



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**INFLUENCIA DE mTOR Y GLUCOSA SOBRE EL CICLO CELULAR
EN MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN**

TESIS

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

PRESENTA

JORGE MANUEL LÓPEZ LÓPEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
VOCAL:	DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
SECRETARIO:	DRA. AURORA LARA NÚÑEZ
1^{er} SUPLENTE:	DR. JOSÉ IGNACIO PÁRAMO RAMÍREZ
2^{do} SUPLENTE:	DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO 114, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Aurora Lara Núñez

SUSTENTANTE:

Jorge Manuel López López

Agradecimientos académicos

A los apoyos económicos otorgados en los proyectos:

CONACyT CB220661

PAIP ALN 5000-9130

PAIP JVR 5000-9124

PAPIIT ALN IA204817

PAPIIT JVR IN215316

Sin los cuales no habría sido posible el desarrollo experimental realizado en este trabajo de tesis.

Contenido

Lista de figuras	III
Lista de tablas	IV
Lista de abreviaturas	V
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 El maíz.....	2
2.1.1 Morfología del maíz.....	3
2.1.2 La semilla.....	3
2.2 Germinación.....	6
2.3 Ciclo celular.....	8
2.4 Ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas y otras proteínas importantes de la germinación.....	10
2.5 TOR.....	11
2.5.1 Inhibición de TOR.....	16
2.5.2 La regulación río arriba de TOR.....	18
2.6 S6K.....	19
2.7 E2F.....	20
2.8 Influencia de carbohidratos en la germinación.....	23
3. Antecedentes	24
3.1 La relación TOR-E2F.....	24
3.2 Proteínas a lo largo del ciclo celular y el papel de la glucosa.....	26
3.3 TOR en <i>Zea mays</i> L.....	27
4. Justificación	30
5. Hipótesis	30
6. Objetivos	31
7. Metodología	32
7.1 Material biológico.....	32
7.1.1 Ejes embrionarios de maíz.....	32
7.2 Métodos.....	32
7.2.1 Imbibición y tratamientos.....	32

7.2.2	Incorporación del AZD-8055	33
7.2.3	Extracción de proteínas	33
7.2.4	Cuantificación de proteínas	34
7.2.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	35
7.2.6	Western blot.....	36
8.	Resultados y discusión	38
8.1	Niveles de proteínas durante la germinación	38
8.2	Marcadores del ciclo celular seleccionados	41
	□ Abundancia proteica de CDKA (34 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	41
	□ Abundancia proteica de CYCD3 (37 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	43
	□ Abundancia proteica de CYCB1;2 (49 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	45
	□ Abundancia proteica de CYCD4 (42 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	47
	□ Abundancia proteica de CYCD5;3 (39 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	49
	□ Abundancia proteica de PCNA (29 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.....	51
8.3	Influencia de ZmTOR y glucosa sobre el ciclo celular del maíz durante la germinación.....	52
9.	Conclusiones	56
10.	Perspectivas	56
11.	Referencias	57

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Planta de maíz, <i>Zea mays</i> L.	2
Figura 2	Morfología de una semilla de maíz madura.	5
Figura 3	Las fases de la germinación y lo que acontece en cada una.	7
Figura 4	Fases del ciclo celular y algunas de las proteínas involucradas en su progresión, en eucariontes.	9
Figura 5	Mecanismo de acción de la rapamicina (Sirolimus) en células humanas.	12
Figura 6	Vista general de las funciones de TOR.	13
Figura 7	Estructura de mTOR y de los complejos mTORC en mamíferos.	15
Figura 8	Vías de señalización de TOR en mamíferos y en plantas	16
Figura 9	Estructura del AZD-8055.	17
Figura 10	El juego y los papeles de TOR y SnRK1.	18
Figura 11	La vía alterna TOR-E2F en plantas.	21
Figura 12	Vía de señalización de E2F y los genes bajo su regulación.	22
Figura 13	Los genes regulados por E2F también son regulados por TOR.	24
Figura 14	Los experimentos que demuestran la relación directa TOR-E2F.	25
Figura 15	Morfología de ejes embrionarios después de 72 horas de imbibición.	26
Figura 16	Abundancia proteica de marcadores de ciclo celular seleccionados.	27
Figura 17	Expresión del gen <i>ZmTOR</i> en diferentes medios de imbibición y tiempos.	28
Figura 18	Cortes histológicos. Patrón celular en el meristemo apical de la raíz a las 24 horas de imbibición en diferentes tratamientos.	29
Figura 19	Cuantificación de proteínas totales para todos los tratamientos y horas analizados.	39
Figura 20	Abundancia proteica de CDKA en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	41
Figura 21	Abundancia proteica de CYCD3 en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	43
Figura 22	Abundancia proteica de CYCB1;2 en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	45
Figura 23	Abundancia proteica de CYCD4 en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	47
Figura 24	Abundancia proteica de CYCD5;3 en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	49
Figura 25	Abundancia proteica de PCNA en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.	51

Lista de tablas

		Página
Tabla 1	Distribución ponderal de las principales partes de la semilla.	4
Tabla 2	Comparación entre los dos complejos de TOR en mamíferos.	14
Tabla 3	Inhibidores de TOR evaluados en <i>Arabidopsis thaliana</i> wild-type en el estudio de Montané y Menand, 2013.	17
Tabla 4	Composición del buffer de imbibición.	33
Tabla 5	Composición de los medios de imbibición usados en cada tratamiento.	33
Tabla 6	Composición del buffer de extracción de proteínas.	34
Tabla 7	Componentes de los geles concentrador y separador. Ejemplo para preparar dos geles.	35
Tabla 8	Componentes del buffer de carga.	35
Tabla 9	Composición del buffer de electrodos.	36
Tabla 10	Composición del buffer de transferencia.	36

Lista de abreviaturas

APS	Persulfato de amonio.
AZD-8055	(5-{2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolina-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol.
CDK	Cinasa dependiente de ciclina.
CYC	Ciclina.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
kDa	Kilodaltones.
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular.
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PBS	Amortiguador fosfato salino.
pRB	Proteína del retinoblastoma.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
RBR	Proteína relacionada al retinoblastoma.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TEMED	Tetrametiletilendiamina.
TOR	Blanco de la rapamicina.
Tris	Trisaminometano.

1. Resumen

Debido a la importancia económica, alimentaria y como herramienta de análisis que tiene el maíz, la germinación de esta planta fue utilizada como modelo de estudio en este trabajo. Como un proceso vital para todos los seres vivos, el ciclo celular se encuentra estrictamente regulado. En eucariontes, a lo largo de las fases de este ciclo intervienen en su avance diversos tipos de proteínas, y de su constante recambio depende su progresión. Entre ellas, quizá las más importantes y estudiadas sean las ciclinas (CYC) y las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs).

En el control central del ciclo celular está la proteína TOR. Entre sus funciones están actuar principalmente durante la transición G1/S regulando el avance del ciclo celular, estimulando la síntesis de DNA y proteínas *de novo*, esto último a través de su sustrato S6K, activando el catabolismo e inhibiendo el anabolismo y la autofagia, y recientemente se ha encontrado al factor transcripcional E2F como otro de sus sustratos directos. Por otro lado, trabajos previos en este grupo de investigación, han puesto de manifiesto el papel de la glucosa como un estimulador positivo del ciclo y la proliferación celular. Existe también una conexión entre las vías de TOR y glucosa, ya que se ha demostrado que ésta última es capaz de activar a TOR.

En el presente trabajo, en ejes embrionarios de maíz, se utilizó un inhibidor selectivo de la actividad de cinasa de TOR, AZD-8055, y glucosa, para evaluar la influencia de estos elementos en la germinación. Se observó que los niveles de proteína total, en presencia de AZD, disminuyeron en comparación a tratamientos control sin el inhibidor. Por otro lado, en presencia de glucosa, este efecto inhibitorio fue menos evidente. El perfil de abundancia proteica de CDKA, CYCD3, CYCD4 y CYCD5;3 se modificó diferencialmente en presencia del AZD-8055 y/o de glucosa, sugiriendo que estas proteínas se encuentran bajo la regulación de TOR. A pesar de que la glucosa y TOR son vistos como controladores positivos dentro del ciclo celular, la regulación de algunas de estas proteínas fue de forma negativa, lo que implicaría un control de estas también por medio de otras vías. Otras proteínas, como CYCB1;2 y PCNA, no se afectaron por la presencia del inhibidor.

2. Introducción

2.1 El maíz

El maíz (*Zea mays* L., figura 1) es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Perteneció a la familia de las Poáceas (gramíneas), tribu Maydeas. Es la única especie cultivada de este género y tiene gran importancia económica. El maíz cultivado es una planta completamente domesticada y el hombre y el maíz han



Figura 1. Planta de maíz, *Zea mays* L.

vivido y evolucionado juntos desde tiempos remotos. El maíz no crece en forma silvestre y no puede sobrevivir en la naturaleza, siendo completamente dependiente de los cuidados del hombre (FAO, 2015).

Hoy día el maíz es uno de los cultivos más importantes y relevantes en contextos tales como el alimenticio y el económico en todo el mundo. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total (FAO, 2015). Los maíces de México son de un interés especial debido al papel que han desempeñado en el desarrollo de las variedades modernas y altamente productivas de América (Trigo y Lechuga, 2002). El maíz ya cuenta con un largo historial como herramienta en la genética y la genómica y es considerado como uno de los sistemas de estudio en plantas más accesible. Con su genoma completamente secuenciado, una variedad de herramientas y métodos citogenéticos y marcadores fenotípicos característicos, con el maíz es posible estudiar cuestiones más allá de la biología de plantas común (Nannas y Dawe, 2015).

Ésta es una planta C4 (es decir, el producto inmediato de la fijación de CO₂ es una molécula de 4 carbonos) con una alta tasa de actividad fotosintética y fue el primer cereal en ser sometido a rápidas e importantes transformaciones tecnológicas en su forma de cultivo. El éxito de dichas aplicaciones ha estimulado una revolución

agrícola generalizada en muchas partes del mundo. A causa de la gran importancia del maíz como alimento básico de muchas personas, y de su alto valor nutritivo, sobre todo en lo que se refiere a las proteínas, se han hecho múltiples esfuerzos para mejorar el aprovechamiento biológico de sus nutrientes (Paliwal *et al.*, 2001).

Continuamente el genoma de esta planta se analiza y estudia, y por tratarse de una planta monoica aporta gran información, ya que posee una parte materna (femenina) y otra paterna (masculina) por lo que se pueden crear varias recombinaciones (cruces) y nuevos híbridos para el mercado (<https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/maiz>, consultado el 27/07/18).

2.1.1 Morfología del maíz

La planta de maíz es alta, con abundantes hojas y un sistema radicular fibroso, normalmente con un solo tallo que tiene hasta 30 hojas. Algunas veces se desarrollan una o dos yemas laterales en la axila de las hojas en la mitad superior de la planta; éstas terminan en una inflorescencia femenina, la cual se desarrolla en una mazorca cubierta por hojas que la envuelven (Paliwal *et al.*, 2001).

A continuación, se hará una descripción breve de las partes que conforman la semilla del maíz, ya que ésta, y más precisamente el eje embrionario, es la parte de interés en este estudio.

2.1.2 La semilla

La semilla, que contiene en el embrión al nuevo individuo de la especie en su forma mínima, está estructural y fisiológicamente dotada para desempeñar su papel de protección y dar origen de la nueva planta. Contiene abundantes recursos (proteínas, lípidos, carbohidratos) de reserva para asegurar la supervivencia de la plántula, hasta que ésta se establezca definitivamente como un organismo autótrofo y autosuficiente (Bewley, 1997). Con la entrada de agua a la semilla, se reanudan o comienzan los procesos implicados en el desarrollo de la planta. El desarrollo

exitoso de una semilla es un proceso complejo que requiere de la integración de varios factores genéticos, metabólicos y ambientales, que a su vez influyen en la progresión de las vías moleculares fisiológicas implicadas en el mismo (Dante *et al.*, 2014).

Un grano de maíz maduro está compuesto por tres principales partes: pericarpio (cáscara), embrión (germen) y endospermo. Otras clasificaciones incluyen al pedicelo y la aleurona. En la tabla 1 se presenta la composición de la semilla en términos de la masa de cada componente.

Tabla 1. Distribución ponderal de las principales partes de la semilla (FAO, 2015).

Estructura	Distribución ponderal (%)
Pericarpio	5-6
Endospermo	80-85
Embrión	10-12

En la figura 2 se presenta una semilla o grano maduro de maíz. El grano del maíz es botánicamente clasificado como una cariósida, un fruto con una sola semilla, a la que está unido el pericarpio. En la semilla se encuentra toda la información genética y maquinaria enzimática necesarias para lograr producir un nuevo individuo de la especie, así como materiales de reserva en grandes cantidades, asegurando la supervivencia de la misma.

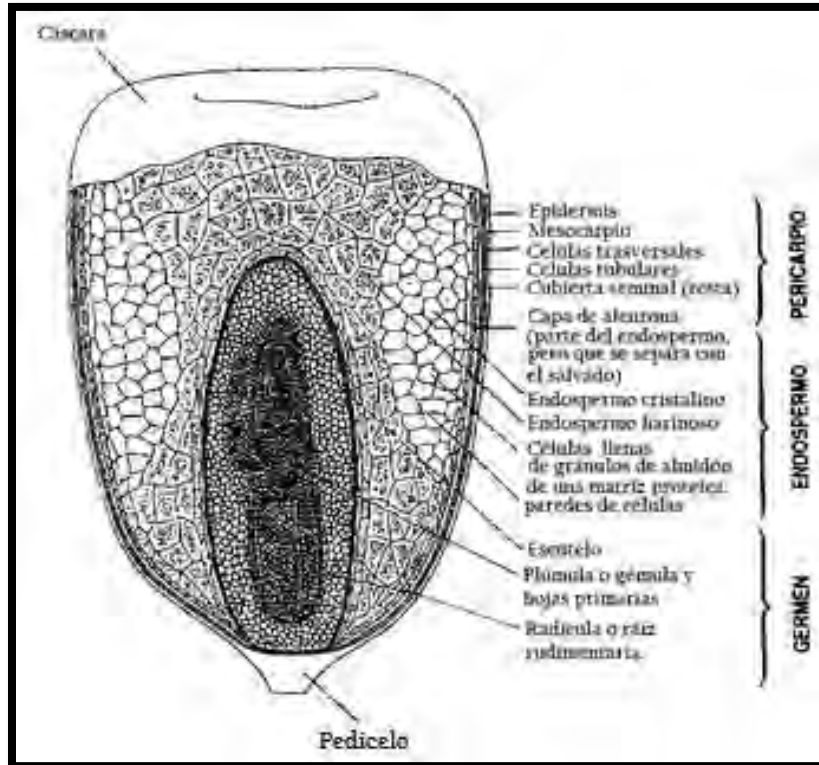


Figura 2. Morfología de una semilla de maíz madura. Hosney, 1991.

El pericarpio es la capa externa del grano. Está compuesta de células muertas y protege al grano resistiendo la entrada de agua y previniendo infecciones por microorganismos. A su vez, está dividido en más capas. El pedicelo se encuentra en la base del grano. Tiene un papel durante la maduración de la semilla, gracias a su capacidad de absorber agua y nutrientes. También será la parte encargada de unir al grano con la mazorca en etapas posteriores de desarrollo. En el embrión se encuentra la información genética, las enzimas y los componentes necesarios para la germinación, ya que aquí se halla el eje embrionario. El embrión tiene en comparación una mayor tasa de absorción de humedad, ya que se conecta al endospermo durante este proceso. Además, es rico en lípidos de interés económico (www.ogtr.gov.au). El endospermo comprende 80-84% del peso seco del grano y es la fuente de energía, debido a su alto contenido de almidón, y proteínas necesarias para la germinación. En el endospermo se encuentra una capa superficial de aleurona, que contiene lípidos, pigmentos, proteínas y gránulos de almidón.

2.2 Germinación

La germinación es una sucesión de eventos moleculares y fisiológicos que tiene como finalidad el desarrollo de una plántula a partir de una semilla quiescente. Este proceso involucra el despertar metabólico de la semilla latente y la reanudación de los procesos de desarrollo de la planta. Esto implica que las semillas ya cuentan con, o rápidamente adquieren, la memoria bioquímica del programa morfogénico que crea un nuevo individuo de la especie (Vázquez-Ramos y Sánchez-Jiménez, 2003). Adicionalmente se sabe que proteínas típicas del ciclo celular y que participan en la germinación, tales como ciclinas, CDKs, PCNA, entre otros, se encuentran ya en una cantidad basal en ejes embrionarios no embebidos (Lara-Núñez *et al.*, 2008).

