducidos.

El almidón es un polímero almacenado en las semillas, el cual está formado a su vez por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de 300 a 400 unidades de glucosa, las que se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α (1→4). Mientras que, la amilopectina es un polímero de 100 a 1,000 veces más grande que la amilosa y consiste en cadenas de glucosa unidas vía un enlace glucosídico α (1→6), para producir una molécula con múltiples ramificaciones (Bewley et al. 1994) (Figura 4).

El almidón es degradado por las α y β -amilasas, las semillas secas de maíz contienen principalmente β -amilasas, aunque la mayor actividad enzimática está dada por la α -amilasa, la cual realiza el 90% de toda la actividad amilolítica del endospermo. El ácido giberélico asegura la síntesis de α -amilasa, sin embargo puede inhibirse con el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas y de la síntesis de RNA. La influencia del ácido giberélico se afecta por el ácido abscísico, hormona antagonista que reduce la capacidad germinativa de un tejido.

La β -amilasa forma unidades de maltosa a partir del almidón. Cuando se degrada la amilopectina se forman oligosacáridos y al degradarse la amilosa, se obtienen unidades de glucosa. La maltosa raramente se acumula, ya que hay una actividad alta de la enzima maltasa.

La α -amilasa se origina en el escutelo y se secreta hacia el endospermo, mientras que la β -amilasa se origina en el endospermo. El aumento en la actividad de la α -amilasa depende de la presencia del embrión.

El almidón es almacenado en cuerpos celulares discretos denominados gránulos de almidón, los cuales son característicos para cada especie (Bewley & Black 1978), la forma del gránulo depende del contenido de amilosa, los granos más redondos son los que contienen un alto porcentaje de amilosa y el tamaño de los granos va de 2 a 100 μm de diámetro dentro de una misma semilla, los granos pequeños corresponden al 90% del número total, pero sólo contienen el 10% del almidón total. La amilosa y la amilopectina se encuentran en proporciones no fijas. Los cereales "cerosos" contienen un alto contenido de amilopectina.

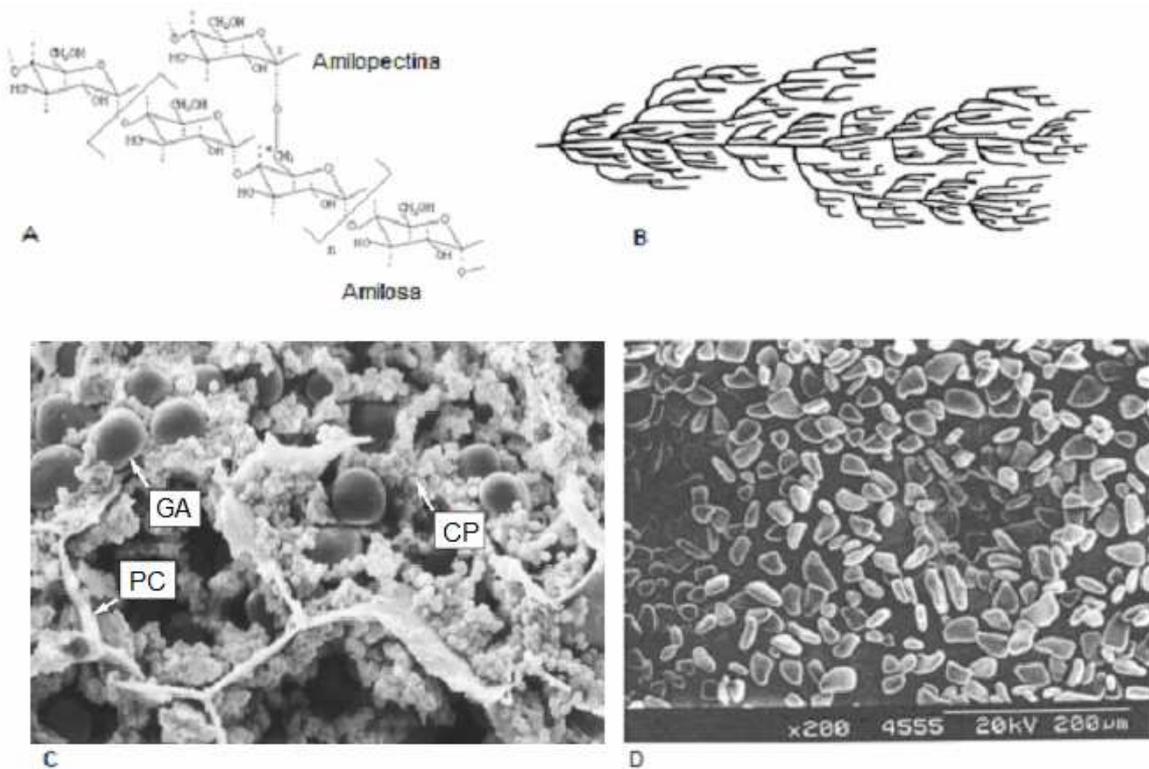


Figura 4. El almidón en los cereales. A) Composición química del almidón. B) Estructura propuesta de la amilopectina. C) Imagen de microscopía electrónica de los granos de almidón inmersos en la matriz proteica del endospermo. PC: pared celular, GA: grano de almidón, CP: cuerpo proteico. D) Microscopía electrónica de granos de almidón de *Secale cereale* (centeno). Imágenes adaptadas de; (Araujo, V, Rincon, & Padilla 2004;Gott et al. 2006;Sabelli & Larkins 2009).



Las hemicelulosas juegan un papel importante en el almacenamiento de carbohidratos de leguminosas, ya que están ausentes en el almidón. Los endospermos de especies como la nuez de marfil y el café son extremadamente duros debido a la alta cantidad de hemicelulosas contenidas en su pared celular, las hemicelulosas no se encuentran almacenadas como granos. Muchas de las hemicelulosas son principalmente mananas (largos polímeros de manosa), unidos vía enlaces β (1 \rightarrow 4) con pequeñas cantidades variables de carbohidratos que forman los extremos de la cadena unidos vía enlace glucosídico α (1 \rightarrow 6). Así por ejemplo podemos tener galactomananas, glucomananas, arabinomananas, etc. La dureza del polímero disminuye al aumentar la cantidad de carbohidratos trazas, lo cual puede dar origen a la formación de carbohidratos como los mucílagos, los cuales se forman por un incremento en la sustitución de manosas por galactosas.

La mayor parte del metabolismo de los carbohidratos almacenados en forma de almidón o bien el encontrado en las paredes celulares del endospermo se degradaran durante la etapa post-germinativa, por lo que su uso será el que soporte el crecimiento de la plántula.

Mientras que los carbohidratos libres raramente son la principal forma de almacenamiento, los disacáridos como la sacarosa y oligosacáridos como las series de rafinosa son fuentes menores de almacenamiento en el embrión y en tejidos de reserva. Este tipo de azúcares son muy importantes en la respiración durante la germinación y el crecimiento temprano de la plántula (Bewley et al. 1978). El aporte de estos carbohidratos es vital para mantener el desarrollo de las fases germinativas.

Tipos de transporte membranar.

Las células embrionarias, al igual que todos los seres vivos están constituidos por membranas. La membrana define el límite externo de la célula y regula el tráfico molecular a través de este límite. Basado en sus propiedades fisicoquímicas sólo permite el paso libre de sustancias pequeñas con momentos dipolares bajos (Ediden, 1997) y el paso selectivo de

▶

sustancias con alta polaridad ocurre con la ayuda de proteínas transportadoras de iones (canales y bombas) y de proteínas transportadoras de metabolitos no iónicos (transportadores o acarreadores) (Miyazawa, Fujiyoshi, & Unwin 2003; Mueckler 1994).

El transporte de las moléculas puede estar favorecido, es decir, se puede dar de forma espontánea (transporte pasivo) o no (transporte activo). El primer caso requiere un gradiente químico o electroquímico (moléculas iónicas), mientras que para el segundo caso se requiere del aporte de energía proporcionada por la entrada de otro metabolito a favor de su gradiente químico o electroquímico (iones), a la hidrólisis del ATP, o durante el acoplamiento con una enzima redox que se oxida. Este tipo de transporte es llamado de transporte activo (Figura 5).

El transporte pasivo es un transporte espontáneo, los cambios espontáneos en sistemas a temperatura y presión constante sólo se producen a partir de estados de mayor energía libre de Gibbs, a menor energía de Gibbs (ΔG negativo) alcanzando el equilibrio cuando todos los sistemas tienen la misma energía y por lo tanto su ΔG es cero.

Las sustancias disueltas en compartimientos separados por una membrana biológica tienden a pasar espontáneamente a partir del estado de mayor energía libre o el estado con mayor cantidad de materia. Hasta que la energía libre se iguala en todos los compartimientos, se dice entonces, que se ha alcanzado el equilibrio termodinámico (Garrdhan & Rega 1977). Este transporte puede o no ser mediado por proteínas transportadoras.

Sólo las moléculas de peso molecular pequeño e hidrofóbicas, como el O_2 , CO_2 , N_2 ; o aquellas que son hidrofílicas pero sin carga por ejemplo, el glicerol y el etanol, presentan un coeficiente de permeabilidad membranar alto y difundirán libremente en la membrana en el proceso denominado *difusión pasiva*. Mientras que el resto de las moléculas son transportadas por una serie de distintas proteínas membranales, las cuales facilitarán el paso a través de la membrana mediante el fenómeno llamado *difusión facilitada*.

Por otra parte, se describe que el transporte de un soluto a través de la membrana biológica es de *tipo activo* cuando va de un compartimento de menor concentración o energía libre a otro con mayor concentración o energía (ΔG positivo), este proceso no es espontáneo y requiere de energía para llevarse a cabo, esta energía es tomada a partir de otras reacciones acopladas espontáneas, las cuales permiten pagar la demanda exigida por el transporte activo al liberar energía. Las reacciones espontáneas acopladas son aquellas como la hidrólisis de ATP, el paso de una sustancia a favor de su gradiente y la óxido-reducción de proteínas.

El acoplamiento de una reacción con un cambio de energía libre de Gibbs negativa con una reacción con un cambio de energía libre de Gibbs positiva, será capaz de hacer que la reacción global sea negativa, siempre y cuyo la energía de la reacción espontánea proporcione un exceso para favorecer la reacción no espontánea, y por lo tanto se lleven a cabo los dos procesos (Hoffmann & Nagypal 2006).

(Bonting & Pont 1981) sugieren que según la naturaleza del proceso que proporciona la energía negativa a la reacción global, los sistemas de *transporte se clasifican en primario y secundario*.

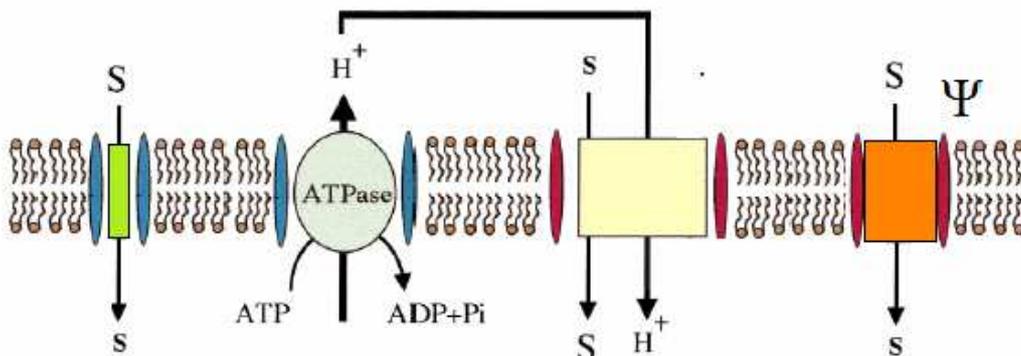


Figura 5. El transporte de sustancias polares a través de la membrana se realiza a través de proteínas transportadoras integrales de membrana. Los transportadores son capaces de catalizar el paso de metabolitos polares hacia el interior celular mediante transporte pasivo (cuando el metabolito está a favor de su gradiente de concentración) y pasivo (cuando la energía requerida se acopla a un flujo de otro metabolito que se encuentra a favor de su gradiente de concentración); S: Sustrato a transportar concentrado; s: sustrato a transportar no concentrado; ATPase: Bomba ATPasa/H⁺; H⁺: protón; ψ : gradiente electroquímico.



Un sistema de transporte activo primario toma la fuente de energía de la reacción de degradación de una sustancia a un estado de menor energía libre, como la hidrólisis de ATP en ADP y ortofosfato, como el sistema de transporte de calcio del retículo sarcoplásmico (Lee & East 2001). A las proteínas encargadas de realizar este tipo de transporte se les conoce como bombas y generalmente mantienen constantes estos gradientes formando estados estacionarios necesarios para el transporte de otras sustancias.

Los sistemas secundarios de transporte activo son aquellos cuya fuente energía es adquirida a partir de un gradiente electroquímico generado por un tipo de transporte primario, como el transportador de sacarosa de las células embrionarias, las cuales internalizan sacarosa en contra de su gradiente a expensas de la entrada de protones a favor de su gradiente. Como las dos moléculas se transportan en un solo sentido, entonces se llama simporte o cotransporte. Se dice que es un antiporte o un contra-transporte cuando una de las moléculas va en una dirección y la otra en el sentido opuesto.

Protocolo general para la medición de la actividad de transporte por proteínas membranales.

La medición de la actividad de las proteínas transportadoras se realiza siguiendo el siguiente protocolo: 1) determinar el tipo de material membranal a estudiar y su pureza, 2) escoger el protocolo de detección del transporte del soluto o metabolito de interés, 3) utilizar de compuestos que ayuden a determinar el tipo, requerimientos específicos y la dirección del transporte que se está llevando a cabo, como por ejemplo con el uso de los ionóforos, 4) obtención de los valores de afinidad y/o especificidad por sustratos.

1. Material membranal.

Para el estudio del transporte a través de las membranas celulares se utilizan diferentes aproximaciones experimentales, protoplastos (Sinha, Wetten, & Caligari 2003), proteína reconstituida en liposomas, células en suspensión, vesículas de membrana, entre otras.