En el estudio de las plantas existen diversas definiciones para el proceso de germinación. Desde el punto de vista agronómico la germinación ocurre en el momento en que la plántula emerge del suelo, mientras que en términos fisiológicos se entiende por germinación la protrusión de la radícula debido a la elongación del eje embrionario.

En este grupo de estudio se ha optado por una definición molecular, y se ha llegado a la convención de que la germinación consiste en los sucesos comprendidos entre la entrada de agua a la semilla, con la consecuente activación de su metabolismo (proceso llamado imbibición), y la exitosa conclusión de la primera ronda del ciclo celular (Vázquez-Ramos y Sánchez-Jiménez, 2003). Existen reportes que indican que hacia las 6 horas de imbibición se ha reactivado el ciclo celular, hacia las 12 horas las células se encuentran en la fase S, mientras que cerca de las 30 horas éstas se encuentran en la fase M (Reyes *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2000). La transición G1/S es el momento estudiado de la germinación en este trabajo, ya que aquí actúan las proteínas que forman parte del ciclo celular y que son de interés por parte de nuestro grupo, y ya se ha observado que estas proteínas presentan niveles variables a diferentes tiempos de imbibición analizados (Godínez-Palma *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2005; Lara-Núñez *et al.*, 2008).

En el año 2010 Nonogaki *et al.* describieron el proceso germinativo en tres fases, tal como se presenta en la figura 3.

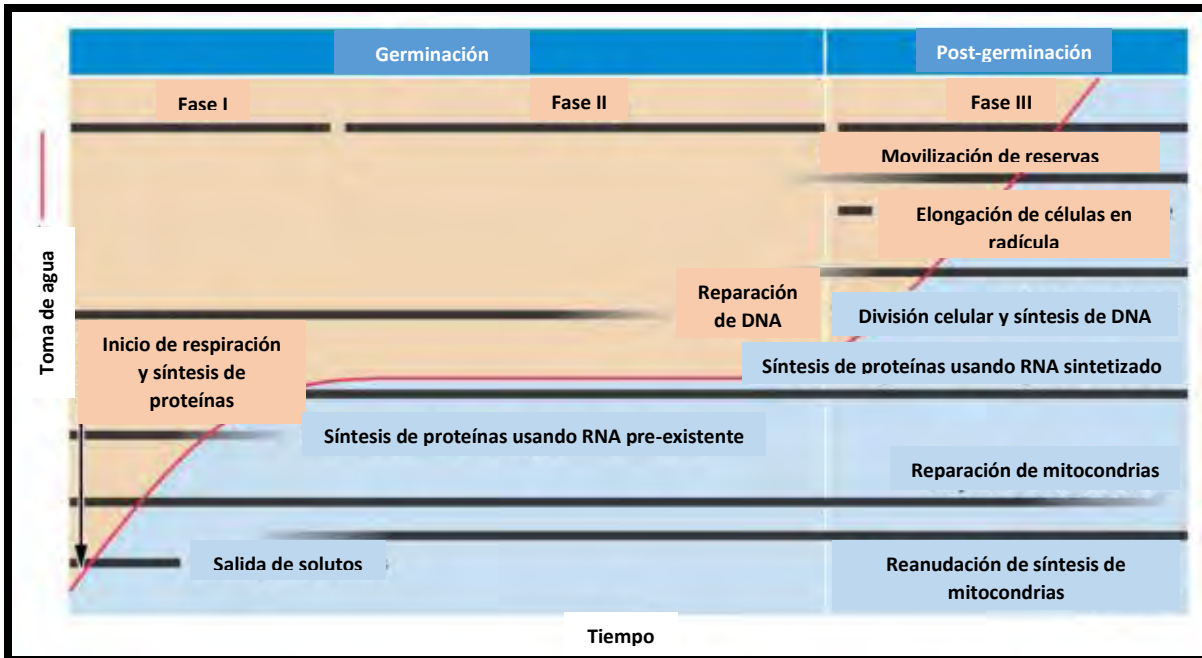


Figura 3. Las fases de la germinación y lo que acontece en cada una. Modificado de Nonogaki *et al.*, 2010.

Abreviaturas. DNA: ácido desoxirribonucleico.

Al inicio (primera fase) la semilla percibe e incorpora agua fácil y rápidamente debido a su baja concentración en el interior. La entrada de agua reactiva diversos procesos fisiológicos y bioquímicos. La actividad de las mitocondrias y de enzimas específicas comienzan a producir la energía necesaria para el crecimiento y desarrollo de la semilla. El ingreso de agua durante esta fase resulta en alteraciones estructurales temporales en las células, particularmente en las membranas, lo que ocasiona una rápida salida de solutos y metabolitos de baja masa molecular hacia el medio de imbibición. Eventualmente los componentes de las membranas regresan a su configuración estable, terminando con la salida de componentes de la célula. La forma en la que la célula repara estos daños inducidos por el fenómeno de desecación-rehidratación aún se desconoce. Algunas vías metabólicas glicolíticas y oxidativas de pentosas fosfato, así como algunas enzimas del ciclo de Krebs son activadas también en esta fase (Bewley, 1997).

En la segunda fase la toma de agua se vuelve constante. Es aquí cuando comienzan a actuar las hormonas. Éstas son sustancias químicas producidas por la planta, que en concentraciones bajas, influyen en el desarrollo de varios procesos fisiológicos (Davies, 2010). El ácido giberélico (GA) es la hormona encargada de hacer que la germinación progrese. Por el otro lado se encuentra al ácido abscísico (ABA), que cumple con la función antagonista de retrasar la germinación y mantener el estado dormante de la semilla (en las especies que presenten dormancia). El equilibrio entre la actividad de ambas hormonas es fundamental para el establecimiento y progreso de la germinación. Otras hormonas importantes para el desarrollo de la planta son las auxinas y las citocininas. En esta fase ocurre la protrusión de la radícula, hecho que para varios investigadores marca el fin de la germinación.

En la última fase, también llamada post-germinación, vuelve a haber abundante entrada de agua, además de intensa división y crecimiento celular y movilización de moléculas de reserva energética. Existe también crecimiento de la plántula debido a estos hechos (Nonogaki *et al*, 2010).

2.3 Ciclo celular

La formación exitosa de un nuevo individuo de una especie es resultado de una serie de procesos moleculares estrictamente regulados, llevados a cabo por las células de dicho individuo, en la cual éstas terminan por dividirse en dos células genéticamente idénticas.

El ciclo celular es este conjunto de procesos controlados cuya finalidad es la duplicación y segregación de toda la información genética en dos células idénticas. En organismos eucariontes (entre ellos, *Zea mays* L.) el ciclo celular está dividido típicamente en cuatro fases: G1, S, G2 y M.

En la figura 4 se presenta un esquema del ciclo celular en eucariontes, incluidas varias de sus proteínas típicas. G1 es una fase de actividad bioquímica intensa. La maquinaria enzimática despierta y comienza a actuar. Los organelos y diversas

estructuras citoplasmáticas como microtúbulos, microfilamentos de actina y ribosomas aumentan en número y como consecuencia la célula aumenta de tamaño. Ésta es una etapa de preparación y percepción del ambiente exterior para

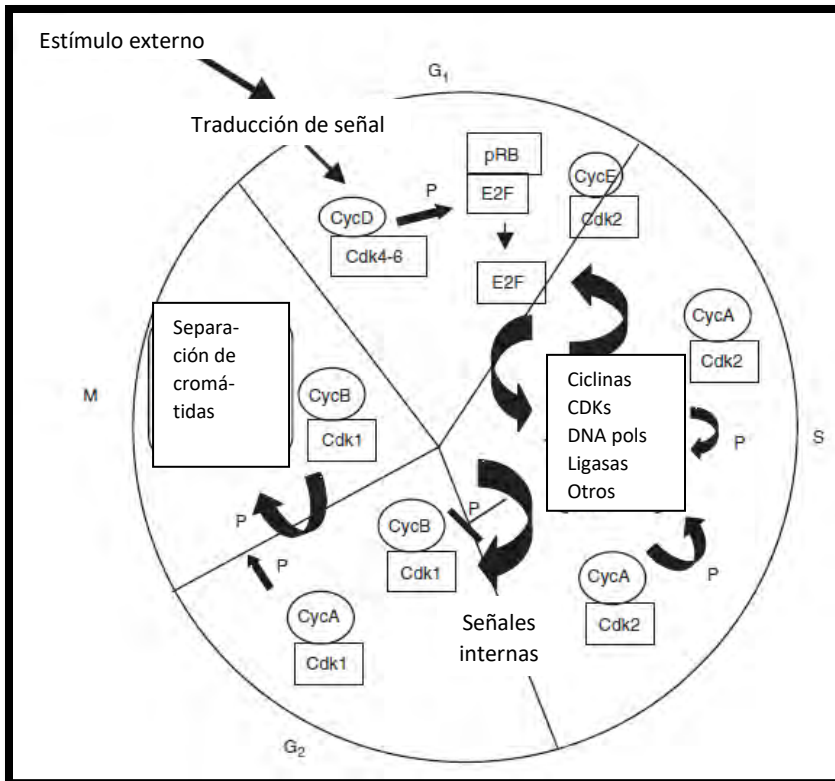


Figura 4. Fases del ciclo celular y algunas de las proteínas involucradas en su progresión, en eucariotes. Modificado de Vázquez-Ramos y Sánchez-Jiménez, 2003. Abreviaturas. Cyc: ciclina. CDK: cinasa dependiente de ciclina. pRB: proteína del retinoblastoma.

la posterior replicación del DNA (Lomanto, 2003). Las células en G1 pueden detener su avance en el ciclo celular y entrar en una fase llamada G0. En esta fase de reposo las células no tendrán actividad replicativa ni crecimiento. Es un estado de latencia inducido por condiciones de desarrollo no favorables (falta de nutrientes, fallos en

el funcionamiento de la célula) que podría llegar a ser por tiempo indefinido.

Durante la fase S (síntesis) del ciclo se lleva a cabo la replicación del DNA. Una vez que se tienen los recursos enzimáticos y energéticos necesarios el DNA es duplicado para su futura segregación en dos células nuevas.

La fase G2 consiste en la preparación de la célula para dividirse, completando la síntesis de los organelos y estructuras que conformarán las células producidas. En esta etapa también se encuentra un importante *checkpoint* o punto de control, en el

que se evalúa la integridad del DNA sintetizado en la fase anterior, y de haber errores, se corrigen.

En la fase M (mitosis) tiene lugar la división celular. Los cromosomas, con idéntica información genética, son repartidos equitativamente entre las dos células hijas producidas. Al terminar la división, las células regresan a la fase G1, completando el ciclo. Cada una de las fases procede en orden y una fase debe ser completada antes de que la siguiente pueda comenzar. Por esta razón es esencial que cada una de las fases del ciclo celular estén altamente reguladas y coordinadas. Esta regulación ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo y se han definido tres importantes puntos de control a lo largo el ciclo: uno en cada una de las fases G1 y G2 y otro antes de la anafase, en la fase M.

2.4 Ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas y otras proteínas importantes de la germinación

El ciclo celular está controlado por la actividad de complejos cinasa formados por una proteína llamada ciclina (cyclin, CYC) y una cinasa dependiente de ciclina (cyclin-dependent kinase, CDK). En diversos modelos animales se ha observado que la estimulación de la proliferación celular por diferentes medios conduce a la activación de un complejo ciclina-CDK. Este complejo, formado por una ciclina tipo D y CDK4 o CDK6 parece ser la entrada molecular al ciclo celular (Vázquez-Ramos y Sánchez-Jiménez, 2003).

Al tiempo que es necesario avanzar a la transición G1/S, los complejos CDK asociados a una ciclina D fosforilan e inhiben la actividad de la proteína pRb, la cual actúa como represor de dos factores transcripcionales. Esto lleva a la liberación de E2F y DP, que son dichos factores transcripcionales y que promoverán la expresión de genes necesarios para el establecimiento de la fase S del ciclo (Polit *et al.*, 2012).

En plantas se han encontrado homólogos de la mayoría de las proteínas clave en la vía de inicio del ciclo celular y la vía de Rb, así como genes blanco de E2F. Éstos presentan grandes similitudes en cuanto a su estructura y funciones. El crecimiento de plantas, comparado con el de animales, se ve más afectado por el ambiente externo en el que se encuentran, sugiriendo que las plantas han desarrollado mecanismos que dependen de este ambiente para controlar su división celular y crecimiento en general. La mayoría de la actividad mitótica en plantas se localiza en pequeños grupos de células llamados meristemos, que ya están presentes en los embriones y se encuentran activos durante la mayor parte del ciclo de vida de la planta (den Boer, 2010).

Otra proteína involucrada en el ciclo celular que ha sido ampliamente estudiada es el antígeno nuclear de proliferación celular (proliferating cell nuclear antigen, PCNA). En eucariontes superiores, el gen y la proteína de PCNA se encuentran altamente conservados y la proteína se ha utilizado como un marcador de la fase S. Puede encontrarse asociado a ciclinas D y en complejos de 131 a 163 kDa. Estos complejos cambian su masa durante la germinación y se ha visto que hacia el inicio de la fase S predomina un complejo de 100 kDa, probablemente PCNA en su forma homotrimérica. La principal función de PCNA en la fase S es actuar asociada a la polimerasa δ para darle procesividad a la replicación del DNA (Sánchez-Jiménez, 2002).

2.5 TOR

En 1975, un texto publicado por Vézina y colaboradores describió el descubrimiento en la Isla de Pascua, Chile, de un nuevo microorganismo perteneciente a la familia de los estreptomicetos (bacterias filamentosas): *Streptomyces hygroscopicus*. En los estudios realizados con este microorganismo, se puso de manifiesto su capacidad para inhibir el crecimiento de una levadura, *Candida albicans*, y dos hongos dermatofitos, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton granulosum*. El compuesto responsable de dicha actividad biológica fue identificado posteriormente,

y se le dio el nombre de rapamicina. Tiempo después la producción de cepas mutantes resistentes a las propiedades inhibitorias del crecimiento de la rapamicina llevaron al descubrimiento de su proteína blanco, TOR (Target of Rapamycin; Betz, 2013).

Años más tarde la rapamicina se usaría también como un fármaco inmunosupresor. Conocida como *sirolimus* en el ámbito clínico, su mecanismo de acción consiste en unirse a una proteína citosólica llamada FKBP12. Esta proteína media la interacción entre la rapamicina y TOR. En levaduras y mamíferos la rapamicina y FKBP12 forman un complejo heterólogo y éste se une de forma específica al dominio FRB de TOR, inhibiendo la actividad de cinasa de esta última, como se observa en la figura 5 (Deng *et al.*, 2016).

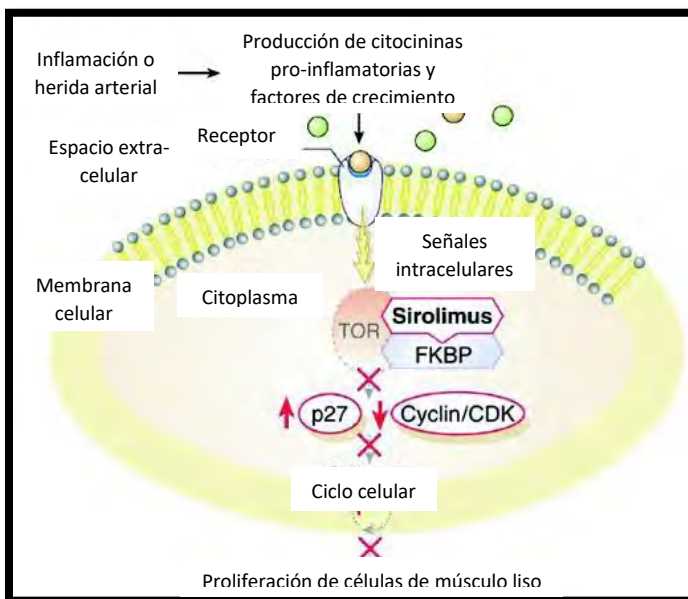


Figura 5. Mecanismo de acción de la rapamicina (Sirolimus) en células humanas. Modificado de Rexin *et al.*, 2015.

Abreviaturas. Cyc: ciclina. CDK: cinasa dependiente de ciclina. TOR: blanco de la rapamicina.

Al continuar las investigaciones con esta proteína se descubrió que TOR era un regulador del crecimiento celular altamente conservado (Rexin *et al.*, 2015). Fue así como esta proteína comenzó a tomar relevancia en el ámbito de la investigación, y desde entonces ha sido el objeto de estudio de interés principalmente en mamíferos. Su contraparte en plantas ha sido menos estudiada, pero existe ya evidencia de su participación igualmente

relevante en el ciclo celular y en procesos vitales para la planta (Rexin *et al.*, 2015).

TOR es una proteína de aproximadamente 280 kDa. Es una cinasa de tipo serina/treonina que pertenece a la vía de señalización fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt

(PI3K/Akt) en humanos, y su papel es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular (Pinzón *et al.*, 2009). Se ha encontrado que la vía de TOR está altamente conservada en organismos eucariontes, desde levaduras hasta mamíferos y plantas.

Esta proteína es un regulador maestro de diversos procesos celulares, como se observa en la figura 6. TOR está encargada, entre otras cosas, de:

- Controlar el progreso del ciclo celular, en especial en la transición G1/S.
- Estimular la división celular en zonas proliferativas de la semilla.
- Promover la activación de genes necesarios para entrar a la fase S.
- Estimular la síntesis de proteínas y DNA *de novo*.
- Activar el catabolismo (producción de energía) y reprimir el anabolismo (consumo de energía).
- Inhibir la autofagia y la senescencia de la semilla.

Que la actividad de TOR esté conservada, junto con algunos de sus elementos asociados, sugiere la existencia de una ruta regulatoria antigua que se ha ido adaptando para coordinar una amplia variedad de estrategias de crecimiento celular y a nivel de un organismo (Rexin *et al.*, 2015).

En mamíferos TOR forma dos complejos cinasa conservados pero estructuralmente distintos, denominados mTORC1 y mTORC2. Cada complejo fosforila diferentes conjuntos de sustratos para regular el crecimiento celular

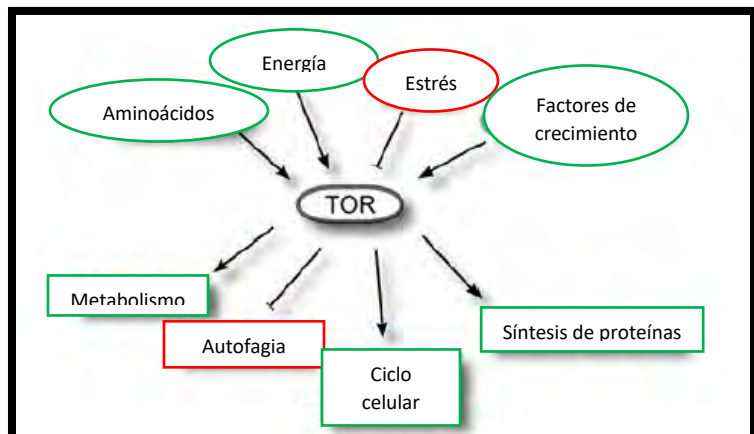


Figura 6. Vista general de las funciones de TOR. Modificado de Rexin *et al.*, 2015. Abreviaturas. TOR: blanco de la rapamicina.

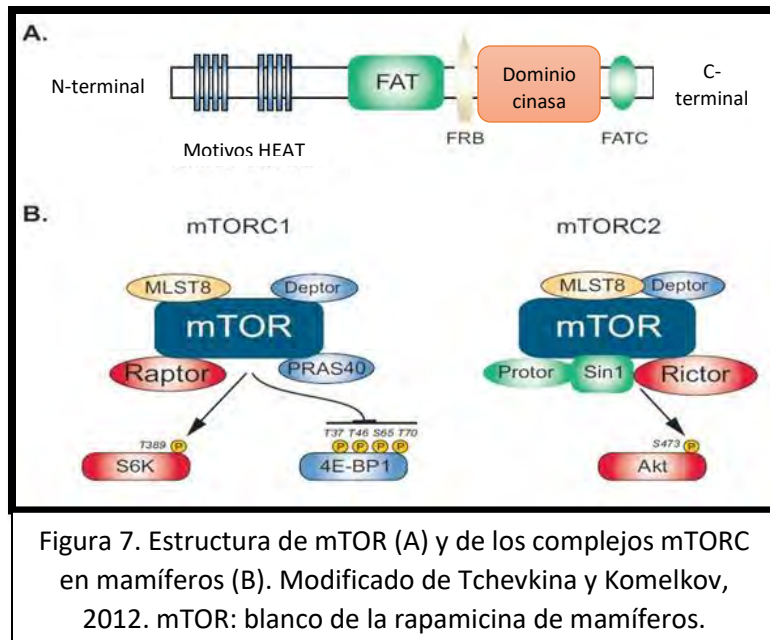
(Betz, 2013). A su vez, los dos complejos formados en levaduras son llamados TORC1 y TORC2. En la siguiente tabla se presentan las diferentes proteínas accesorias de cada uno de los complejos de TOR en mamíferos, así como algunas

de sus funciones observadas. Las características y funciones del complejo mTORC1 son equivalentes al complejo TOR de plantas.

Tabla 2. Comparación entre los dos complejos de TOR en mamíferos

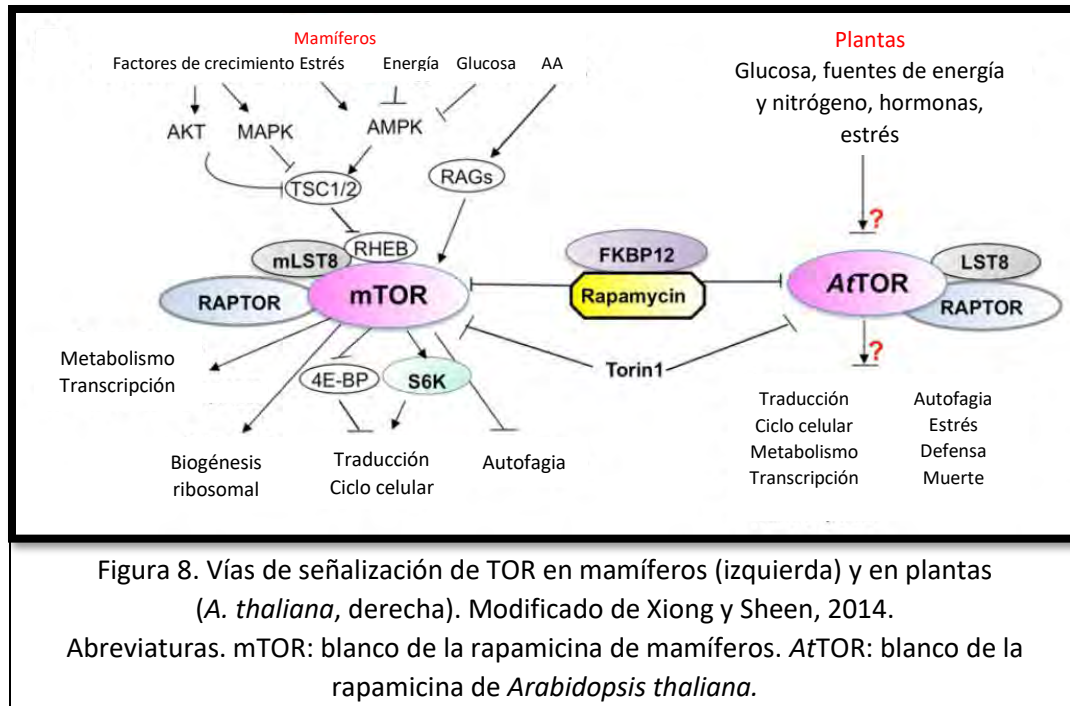
mTORC1		mTORC2	
Responde a aminoácidos, glucosa, insulina y factores de crecimiento para controlar la proliferación y el crecimiento celular, promoviendo procesos anabólicos (transcripción, traducción, biogénesis de ribosomas) y regulando negativamente la autofagia (Xiong y Sheen, 2014).		Controla el crecimiento celular regulando la estructura y polaridad del citoesqueleto, la glucólisis, glucogénesis, lipogénesis y gluconeogénesis vía la fosforilación de Akt y la apoptosis (Xiong y Sheen, 2014).	
Proteínas accesorias en común			
mTOR (mechanistic/mammalian target of rapamycin)	Es la subunidad cinasa, responsable de la actividad del complejo. Una estructura más detallada es presentada más adelante.		
mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein8)	En <i>Arabidopsis</i> , las plantas deficientes de LST8 son viables, pero crecen lentamente, son más quebradizas y presentan alteraciones en sus perfiles de metabolitos (Rexin <i>et al.</i> , 2015).		
Proteínas accesorias particulares			
RAPTOR (regulatory associate protein of TOR)	La unión de RAPTOR a mTOR es necesaria para que ésta fosforile a 4EBP1 (Hara <i>et al.</i> , 2002) y a S6K1 <i>in vitro</i> , ya que ambas contienen un motivo de señalización por TOR que media su interacción con RAPTOR y su consecuente fosforilación (Foster y Fingar, 2010).	RICTOR (rapamycin-insensitive companion of TOR)	El <i>knockdown</i> de <i>Rictor</i> resulta en la pérdida de la polimerización de la actina y propagación celular. En complejo con mTOR fosforila a Akt, PKC y las proteínas de adhesión focal (Foster y Fingar, 2010).

Estructuralmente mTOR (subunidad, figura 7) consta de 2549 aminoácidos y en la región N-terminal contiene hasta 20 motivos HEAT repetidos en tándem. Estos motivos están presentes en muchas proteínas y se sugiere que la estructura superhelicoidal que forman podría participar en interacciones proteína-proteína. Seguidamente, se encuentra un dominio FAT y un dominio FRB, éste último siendo el sitio de unión del complejo inhibitorio rapamicina-FKBP12. Hacia la región C-terminal se encuentra el dominio de cinasa de la proteína, seguido por el dominio FATC. Los dominios FAT y FATC se encuentran siempre en asociación y se ha hipotetizado que las interacciones entre ambos podrían contribuir a la actividad de cinasa del complejo mediante mecanismos aun no descritos (Tchevkina y Komelkov, 2012).



En plantas se ha observado que la asociación de TOR con sus proteínas accesorias difiere a aquello observado en levaduras y mamíferos. A pesar de la importancia de TORC2 en mamíferos y levaduras no se ha encontrado un complejo equivalente a éste en plantas, ni siquiera a nivel de bases de datos de genomas. Su ausencia en plantas podría estar relacionada al desarrollo de estrategias alternativas para coordinar el crecimiento celular, ya que en plantas existen diferentes dinámicas en la formación del citoesqueleto y la expansión celular se ve influenciada por el fenómeno de turgencia (Rexin *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado la existencia de proteínas equivalentes de mTORC1 en plantas, como RAPTOR (Deprost *et al.*, 2004), así como su interacción con blancos conservados río abajo, como la proteína S6K (Mahfouz *et al.*, 2006). En la figura 8 se presenta una comparación de las vías de señalización de TOR en mamíferos y plantas (en

específico para este caso, *A. thaliana*). Se pueden observar elementos en común, tales como los activadores y represores de la vía, algunas proteínas accesorias del complejo proteico y los procesos que TOR puede controlar.



A pesar de que se ha visto que mTOR entra al núcleo para regular directamente la transcripción, la mayoría de las funciones de este complejo son mediadas a través de sus bien descritos sustratos, S6K y 4E-BP1 (Xiong y Sheen, 2014).

2.5.1 Inhibición de TOR

Anteriormente se explicó que TOR en animales y levaduras se inhibe eficazmente por la rapamicina, gracias a la capacidad de ésta de formar un complejo con las proteínas citosólicas FKBP12 y en conjunto unirse al complejo de TOR, reprimiendo la actividad de cinasa. Sin embargo, el uso de la rapamicina en plantas ha sido poco satisfactorio (Ren *et al.*, 2012). Estudios en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la poca o nula sensibilidad por parte de estas plantas a la rapamicina. Debido a la necesidad de estudiar la contraparte de TOR en plantas, inhibidores competitivos del sitio activo de TOR (se unen al sitio de unión de ATP) fueron desarrollados y

evaluados, proporcionando mejores resultados. En la tabla 5 se presentan dichos inhibidores:

Tabla 3. Inhibidores de TOR evaluados en *Arabidopsis thaliana* wild-type en el estudio de Montané y Menand, 2013.

Primera generación	Segunda generación
KU63794	AZD-8055
Torin1	Torin2
WYE-354	WYE-132

Debe mencionarse que los residuos de aminoácidos importantes para la unión del ATP en TOR están altamente conservados entre mamíferos y plantas (Montané y Menand, 2013). En este mismo estudio en *Arabidopsis*, los llamados asTORis (active-site TOR inhibitors) demostraron inhibir, de manera dosis-dependiente, el crecimiento general de la planta. También se observó una diferenciación temprana de los meristemas, hecho que provocó la reducción del tamaño de estas zonas y el acortamiento de células epidérmicas y pelos radiculares. La expresión del gen *AtTOR* también se vio abatida de manera dosis-dependiente. Además, el efecto inhibitorio en el crecimiento fue observado también en diferentes angiospermas, como *Oryza sativa* (arroz), *Panicum miliaceum* (mijo), *Lotus japonicus* y *Nicotiana benthamiana*.

Los inhibidores de segunda generación fueron aproximadamente diez veces más eficientes al inhibir el crecimiento que los de primera generación, resultados consistentes con lo reportado para células de mamíferos. AZD-8055, el inhibidor de segunda generación resaltado en la tabla 3 y cuya estructura se observa en la figura 9, fue el inhibidor utilizado en este estudio.

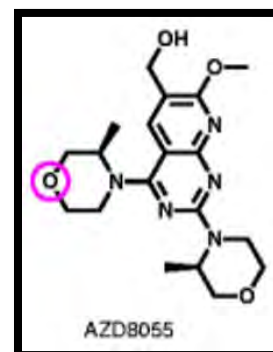


Figura 9.
Estructura del
AZD-8055.
Feldman y Shokat,
2010.

2.5.2 La regulación río arriba de TOR

La habilidad de las plantas para continuamente percibir los niveles de nutrientes en sus diferentes tejidos y estados de desarrollo es vital para su supervivencia. Por lo

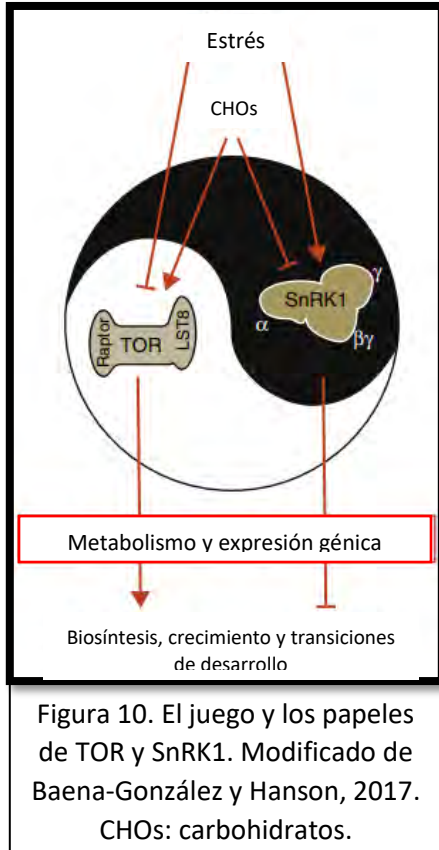


Figura 10. El juego y los papeles de TOR y SnRK1. Modificado de Baena-González y Hanson, 2017. CHO: carbohidratos.

tanto, existen en eucariontes dos importantes reguladores que responden a los cambios de energía y nutrientes en la célula: las cinasas TOR y SnRK1. El juego entre ambos reguladores centrales dirige el crecimiento y desarrollo celular dependiente del estado energético (Lastdrager *et al.*, 2014).

En la figura 10 está representado el juego entre ambas cinasas, y lo que significa cada una para la planta en términos de su desarrollo. La cinasa SNF1 fue descrita en un inicio en levaduras como una cinasa serina/treonina involucrada en la adaptación energética a la falta de glucosa, promoviendo la utilización de fuentes de carbono alternas (Robaglia *et al.*, 2012). Los ortólogos de

esta proteína, que presentan un marcado nivel de conservación, se encontraron después en otros eucariontes: SnRK1 en plantas y AMPK en animales. Las proteínas de su estructura heterotrimérica, que consiste en una subunidad catalítica α (alfa) y dos subunidades regulatorias β (beta) y γ (gamma) se encuentran codificadas en varios genes (Wurzinger *et al.*, 2018).

Contrario a TOR, SnRK1 se activa en respuesta a un estado nutrimental y energético bajo o desfavorable (estrés), promoviendo la activación del catabolismo y reprimiendo procesos que consumen energía. Ya se sabe también que TOR es un sustrato directo de SnRK1, y que es inhibido al ser fosforilado. En la contraparte en mamíferos, se ha comprobado que AMPK fosforila un residuo conservado de Ser en la subunidad RAPTOR (Robaglia *et al.*, 2012).