Las vesículas de membrana se producen cuando se realiza la ruptura mecánica de la célula y gracias a las propiedades fundamentales de las membranas celulares, estas tienen la capacidad de autosellarse para evitar los contactos entre la parte apolar de la membrana con el medio hidrofílico, así los fragmentos de membrana que se producen por la ruptura celular tienden de manera espontánea a formar vesículas, de esta manera se logra obtener una gran variedad de vesículas en cuanto a tamaño, densidad y componentes membranal e intravesicular. Para realizar los estudios de transporte en vesículas de membrana se deben de cumplir varios requisitos: a) La purificación o enriquecimiento de un solo tipo de vesículas de membrana, b) que tengan una orientación única, ya que en general cuando se autosella la membrana, puede hacerlo tanto en la orientación en la que originalmente se encontraba la proteína transportadora, denominadas vesículas en orientación correcta (right side-out), o bien hacerlo en la orientación contraria o denominada orientación opuesta (inside-out), c) que se mantengan en esa orientación por tiempos prolongados en el refrigerador para llevar a cabo varios registros de transporte en las mismas vesículas. Si bien existen protocolos ya descritos en la literatura, en general se tiene una proporción importante de membranas contaminantes, que puede disminuir al incrementar el número de purificaciones, con el inconveniente de obtener cantidades disminuidas de la proteína final.

En este trabajo, se utilizó otra estrategia experimental en lugar de la obtención de vesículas de membrana plasmática, debido a que a partir de 20 g de tejido embrionario de maíz (extraídos de manera manual), apenas se obtiene una cantidad de aproximadamente 0.01% de membranas plasmáticas purificadas y con una orientación mixta de las membranas, lo que dificulta reconocer si el transporte está ocurriendo y además si es dependiente del movimiento de protones (Sanchez-Nieto et al. 1998).

La estrategia que seguimos en este trabajo para determinar la capacidad de transporte de los embriones de maíz, fue la de usar células embrionarias en suspensión. Los cultivos celulares, presentan células aisladas que no están diferenciadas ni organizadas en forma de

▶

tejidos. Se encuentran suspendidas en un medio líquido donde se mantienen y se dividen constantemente. De las suspensiones de células se originan embriones somáticos que son aislados y transferidos a medios de germinación sólidos para la recuperación de plantas completas. Una de las ventajas para estudios de transporte es que la proteína transportadora se encuentra colocada en su conformación nativa, expone los sitios de reconocimientos del soluto o metabolito en el exterior y lo transporta hacia el interior celular, así de manera inequívoca se detecta la orientación del transporte. Otra ventaja, es que una vez que la metodología de su producción se ha establecido es factible realizar experimentos con un cultivo continuo de los tejidos embrionarios. Afortunadamente el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Bioquímica tuvo la capacidad de proporcionar de dos a tres preparaciones de células embrionarias de maíz por semana durante el tiempo que se llevó a cabo este trabajo de tesis.

2. Detección del transporte mediante la incorporación de marca radiactiva.

Una vez obtenidas las células del tejido celular, éstas son cuantificadas y suspendidas en un medio que asemeja las condiciones basales a las del tejido embrionario *in vivo*. Para la detección del carbohidrato transportado al interior celular hemos utilizado metabolitos marcados radiactivamente (glucosa, sacarosa) a través de la incorporación de ^{14}C dentro de su estructura. Estos metabolitos marcados son incorporados al medio de células suspendidas y a través de una cinética de transporte estas células comienzan a incorporar el metabolito. Posteriormente se extrae una cantidad constante de células a distintos tiempos para separarlas del medio extracelular con la ayuda de una filtración en papel de nitrocelulosa. Estos filtros son disueltos en un medio de compuestos bencílicos que permiten la transmisión de la radiactividad para poder cuantificarse con la ayuda de centelladores (Mostafa, Fallin, & Fang 1970; Wigfield 1974). La marca cuantificada corresponde a la cantidad de carbohidrato transportado al interior celular.

3. Efecto de ionóforos en la actividad de transporte a través de la membrana.

Existen sustancias que son capaces de acarrear iones selectivamente a través de la membrana. Los compuestos que los constituyen son altamente hidrofóbicos y presentan afinidad de unión de forma selectiva por compuestos iónicos. Estas sustancias se conocen como ionóforos y su empleo en medios celulares provoca igualar las concentraciones extra e intracelular del ión unido selectivamente al ionóforo, con la consecuente inactivación de los transportadores que requerían del gradiente químico-eléctrico perdido, este aporte farmacológico permite caracterizar transportadores gradiente-dependientes.

El CCCP es un ionóforo selectivo a protones, se trata de un ácido débil con baja polaridad en su forma disociada debido a que la carga se deslocaliza a lo largo de sus enlaces conjugados y átomos electronegativos por lo que su libre acceso a través de la membrana provocará igualar el pH intracelular del extracelular (Orlov et al. 1994); (Figura 6), al disipar este gradiente, se logra la inactivación de simportadores glucosa/H⁺ y sacarosa/H⁺. En este caso el transporte medido se atribuye a la actividad de otro tipo de transportadores como los dependientes de voltaje ya que una igualdad de pH en ambas zonas no significa una igualdad en el potencial eléctrico, por lo que este gradiente genera la fuerza motriz de otros posibles transportadores.

La valinomicina es un ionóforo con selectividad al K⁺, molecularmente se trata de un anillo con 3 repetidos de D y L-valina, ácido D-hidroxiacético y ácido L-láctico (Neupert-Laves & Dobler 1975), el potasio se estabiliza en el centro de la molécula mediante enlaces de coordinación entre el ión y los 6 oxígenos de los ácidos (oxígenos del grupo éster) (Rose & Jenkins 2007), adicionalmente es capaz de coordinarse con dos oxígenos provenientes de las moléculas de agua, alcanzando un número de enlaces de 8 (Eisenman, Aqvist, & Alvarez 1991). La valinomicina unida al potasio aún es hidrofóbica y sin restricciones a lo largo de la membrana, abate el gradiente de este ión (Figura 6), consideración suficiente para apreciar su potente acción tóxica. La valinomicina se sintetiza por el hongo *Streptomyces fulvissimus*

y actúa como agente antibiótico, insecticida y nematocida. Su presencia a bajas dosis, abate el gradiente del ión al liberarlo del interior celular, esta liberación aumenta el potencial de membrana que provoca la modulación de transportadores regulados por el voltaje.

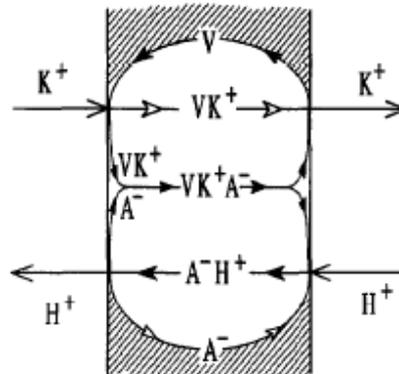


Figura 6. Movimientos iónicos a través de la membrana en presencia de valinomicina (V) y CCCP (A-) Adaptado de (Orlov et al. 1994).

Transportadores de carbohidratos en plantas.

En plantas superiores, la fijación de CO_2 ocurre predominantemente en células de hojas maduras, capaces de sintetizar carbohidratos a concentraciones más altas de las que el propio tejido usará. Estos tejidos funcionan como exportadores de carbohidratos y se les conoce como tejidos fuente. Las células heterotróficas de raíces, tejidos reproductivos y estructuras de almacén son conocidos como tejidos demanda. Los mecanismos de transporte deben permitir que estos tejidos reciban un adecuado suplemento de carbohidratos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Williams, Lemoine, & Sauer 2000). El transporte de carbohidratos entre tejidos fotosintéticos fuente y tejidos heterotróficos demanda se conoce como asimilación fraccionada (Bush 1993b).

Los transportadores de azúcares juegan una variedad de papeles esenciales. Un simportador protón sacarosa está bien establecido como el transportador clave en la toma apoplástica del floema mientras que los transportadores de hexosas se han asociado con la toma de azúcar en muchos tejidos demanda (Ward et al. 1998).

Todos los transportadores de carbohidratos pertenecen a la superfamilia de facilitadores transmembrana (MFS). Los miembros de MSF son llamados también como la familia de uniporte-simporte-antiporte. Se han encontrado en todos los sistemas vivos y consisten de 17 familias distintas. La familia de los transportadores de carbohidratos consta de 133 proteínas con un tamaño entre 404-818 aminoácidos derivadas de bacterias, algas, protozoarios, levaduras, animales y plantas. Los sustratos que son reconocidos por estos transportadores son monosacáridos, disacáridos e inositoles (Pao, Paulsen, & Saier, Jr. 1998). Los transportadores de carbohidratos de plantas comparten homología con transportadores de hexosas de levaduras, simportadores azúcar-protón de bacterias y permeasas de mamífero sin embargo no presenta homología con proteínas transportadoras como los simportadores Na^+/Glu de mamíferos (Lemoine 2000; Marger & Saier, Jr. 1993) ni con las fosfotransferasas bacterianas que regulan la toma de glucosa mediante un mecanismo distinto. Mediante el análisis de patch clamp del simportador monosacárido- H^+ AtSTP1 de *Arabidopsis* se ha propuesto un mecanismo secuencial en el cual los protones y el azúcar son importados en dos pasos a diferencia del simportador Na^+ -glucosa de mamíferos que importa sus sustratos en un mecanismo simultáneo (Parent et al. 1992).

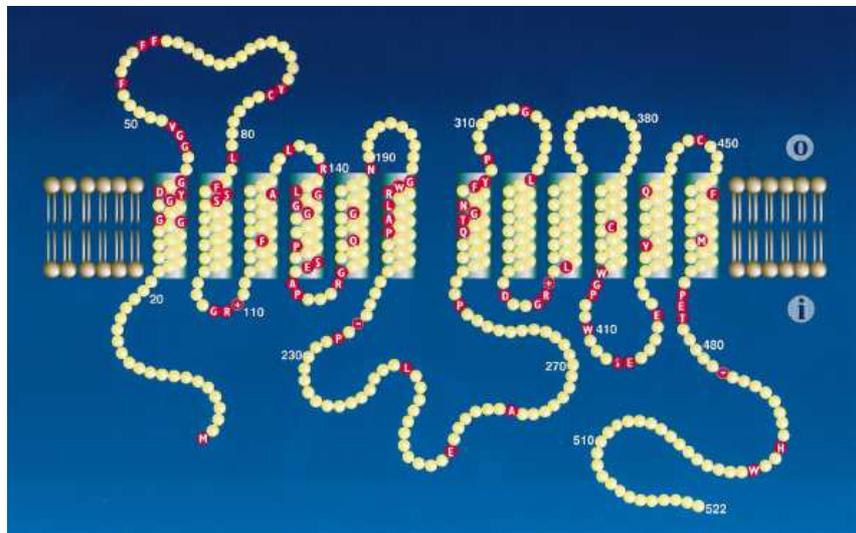


Figura 7. Modelo topológico de un transportador de monosacáridos de *Arabidopsis thaliana* AtSTP1. Las posiciones de los residuos hidrofóbicos fueron determinados mediante análisis de hidrofobicidad (considerando 21 aa de longitud de la hélice). Residuos de los aminoácidos altamente conservados desde algas hasta plantas superiores (81 residuos = 15.5% de todos los aminoácidos) así como sus cargas (rojo). O (exterior), I (interior). (Imagen adaptada de Bütner y Sauer, 2000).



Las plantas superiores poseen dos familias distintas de acarreadores de carbohidratos: los transportadores de disacáridos, que principalmente catalizan la reacción de transporte de la sacarosa y los transportadores de monosacáridos, que transportan una amplia variedad de monosacáridos. Algunos juegan un papel puramente nutricional al transportar los carbohidratos al interior celular para crecer y desarrollarse, mientras que otros están involucrados en la generación de gradientes osmóticos requeridos para la generación del flujo a lo largo del floema. Otras proteínas tipo acarreadores se han sugerido actúan como sensores en la percepción de azúcares en el medio, debido a que al expresarse en ovocitos de *Xenopus* no muestran función de transporte. Esta propiedad no se ha caracterizado en plantas, sin embargo se conoce esta función en proteínas de levaduras, cuyas secuencias son homólogas a transportadores de carbohidratos de otros organismos (Hansen & Wright 1999; Williams et al. 2000).

Los transportadores de carbohidratos tienen un peso molecular de aproximadamente 55 a 65 KDa y del análisis de hidrofobicidad se sugiere que son proteínas integrales de membrana altamente hidrofóbicas con aparentemente 12 cruces transmembranales, con tres regiones voluminosas solubles orientadas hacia el citoplasma: el carboxilo terminal, el amino terminal y un asa que conecta a la hélice transmembrana 6 con la 7. Se propone que los doce alfa-hélices transmembrana formados en la estructura de la familia de los transportadores evolucionaron de un gen transportador con seis segmentos transmembrana que se duplicaron y se fusionaron, de ahí que el asa que conecta los dominios 6 y 7 sea tan larga (Buttner et al. 2000)(Figura 7).

Los transportadores de monosacáridos se encuentran dentro del genoma de todos los seres vivos mientras que los transportadores de disacáridos, únicamente se han descrito en plantas superiores. Esta diferencia recae en la importancia de las propiedades de estos carbohidratos, los cuales son relativamente más estables que los monosacáridos, en adición los disacáridos no son susceptibles a la oxidación y a la degradación enzimática, lo cual

explica su función en la asimilación fraccionada de carbohidratos en plantas superiores (Lemoine 2000; Sauer 2007; Williams et al. 2000).

Estudios de sobreexpresión de transportadores de monosacáridos en sistemas heterólogos como las levaduras y los ovocitos de *Xenopus* han permitido la caracterización individual sin el solapamiento de la actividad de otros transportadores homólogos expresados en la misma célula o en el mismo tejido, sin embargo se ha demostrado la presencia de transportadores con actividad y afinidad por el sustrato similar (Tabla 1). Hasta el momento las proteínas analizadas con los sistemas heterólogos muestran sensibilidad a desacoplantes (protonóforos), con un incremento en la actividad de transporte directamente proporcional al aumento en el potencial transmembrana o en el gradiente protónico para concentrar a su sustrato en el medio intracelular respecto del medio extracelular. Con base en este comportamiento se consideran a los transportadores de monosacáridos como simportadores de protones (Bush 1993a).