La señalización de SnRK1 es bloqueada mediante azúcares, entre ellas la glucosa-6-fosfato (G6P), y se sugiere también la participación de la trehalosa-6-fosfato, T6P (Baena-González y Hanson, 2017). El camino en esta materia aun no es muy claro, pero en años recientes, con el desarrollo de nuevos inhibidores de la actividad de cinasa de TOR efectivos en plantas, es posible estudiar más a fondo a este regulador.

2.6 S6K

La traducción de proteínas es un proceso que consume energía y por lo tanto debe ser bien regulado, tanto a nivel celular como de organismo, para aprovechar correctamente los recursos nutrimentales. La vía de señalización de TOR, evolutivamente conservada, actúa como un sensor de nutrientes que controla la capacidad de crecimiento de las células mediante la regulación de la síntesis de proteínas (Henriques *et al.*, 2013). A través de diversos estudios se ha establecido una relación entre TOR y la traducción de proteínas. La inactivación de TOR, ya sea a nivel de gen o usando un inhibidor de su actividad, implica una disminución en la abundancia de polisomas (Dobrenel, 2016). TOR controla la síntesis de proteínas a diferentes niveles, actuando durante la biogénesis ribosomal, la acumulación de polisomas y otros procesos de traducción de proteínas (Xiong y Sheen, 2014).

Probablemente el sustrato más estudiado de TOR es la cinasa S6K (S6 kinase), que cuando está fosforilada, se encuentra en su estado activo. De esta manera, la función más conocida de esta cinasa es promover la síntesis de proteínas *de novo*.

En mamíferos y plantas existe la proteína ribosomal S6, RPS6 (ribosomal protein S6) (Tchevkina y Komelkov, 2012). La sensibilidad de la fosforilación de RPS6 a la rapamicina sugirió que S6K era quien fosforilaba a esta proteína, ya que la activación de ésta última depende de TOR. RPS6 es un componente clave de la subunidad ribosomal 40S y actúa pareando tRNA a mRNA y reclutando factores de inicio de traducción, y por lo tanto, regulando la traducción de proteínas (Ren *et al.*,

2012). El estado de fosforilación de esta proteína es un reflejo de la actividad de S6K y se ha usado recientemente como un marcador o indicador de proliferación celular (Kim *et al.*, 2014).

En la actualidad varios estudios en plantas han confirmado que la inhibición química o el *knockdown* de genes de proteínas accesorias de TOR causa una disminución en el nivel de fosforilación de S6K en sitios equivalentes a sus contrapartes en mamíferos. Más evidencia de la fosforilación de S6K dependiente de TOR se encuentra en estudios que demuestran que existe interacción física entre las proteínas TOR, Raptor y S6K en ensayos de sobreexpresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (Rexin *et al.*, 2015).

En mamíferos existen dos S6K: S6K1 y S6K2, con un 70% de homología (Reinhard *et al.*, 1992). Además, se ha visto que S6K es activada de forma dependiente de TOR mediante fosforilaciones en Thr389 y Thr229 (Ma y Blenis, 2009). Por otro lado, en plantas, en el año 2013 Xiong y colaboradores demostraron que el genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes S6K, y que las proteínas para las que codifican son fosforiladas directamente por TOR. En maíz, el grupo de Sánchez-Jiménez (Reyes de la Cruz *et al.*, 2004; Garrocho-Villegas 2013) ha caracterizado y estudiado al ortólogo ZmS6K, analizando su secuencia y grado de conservación, su estado de fosforilación en respuesta a diferentes factores, entre otros aspectos. Por lo tanto, la proteína S6K y su estado de fosforilación han sido utilizados como marcadores de la actividad de cinasa de TOR (Xiong *et al.*, 2013; Garrocho-Villegas *et al.*, 2013).

2.7 E2F

La función regulada y coordinada de genes específicos del ciclo celular es esencial para el avance del ciclo y la división celular. Entre los reguladores del ciclo celular se encuentra E2F (Shen, 2002). La familia de factores transcripcionales E2F son efectores que se encuentran en la cascada de señalización de la proteína del retinoblastoma (Rb) y se cree que tienen un papel fundamental en el control de la

división celular. En humanos, Rb se identificó como un supresor tumoral que controlaba varias etapas de la proliferación celular a través de su interacción con miembros de la familia de factores transcripcionales E2F. En un principio se pensó que Rb se encontraba exclusivamente en animales, pero ahora se sabe que las plantas poseen homólogos, llamados RBR (retinoblastoma-related). De hecho, parece que la vía Rb-E2F fue una adquisición evolutivamente temprana en eucariontes (Desvoyes *et al.*, 2014).

Los genes regulados por E2F incluyen genes involucrados en la progresión del ciclo celular, síntesis de DNA, así como su replicación y reparación. El enfoque de E2F ha sido ver a este componente como un regulador positivo para el progreso del ciclo. Sin embargo, en estudios recientes las actividades atribuidas a E2F han sido diversas. E2F puede servir como activador o como represor de la transcripción. La aplicación de nuevas herramientas experimentales y la bioinformática ha expandido el número y la naturaleza de los genes identificados como potencialmente regulados por E2F, varios de los cuales están no solo implicados en el control tradicional de la transición G1/S, sino que llevan a cabo funciones en otros procesos celulares tales como reparación y recombinación de DNA, apoptosis, diferenciación y desarrollo celular, así como genes con función aún desconocida. Sin embargo, la función más ampliamente estudiada y comprendida de E2F es la de regular la transición G1/S y la entrada a la fase S durante el ciclo celular (Dimova y Dyson, 2005).

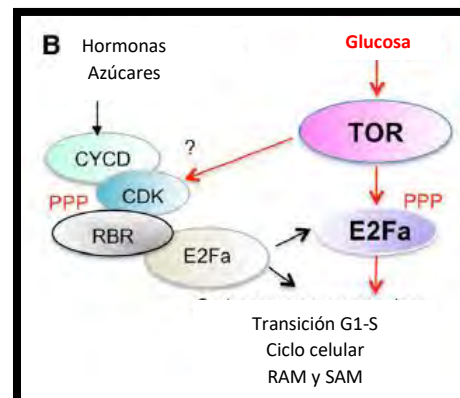


Figura 11. La vía alterna TOR-E2F en plantas. Modificado de Xiong, 2014.

Abreviaturas. Cyc: ciclina. CDK: cinasa dependiente de ciclina.

RBR: proteína relacionada al retinoblastoma.

Recientemente se ha encontrado una conexión entre las vías activadas por la glucosa, TOR y E2F. Como se mencionó anteriormente, la ruta clásica en mamíferos de la liberación y consecuente activación del factor transcripcional E2F

consiste en la formación y activación del complejo formado por una ciclina D y CDK4/6, el cual fosforila e inhibe a la proteína pRB. Sin embargo, un estudio reciente (Xiong *et al.*, 2013) reveló que TOR es capaz de fosforilar y activar directamente a E2F, sugiriendo una nueva vía de regulación de entrada a la fase S con TOR como controlador e independiente de RBR (figura 11). Una propuesta de esta vía de señalización en plantas, incluyendo la vía tradicional de liberación de E2F, el mecanismo de activación y algunos de los genes activados por E2F se muestra en la figura 12.

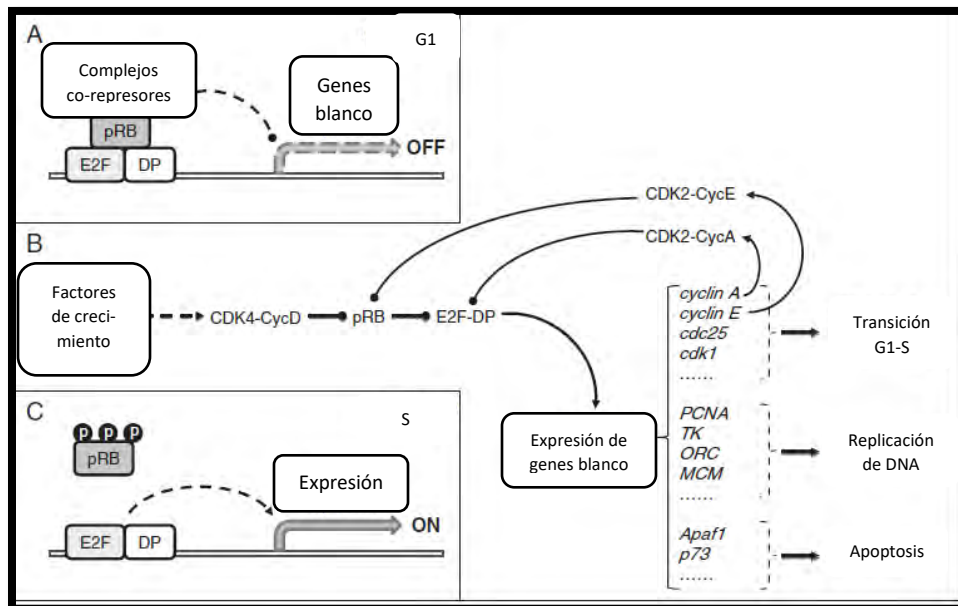


Figura 12. Vía de señalización de E2F y los genes bajo su regulación. Ji y Dyson, 2010.

Abreviaturas. Cyc: ciclina. CDK: cinasa dependiente de ciclina. pRB: proteína del retinoblastoma. PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular.

Al inicio de la vía clásica, pRB se encuentra unida a E2F y DP (A), impidiendo la expresión de genes blanco. Al recibir un estímulo (factores de crecimiento, energía) un complejo CycD-CDK activado fosforila e inhibe a pRB, liberando a los factores de transcripción E2F y DP (B). Entonces E2F puede promover la expresión de genes necesarios para entrar a la fase S del ciclo celular (C).

2.8 Influencia de carbohidratos en la germinación

El estado nutricional de la célula juega un papel importante durante la germinación. Una semilla no puede germinar sin una adecuada fuente de carbono y la utilización de sus recursos de reserva. Entre los nutrientes, a los carbohidratos o azúcares se les ha reconocido un papel doble: como fuentes de carbono y energía y como moléculas de señalización. Los carbohidratos solubles podrían tener una influencia diferencial en la germinación, ya sea activando o bloqueando procesos clave. Se sabe que, en diferentes tejidos de las plantas, las hexosas, como la glucosa, promueven la proliferación celular, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación y maduración (Lara-Núñez, 2017; Gibson 2004; Koch 2004). Los efectos de los azúcares en el crecimiento y desarrollo de la planta son diversos. Se ha visto que los niveles de transcritos de numerosos genes responden diferencialmente a concentraciones cambiantes de azúcares (Lastdrager, 2014).

En *Arabidopsis* la glucosa es capaz de activar los meristemas (Xiong *et al.*, 2013), que son zonas de alta proliferación celular que contienen células madre o progenitoras que sustentan el desarrollo post embrionario de los órganos de la planta. En maíz se ha estudiado la influencia de la glucosa y la sacarosa en los niveles de expresión de los genes *CycD2* y *CycD3*. La expresión de estos genes y la actividad de cinasa de varios complejos Cyc-CDK se favoreció en presencia de estos azúcares (Riou-Khamlichi *et al.*, 2002). Así mismo, en trabajos realizados dentro de este grupo de trabajo (Lara-Núñez *et al.*, 2017; García-Ayala, 2015; Ayub-Miranda, 2015) se han estudiado los niveles proteicos de distintos marcadores del ciclo celular, así como el efecto de distintos azúcares en los mismos. Incluso se ha obtenido evidencia de que existen interacciones entre niveles de azúcares y fitohormonas (Singh *et al.*, 2014), sugiriendo que los azúcares influirían en otras rutas metabólicas, más allá de la germinación.

Recientemente, Xiong y Sheen (2011, 2013, 2014) demostraron que en *Arabidopsis* existe una relación entre TOR y la vía de señalización de la glucosa, observando su

influencia en la activación de meristemos, expresión y niveles proteicos de marcadores del ciclo celular, estado de fosforilación de S6K y E2F y a nivel de fenotipo en diferentes etapas del desarrollo de la planta.

3. Antecedentes

3.1 La relación TOR-E2F

En 2013 Xiong y colaboradores demostraron que existe una interacción directa entre TOR y E2F en *Arabidopsis thaliana*. Análisis bioinformáticos revelaron que la mayoría de los genes activados por la vía de la glucosa coinciden con genes típicos de la transición G1-S y que son blancos putativos de E2F (figura 13). Entre ellos se encuentran genes de la familia Mantenimiento de Mini-cromosomas (*MCM* por sus siglas en inglés), Ciclo de División Celular (*CDC*) y Complejo de Reconocimiento de Origen (*ORC*), así como los genes Blanco de E2F (*ETG1*) y Antígeno Nuclear de Proliferación Celular 1 (*PCNA1*). Además, tratamientos con otros carbohidratos como xilosa, fructosa y galactosa no estimularon la expresión de dichos genes, reforzando la propuesta de la relación glucosa-TOR-E2F.



Figura 13. Los genes regulados por E2F también son regulados por TOR. Modificado de Xiong *et al.*, 2013.

Abreviaturas. Glc: glucosa. TOR: blanco de la rapamicina.

Al analizar el comportamiento de dichos genes en hojas, bajo diferentes tratamientos (mencionados a continuación), se observa una expresión diferencial. En la figura 14a la expresión de la mayoría de los genes se ve disminuida en presencia de rapamicina y AMA (antimicina A, un inhibidor de transporte de electrones mitocondrial) y en una línea mutante del gen *tor*, comparadas contra la expresión ectópica de *E2F*. Adicionalmente, la fosforilación en T449 de S6K1 también se afectó en dichos tratamientos. En la figura 14b se

observa que el inmunoprecipitado de TOR endógena es capaz de fosforilar directamente a E2Fa *in vitro*. Esta acción se bloqueó por el inhibidor competitivo específico de TOR torin1, en concentraciones crecientes. La fosforilación de E2F también desaparece en las líneas mutantes de *tor*. Como dato adicional, el mismo comportamiento es observado para la proteína 4E-BP1 (proteína humana inhibida junto con E2F por pRB). En la figura 14c también es posible observar que la fosforilación de E2F se mantiene aun inhibiendo a la proteína S6K1, sugiriendo que no es ésta última quien en realidad fosforila a E2F y que ambas vías, aun dependiendo de TOR, son independientes entre sí.

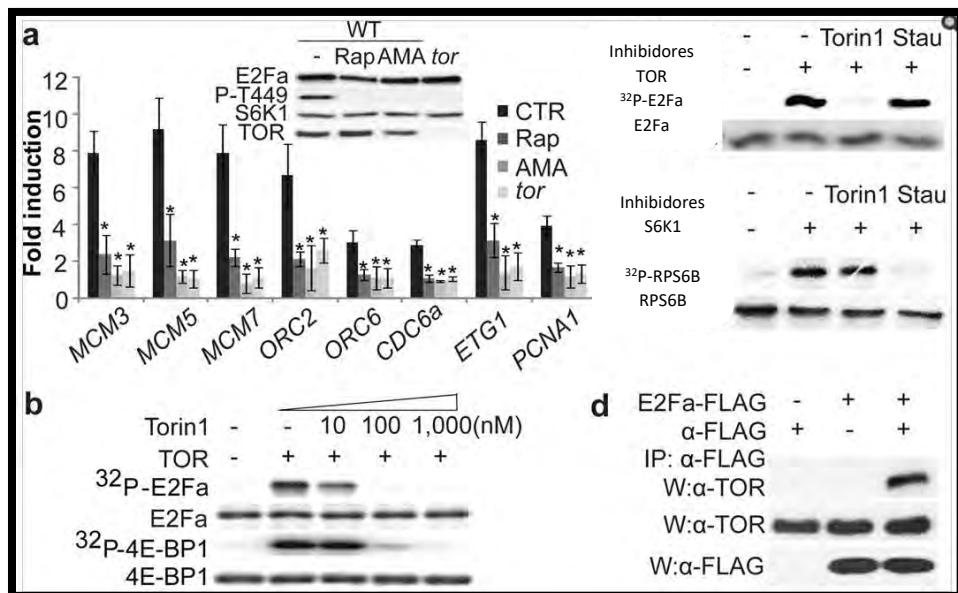


Figura 14. Los experimentos que demuestran la relación directa TOR-E2F. Modificado de Xiong, 2013.

Abreviaturas. TOR: blanco de la rapamicina. MCM: genes Mantenimiento de mini-cromosomas. ORC: genes Complejo de Reconocimiento de Origen. CDC: genes Ciclo de División Celular. ETG: genes Blanco de E2F. PCNA: genes Antígeno Nuclear de Proliferación Celular. CTR: control. AMA: antimicina A. Rap: rapamicina.

En conjunto los datos sugieren que esta fosforilación directa TOR-E2F podría ser una nueva vía de señalización importante para la activación de genes de fase S, actuando alternativa o paralelamente a la vía convencional Cyc-CDK-RBR (Xiong *et al.*, 2013).

3.2 Proteínas a lo largo del ciclo celular y el papel de la glucosa

Con el fin de analizar el impacto que los azúcares podrían tener en las semillas de maíz durante la germinación, en un estudio de Lara-Núñez y colaboradores (2017), ejes embrionarios fueron embebidos con o sin sacarosa o glucosa. Se analizó la expresión de marcadores clave del ciclo celular, así como su abundancia proteica, el patrón celular y la síntesis de DNA *de novo* en los meristemos.

En dichas zonas meristemáticas se observó un mayor número de células en el medio con glucosa, hecho que sugiere que la glucosa estimula la proliferación celular. Así mismo, su efecto fue visible a nivel fenotípico. En presencia de glucosa los ejes embrionarios adquirieron una morfología torcida y de enrollamiento sobre ellos mismos, como se aprecia en la figura 15.

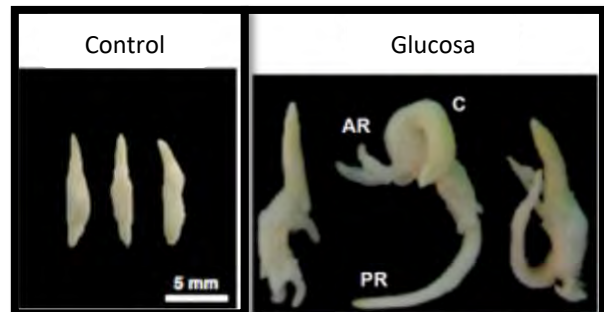
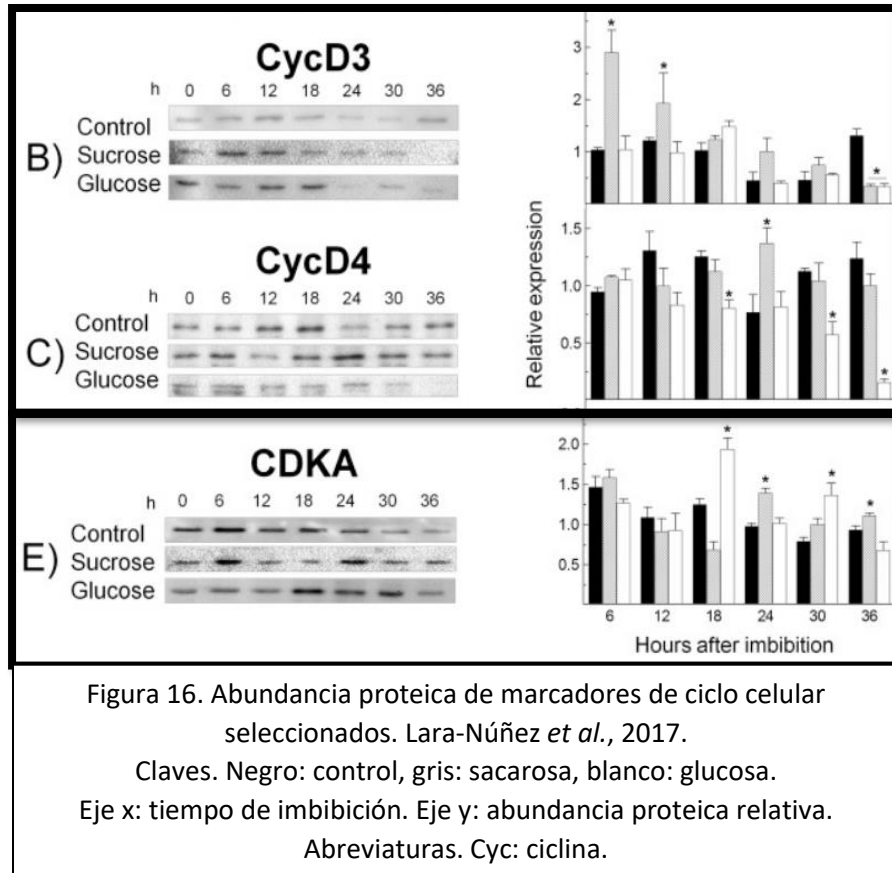


Figura 15. Morfología de ejes embrionarios después de 72 horas de imbibición. Modificado de Lara-Núñez *et al.*, 2017. Abreviaturas. C: coleoptilo. AR: raíces adventicias. PR: raíces primarias.

Mediante western blot (figura 16) se observó que la CycD3 es estimulada ligeramente por la glucosa a tiempos tempranos (hasta 18 horas) para después caer al igual que el tratamiento control. A partir de las 18 h la CycD4 comienza a disminuir hasta niveles casi indetectables a las 36 h en glucosa, en concordancia con la expresión de su gen. CDKA fue estimulada notablemente a las 18 y 30 h con glucosa, mientras que ambos genes *CDKA* se expresaron más a las 24 h (datos no presentados).



3.3 TOR en *Zea mays* L.

Dentro del grupo de estudio, el trabajo de Jesús Flores (datos aun no publicados) son el antecedente directo en materia de TOR.

El análisis *in silico* del gen *ZmTOR* reveló que *ZmTOR* es una proteína de 2464 aminoácidos y 277 kDa. Al incorporar AZD-8055 en el medio de imbibición con glucosa, se observó que los ejes embrionarios perdieron la capacidad de adquirir la morfología típica observada anteriormente (imagen no mostrados).

La expresión de *ZmTOR* (figura 17) se favoreció en los medios con glucosa 90 mM, aun en presencia del inhibidor AZD.

0h	SUC 2%			BI			BI + AZD 30µM			GLU 90mM			GLUC 90mM + AZD 30µM		
	6	12	24	6	12	24	6	12	24	6	12	24	6	12	24
1	1.44	10	5.56	6.75	11.27	8.86	6.82	14.0	4.73	11.15	16.90	11.07	14.40	16.1	17.1

Figura 17. Expresión del gen *ZmTOR* en diferentes medios de imbibición y tiempos. Flores-Sánchez, datos no publicados.

Abreviaturas. Suc: sacarosa. BI: amortiguador de imbibición sin azúcar. Glu: glucosa.

También la expresión de los genes *CDKA1* y *KRP3* aumentó en presencia de glucosa. *CYCD4;2* fue estimulado por glucosa pero reprimido con el inhibidor, aunque no así en presencia de solo el inhibidor sin azúcar, donde no se observó efecto alguno (datos no presentados).

Mediante cortes histológicos a las 24 horas de imbibición (figura 18), se observó que el tamaño celular en el medio con glucosa e inhibidor fue menor con respecto al medio control, mientras que el tamaño más pequeño se observó en el medio con glucosa. Por el contrario, la densidad celular fue intermedia en el medio con glucosa e inhibidor respecto al medio control, y mayor en el medio con glucosa. Estos resultados sugieren una vez más que la glucosa estaría favoreciendo la proliferación celular, mientras que la sacarosa favorecería la diferenciación, y que la inhibición de TOR, por AZD, estaría modificando o minimizando la acción de la glucosa.

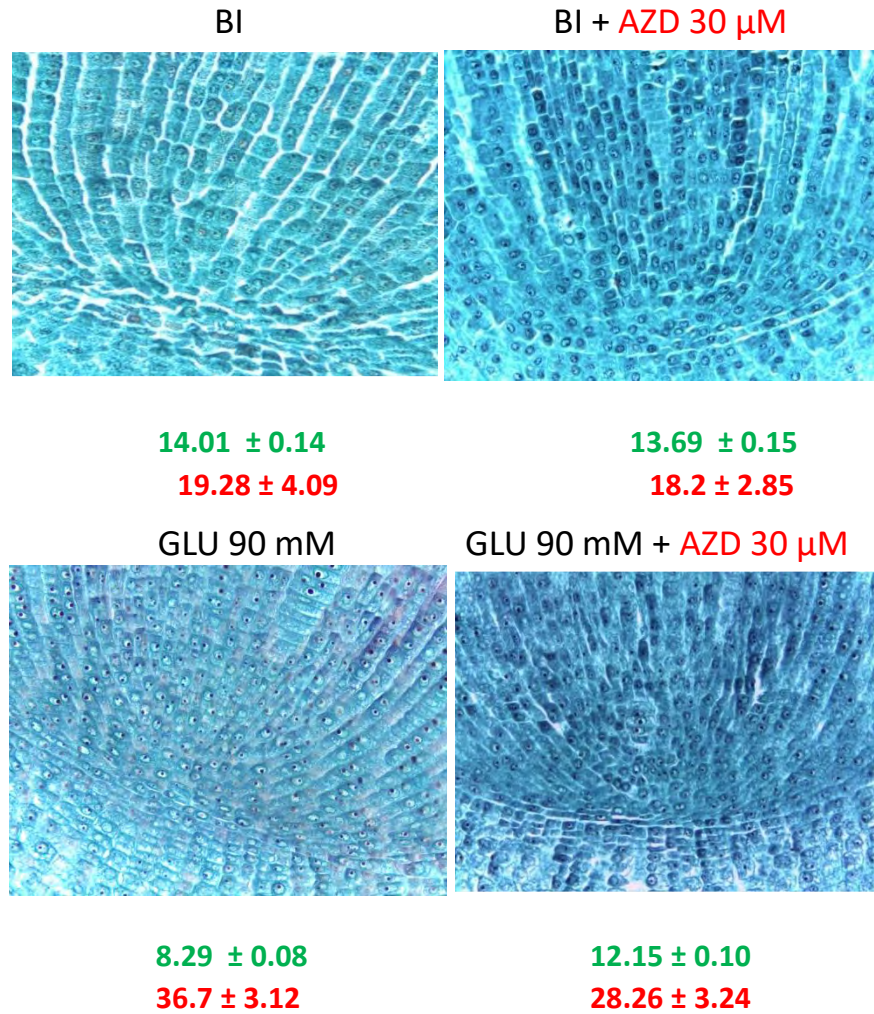


Figura 18. Cortes histológicos. Patrón celular en el meristemo apical de la raíz a las 24 horas de imbibición en diferentes tratamientos. Flores-Sánchez, datos no publicados.

Abreviaturas. BI: buffer de imbibición. Glu: glucosa

Tamaño celular en μm

Densidad celular en número de células/μm²

4. Justificación

Debido a que este es un tema aun poco estudiado en plantas y siendo TOR un regulador maestro de diversos procesos celulares, entre ellos, el ciclo celular en eucariontes, el presente proyecto pretende ampliar los conocimientos en materia de este componente y aquellos marcadores del ciclo celular que dependen de su actividad, observando la influencia de la glucosa y la inhibición de la actividad de cinasa de TOR, usando como modelo la germinación del maíz.

5. Hipótesis

El efecto negativo que tendrá el AZD-8055 sobre la actividad de cinasa de TOR tendrá un impacto en la activación de la proteína S6K, lo que se reflejará en la modificación de abundancia de proteínas, entre ellas, marcadores clave del ciclo celular de la transición G1/S, en presencia o ausencia de glucosa.

6. Objetivos

➤ Objetivo general

Determinar el efecto de la presencia de glucosa y de la inhibición de la actividad de cinasa de TOR sobre la abundancia de proteínas típicas del ciclo celular en la germinación de maíz.

➤ Objetivos particulares

Comprobar el abatimiento de la actividad de TOR mediante la cuantificación de proteínas totales en todos los tiempos y tratamientos utilizados.

Evaluar el patrón de algunas proteínas relacionadas al ciclo celular, mediante Western blot, a lo largo de la germinación en ejes embebidos con glucosa o sin azúcar, con y sin AZD.

7. Metodología

7.1 Material biológico

7.1.1 Ejes embrionarios de maíz

A partir de semillas de maíz (*Zea mays*) var. Chalqueño (cosechas 2016 y 2017), almacenado a 4°C, se extrajeron los ejes embrionarios utilizados en los experimentos. Los ejes se almacenaron en oscuridad y a 4°C, no más de 5 días, hasta su procesamiento.

7.2 Métodos

7.2.1 Imbibición y tratamientos

Los ejes extraídos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.4% durante 15 min en agitación. En condiciones de esterilidad (trabajando en una campana de flujo laminar) los ejes se lavaron con abundante agua destilada estéril y se dejaron secar varios minutos.

Posteriormente 15 ejes por cada tratamiento y tiempo, divididos en tres series de 5 ejes cada uno, es decir, triplicados biológicos, fueron distribuidos en cajas Petri desechables sobre papel filtro estéril Whatman. Los ejes se incubaron a 25°C y oscuridad durante 6, 18 y 30 h. A continuación, se presenta la composición del amortiguador de imbibición (tabla 4) y las soluciones de imbibición utilizadas para cada tratamiento (tabla 5).

Tabla 4. Composición del amortiguador de imbibición.

Componente	Concentración (mM)
Tris-HCl pH 7.4	50
KCl	50
MgCl ₂	10

Abreviaturas. Tris: trisaminometano.

Tabla 5. Composición de los medios de imbibición usados en cada tratamiento.

Medio	Control (C)	Control + AZD (CA)	Glucosa (G)	Glucosa + AZD (GA)
Composición	Amortiguador de imbibición	Amortiguador de imbibición + AZD 30 µM	Amortiguador de imbibición + glucosa 90 mM	Amortiguador de imbibición + glucosa 90 mM + AZD 30 µM

7.2.2 Adición del AZD-8055

Después de agregar el volumen correspondiente de inhibidor a los medios de imbibición, todos los ejes extraídos fueron sometidos a vacío durante 5 minutos, con un reposo de 30 s, y vacío 5 min más. La permeabilidad temporal de las membranas celulares originada garantizaba que el AZD ingresara de forma adecuada a las células. El estrés temporal no era suficiente para llegar a comprometer la viabilidad de los ejes, de acuerdo a lo ensayado y observado en otros estudios del grupo de trabajo. Los ejes embrionarios de tratamientos sin AZD pasaron por el mismo procedimiento para mantener la uniformidad en las condiciones de estudio.

7.2.3 Extracción de proteínas

Terminados los tiempos de germinación, se realizó la extracción de proteínas, homogeneizando 5 ejes/mL de amortiguador de extracción de proteínas en un

mortero frío. El amortiguador de extracción de proteínas tuvo la composición siguiente (tabla 6):

Tabla 6. Composición del amortiguador de extracción de proteínas.

Componente	Concentración	Componente	Concentración
Tris-HCl pH 7.5	25 mM	Na ₂ VO ₄	1 mM
MgCl ₂	15 mM	Glicerol	30%
KCl	25 mM	Coctel de inhibidores de proteasas*	1 tableta/50 mL
Na ₂ EDTA	50 mM	β-glicerofosfato	60 mM
NaCl	250 mM	PMSF	2 mM
Tritón X-100	0.2%	Benzamidina	1 mM
DTT	1 mM	Ácido ε-aminocaproico	5 mM
NaF	1 mM		

*Marca "cOplete" (Sigma-Aldrich)

Abreviaturas. Tris: trisaminometano, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. DTT: dicloro difenil tricloroetano. PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Los extractos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C. Finalmente fueron distribuidos en alícuotas y almacenados a -70°C hasta su utilización.

7.2.4 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de los extractos se hizo mediante el método de Bradford (1976) en placa. Como curva patrón se usaron concentraciones crecientes de BSA. La lectura se realizó con el equipo EPOCH de Bio Tek.

Las cuantificaciones de los extractos de la figura 19 en la sección de Resultados se hicieron directamente con una lectura de proteínas a 280 nm en un equipo BioDrop de cuantificación de proteínas y DNA.

7.2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizaron vidrios para electroforesis de 1 mm de grosor para hacer los geles de poliacrilamida. La composición de las dos fases del gel fue la siguiente (tabla 7):

Tabla 7. Componentes de los geles concentrador y separador. Ejemplo para preparar dos geles.

Gel separador al 12%		Gel concentrador al 5%	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Acrilamida 30%	4.0 mL	Acrilamida 30%	0.8 mL
Tris-HCl 0.75 M pH 8.8	2.5 mL	Tris-HCl 0.75 M pH 6.8	1.7 mL
Agua destilada	3.4 mL	Agua destilada	2.5 mL
APS	50 μ L	APS	50 μ L
TEMED	7 μ L	TEMED	10 μ L

Abreviaturas. Tris: trisaminometano. APS: persulfato de amonio. TEMED: tetrametiletilendiamina.

Las muestras fueron preparadas con un amortiguador de carga con la composición siguiente (tabla 8):

Tabla 8. Componentes del amortiguador de carga.