La actividad de transporte de estas proteínas presenta selectividad relativa hacia el reconocimiento preferencial de los carbohidratos. Se ha demostrado que estos transportadores prefieren el transporte de un carbohidrato sobre otro, así se reconoce que hay transportadores que preferencialmente transportan polioles como el sorbitol o manitol, o bien que transportan glucosa en lugar de galactosa o fructosa. Esta especificidad es interesante porque las diferencias entre la mayoría de las hexosas solo son de tipo enantiomérico, es decir, que reconoce moléculas que sólo difieren en el arreglo de los mismos grupos funcionales (-CO-, -OH) característicos.

Con el conocimiento del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* se ha identificado al menos 56 genes que podrían pertenecer a transportadores de hexosas. Al analizar más de cerca cada uno se pueden establecer claramente 7 grupos de genes: 1) AtSTP (Sugar Transport Protein) que codifican para los transportadores de hexosas de la membrana plasmática; 2) AtVGT (Vacuolar Glucose Transporter)-like, transportadores que se localizan

▶

especialmente en la vacuola si bien hay 1 gen de esta familia que se ha localizado en el cloroplasto; 3) AtTMT (Tonoplast Monosaccharide Transporter) transportadores de localización vacuolar; 4) AtpGlcT (Plastidic Glucose Transporter)/AtSGB1(Suppressor of G Protein Beta1) Transportadores de localización cloroplástica o del Golgi 5) AtPLT (Polyol Transporter) transportadores de sorbitol o manitol; 6) AtINT (Inositol Transporter) transportador exclusivo de inositol y 7) AtERD6-like, genes que se encienden en respuesta a deshidratación, sequía o tratamiento por frío y que presentan una homología del 45 al 95% con la familia STP pero de los cuales no se ha logrado medir su actividad de transporte, lo cual coloca a la familia como los posibles receptores o sensores de azúcares (Buttner 2007).

En Arabidopsis los 20 genes distintos de la subfamilia STP, presentan características distintas en cuanto a la afinidad por las hexosas y su localización tisular. Se conoce que AtSTP1 es un transportador muy eficiente de glucosa con una Km de 20 μ M que también transporta galactosa y fructosa pero con muy baja especificidad. Se localiza de manera preferencial en los estomas. Mientras que AtSTP3 tiene una Km por la glucosa de 2 mM, además de galactosa, xilosa y manosa. AtSTP3 se expresa preferencialmente en las hojas verdes y aumenta cuando hay un estrés ambiental. El AtSTP2 presenta una Km de 50 μ M para galactosa y se presenta preferencialmente en el polen (Buttner 2007).

Justificación.

Los eventos de movilización de reservas contenidas en el endospermo de cereales se han descrito ampliamente. Una vez que la radícula emerge de la semilla, el embrión es capaz de sintetizar y secretar a la hormona ácido giberélico (GA), la cual induce la expresión de genes que codifican proteínas que se encuentran involucradas en el ablandamiento o aflojamiento de la pared celular como las glucanasas, pectimetilesterasas y xilanasas, entre otras. Además el GA induce la expresión de formas específicas de α -amilasas que degradarán el almidón del endospermo para nutrir al eje embrionario en crecimiento. Otra hormona implicada en el proceso germinativo es el ácido abscísico (ABA), hormona que mantiene a la semilla en estado quiescente, pero al comenzar la hidratación de la semilla, el ABA comienza a degradarse. Este fenómeno aumenta el índice GA/ABA y por lo tanto la germinación se produce. A pesar de que las semillas han sido estudiadas ampliamente no se han identificado los procesos de transporte que ocurren en el tejido embrionario previo a su germinación.

En cuanto a los eventos de movilización de carbono anteriores a la salida de la radícula, hemos encontrado en el laboratorio que hay un continuo cambio en el contenido, tipo y disposición espacial de las moléculas carbonadas, por ejemplo, al inicio de la germinación la sacarosa disminuye alrededor del 60% en las primeras 8 horas tanto en el embrión completo como en el eje embrionario, sin embargo llega a ser residual en el eje embrionario, después de las 24 h (6% respecto al inicio del proceso de germinación), mientras que el escutelo comienza a sintetizar a la sacarosa a las 12 h de embebidas (Martínez-Marcelo 2008), utilizando para ello el carbono que se encuentra en los lípidos almacenados en ese tejido, ya que cerca del 37% de su peso son lípidos (Luna-Löaiza 2010; To, Reiter, & Gibson 2002). Una vez que la germinación ocurre alrededor de las 24 h, la semilla es capaz de no sólo usar el resto de lípidos que se encuentran en el escutelo sino comienza también la movilización de la glucosa que se almacenó en forma de almidón en el endospermo, siendo esta reserva alrededor del 80% de su peso. Tanto los lípidos como el

▶

almidón y las proteínas de reserva serán utilizados hasta que la plántula sea capaz de desarrollar su aparato fotosintético.

En cuanto a la presencia de las proteínas transportadoras hemos encontrado que en el escutelo del maíz se encuentra sólo un gen que codifica para el transportador de sacarosa y que conforme avanza la germinación su expresión como RNAm, proteína y su actividad aumenta, (Greaves-Fernández 2001; Zavala-Zendejas 2001). Sin embargo, el eje embrionario no contiene al transportador de sacarosa, por lo que el disacárido que el escutelo exportó hacia los apoplastos debe pasar por el proceso de hidrólisis, existen invertasas apoplásticas presentes tanto en los embriones como en los ejes embrionarios (Martínez-Marcelo 2008), por lo que la posibilidad de producir hexosas es altamente probable. Por lo anterior, el eje embrionario debe contener transportadores de hexosas para nutrirlo.

Hemos encontrado mediante ensayos de PCR a un gen que codifica para un transportador de hexosas y que su expresión es específica del tejido embrionario de maíz (Gómez-Calderas 2008), sin embargo el que encontremos a un transcrito no nos predice cual es la actividad de transporte que el tejido es capaz de desarrollar. Por lo que el presente trabajo explora la capacidad de toma de glucosa de estas células.

Hipótesis.

Debido a la necesidad nutricional de carbono que presenta el tejido embrionario para su desarrollo, a la alta capacidad de hidrólisis de sacarosa y a la reducida actividad de transporte de este disacárido entonces el tejido embrionario deberá acceder a metabolitos de fácil asimilación como lo son las hexosas del medio apoplástico, esto a través de transportadores específicos para hexosas, los cuales se localizan en la membrana plasmática.

Objetivo general.

Determinar la capacidad de transporte de glucosa del tejido embrionario de maíz.

Objetivos particulares.

1. Obtener la evidencia de que hay proteína transportadora de hexosas en el embrión de maíz.
 - A. Obtención de anticuerpos específicos para detectar al transportador de glucosa en las membranas plasmáticas de plantas.
 - B. Detectar la presencia del transportador de glucosa de la membrana plasmática mediante anticuerpos específicos.
2. Medir la toma de glucosa en las células en suspensión de embriones de maíz.
 - A. Establecer las condiciones para la determinación de la toma de [^{14}C]-glucosa en las células en suspensión de embriones de maíz.
 - B. Evaluar la contribución de la toma de glucosa por difusión y la dependiente del transporte activo de protones.
 - C. Determinar las constantes cinéticas de la toma de glucosa en células en suspensión de embriones de maíz.

Materiales y Métodos.

Material biológico.

Obtención de embriones de maíz.

Los embriones de maíz se extrajeron manualmente de la semilla con la ayuda de una navaja.

Preparación de cultivos de células en suspensión.

Los cultivos de células en suspensión provenientes de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays L*) se proporcionaron por el laboratorio de cultivos vegetales del Departamento de Bioquímica, a cargo de la Agrónoma María Teresa de Jesús Olivera Flores.

Métodos.

Obtención de anticuerpos contra el transportador de hexosas de plantas.

Se inocularon 2 conejos machos de aproximadamente 3 Kg de peso con el antígeno para el transportador de hexosas. La secuencia *LGWLPSEIFPLEIRSAC* hapténizada en la cisteína con la hemocianina (KHL, "Keyhole limpet hemocyanin") fue el antígeno que se utilizó en el protocolo de inmunización y se diseñó a partir del alineamiento de varias secuencias para el transportador de hexosas de la membrana plasmática en plantas. Es una secuencia conservada en los diferentes transportadores de hexosas de la membrana plasmática de plantas, el posible anticuerpo que se genere detectará a todas las isoformas del transportador que se encuentren en la membrana plasmática.

Se obtuvo de cada uno de los conejos aproximadamente 2 mL de suero pre-inmune, después se procedió a la primera inoculación con 1 mg de antígeno disuelto en adyuvante completo de Freund, se realizó una punción detrás de la oreja. A las 2 semanas se realizó el primer refuerzo con 0.5 mg/mL de adyuvante incompleto de Freund, se repitieron los

▶

refuerzos dos veces más, con 2 semanas de diferencia entre cada una. A la semana de la última inmunización se realizó la sangría de cada uno de los conejos para obtener aproximadamente 20 mL de sangre de cada uno.

Después de que se coaguló la sangre se separó con cuidado de las paredes del tubo y se centrifugó a 1000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante o suero que se obtuvo (10 mL/conejo) contiene los anticuerpos.

Purificación parcial del anticuerpo.

Se realizó una purificación parcial por precipitación con sulfato de amonio de la manera descrita por (Liddell 2001). Se diluyó el suero 1:2 en PBS a 4°C. Luego se adicionó una solución saturada de sulfato de amonio (SAS) gota a gota para tener una concentración final de 45% (v/v). Se agitó la suspensión a 4°C durante 30 min y posteriormente se centrifugó a 1000 g por 15 min a una temperatura de 4°C. El precipitado se lavó con SAS al 45%. El botón se resuspendió en un volumen de PBS (10 mM pH 7.2) usando una cantidad similar a la que se comenzó antes de precipitar y se centrifugó nuevamente a 5000 g por 15 min a 4°C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se reprecipitaron las inmunoglobulinas usando una concentración final al 40% de SAS, después se centrifugó a 1000 xg durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en un mínimo volumen de PBS (0.5 mL) y se dializó contra 5 L de PBS a 4°C durante toda la noche. Por último se centrifugó a 5000 xg durante 15 min a 4°C para remover cualquier material insoluble.

Detección del transportador de hexosas en células en suspensión.

Se realizaron slot blots de las células en suspensión de embriones de maíz a diferentes concentraciones disueltos en amortiguador de muestra, posteriormente se pusieron a reaccionar con suero preinmune, o con el anticuerpo en diluciones distintas y se encontró que el anticuerpo presenta reacción al detectar a una proteína desde diluciones de 1:6,000, pero la mejor resolución se encontró a una dilución de 1:3,000. Las bandas que se

revelaron en las placas fotográficas se digitalizaron en un escáner HPscanjet 3500c y se realizó la densitometría de las mismas con el programa Quantity one (Fluor S-TM Multimager Biorad).

Determinación de los niveles del transportador de hexosas mediante inmunoréplica tipo Western.

Se prepararon geles desnaturalizantes al 12% de acrilamida según la técnica de (Laemmli 1970). Se cargaron los carriles con 30 µg de proteína en amortiguador de muestra (0.35M Tris base, 5% SDS, 0.16 M DTT, 7.5% glicerol, 0.4% de azul de bromofenol) por duplicado para cada tiempo, se corrieron los geles utilizando amortiguador de corrida (0.25 M Tris base; 1.9 M Glicina, 0.5% SDS) a 10-15 mA hasta que el azul de bromofenol llegó al final del gel. Para visualizar las bandas de proteínas en el gel, estos se tiñeron con una solución de Azul de Coomassie R250 0.125% (w/v) disuelto en metanol 50% (v/v) y ácido acético 10%, por 10 min para visualizar las proteínas.

Para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), se utilizó el amortiguador de transferencia (0.1 M NaPO₄, pH 6.8, 0.5% SDS, 20% metanol), la transferencia se llevó a cabo por 2 h a 25 V a temperatura ambiente en una cámara húmeda marca Hoefer. Para la detección del transportador de hexosas se utilizó un anticuerpo que reacciona con el anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática en una dilución 1:1,000 por toda la noche a 4°C.

El segundo anticuerpo que se utilizó es un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, la detección de las bandas que reaccionaron con los anticuerpos se realizó mediante una técnica luminiscente. La membrana de nitrocelulosa se colocó por 4 minutos en una solución que contenía: 10 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8.5, 17 µl de peróxido de hidrógeno al 2%, 25 µL de solución A (0.35 g ácido p-cumárico en 25 ml de DMSO) y 50 µl solución B (1.1 g de luminol en 25 ml de DMSO). Después la membrana se colocó entre una bolsa de

▶

plástico y se eliminó el exceso de solución luminiscente y se le colocó una película fotográfica.

Preparación de las células en suspensión de maíz.

El establecimiento de las células en suspensión de maíz (*Zea mays L.*, raza Costeño) se realizó según la metodología descrita a continuación:

1. Se disgregaron 8 g de callo embriogénico de maíz (los callos embriogénicos se obtuvieron según la metodología establecida por (Jiménez 2006) y con ellos se inocularon matraces de 250 ml conteniendo 60 ml de medio N₆p.
2. Se incubaron los cultivos madre de 5 a 8 días bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad), a una temperatura de 25±2°C y en agitación constante de 100 rpm.
3. Pasado el tiempo de incubación los cultivos madre se pasaron por un dispersor celular (SIGMA) estéril, para disgregar los restos de callos y agregados celulares. Con ayuda de un pistilo de vidrio estéril se frotaron los tejidos en forma suave sobre una malla del No. 40, se recolectó la suspensión en un vaso de precipitado estéril y se les agregó medio de cultivo fresco a una razón de 20 a 30 mL de medio fresco y de 30 a 40 mL de las células en suspensión, según la densidad celular.
4. Cada semana se realizó el subcultivo dividiendo la suspensión de cada matraz en dos y agregando 30 mL de medio fresco, en el caso de que se observaran las células muy densas, agregadas u oxidadas, se volvían a pasar por el dispersor celular y se agregaban a medio fresco.