Componente	Concentración	Componente	Concentración
SDS	2%	Azul de bromofenol	0.01%
Glicerol	4%	β -mercaptoetanol	2 mM
Tris-HCl pH 6.8	40 mM		

Abreviaturas. SDS: dodecilsulfato sódico. Tris: trisaminometano.

Se desnaturalizaron las muestras calentándolas durante 5 min a 90°C. Posteriormente se montó una cámara de electroforesis Bio-Rad, se agregó amortiguador de electrodos y se corrieron los geles a 80 V durante 30 min y aproximadamente 1.5 h a 100 V, dependiendo de la proteína a analizar. El amortiguador de electrodos contenía lo enlistado en la tabla 9:

Tabla 9. Composición del amortiguador de electrodos.

Componente	Concentración
Tris-HCl	250 mM
Glicina	1.92 M
SDS	1%

Abreviaturas. Tris: trisaminometano. SDS: dodecilsulfato sódico.

7.2.6 Western blot

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas en los geles fueron transferidas a membranas de PVDF Millipore. Dichas membranas fueron activadas previamente con agitación en metanol puro durante 30 s y después lavadas con abundante agua destilada. Las membranas activadas y los geles fueron equilibrados en amortiguador de transferencia durante 10 min, y después montados en los casetes y cámaras de transferencia. Esta transferencia húmeda fue realizada durante 1 h a 100 V. El amortiguador de transferencia contuvo lo listado en la tabla 10:

Tabla 10. Composición del amortiguador de transferencia.

Componente	Concentración
Tris	25 mM
Glicina	192 mM

Abreviaturas. Tris: trisaminometano.

Al término de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de PBS 1x, Tween 20 al 0.1% y leche al 5% durante 1 h. Después se les colocó el anticuerpo correspondiente en PBS y se dejaron en agitación suave durante toda la noche a 4°C. Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios fueron de 1:1000, excepto para el anticuerpo α -CYCD4, que fue de 1:500.

Al día siguiente, se les realizó un lavado con PBS 1x, seguido de otro con PBS 1x con Tween 20 al 0.1% y NaCl al 2% (astringente), y uno más con PBS 1x. Los lavados se hicieron durante 15 min cada uno en agitación. Posteriormente se agregó

el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa, en una dilución de 1:15000 para todos los casos, en PBS 1x durante 1 h. Transcurrido el tiempo, se volvieron a hacer tres lavados con PBS 1x con la misma duración. Las membranas se sumergieron en solución de revelado por quimioluminiscencia y visualizadas en un equipo ChemiDoc de Bio-Rad. Inmediatamente después del revelado las membranas fueron lavadas brevemente con PBS 1x y teñidas con rojo de Ponceau para poder ser utilizadas como medida de control de carga.

A partir de las imágenes obtenidas, se realizaron densitometrías en el software ImageLab de Bio-Rad, tomando como referencia la banda observada a 0 h en todos los tratamientos y normalizando los valores con los obtenidos en las membranas teñidas con rojo de Ponceau.

El análisis estadístico consistió en un ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05, comparando los tratamientos control (C o CA) contra los tratamientos con glucosa (G o GA) a las mismas horas de análisis.

8. Resultados y discusión

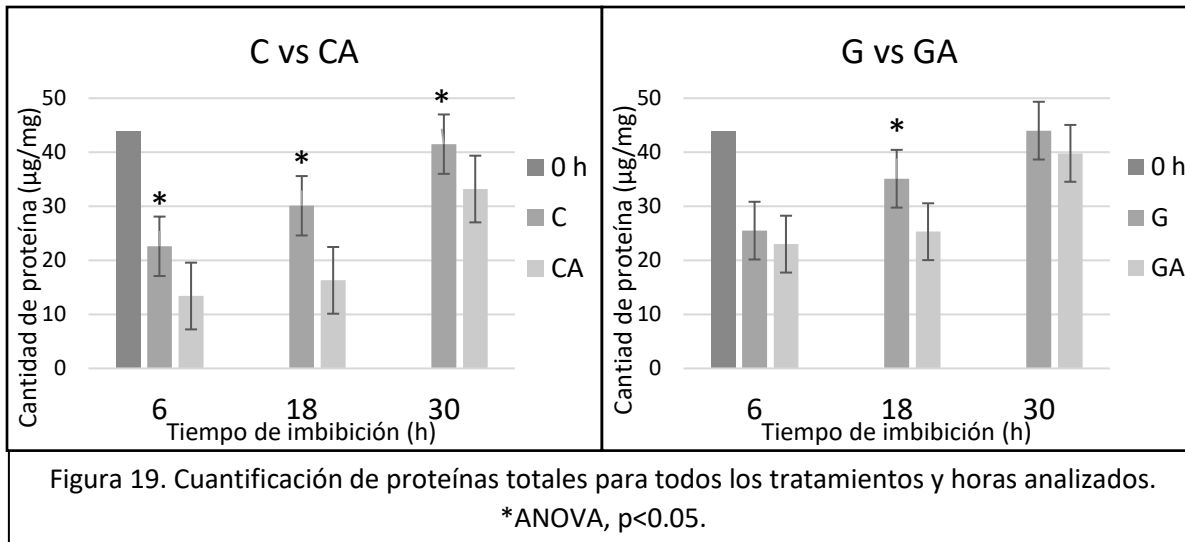
8.1 Niveles de proteínas durante la germinación

Durante la germinación, en las semillas se presentan muchos cambios en su composición química, debido a la utilización de sus reservas (carbohidratos, lípidos, proteínas) para el crecimiento de su eje embrionario. Estudios del efecto de inhibidores de la transcripción y la traducción durante la germinación en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la importancia de las proteínas no solamente de reserva, sino de aquellas presentes desde un inicio en las semillas secas (cantidades iniciales de las proteínas, no de reserva) para el exitoso progreso del proceso, ya que aun en ausencia de síntesis de proteína *de novo*, las semillas permanecen viables (Nakabayashi *et al.*, 2012).

A pesar de que la célula cuenta con recursos de reserva iniciales es necesaria la síntesis *de novo* de proteínas involucradas en fases del ciclo celular posteriores a G1, ya que se ha visto que es en esta fase donde se encuentran las células provenientes de semillas secas (Vázquez-Ramos y Sánchez-Jiménez, 2003), y es necesario también el recambio de las proteínas involucradas en cada una de las fases del ciclo. Como se mencionó en la introducción, TOR controla, a través de su blanco S6K, la síntesis de proteínas *de novo*. Además, sus funciones principales se centran en la transición G1/S. Por lo tanto, una posible forma de evaluar el abatimiento de la actividad de cinasa de TOR es cuantificar la concentración de proteína total presente en los extractos proteicos de todos los tratamientos y horas analizados. En la figura 19 se presentan los datos obtenidos con este ensayo.

A partir de la figura 19, las claves para los medios ocupados son:

- C: medio Control, contiene únicamente la solución de imbibición.
- CA: medio Control + AZD 30 μm
- G: medio con Glucosa 120 mM
- GA: medio con Glucosa + AZD 30 μm



La cantidad de proteína de cada eje se relacionó con su peso fresco, por lo que las unidades que se informan son μg de proteína total/mg de dicho peso fresco. La tendencia observada en todos los casos, aunque en algunas comparaciones no se vea tan marcada, es que hay menor cantidad de proteína total en los tratamientos con AZD. Hacia el tiempo más largo analizado, 30 h, se observa un notable incremento en la cantidad de proteínas en todos los casos, aunque la tendencia anteriormente mencionada se mantiene. Este incremento podría deberse a que, putativamente, las células ya completaron la fase M, habiendo entonces mayor número de células, y por lo tanto más proteínas totales, sumando las pre-existentes y las sintetizadas *de novo*.

Las proteínas son el segundo componente más abundante de reserva de varios tipos de semilla, correspondiendo hasta al 31% de las reservas totales. Las semillas de maíz contienen 10% de proteínas y 70% de ellas son clasificadas como de reserva (Alencar *et al.*, 2012). Hay que puntualizar el hecho de que existe una disminución de proteínas a las 6 h con respecto al nivel encontrado a 0 h, para después recuperarse hacia tiempos más largos de imbibición. La necesidad de la semilla por comenzar el ciclo celular y reanudar sus procesos bioquímicos podría explicar esta disminución, ya que podrían ocuparse cantidades considerables de proteína de reserva como fuente de aminoácidos. Se ha descrito que el crecimiento de la radícula involucra división y/o elongación celular, lo que exige la incorporación

y acción de moléculas diversas que deben ser sintetizadas *de novo*, además del transporte de nutrientes desde el medio exterior (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). En semillas de *Arabidopsis*, dentro y fuera de dormancia, aquellas que son embebidas presentan un incremento de RNAs codificando para proteínas asociadas a la transcripción de RNA y de degradación de proteínas en general (Carrera *et al.*, 2008). Este hecho sugiere que en las primeras horas del ciclo podría haber más degradación que síntesis de proteínas en general. Hacia las 18 h existe un incremento en los niveles proteicos, aunque no se igualan a los niveles observados en los ejes secos. Es hasta las 30 h cuando, probablemente terminada la primera ronda del ciclo celular, la cantidad de proteínas es considerablemente mayor en comparación a la cantidad en ejes secos.

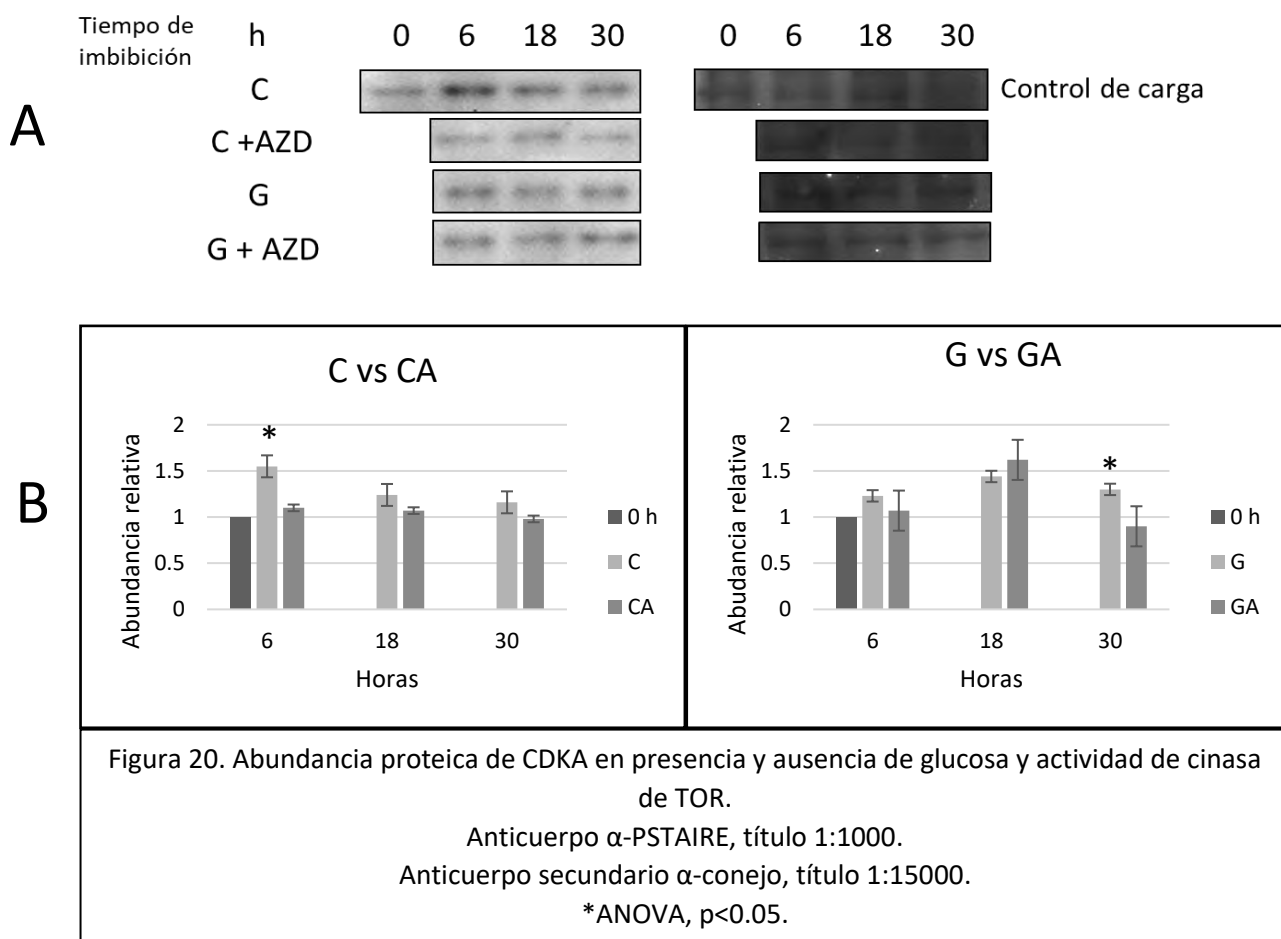
En cuanto al efecto del inhibidor, en el medio C, comparado con el medio CA, se observa una diferencia significativa, lo que sugiere que existe menor actividad de cinasa de TOR en todos los tiempos y que por lo tanto estaría afectada la síntesis *de novo* de proteínas. En el caso de los medios con glucosa, únicamente a las 18 h se observa una diferencia significativa, sugiriendo que la glucosa podría estar contrarrestando el efecto del inhibidor aun durante la post-germinación, ya sea estimulando la activación de TOR, o estimulando la expresión de su gen, y por lo tanto propiciando mayor cantidad de proteína TOR, como lo observado en la figura 17, en la sección de Antecedentes. Debe mencionarse también que la abundancia de una proteína en un tiempo dado es la resultante del balance entre la síntesis y degradación que se llevan a cabo simultáneamente, y si se observa más proteína es porque probablemente ha prevalecido la síntesis o la estabilización, sobre la degradación.

En conclusión, la medida indirecta de la cuantificación de la cantidad de proteínas totales sugiere que la vía de señalización por TOR está afectada, presumiblemente por el efecto de su inhibidor selectivo AZD-8055, y que la glucosa sería capaz de revertir o amortiguar dicho efecto mediante algún mecanismo aún desconocido.

8.2 Marcadores del ciclo celular seleccionados

A partir de la figura 20, el panel A del lado izquierdo corresponde a la imagen del western blot, mientras que el lado derecho corresponde a la membrana teñida con rojo de Ponceau, es decir, el control de carga. El panel B presenta las gráficas obtenidas mediante el análisis densitométrico promedio de triplicados biológicos y normalizados con respecto a los valores del control de carga. Del lado izquierdo se comparan los tratamientos Control, mientras que del lado derecho se comparan los tratamientos Glucosa. Ambas gráficas presentan la misma escala para que también sea posible una comparación visual entre ellas.

- **Abundancia proteica de CDKA (34 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.**



En eucariontes, el ciclo celular es controlado mediante la actividad periódica de complejos heterodiméricos de cinasas de treonina/serina dependientes de ciclinas (CDKs) y sus subunidades activadoras, las ciclinas. En plantas las ciclinas de tipo D se asocian principalmente a CDKA (Garza-Aguilar *et al.*, 2013). Entre los principales tipos de CDKs, los miembros de la familia A contienen un motivo PSTAIRE en la α -hélice que interacciona con la ciclina, y actúan durante la fase S y las transiciones G1/S y G2/M. Las CDKs tipo B, en las que el motivo PSTAIRE es reemplazado por PPTALRE (B1) o PPTTLRE (B2), actúan principalmente en la transición G2/M (Dante *et al.*, 2014). En un estudio de 2013, Godínez-Palma y colaboradores demostraron que, en maíz, las ciclinas D2;2, D4;2 y D5;3 (por definición, ciclinas de la transición G1/S) se unen y activan a CDKA de forma diferencial durante la germinación. Estos complejos además tienen actividad de cinasa y son más activos en tiempos tempranos de la germinación. Durante las etapas tardías de la mitosis y en la mayoría de la fase G2 típicamente la actividad de CDKs es reducida por la proteólisis de ciclinas tipo A y B vía el APC/C (una ubiquitina ligasa que marca proteínas para su degradación; Dante *et al.*, 2014).

En la figura 20 se aprecia que la abundancia proteica de CDKA fue estimulada por la glucosa a partir de las 18 h, lo que coincide con lo reportado por Lara-Núñez y colaboradores en 2017 (figura 16), en comparación con el tratamiento control, en el que la cantidad de proteína disminuye a través del tiempo. Sin embargo, no existe un patrón marcado de abundancia, y de igual forma no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Al parecer, que la vía de TOR se vea comprometida no influye en la abundancia de esta proteína. El incremento de sus niveles en los tratamientos con glucosa podría deberse al incremento en general de las proteínas totales o podría existir una necesidad de mayor cantidad de esta proteína en respuesta a las ciclinas que también podrían ser estimuladas. Comparando con el patrón de expresión de su gen (figura 19), el transcrito de éste también es estimulado en los medios con glucosa a 6 y 12 horas, lo que correlaciona con lo observado a nivel de proteína.

- **Abundancia proteica de CYCD3 (37 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.**

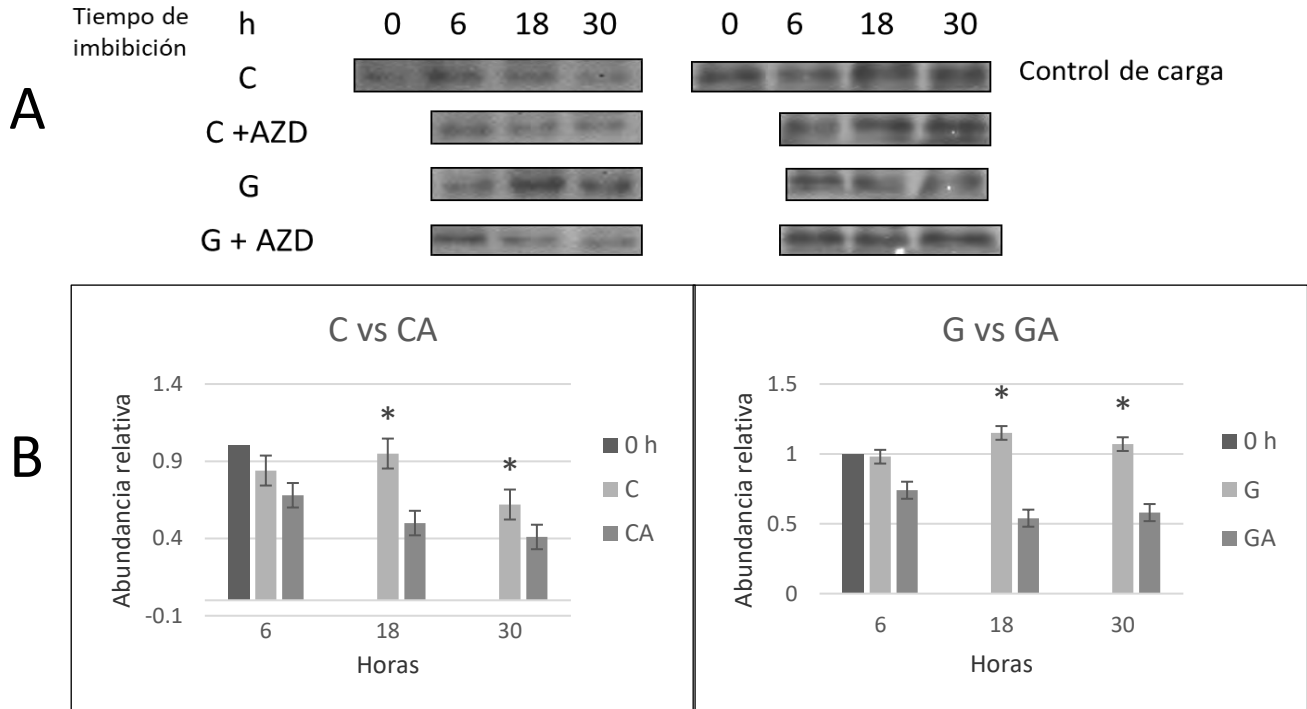


Figura 21. Abundancia proteica de CYCD3 en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.

Anticuerpo α -CYCD3, título 1:1000.

Anticuerpo secundario α -conejo, título 1:15000.

*ANOVA, $p < 0.05$.

En *A. thaliana* existen tres tipos de CYCD3: D3;1, D3;2, D3;3 (Garza-Aguilar *et al.*, 2017), mientras que en *Zea mays* L existen dos: D3;1 y D3;2, y hay algunos estudios sobre las posibles funciones de éstas. En *Arabidopsis* la sobreexpresión de CYCD3;1 en cultivos celulares incrementa los ciclos mitóticos y las células presentan un alargamiento de la fase G2 y un retraso en la activación de genes mitóticos, tales como los que codifican para ciclinas tipo B, sugiriendo que CYCD3 tiene un papel específico en G1/S (Menges *et al.*, 2006). Además, se ha visto que ésta es una proteína inestable degradada por la vía del proteosoma y que se pierde rápidamente cuando la célula entra en fases de reposo, como la fase estacionaria del ciclo y por la inanición por nutrientes como la sacarosa. El tratamiento de células

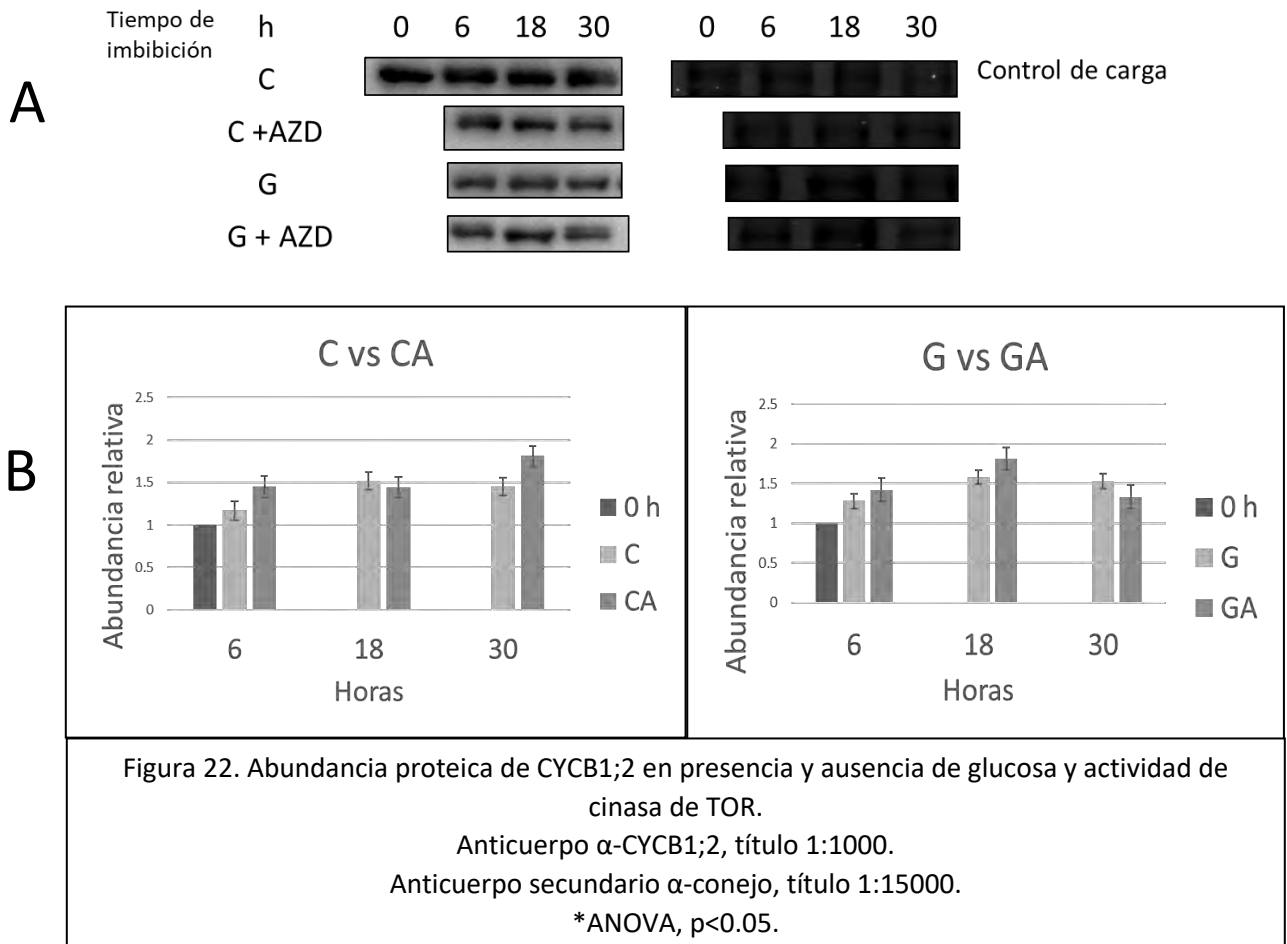
con MG132, un inhibidor del proteosoma, resulta en la acumulación de una forma hiperfosforilada de CYCD3;1. Esto sugiere una posible relación entre el estado de fosforilación y el recambio de la proteína, ya que la fosforilación a menudo está relacionada con la proteólisis dependiente de ubiquitinación (Menges *et al.*, 2006).

Dentro del grupo de trabajo, los reportes concernientes a CYCD3 aportan evidencia de que esta ciclina está implicada en la progresión del ciclo celular a diferentes tiempos y con distintas funciones. CYCD3 forma complejos con CDKA y CDKB1;1 con actividad de cinasa durante la germinación y éstos varían en su masa a lo largo del tiempo, respondiendo a su vez a estímulos externos como fitohormonas y sacarosa (Garza-Aguilar *et al.*, 2017). En el estudio de Lara-Núñez y colaboradores en 2017, a pesar de que los niveles de expresión génica no se afectaron en presencia de glucosa, la cantidad de proteína sí se modificó, siendo estimulada a las 18 horas, de acuerdo a la figura 16.

En este trabajo, como se observa en la figura 21, la CYCD3 presenta un pico de abundancia a las 18 horas y se encuentra en mayor cantidad en todos los tiempos en los medios con glucosa. Por el contrario, en todos los medios con AZD la cantidad de esta proteína cae. Este hecho sugiere que esta ciclina está bajo la regulación directa de la vía de TOR, ya que, al ser afectada esta vía, la abundancia proteica se ve también modificada. Existe entonces correlación entre lo reportado en la literatura y lo observado en el estudio, situando las funciones de esta proteína en tiempos específicos de la germinación (Lara-Núñez *et al.*, 2017). A pesar de que en ambos medios con AZD los niveles de esta proteína caen, esta caída es ligeramente menor en el medio con glucosa, lo que podría indicar que esta ciclina es estabilizada por este elemento, teniendo en cuenta también el incremento en su nivel en el medio con glucosa y sin inhibidor. Ya que se mencionó anteriormente que en maíz existen dos tipos de CYCD3, y debido a que el anticuerpo utilizado no es específico contra alguno de los mismos, no se sabe si el efecto observado es únicamente sobre un tipo de esta ciclina o si es una contribución de ambos, ya que la disminución de los

niveles proteicos no es total. Sin embargo, es evidente que la señalización que permite la estabilización de esta ciclina se pierde por el efecto del AZD.

- **Abundancia proteica de CYCB1;2 (49 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.**

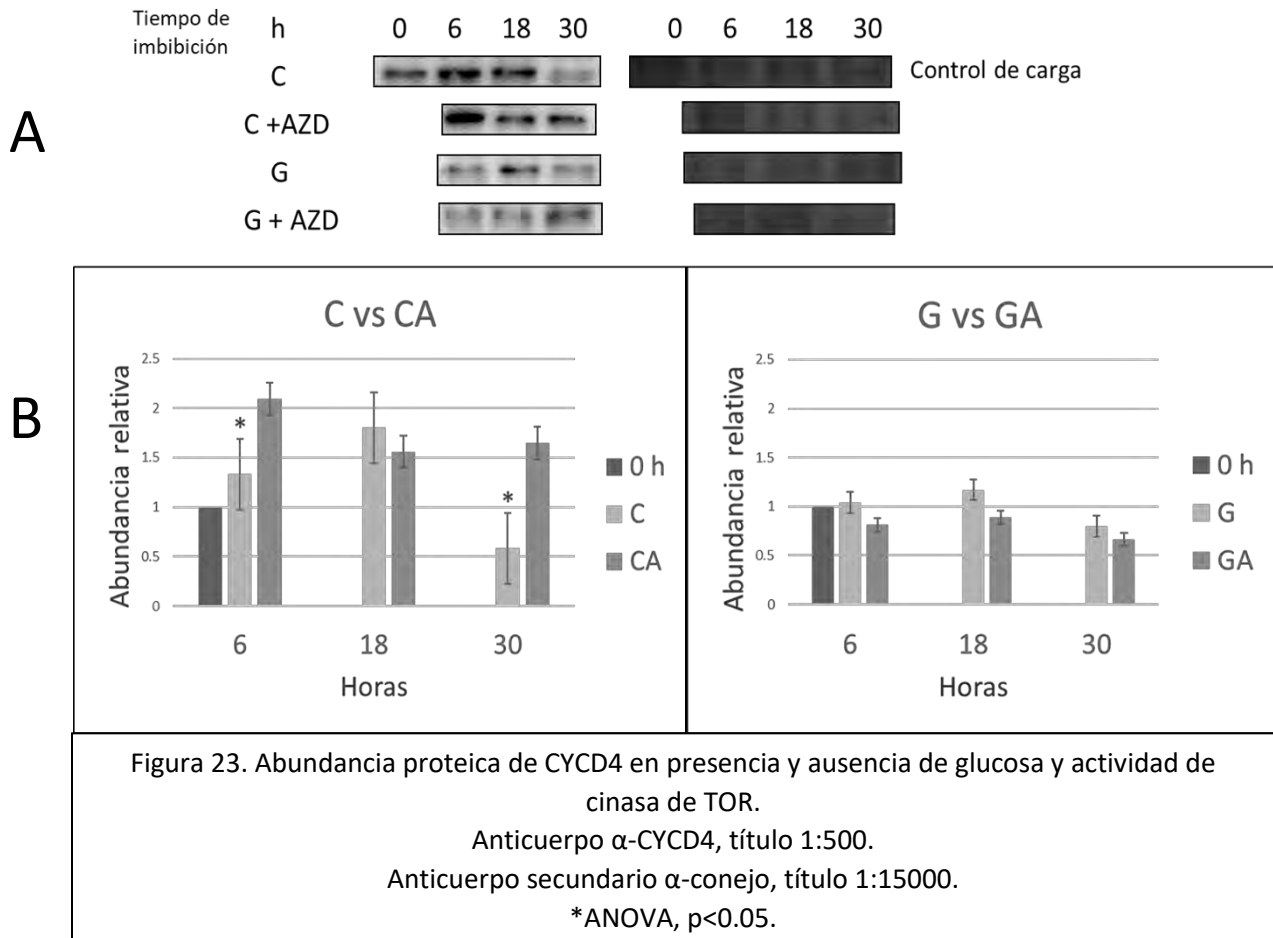


Las ciclinas tipo B controlan la transición G2/M y la transición intra-mitótica (Dante *et al.*, 2014). Sin embargo, la información referente a este tipo de ciclinas en plantas es aún escasa. De acuerdo a Ayub-Miranda (2015), CYCB1;1 y CYCB1;2 son capaces de unirse a CDKA y CDKB de forma diferencial *in vivo* e *in vitro*, y por sí sola, CYCB1;2 muestra un perfil característico de abundancia, en el que su cantidad aumenta a tiempos largos de imbibición. En otros estudios, igualmente en maíz pero en estados de desarrollo avanzados, el nivel proteico de CYCB1;3 permanece

constante desde tiempos tempranos hasta tiempos largos, aunque la expresión de su gen disminuye drásticamente conforme avanza el tiempo (Dante *et al.*, 2014).

En este estudio no se observó algún cambio significativo en el nivel de esta proteína a lo largo de la germinación (figura 22). La abundancia proteica además permaneció relativamente constante en todos los tratamientos. La glucosa elevó ligeramente sus niveles proteicos, pero el AZD no provocó efecto visible alguno. Sin embargo, hay que mencionar que, aunque no muy evidente, se puede observar que a las 30 h y más aún en los tratamientos con AZD, aparecen dos bandas de masas muy similares. Aunque la cantidad de esta proteína podría no estarse viendo afectada, quizá alguna modificación en su estructura estaría apareciendo. A pesar de analizar esta proteína en un estado de desarrollo distinto de la planta, Sabelli y colaboradores (2014) también han observado esta doble banda. Como se ha mencionado, las ciclinas tipo B regulan las fases G2 y M, aunque se ha observado su interacción con CDKs involucradas en fases anteriores del ciclo celular. En este caso, a falta de un efecto diferencial observado entre tratamientos, podría decirse que CYCB1;2 no se encuentra bajo la regulación de TOR.

- Abundancia proteica de CYCD4 (42 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.