Preparación de las células para la toma de glucosa.

Debido a que el medio en el que las células crecieron contiene tanto aminoácidos como sacarosa, fue necesario eliminar estos componentes y someter a las células a un periodo corto de ayuno de metabolitos, por lo que se procedió a lavar la suspensión celular. Se tomaron aproximadamente de 10 a 15 mL de una suspensión celular y se centrifugó a 1300 g durante 10 min en la centrifuga Hettich Universal 320 R Rotor no. 1624. Se desechó el

sobrenadante y se resuspendieron en 0.5 mL de la solución de lavado de células (amortiguador celular a pH 5 o pH 7), se transfirieron a un microtubo y se mezcló bien para posteriormente centrifugar a 1300 g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó y se repitió la operación una vez más adicionando 0.5 mL del amortiguador de lavado. Por último se determinó el número de células en la preparación.

Determinación del número de células.

Se realizaron diluciones por triplicado de una suspensión celular de embriones de maíz germinados, a cada dilución se le determinó su absorbencia a 600 nm usando un Espectrofotómetro UV/Vis Beckman Coulter DU 530 y además se contó el número de células con ayuda de un hemocitómetro y un Microscopio Óptico Olympus CH30. Se graficaron ambos parámetros de la curva (Figura 8A), el intervalo que fue lineal se tomó como referencia en los experimentos (Figura 8B), es decir se realizaba una dilución de las células en suspensión se medía su absorbencia a 600 nm y se determinaba el número de células en la preparación por interpolación del valor de absorbencia en la curva patrón que se presenta en la Figura 8B. El intervalo de absorbencia adecuado para un conteo de células preciso se da entre 0.23 y 0.40.

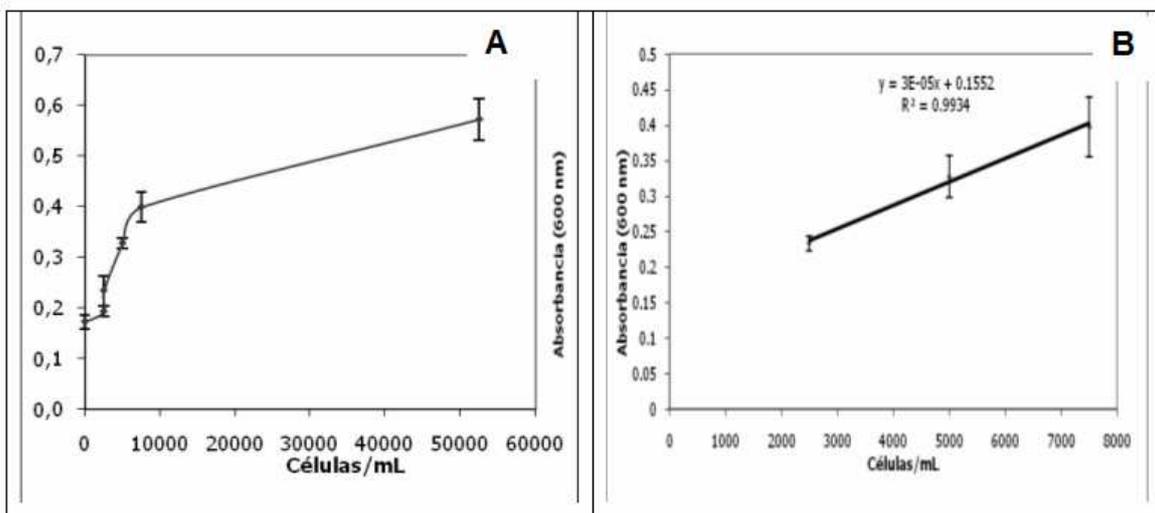


Figura 8. Curva patrón del número de células en suspensión de embriones de maíz. A) Se grafica el número de células/mL de cultivo contra su absorbencia a 600 nm. B) Parte lineal de la curva en A, en donde se presentan los datos de regresión que se utilizaron en la determinación del número de células en el cultivo.

Determinación de la actividad de transporte de glucosa.

Se realizó siguiendo el protocolo de (Bush 1993b) con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó 1 mL de medio de reacción y la actividad se midió en ausencia y en presencia de diferentes iónoforos para determinar si la toma de glucosa era de tipo activo o pasivo. Se inició el transporte de glucosa con la adición de 50 μ L de las células en suspensión al medio de reacción (HEPES 50 mM / NaOH pH 5 o 7, Sorbitol 350 mM 0.1, 1.0 ó 10 mM Glucosa), se mezcló y posteriormente se tomaron alícuotas de 100 μ L a 0.5, 3, 5, 7, 10 y 15 min para obtener las curvas temporales de toma de glucosa. Estos volúmenes se colocaron sobre un filtro de fibra de vidrio (catálogo AP1502500 marca Millipore) que se encontraba en un aparato Manifold marca Millipore conectado al vacío, se lavaron añadiendo 10 mL del amortiguador de lavado que contenía HEPES 50 mM / NaOH pH 5, Sorbitol 350 mM y Glucosa no marcada a una concentración 10 veces mayor a la usada para la reacción de toma de glucosa es decir concentraciones de 1, 10 o 100 mM. Los filtros de vidrio se sacaron del aparato de filtración y se secaron en un horno a 37°C por al menos 12 h. Posteriormente se colocaron los filtros secos en un frasquito de plástico que contenía 3 mL de líquido de centelleo (0.3% 2,5-difenil oxazol, 3.7% etilenglicol, 10.6 % etanol, 25.7 % tritón y 60% Xilol). Se incubaron en el líquido de centelleo con agitación por toda la noche y por último se obtuvo la lectura de las desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo Beckman Instrument LS 6000IC. Se utilizaron como controles una alícuota de 10 μ L de [¹⁴C]-Glucosa resuspendida en el medio de centelleo que generalmente daba en promedio 324299.4 dpm y la misma alícuota filtrada en un filtro de vidrio, el cual daba en promedio 323730.2 Dpm.

Se dejaron reposar los filtros de vidrio durante una noche y al día siguiente se realizaba la lectura de las dpm contenidas en los frascos con la ayuda de un contador de centelleo que fue previamente calibrado (ver calibración abajo). Posteriormente se calculó la actividad de toma de glucosa con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de toma de glucosa (nmol Carbohidrato transportado/10}^6 \text{ células)} = \frac{\text{dpm } [^{14}\text{C}]\text{-Glu} * 1000 * 10^6 \text{ células}}{60 * 3.7 * 10^{10} \text{ dps/Ci} * 250 \text{ Ci/mol}} \quad \text{Ecuación 1}$$

▶

Donde:

dpm son las desintegraciones por minuto de la muestra

1000 es el factor para expresar los valores en nmoles

60 es el factor para convertir minutos a segundos

3.7×10^{10} dps/Ci es el factor de conversión para Ci

250 Ci/mol, valor de actividad que tenía el vial de ^{14}C -Glucosa que se usó en los ensayos

Calibración del contador de centelleo Líquido Beckmann Coulter LS 6500.

Debido a que al realizar un experimento es necesario que los resultados obtenidos sean precisos o con poca dispersión entre ellos, se debe llevar a cabo la adecuada estandarización del equipo. El equipo Beckmann Coulter LS 6500 es un dispositivo que permite medir indirectamente las radiaciones producidas por isótopos inestables, a través de fotones de luz. Con base en el mecanismo de detección estas radiaciones son expresadas como cuentas por minuto (cpm). Las cpm son una medida indirecta de la radiactividad y corresponden a una fracción que se detecta por el equipo de las desintegraciones reales que sufren los núcleos al decaer, las cuales se expresan como dpm.

Las muestras radiactivas se colocan en medios ricos en electrones pi (disolventes aromáticos) para facilitar la transferencia de la energía radiactiva hacia los electrones de la placa de sal de flúor, contenida dentro del detector. Cuando el detector recibe la energía en forma de radiactividad provoca la excitación de los electrones de la placa de sal y la posterior emisión de la energía en forma de fotones. Esta energía se detecta y transforma a pulsos eléctricos mediante el uso de tubos fotomultiplicadores.

Para conocer el número real de las dpm es necesario determinar la eficiencia del equipo, con el fin de poder realizar la conversión (cpm→dpm) de la siguiente manera:

$$\text{dpm} > \text{cpm}$$
$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

Ecuación 2

Cualquier factor que reduce la eficiencia de la transferencia de energía radiactiva o causa la absorción de los fotones producidos, resulta en un apagamiento de la radiactividad de la muestra (Figura 9).

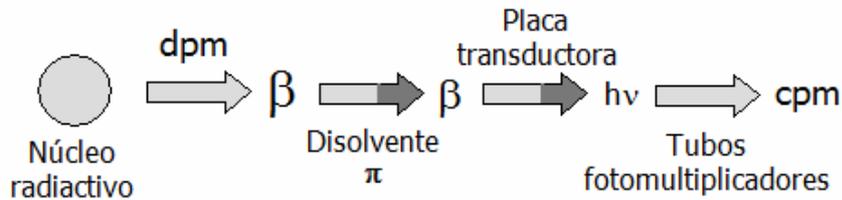


Figura 9. Detección de la emisión de la radiación en un contador de centelleo líquido. Gris claro: radiación emitida; gris oscuro, apagamiento de la energía emitida.

La eficiencia del equipo se calcula a través de una curva de apagamiento de la radiactividad, en la cual se utilizan estándares de elementos radiactivos como el ^3H o el ^{14}C , cada uno de los estándares posee la misma cantidad conocida de núcleos radiactivos, por lo que produce las mismas dpm, los estándares se diferencian en la cantidad de agente apagante agregado, el cual aumenta progresivamente de frasquito en frasquito de cada estándar y entre mayor es la concentración de agente apagante en cada frasquito, menor serán los cpm registrados por el equipo y por lo tanto menor será su eficiencia. El aparato asocia cada valor de eficiencia calculado, a cada H#, valor adimensional que es proporcional a la concentración del agente apagante que hay en cada frasquito, este valor representa la absorbencia detectada por el aparato a una longitud de onda particular del agente, el H# muestra la capacidad de apagamiento que posee una sustancia (Figura 10).

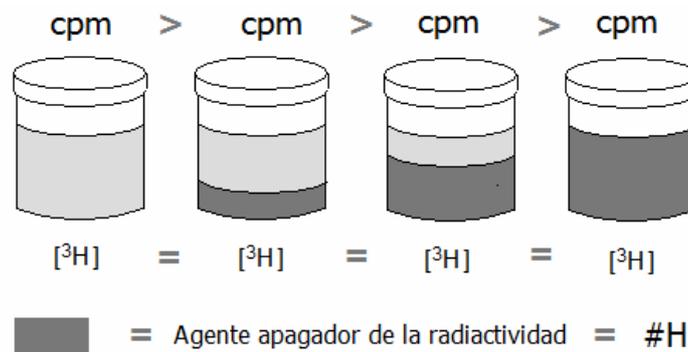


Figura 10. Estándares utilizados en la calibración del aparato detector de la emisión de la radiación, contador de centelleo líquido. Gris claro: radiación emitida; gris oscuro, apagamiento de la energía emitida.

Preparación de curvas de apagamiento.

Condiciones del estándar.

Al momento de hacer la curva de apagamiento habían transcurrido 24.4 años desde que el estuche de estándares se había expedido (Estándar ^3H Amersham International plc. Dpm: 505440. Lote H620. Elaboración: 1.Oct.84). Considerando que el decaimiento radiactivo sufre un comportamiento de tipo exponencial y que el tritio posee una vida media de 12.26 años, entonces se calculó la constante de eliminación del tritio, para luego, determinar la cantidad de tritio que aún existe después del tiempo transcurrido, como se presenta a continuación:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad \text{Ecuación 3}$$
$$t_{1/2} = \frac{\ln\left(\frac{1}{2}\right)}{k} \rightarrow k = \frac{0.693}{t_{1/2}} = \frac{0.693}{12.26 \text{ años}} = 0.05652 \text{ años}^{-1}$$
$$\frac{A}{A_0} = e^{-kt} = e^{(-0.05652 \text{ años}^{-1})(24.42 \text{ años})} = 0.2515$$
$$A = (0.2515)A_0 = (0.2515)(505440 \text{ dpm}) = 127118.16 \text{ dpm}$$

Donde:

A es la radioactividad del tritio al tiempo t expresada como dpm

A₀ es la cantidad de tritio al $t=0$ expresada como dpm

k es la constante de decaimiento del tritio expresada como años⁻¹

t es el tiempo expresado en años

t_{1/2} es el tiempo transcurrido para que la radioactividad del tritio sea la mitad de la radioactividad inicial ($t=0$) expresado como años

En un equipo detector de centelleo líquido Beckmann Coulter LS 6500, se midió el estudio de estándares y los datos obtenidos se encuentran en la Figura 11. El dato del H# viene dado por el aparato mientras que la eficiencia se determina al dividir los cpm obtenidos para cada frasquito entre los dpm reportados por el fabricante. Los datos de eficiencia obtenidos

se utilizaron para graficarlos contra la cantidad de agente ocultante (H#) con el objetivo de conocer la eficiencia exacta de cada medición y así determinar el valor real de dpm, como se presenta en las siguientes ecuaciones (Gibson 1980).

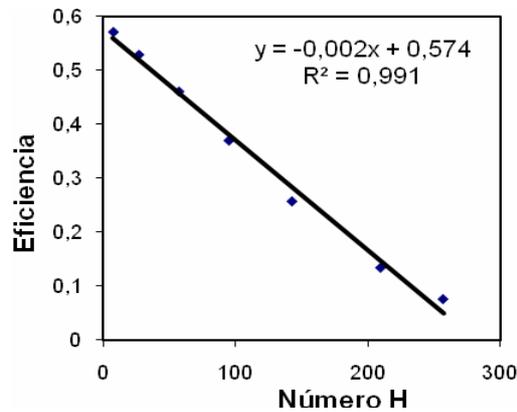


Figura 11. Curva estándar del apagamiento de la radiactividad.

Los valores de regresión se utilizaron para calcular la eficiencia y con ello sacar las dpm de las muestras.

$$\text{Eficiencia} = -0,002 (\text{H}\#) + 0,5743 \quad \text{Ecuación 4}$$
$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm}}{\text{Eficiencia}}$$

Donde 0.5743 es la ordenada al origen y -0.002 es la pendiente de la curva en la Figura 11.

Obtención de los valores de Km y Vmax para el transporte de glucosa.

Se determinó la actividad de toma de glucosa por las células como se describió anteriormente, pero el medio de reacción contuvo diferentes concentraciones de glucosa. Para distinguir entre la contribución del transporte activo del difusional, se hicieron las determinaciones como sigue:

- a) Para detectar el transporte difusional se realizó la determinación de actividad de transporte usando un amortiguador a pH 7.0, es decir en ausencia de gradiente de protones.

▶

b) Para detectar el transporte activo se usó un amortiguador a pH menor de 7.0 creando así una diferencia de pH entre el interior celular y el medio externo y adicionalmente el medio contuvo el ionóforo valinomicina. Con el medio de toma de glucosa usado se midió en conjunto la contribución de ambos tipos de transportes y al valor obtenido se le restó la contribución del valor difusional obtenido de la manera descrita en el inciso a con lo que se obtiene la actividad de transporte activo.

Cálculo para la obtención de los parámetros cinéticos para el transporte de glucosa.

Se utilizaron dos estrategias, en la primera con los datos de velocidad a cada una de las concentraciones de sustrato se vaciaron a una hoja de cálculo del programa MicroCal Origin versión 3.0, con el software incluido en el programa se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos.

La segunda forma fue re-graficar los datos experimentales, utilizando la ecuación de Hanes que es una expresión matemática de la forma lineal de la ecuación Michaelis-Menten, con la cual se pueden obtener la K_m y la V_{max} . Para obtener la forma lineal existen varias opciones, pero la que produce los mejores resultados es la gráfica de Hanes, en la que se grafica en el eje de las ordenadas al índice $[s]/\text{velocidad}$ y en el de las x la $[s]$. Este es un gráfico que se usa en el manejo de datos de enzimas, aunque no es tan popular como el de dobles recíprocos o Lineaweaver-Burk, pero es una representación más confiable en la que el error es constante a lo largo de la curva, contrario al de Lineaweaver-Burk en donde a concentraciones bajas de sustrato el error aumenta grandemente, generando una curva que se desvía con mucho de los valores reales de V_{max} y K_m (Eisenthal & Cornish-Bowden 1974). La ecuación linealizada de Michaelis, según Hanes es:

$$\frac{[s]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [s] \quad \text{Ecuación 5}$$

La pendiente de la curva es $1/V_{max}$ y el intercepto en X es la K_m/V_{max} .

Resultados.

Detección del transportador de hexosas mediante anticuerpos específicos.

Con la finalidad de determinar la presencia de transportadores de hexosas en la membrana plasmática de embriones de maíz se realizó la obtención de un anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática, para ello se inmunizó un péptido haptenido a hemocianina. El péptido ya se había diseñado en un trabajo anterior, sin embargo, los anticuerpos que se obtuvieron y se almacenaron a -70°C , producían dos bandas de reacción, aún habiendo añadido inhibidores de proteasas a las muestras. Por lo que uno de los objetivos del presente trabajo fue realizar nuevamente la inmunización del mismo antígeno y corroborar la especificidad de la reacción.

Se inmunizaron dos conejos pero sólo uno de ellos tuvo una reacción específica, considerando como específico la detección de una sola proteína a diluciones altas del anticuerpo y que detecte a una proteína con el peso molecular alrededor de los 60 kDa como se presenta en la Figura 12. Por lo que consideramos que la obtención del anticuerpo contra el transportador de hexosas fue exitosa y puede ser utilizado para identificar al transportador en muestras de células de tejido vegetal.

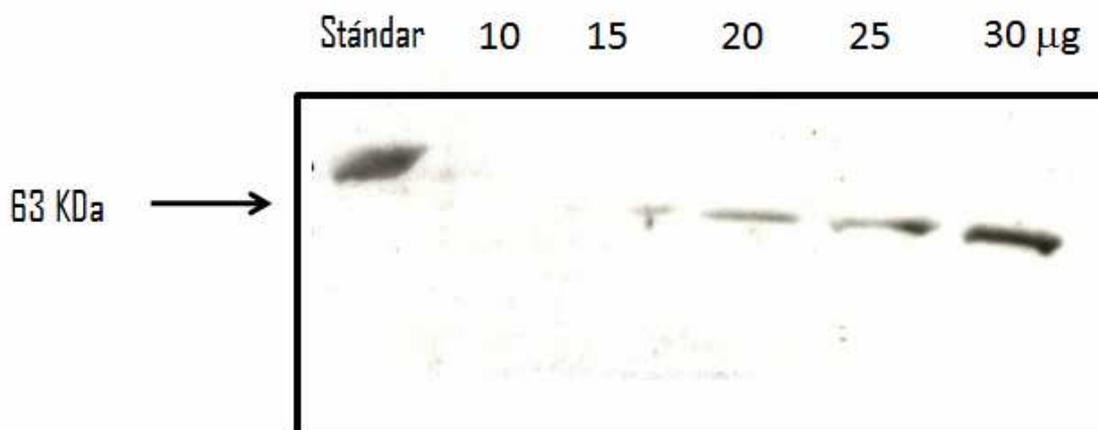


Figura 12. Detección del transportador de hexosas en inmunoréplica tipo Western. Se usaron diferentes concentraciones de proteína membranal desde 10 hasta 30 µg. El revelado de la reacción con el anticuerpo se realizó mediante la técnica de luminiscencia.

Detección del transportador de hexosas en las células en suspensión de maíz.

Una vez que se encontró que sólo se detectaba una banda en las fracciones membranales con el anticuerpo obtenido, se evaluó si el anticuerpo detectaba a la proteína transportadora en las células en suspensión, a las diluciones en las que se iban a usar en el ensayo de medición de actividad de transporte. Se encontró que a partir de 240 células se puede detectar transportador (Figura 13). Además conforme se incrementó el número de células hubo un aumento en la detección del transportador con los anticuerpos que fueron hechos para este fin. Sin embargo, la suspensión de células es difícil de tomar después de las 720 células.

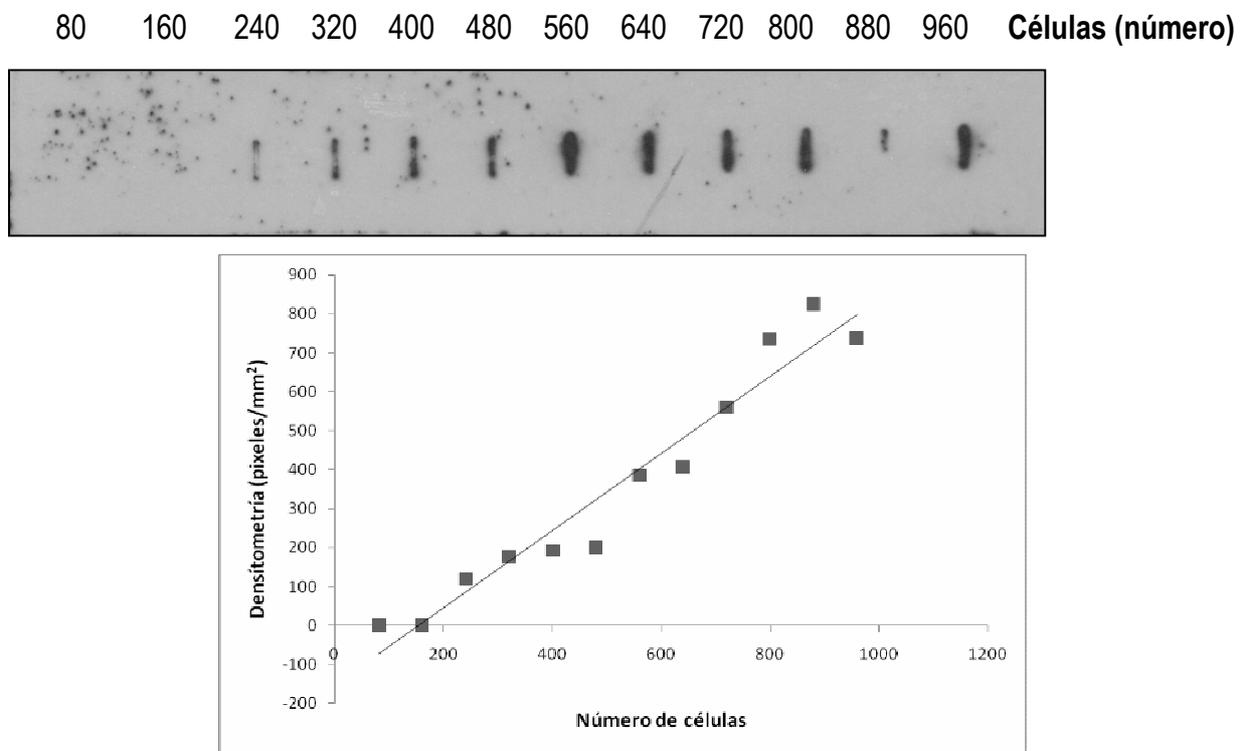


Figura 13. Presencia del transportador de hexosas en células en suspensión de embriones de maíz. Se realizaron diluciones seriadas de células en suspensión. Arriba: Blot en ranura de células en suspensión y Abajo: Densitometría de las bandas de la figura de arriba.

La detección del transportador de hexosas en las células en suspensión confirmó la presencia del transportador en las células por lo que se procedió a determinar la capacidad de transporte de glucosa de estas células. Adicionalmente, permitió al laboratorio contar con una herramienta experimental importante, los anticuerpos contra el transportador de

hexosas de la membrana plasmática. Actualmente estos anticuerpos se usan en estudios sobre el efecto de diferentes factores ambientales en la expresión de la proteína en las membranas plasmáticas de maíz, jitomate y tabaco (proyectos en progreso en el laboratorio).

Toma de glucosa por las células en suspensión de embriones de maíz.

Para la medición de la toma de glucosa se realizaron curvas temporales de incorporación de glucosa marcada uniformemente con [¹⁴-C].

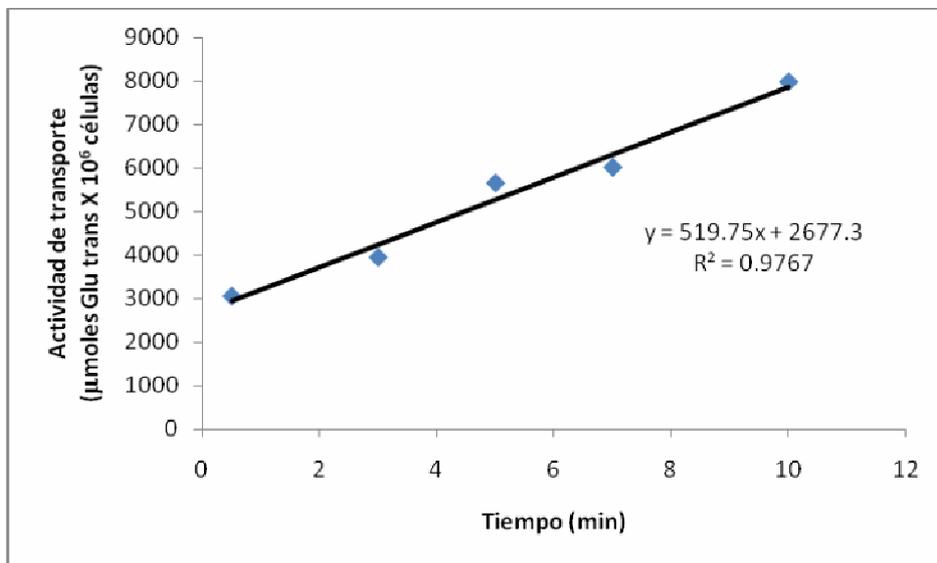


Figura 14. Curva temporal de la toma de glucosa en células en suspensión de maíz. Se utilizó una concentración final de glucosa de 3 mM, la pendiente de la curva es la actividad de toma de glucosa expresada en µmoles de glucosa transportada /1X10⁶ células.

En la Figura 14, se presenta una curva temporal típica de incorporación de glucosa a las células en suspensión de embriones de maíz, misma que se logró determinar una vez que se obtuvieron las condiciones de cantidad de marca radiactiva a añadir, número de células, tiempo de obtención de las células en suspensión (antes de que comiencen acumular compuestos fenólicos) y el número de lavados de las células después de la incorporación de la glucosa radiactiva.

▶

Como se observa en la Figura 14 la toma de glucosa por las células en suspensión mediante el método de incorporación de marca radiactiva es capaz de detectar la toma de [¹⁴C]-glucosa desde el primer minuto del ensayo. La pendiente de la curva nos da el valor de la actividad de toma de glucosa por las células en suspensión usadas por minuto y varía dependiendo de la condición experimental en la que se coloquen las células.

Efecto del pH en la toma de glucosa.

La toma de glucosa en las células vegetales puede ser del tipo activo o difusivo, por lo que teníamos la posibilidad de que la actividad de transporte de glucosa fuera la sumatoria de ambas fuentes, para evaluar la proporción de cada una de ellas en la toma de glucosa medida, se realizaron los ensayos de medición de transporte de glucosa en las células en suspensión a dos pHs distintos, uno en donde no hubo la imposición de una diferencia de pH, es decir a pH 7.0 y otro en el que se imponía una diferencia de pH, pH 5.0 afuera, en el primero se pone en evidencia el transporte por difusión facilitada, mientras que en el segundo se puede observar el transporte activo sumado al del transporte difusional.

Encontramos que existe transporte de glucosa al interior de las células embrionarias a ambos pHs, sin embargo la toma de glucosa es mayor entre 4 y 6 veces cuando el medio externo se encuentra a pH 5.0 (Figura 15), hay que recordar que a este pH se encuentran sumadas las actividades de transporte tanto de la toma difusiva como la del transporte activo. Por lo anterior, se restó a la actividad de toma de glucosa a pH 5.0 la de la toma debida al transporte activo, es decir la obtenida a pH 7.0, el resultado se presenta en la Figura 16.

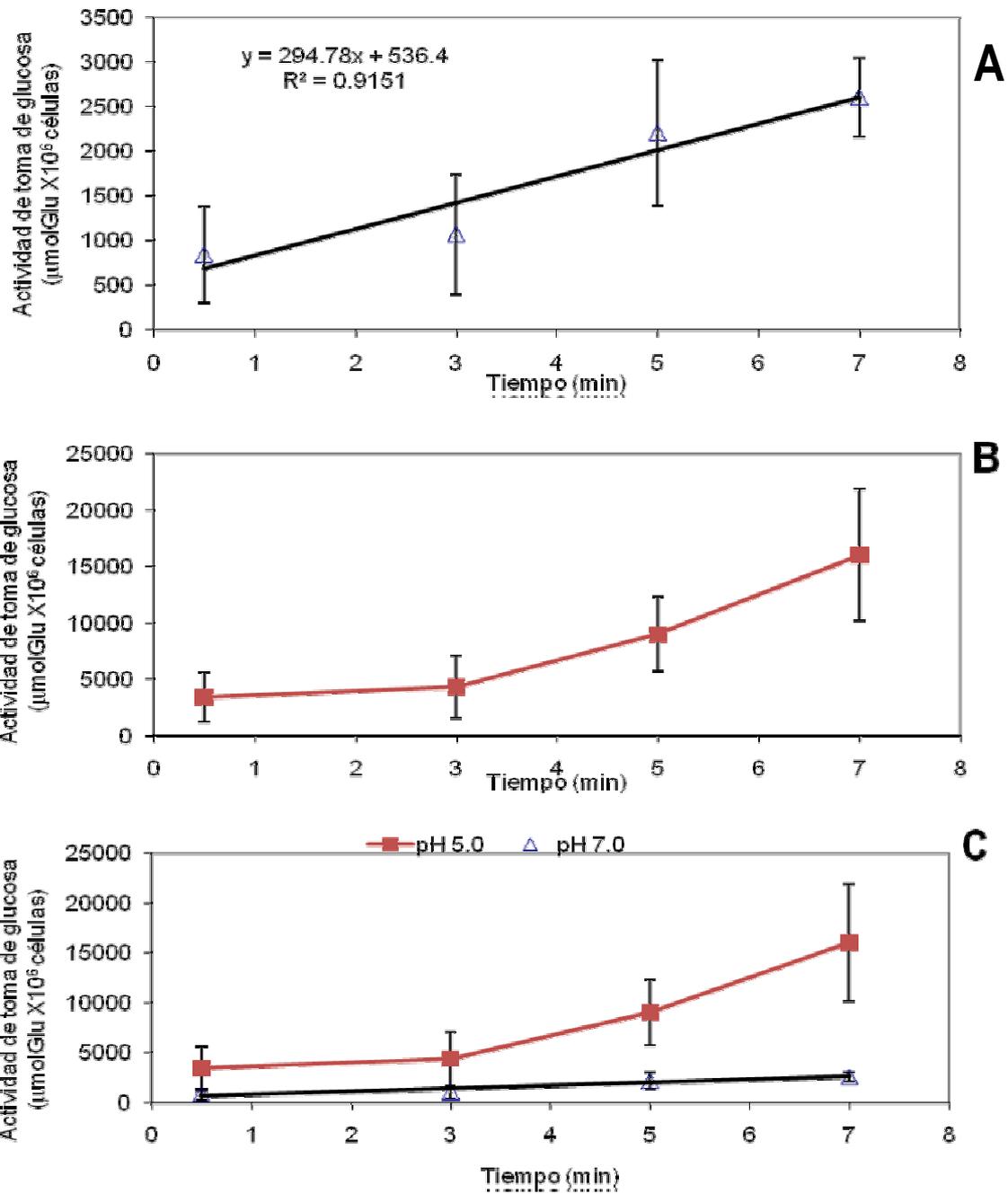


Figura 15. Curva temporal de toma de glucosa de células en suspensión a dos pHs. A) La toma de glucosa a pH 7.0 es lineal según se presenta en la ecuación de la recta, B) la toma de glucosa a pH 5.0 aumenta conforme avanza el tiempo de incubación del tejido pero no sigue un comportamiento lineal, C) Toma de glucosa a ambos pHs, se observa que la toma de glucosa a pH 5.0 es mayor que a pH 7.0 a todos los tiempos en los que se incubó el tejido. Los valores representan la media \pm sd de la actividad de transporte medida en al menos 5 diferentes preparaciones de células en suspensión.

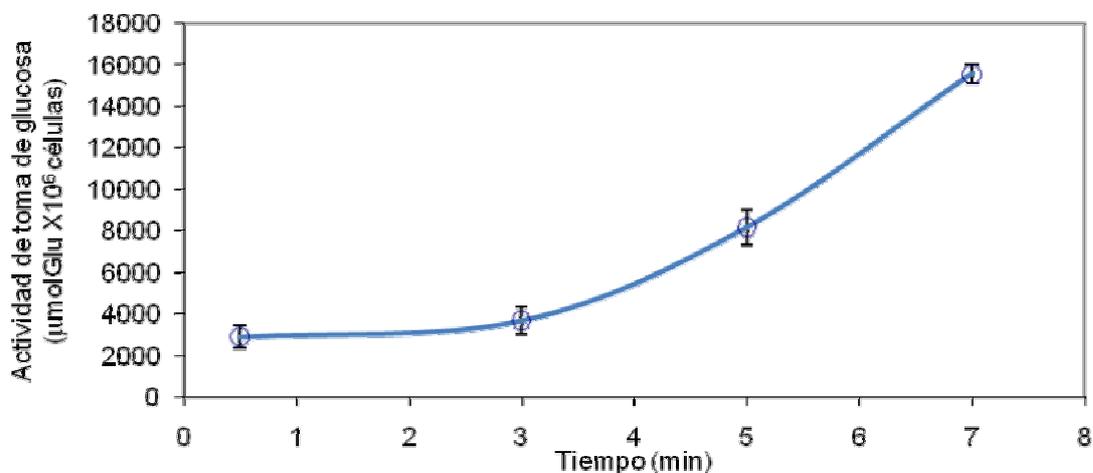


Figura 16. Curva temporal de transporte activo de glucosa por las células en suspensión de maíz. Los datos de la curva fueron obtenidos de la resta de la medición de glucosa a pH 5.0 (Figura 15B) con los datos de la toma de glucosa a pH 7.0 (toma de glucosa difusiva; Figura 15A). Si consideramos la pendiente de toma de glucosa entre 3 y 7 minutos la toma de glucosa es de $9241.6 \mu\text{mol} \times 10^6 \text{ células min}^{-1}$.

El transporte de glucosa a pH 5.0 por las células en suspensión es evidentemente más alto al del transporte difusivo (Figuras 15C y 16). Para corroborar que este transporte es realmente activo y dependiente de pH se incorporó en la determinación al carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), un ionóforo para protones, el cual equilibra las concentraciones de protones adentro y afuera de la membrana (Figura 17A). Se realizó un experimento similar a los anteriores pero después de sacar la alícuota del minuto 10 se adiciono CCCP, observando que la actividad de transporte decrece y se mantiene en valores bajos, similar al valor de toma de glucosa difusiva. Por lo que el incremento en la toma de glucosa a pH 5.0 sí es dependiente de protones.

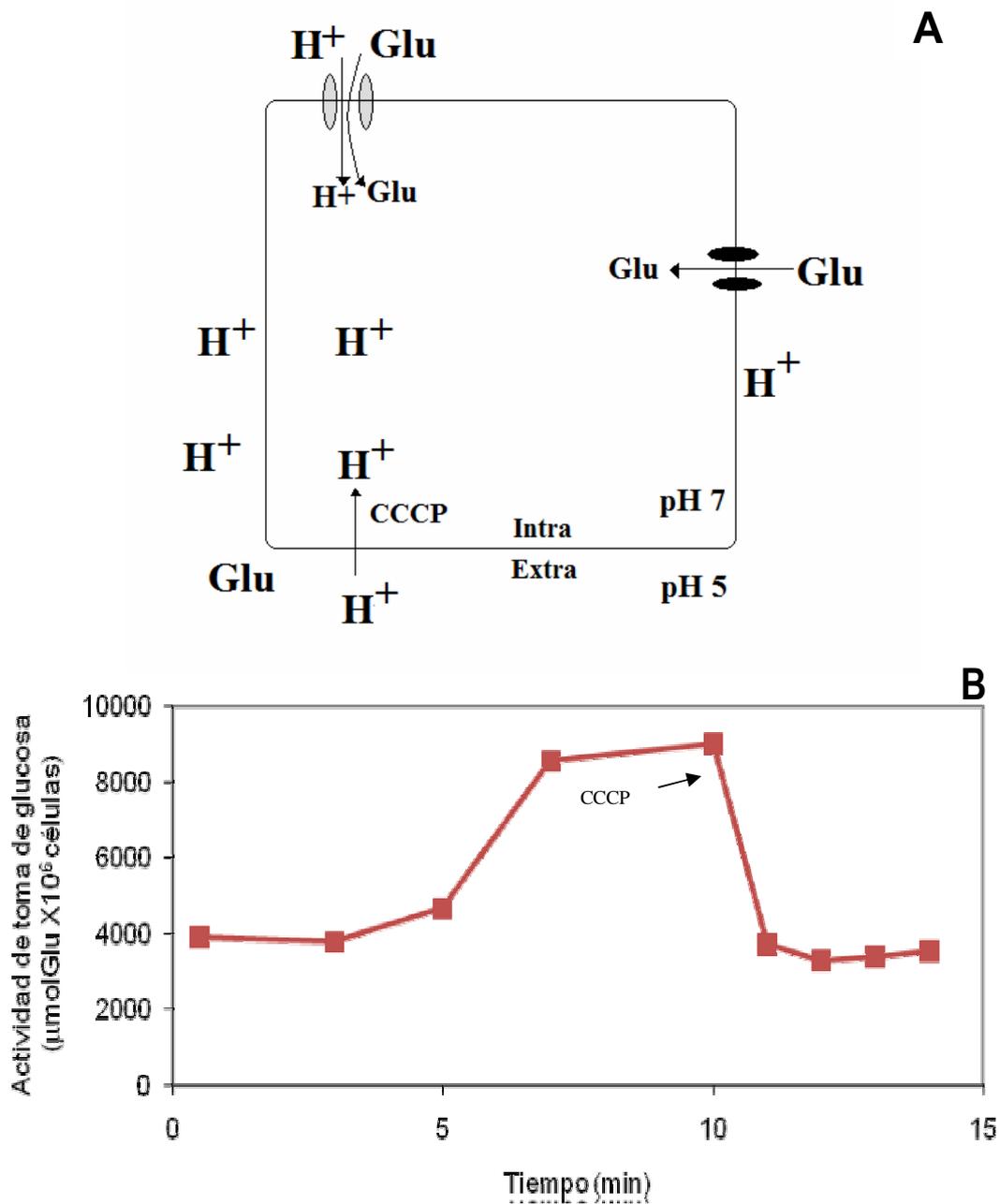


Figura 17. Efecto del CCCP sobre curva temporal de actividad de transporte de glucosa. A) Esquema que indica el efecto del CCCP, ionóforo que equilibra la concentración de protones a través de la membrana y el transporte difusivo de glucosa continúa, mientras que el del transporte activo se detiene. B) Determinación del efecto del CCCP en las células en suspensión de embriones de maíz. La actividad de transporte en presencia del ionóforo disminuye y no vuelve a aumentar.



Para comprobar que efectivamente es dependiente de los protones tanto de su concentración como de su carga se realizó la medición de la actividad de toma de glucosa a pH 5.0 y en presencia del ionóforo para potasio, la valinomicina. El fundamento de su uso se presenta en la Figura 18A, si el transporte de glucosa es mediante un transportador de tipo paralelo o simporte, es capaz de acarrear glucosa junto con el movimiento de protones, por lo que la concentración de glucosa va aumentando en el interior celular y la concentración de protones se empieza a equilibrar con la concentración externa de protones. Sin embargo, al incorporar la valinomicina comienza a expulsar K^+ del interior de la célula, permitiendo así un decremento en el número de cargas positivas en el interior celular, que permite que el transportador continúe incorporando cargas positivas al interior de la célula y por tanto la glucosa siga incrementándose en el interior celular.

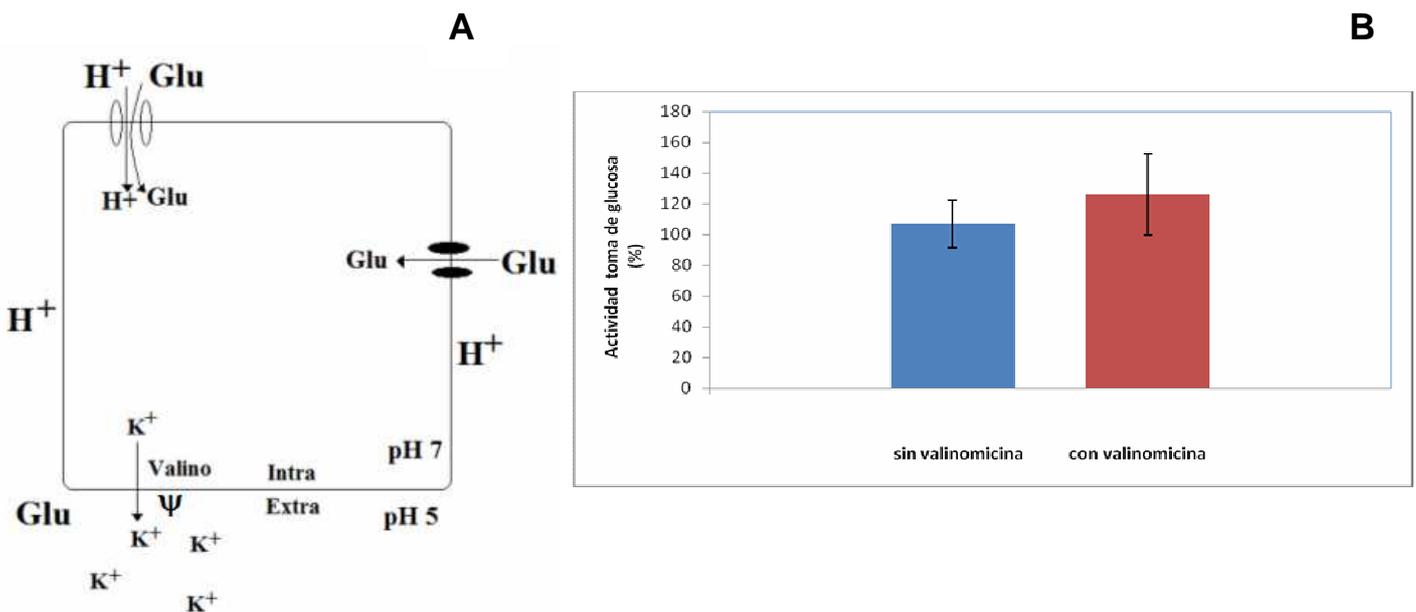


Figura 18. Actividad de transporte de glucosa en presencia de un gradiente de pH y valinomicina. A) Esquema que indica el efecto de valinomicina en el transporte de glucosa por las células embrionarias de maíz. B) Determinación de la actividad de transporte de glucosa en presencia y ausencia de valinomicina y a pH 5.0, expresada en porcentaje.

▶

Se encontró que efectivamente la actividad de transporte se ve favorecida al incorporar la valinomicina si bien la diferencia parece no ser significativa respecto a la medición sin el ionóforo (Figura 18B).

Determinación de las constantes cinéticas K_m y V_{max} para el transporte de glucosa.

Se obtuvieron las curvas temporales de actividad a diferentes concentraciones de glucosa y de la parte lineal de cada curva se obtuvo la pendiente, con estos valores se obtuvo la curva de la Figura 19A. La curva se ajustó a la fórmula de una hipérbola cuadrática, ecuación que describe el comportamiento michaeliano de enzimas con la herramienta presente en el programa MicroCal Origin8, comportamiento que describe la toma de glucosa por los embriones. También se realizaron los regráficos lineales de la ecuación de Michaelis-Menten, el de Lineweaver-Burk (Figura 19B) y el de Hanes-Wolf (Figura 19C). Los valores de K_m y V_{max} obtenidos por estos tres métodos se presentan en la Tabla 1.

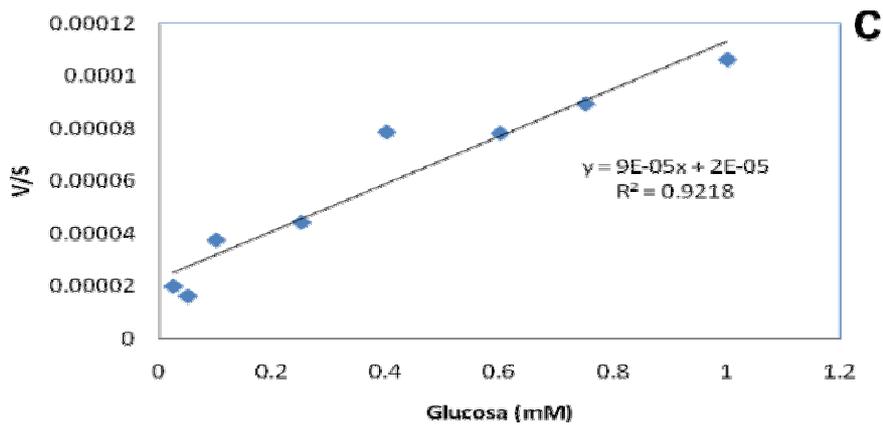
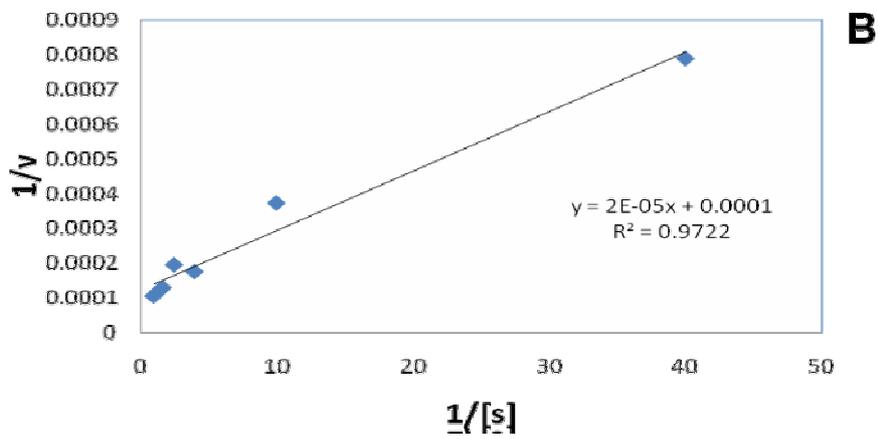
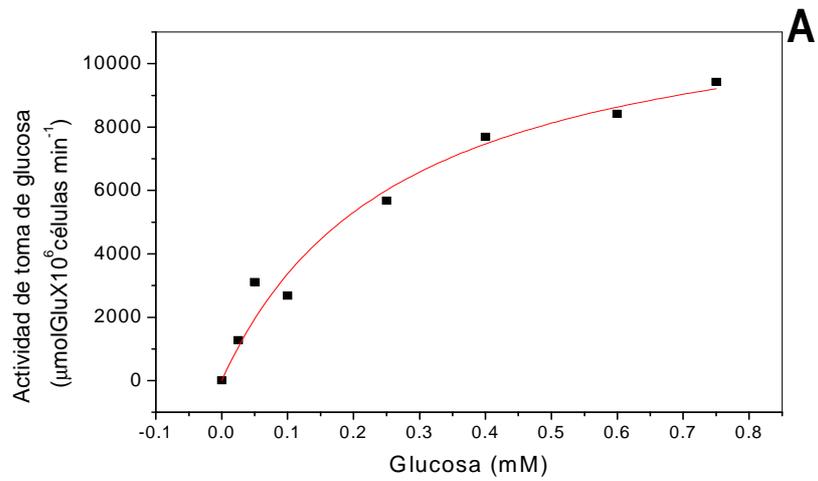


Figura 19. Curva de saturación de la toma de glucosa por las células en suspensión de embriones de maíz. La toma de glucosa se midió a pH 5.0 en presencia de valinomicina, a la actividad obtenida se le descontó la actividad difusiva A) Gráfico de Michaelis-Menten. B) Gráfico de dobles recíprocos de los datos en A y C) Gráfico de Hanes-Wolf de los datos en A.



Los valores de Km con cualquiera de los métodos empleados se encuentran alrededor de los 200 μM , sin embargo los valores de Vmax varían dependiendo del método que se use. Se conoce que el método de Hanes-Wolf es un método más preciso en el sentido de que las variaciones debidas a la manipulación de las diferentes concentraciones de sustrato no son tan grandes como al hacer el gráfico de Lineweaver-Burk ya que se tiene el efecto de la concentración de sustrato en ambos ejes (Figura 19C). En este trabajo usamos también un software que realiza la iteración de los datos mediante un programa de regresión no lineal, por lo que los valores son obtenidos con mayor precisión que los valores obtenidos por medio de cualquiera de los regráficos que anteriormente se realizaban, sin embargo no dejamos de presentar los resultados obtenidos utilizando los otros métodos en vista de que hay todavía reportes que los manejan y se presentan aquí solo con fines comparativos.

TIPO DE GRÁFICO	Vmax ($\mu\text{mol X } 10^6 \text{ células}$ min^{-1})	Km (mM)
Michaelis-Menten	12,549.065 \pm 1367.89	0.272 \pm 0.0745
Lineweaver-Burk	8,304.95 \pm 900.8	0.1528 \pm 0.09
Hanes-Woolf	11,111.11 \pm 1203.0	0.222 \pm 0.045

Tabla 1. Comparación de los valores de Km y Vmax de la toma de glucosa por las células en suspensión de embriones de maíz. Las determinaciones se realizan al menos por duplicado en 2 preparaciones distintas usando al menos 8 puntos para cada concentración de sustrato probada. Los datos están expresados como promedio \pm desviación estándar.

▶

Discusión.

Importancia de la obtención de un anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática de células vegetales.

Para generar los anticuerpos contra el transportador de hexosas para la membrana plasmática de plantas se utilizó la secuencia *LGWLPSEIFPLEIRSAC*, que es una secuencia conservada en todos los transportadores localizados en las membranas plasmáticas de plantas. La obtención de un anticuerpo específico contra el transportador de glucosa es una herramienta valiosa para determinar no sólo los niveles comparativos entre diferentes tejidos o preparaciones, sino también para determinar la localización tisular en ensayos de inmunohistoquímica.

Actualmente, la mayor parte de los estudios sobre la regulación de la expresión de alguna proteína en particular se realizan por la evaluación de la expresión de los niveles de transcrito y no van más allá en conocer si efectivamente los niveles de proteína también están modificados, por lo que el obtener anticuerpos específicos contra una proteína puede proveer información más cercana a lo que *in vivo* puede estar ocurriendo en la célula y como está regulación puede directamente impactar en la fisiología del organismo.

Lamentablemente la producción del anticuerpo y su purificación se llevó más del tiempo esperado, por lo que no se obtuvieron los datos sobre la distribución del transportador en el tejido, lo cual hubiera sido deseable. Sin embargo, sí se produjo una herramienta molecular específica, esto es, la detección exitosa de una banda de proteína que responde al anticuerpo y con un peso molecular predicho para las proteínas que transportan hexosas en plantas. Además la dilución de trabajo es muy buena 1:3000, por lo que la cantidad de suero obtenida que fue de alrededor de 20 mL será suficiente para hacer un gran número de ensayos por varios años.

Transporte de glucosa en tejido embrionario de maíz

En las células embrionarias de maíz se detectó la reacción al anticuerpo previo a la determinación de toma de glucosa por las células, ya que era altamente probable que sus células las contuvieran, según se predice en el modelo de la Figura 17.

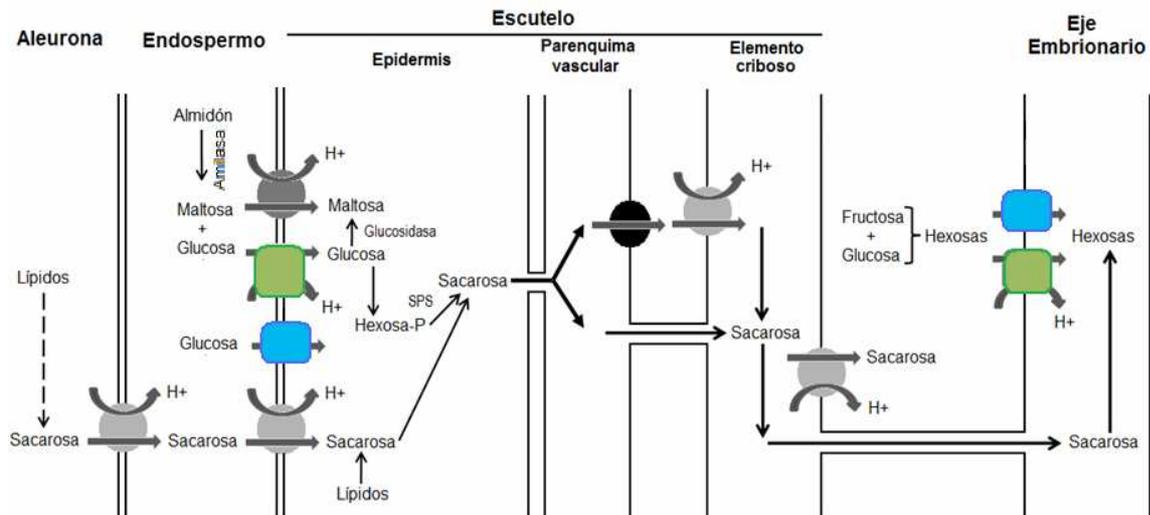


Figura 20. Modelo del transporte de glucosa y sacarosa en tejido embrionario de maíz. Modificado y adaptado de (Aoki et al. 2006;Gómez-Calderas 2008)

Transporte en el endospermo

Conocemos que el embrión de maíz se encuentra cubierto por el endospermo, una fuente rica de glucosa presente en el almidón que contiene. Por lo que se postula que el transporte de glucosa que ocurre posterior a la hidrólisis del almidón se movería de una zona concentrada –las células del endospermo- hacia el embrión (una zona menos concentrada), siendo el transporte difusivo altamente probable. Los datos de (Griffith, Jones, & Brenner 1987) apoyan esta propuesta; ellos demostraron que hay un gradiente de carbohidratos en dirección de la aleurona hacia el embrión del maíz de mayor a menor concentración de carbohidratos, con valores de 200 a 2 mM. Y que a concentraciones de 50 mM la toma de glucosa es la más alta. Además, la adición de CCCP, azida de sodio y el 2,4 dinitrofenol no inhiben la toma de los carbohidratos al endospermo, por lo que el transporte que proponen es del tipo difusivo. No obstante lo anterior, no dejamos de colocar en el modelo la posible



contribución del transporte activo, ya que (Felker, Thomas, & Crawford 1991) encontraron en protoplastos de endospermos de maíz que el transporte *de* sacarosa, glucosa y fructosa es bifásico y uno de los componentes del transporte se eliminaba al añadir p-cloromercuribencen sulfonato (PCMBs), reactivo que es muy usado para inhibir el transporte activo, si bien tenemos que considerar que el PCMBs es un compuesto que se une a las histidinas de todas las proteínas y que podría influir en otras proteínas que no son transportadores, pero que pudieran tener que ver con el uso de los carbohidratos.

Transporte en el embrión

En el embrión pueden ocurrir varios tipos de transporte de carbohidratos como: el transporte de sacarosa, maltosa y el de la glucosa, estos tres principalmente en los escutelos del embrión. Mientras que sumergido en el interior se encuentra el eje embrionario, el que sabemos no contiene transportador de sacarosa (Gómez-Calderas 2008; Greaves-Fernández 2001) por lo que el transporte de glucosa debería de ocurrir, sin embargo este podría ser de cualquiera de los dos tipos posibles de transporte, el pasivo o el activo de glucosa. Si consideramos que entre el tiempo 0 y las primeras horas de la germinación el eje embrionario presentaría la capacidad de uso de sus propias reservas de carbono, en forma de sacarosa, glucosa y aminoácidos (Martínez-Marcelo 2008; To et al. 2002), es posible que haya un incremento transitorio en la cantidad de carbono en la célula, por lo que la glucosa deberá acumularse en los ejes embrionarios mediante un transporte de tipo activo.

En este trabajo encontramos que en los embriones hay dos tipos de transporte, uno que contribuye en menor medida (cerca de 3 a 6 veces menos) y que se da a pH 7.0 y otro que ocurre a pH 5.0.

Si consideramos que el pH extracelular en las células vegetales se encuentra entre 4.5 a 5.5 y el pH intracelular se mantiene entre 7.5 y 7.8 y solo varía hasta 8.3 en condiciones extremas como lo son el mantener el tejido en un medio a pH 9.0 en presencia de 20 mM

▶

de amonio (Gerendas & Ratcliffe 2000), *in vivo* las células embrionarias del maíz presentarían un gradiente de pH de aproximadamente 2.0, el cual fue impuesto en este trabajo y bajo esta condición se obtuvo la mayor velocidad de transporte de glucosa. Ambos tipos de transporte, el transporte difusivo y el activo, estarían funcionando. Sin embargo, el transporte difusivo se dará toda vez que haya disponible glucosa que provenga del almidón, el cual se conoce que empieza a hidrolizarse al menos a contenidos de agua mayores de 60% (Wang , Jing , & Lin 2005), por lo que, en condiciones de inicio de la germinación el transporte que esencialmente estaría funcionando es el activo.

En maíz no se ha medido la toma de glucosa durante la germinación, pero hay estudios de transporte de hexosas en embriones en desarrollo de avena, en donde los autores encuentran que existen dos tipos de transporte. Un transporte sensible a desacoplantes y otro transporte de tipo difusible, similar a nuestros resultados (Cameron-Mills & Duffus 1979). En las semillas de *Vicia faba* (Weber et al. 1997) al igual que de Ricino (Williams et al. 2000) se midieron y caracterizaron los niveles de los transcritos para el putativo transportador de hexosas de la membrana plasmática de embriones en desarrollo, se concluyó que su secuencia correspondía al transportador de tipo activo caracterizado en *Arabidopsis thaliana*.

Recientemente se identificó a un transportador de glucosa en la vacuola de *Arabidopsis thaliana* (*AtVGT1*) que facilita el desarrollo de la flor y el inicio de la germinación, se presenta que la ausencia del gen reduce la capacidad de formar la flor y de la semilla de germinar (Aluri & Buttner 2007), sin embargo, no se le atribuye una actividad de transporte en la vacuola, por lo que es difícil determinar la fisiología del transportador en la célula. Las mediciones de actividad de toma de glucosa son importantes para dar certidumbre y soportar argumentos que se tiene sólo con los datos obtenidos a nivel de transcrito.

En este trabajo se midió la velocidad de toma de glucosa por las células del embrión y se obtuvieron sus constantes cinéticas, el valor de Km encontrado es de 0.27 mM. Los valores

▶

reportados para los transportadores de glucosa se han obtenido por la sobreexpresión de cada uno de los transportadores en sistemas heterólogos, sean ovocitos de *Xenopus* o células de levadura, varían entre 20 a 2,000 μM (Büttner y Sauer, 2001), entonces el valor de K_m encontrado está en el intervalo esperado para este tipo de transporte. Tampoco hay que olvidar que en las células en suspensión de maíz se encuentran todos los transportadores de hexosas y que el valor de toma de glucosa (V_{max}) así como de su K_m es un dato que puede ser la expresión del conjunto de transportadores presentes, aún cuando en la cinética de toma de glucosa encontramos que el comportamiento era típicamente Michaeliano, lo que habla de la posibilidad de tener un solo tipo de transportador o bien de que los transportadores presentes tienen valores de actividad de transporte y K_m similares. Lo anterior nos lleva a la reflexión de ¿por qué una misma célula cuenta con varias proteínas transportadoras si al final la expresión global de su transporte es la misma?, la respuesta posible es que siendo las plantas y en este caso las semillas, organismos sésiles sujetos a los cambios eventuales del ambiente, sean estos cambios los que induzcan que una forma particular de transportador cambie o que regule su actividad para responder y amortiguar los cambios metabólicos que deban darse al enfrentarse a la presencia de lluvias, a la escasez de agua, a la presencia de patógenos, a los cambios en la intensidad luminosa, a los periodos largos de almacenamiento, entre otros.

Por lo anterior, es importante medir bajo diferentes condiciones o tratamientos cómo se afecta la actividad de transporte de glucosa y si esto tiene un impacto fisiológico observable como es el adelanto o atraso de la germinación, la aceleración en el enverdecimiento de las hojas o bien los cambios en enzimas clave en el uso de la sacarosa y la glucosa, como son las invertasas y las hexocinasas. Mediciones que se pueden realizar ya que en este trabajo se obtuvieron las condiciones para la determinación de la toma de glucosa usando el método radiactivo y como material experimental a las células en suspensión de maíz.

▶

Conclusiones.

- Las células embrionarias de maíz presentan tanto transporte activo como difusional de glucosa.
- El transporte difusional es aproximadamente 4 a 6 veces menos que el transporte activo.
- El transporte activo presentó una Km de 0.272 ± 0.074 , mientras que la Vmax fue de $12,549 \pm 1367.89$.



Perspectivas.

Obtener las actividades de toma de glucosa a diferentes tiempos en la germinación del maíz mediante condiciones que modifiquen la germinación y la movilización o disponibilidad de carbono del tejido embrionario como son: la presencia de patógenos, los cambios en la concentración de hormonas (ABA y GA), así como en estrés hídrico u osmótico.

Referencias.

1. Aluri S. & Buttner M. (2007) Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 2537-2542.
2. Angelovici R. et al. (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* **15**, 211-218.
3. Aoki N. et al. (2006) Pathway of sugar transport in germinating wheat seeds. *Plant Physiol* **141**, 1255-1263.
4. Araujo d., V, Rincon A.M., & Padilla F. (2004) [Characterisation of *Dioscorea bulbifera* native starch]. *Arch.Latinoam.Nutr.* **54**, 241-245.
5. Bewley, J. & Black, M. (1978) Development, germination and growth. *Physiology and Biochemistry of Seeds in relation a Germination.*, pp. 28-33. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
6. Bewley, J. & Black, M. (1994) *Seeds, Physiology of Development and Germination.*, pp. 12-16. Ed. Plenum Press New York and London..
7. Bewley J.D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
8. Bonting, S.L. & Pont, J.J.H.H. (1981) *Membrane transport*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
9. Bush D.R. (1993a) Inhibitors of the proton-sucrose symport. *Arch.Biochem.Biophys.* **307**, 355-360.
10. Bush D.R. (1993b) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annu.Rev.PlantPhysiol.PlantMol.Biol.* **44**, 513-542.
11. Buttner M. (2007) The monosaccharide transporter(-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **581**, 2318-2324.
12. Buttner M. & Sauer N. (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim.Biophys.Acta* **1465**, 263-274.
13. Cameron-Mills V. & Duffus C.M. (1979) Hexose Transport in Isolated Immature Barley Embryos. *Annals of Botany* **44**, 485-494.
14. Coe E.H., Jr. (2001) The origins of maize genetics. *Nat.Rev.Genet.* **2**, 898-905.
15. Eisenman G., Aqvist J., & Alvarez O. (1991) Free energies underlying ion binding and transport in protein channels: free energy perturbation simulations of ion

binding and selectivity for valinomycin. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **87**, 2099-2109.

16. Eisenthal R. & Cornish-Bowden A. (1974) The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem.J.* **139**, 715-720.
17. Felker F.C., Thomas P.A., & Crawford C.G. (1991) Isolation and sugar uptake characteristics of protoplasts from maize endosperm suspension cultures. *Physiologia Plantarum* **81**, 83-88.
18. Garrdhan,P.J. & Rega,A.F. (1977) Transporte a través de la membrana celular., pp. 25-40. Universidad de Buenos Aires. Secretaría General de la OEA., Argentina. Washington DC.
19. Gerendas J. & Ratcliffe R.G. (2000) Intracellular pH regulation in maize root tips exposed to ammonium at high external pH. *J.Exp.Bot.* **51**, 207-219.
20. Gibson,J.A.B. (1980) Liquid Scintillation Counting, Recent Applications and Developments., pp. 153-172. New York.
21. Gómez-Calderas, A. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación del maíz. 2008. Facultad de Química, UNAM.
Ref Type: Thesis/Dissertation
22. Gott,B. et al. (2006) Biology of starch, pp. 35-45. Left Coast Press, California.
23. Greaves-Fernández, N. Estudio de la expresión de los RNAm del transportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. 2001. Facultad de Química, UNAM.
Ref Type: Thesis/Dissertation
24. Griffith S.M., Jones R.J., & Brenner M.L. (1987) In Vitro Sugar Transport in Zea mays L. Kernels : I. Characteristics of Sugar Absorption and Metabolism by Developing Maize Endosperm. *Plant Physiol* **84**, 467-471.
25. Hansen G. & Wright M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 226-231.
26. Hartmann,H. & Kester,D. (1998) Propagación de plantas, principios y prácticas., p. 760. Compañía Editorial Continental, México.
27. Herrera,J. et al. (2006) Germinación y crecimiento de la planta., pp. 18-28. Universidad de Costa Rica., Costa Rica.



-
28. Hoffmann E.A. & Nagypal I. (2006) Response reactions: equilibrium coupling. *J.Phys.Chem.B* **110**, 10581-10584.
 29. Ingle J., Beevers L., & Hageman R.H. (1964) Metabolic Changes Associated with the Germination of Corn. I. Changes in Weight and Metabolites and their Redistribution in the Embryo Axis, Scutellum, and Endosperm. *Plant Physiol* **39**, 735-740.
 30. Jiménez, V. M. J. Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L.) con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia. 99. 2006. Facultad de Ciencias, UNAM.

Ref Type: Thesis/Dissertation

31. Khan,A.A. (1982) The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination., p. 547. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
32. Kigel,J. & Galili,G. (1995) Seed development and germination, p. 853. Israel. New York.
33. Labouriau, L. Germinación de Semillas. 173. 1983. Secretaría General de Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

34. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
35. Lee A.G. & East J.M. (2001) What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem.J.* **356**, 665-683.
36. Lemoine R. (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim.Biophys.Acta* **1465**, 246-262.
37. Liddell,J.E. (2001) Antibody Purification by Ammonium Sulfate Precipitation, John Wiley & Sons, Ltd.
38. Luna-Löaiza, V. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. 2010. Facultad de Química, UNAM.

Ref Type: Thesis/Dissertation

39. Marger M.D. & Saier M.H., Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem.Sci.* **18**, 13-20.



-
40. Martínez-Marcelo, V. H. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. 2008. Facultad de Química, UNAM.

Ref Type: Thesis/Dissertation

41. Mayer, A.M. & Poljakof-Mayber, A. (1989) The germination of seeds., pp. 118-122. Rules Pergamon Press., Great Britain.
42. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., & Unwin N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.
43. Mostafa I.Y., Fallin E., & Fang S.C. (1970) Comparative studies of liquid scintillation counting of aqueous ¹⁴C samples. *Anal. Biochem.* **36**, 238-243.
44. Mueckler M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**, 713-725.
45. Neupert-Laves K. & Dobler M. (1975) The crystal structure of a K⁺ complex of valinomycin. *Helv. Chim. Acta* **58**, 432-442.
46. Orlov V.N. et al. (1994) Combination of the electrogenic ionophores, valinomycin and CCCP, can lead to non-electrogenic K⁺/H⁺ exchange on bilayer lipid membranes. *FEBS Lett.* **345**, 104-106.
47. Pao S.S., Paulsen I.T., & Saier M.H., Jr. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1-34.
48. Parent L. et al. (1992) Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J. Membr. Biol.* **125**, 49-62.
49. Pua, E.C. & Davey, M.R. (2009) Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives, Springer.
50. Ramírez-Sóstenes, J. Alteraciones en el metabolismo de carbono durante priming natural de semillas de *opuntia tomentosa*. 2008. Facultad de Química, UNAM.

Ref Type: Thesis/Dissertation

51. Rose L. & Jenkins A.T. (2007) The effect of the ionophore valinomycin on biomimetic solid supported lipid DPPTE/EPC membranes. *Bioelectrochemistry.* **70**, 387-393.
52. Sabelli P.A. & Larkins B.A. (2009) The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol* **149**, 14-26.
-



-
53. Sanchez-Nieto S. et al. (1998) Comparison of plasma membrane H⁺-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim.Biophys.Acta* **1414**, 175-187.
 54. Sauer N. (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett.* **581**, 2309-2317.
 55. Sinha A., Wetten A.C., & Caligari P.D.S. (2003) Optimisation of Protoplast Production in White Lupin. *Biologia Plantarum* **47**, 21-25.
 56. Srivastava L.M. (2002) Seed Germination, Mobilization of Food Reserves, and Seed Dormancy. In: *Plant Growth and Development* pp. 447-471. Academic Press, San Diego.
 57. To J.P., Reiter W.D., & Gibson S.I. (2002) Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC.Plant Biol.* **2**, 4.
 58. Walker D.J., Leigh R.A., & Miller A.J. (1996) Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 10510-10514.
 59. Wang X.F., Jing X.M., & Lin J. (2005) Starch Mobilization in Ultradried Seed of Maize (*Zea mays* L.) During Germination. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 443-451.
 60. Ward J.M. et al. (1998) Sucrose transport in higher plants. *Int.Rev.Cytol.* **178**, 41-71.
 61. Weber H. et al. (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* **9**, 895-908.
 62. Wigfield D.C. (1974) The determination of the radioactivity of ¹⁴C samples adsorbed on glass vials by direct liquid scintillation counting. *Anal.Biochem.* **59**, 11-15.
 63. Williams L.E., Lemoine R., & Sauer N. (2000) Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* **5**, 283-290.
 64. Zavala-Zendejas, S. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz: Patrón de la proteína y de la actividad. 2001. Facultad de Química, UNAM.

Ref Type: Thesis/Dissertation