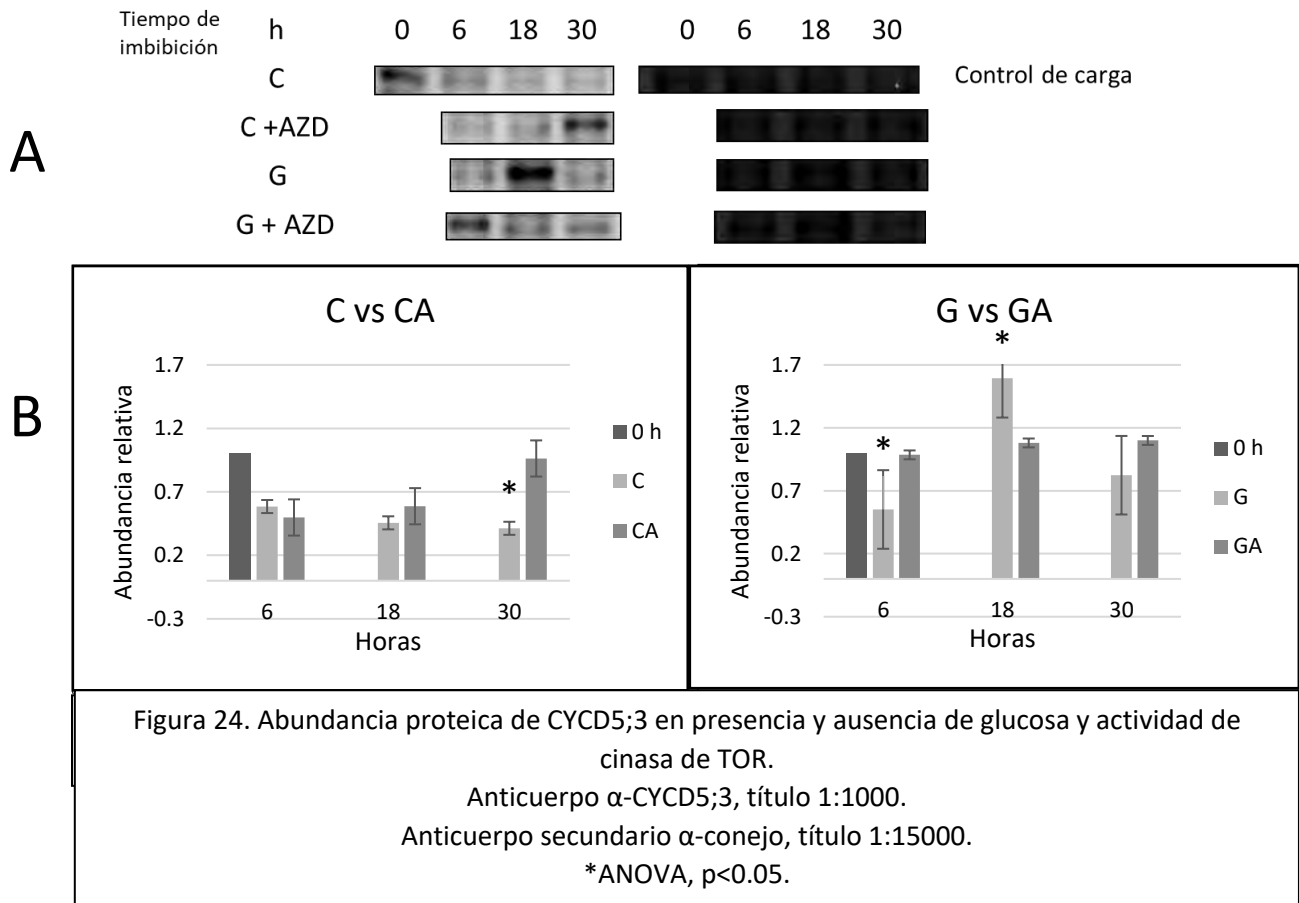
Godínez-Palma *et al* (2014) observaron que CYCD4 interacciona con actores importantes de la germinación, como algunos tipos de CDKA y CDKB, siendo esto de forma diferencial y variable a través del tiempo. El complejo con CDKA presenta además su mayor actividad a las 12 h de imbibición, lo que sugiere que este complejo es importante para la transición G1/S. En este mismo estudio se observó que CYCD4;2 (junto con CYCD2;2 y CYCD5;3) está presente en semillas secas. En ensayos con cicloheximida (un inhibidor de síntesis proteica) se vio que los niveles de esta proteína se reducen a tiempos tempranos, por lo que sus niveles observados en tiempos posteriores deben ser el resultado de un balanceado

proceso de síntesis y degradación a lo largo de la germinación. Este hecho, mencionado con anterioridad, es cierto para cada una de las proteínas analizadas.

En la figura 23, el resultado de este ensayo en el tratamiento control, pone de manifiesto un comportamiento observado anteriormente (Godínez-Palma *et al.*, 2014; Lara-Núñez *et al.*, 2017) respecto a la abundancia proteica, en el que ésta tiene un pico de abundancia a las 18 horas, para decaer hacia tiempos más largos. Este comportamiento puede ser comparado también con la expresión de *CYCD4;2* (Lara-Núñez *et al.*, 2017) y *CYCD4;1* (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006, datos no mostrados). En ambos casos, la expresión de los genes fue aumentando hasta las 24 horas de imbibición, y debido a esto, *CYCD4;1* podría tener también un papel en las fases S-G2 (Quiroz-Figueroa y Vázquez-Ramos, 2006). Al parecer, la acumulación de esta ciclina, ya sea estimulando su síntesis o impidiendo su degradación, se ve promovida por el AZD en ausencia de azúcar en el medio (tratamiento CA). Este hecho podría sugerir, aun sin saber el mecanismo exacto, que la inhibición de TOR no afecta solo de forma negativa a todas las proteínas, ya que se vio que esta ciclina en particular podría estar regulada de manera positiva por la inhibición de dicho regulador maestro.

La glucosa por otro lado, ejerce un efecto negativo en la abundancia de esta ciclina, ya que en la figura 23 se observa que su nivel proteico fue más bajo que en los tratamientos control, incluso en presencia de AZD. De igual forma que con la inhibición de TOR, se presenta en este caso un efecto contrario al esperado, ya que uno de los papeles de la glucosa como molécula de señalización es estimular la síntesis y las actividades realizadas por las ciclinas D. Esta ciclina presentó resultados contrastantes con el resto de ciclinas D analizadas, lo que podría llevar a pensar que en particular *CYCD4* se regula por mecanismos y vías alternas.

- **Abundancia proteica de CYCD5;3 (39 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.**

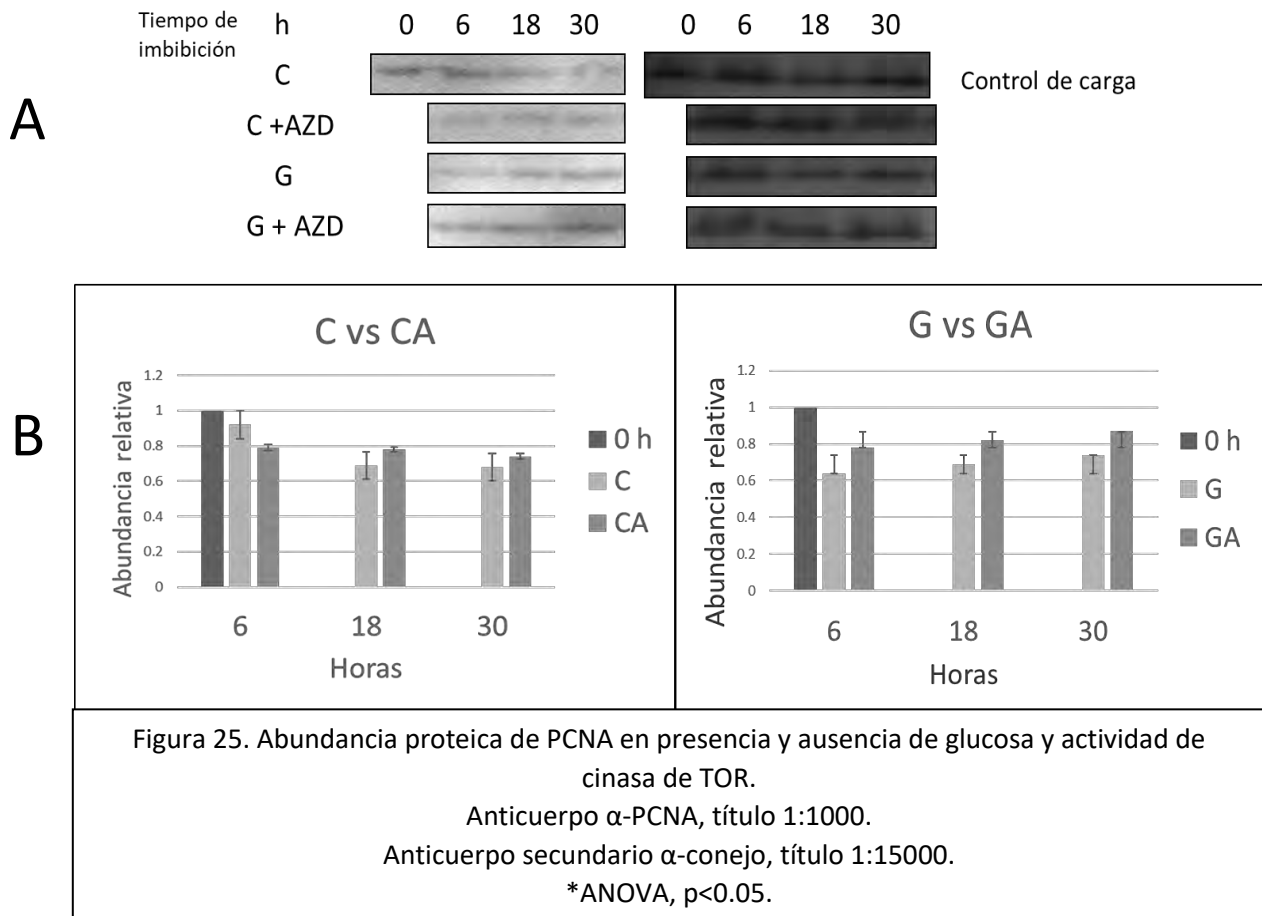


Para la última ciclina tipo D analizada en este estudio, se encontró que presenta, en general, niveles proteicos bajos a lo largo de la germinación en condiciones control (figura 24, medio C) comparado al nivel de los ejes de semilla seca. La adición de AZD al medio control causa acumulación de esta proteína al tiempo más largo analizado, 30 h. Ya que se ha visto que esta es una proteína inestable en tiempos cortos de germinación, y que por lo tanto sus niveles proteicos en tiempos largos deberían ser el resultado del balance entre degradación y síntesis *de novo* (Godínez-Palma *et al.*, 2014), su acumulación podría deberse a que la maquinaria enzimática responsable de su degradación, presumiblemente el proteasoma, es insuficiente para llevar a cabo el proceso, debido a la misma influencia de la inhibición de TOR.

El efecto de la glucosa sobre este marcador del ciclo celular es que aumenta su cantidad, siendo este hecho más notorio a 6 y 30 h en presencia de AZD. Sin reportes previos de la influencia de la glucosa sobre esta ciclina, se estaría observando una regulación similar que sobre CYCD3, cuya abundancia fue estimulada por la glucosa.

De esta ciclina se sabe que es capaz de interactuar con CDKA de manera constante hasta las 24 h de imbibición, y que solo interacciona con CDKB a las 18 h, para después decaer significativamente a tiempos más largos. También se ha observado que es una proteína inestable que presenta su pico de abundancia a las 18 h (Godínez-Palma *et al.*, 2013). El hecho de que esta ciclina presente interacción con CDKB (una proteína que actúa principalmente en las fases G2-M), podría indicar que si bien su papel teóricamente es asociado a las fases G1-S, también tendría la capacidad de estar regulando de alguna forma, aunque en menor medida, las fases G2-M.

- **Abundancia proteica de PCNA (29 kDa) en presencia y ausencia de glucosa y actividad de cinasa de TOR.**



El antígeno nuclear de proliferación celular, PCNA, se descubrió en células de levaduras, plantas y animales con ciclo celular en progresión, sugiriendo que éste ejerce sus funciones en la regulación del mismo y en la replicación y reparación de DNA, aunque después se observó que PCNA también juega un papel importante en otros procesos referentes al genoma completo (Strzalka y Ziemienowicz, 2011). En mamíferos, PCNA se puede encontrar asociado con ciclinas tipo D y Cdk4/6, el complejo cinasa responsable del inicio del ciclo celular en respuesta a factores de crecimiento y señales mitogénicas. Durante la germinación del maíz, PCNA se ha encontrado en complejos de 131-163 kDa de masa. Al inicio de la fase S un complejo de 100 kDa es el que predomina, presumiblemente, el complejo homotrimérico (Sánchez *et al.*, 2002).

En la figura 25 se observa que los niveles proteicos de PCNA no presentan variaciones significativas a lo largo de los tiempos analizados y en los tratamientos utilizados, presentando un patrón de abundancia constante. A pesar de tratarse de una proteína que se encuentra a lo largo de gran parte del proceso de germinación y de llevar a cabo una de sus funciones más importante durante la fase S del ciclo, los niveles de ésta no se modificaron de forma alguna por la inhibición de TOR ni por la presencia de glucosa, por lo que podría decirse que no se encuentra bajo la regulación de los elementos mencionados. Dada la importancia de PCNA en varios procesos, la célula podría no estar permitiendo que exista un exceso o una carencia de esta proteína a lo largo del ciclo celular, sino que mantiene sus niveles constantes a través de un mecanismo independiente de TOR y de la glucosa.

8.3 Influencia de ZmTOR y glucosa sobre el ciclo celular del maíz durante la germinación

Desde su descubrimiento, TOR ha sido objeto de estudios concernientes a su estructura, función y relación con otros elementos importantes del ciclo celular. A pesar de estar menos estudiada en plantas, el complejo proteico en el que se encuentra asociada está ya bien caracterizado (Moreau *et al.*, 2010), se ha estudiado la inhibición de su actividad (Montané y Menand, 2013), su relación con la glucosa, y se han propuesto algunos modelos de la vía de señalización en la que participa, incluyendo la novedosa vía TOR-E2F (Xiong *et al.*, 2013). A pesar de la importancia del papel que juega TOR en eucariontes, poco se sabe aún de su vía de señalización y sus reguladores río arriba en plantas y sus efectores río abajo. Esto debido a la falta de estandarización de técnicas moleculares y bioquímicas que permitan monitorear la actividad de cinasa de TOR *in vivo*, y el hecho de que mutantes o la delección de *tor* en *Arabidopsis* resulten ser letales para el individuo (Xiong y Sheen, 2012).

En *Arabidopsis* se ha llevado a cabo el monitoreo de la actividad de TOR endógena mediante el estado de fosforilación de la proteína S6K. En el estudio de Xiong y colaboradores en 2013 (imagen no presentada), S6K es sobre-expresada en hojas y se observa que su nivel de fosforilación disminuye a medida que se utilizan concentraciones crecientes, y mayores a las usadas en mamíferos, de rapamicina. De igual forma, este control de la actividad de TOR fue empleado en callos de maíz en el estudio de Garrocho-Villegas, en 2013 (imagen no presentada). El efecto obtenido fue similar, lo que confirma que el estado de fosforilación de la proteína S6K es un marcador bioquímico directo de la actividad de cinasa de TOR. En el presente estudio, sin embargo, no fue posible detectar una señal concluyente de la presencia de esta proteína en su estado fosforilado. No se encontraron tampoco reportes de que S6K haya sido visualizada en etapas tan tempranas del desarrollo del maíz, en comparación con los modelos descritos arriba. En *Arabidopsis*, no ha sido posible detectar a S6K endógena con éxito. Es probable que esta proteína se encuentre en una cantidad muy baja para llevar a cabo un análisis densitométrico satisfactorio, lo que explicaría la dificultad para generar un ensayo *in vivo* de la medida de la actividad de cinasa de TOR de forma exitosa y/o reproducible en *Arabidopsis* (Xiong y Sheen, 2012), y en maíz tampoco ha sido posible llevar a cabo este análisis (Dra. Tzvetanka Dimitrova, Facultad de Química, UNAM, comunicación personal). A pesar de este inconveniente, el indicio de la actividad de cinasa de TOR está también reflejado, aunque de manera indirecta, en la cantidad de proteína total presente en cada tratamiento, ya que el estimular la síntesis de proteínas *de novo* es una de las principales funciones de TOR en eucariontes.

La activación de S6K promueve la hiperfosforilación de RPS6 en la subunidad 40S ribosomal y estimula el reclutamiento selectivo de polisomas de mRNAs específicos. A pesar de que el mecanismo exacto involucrado en este proceso no está del todo claro, la activación de la vía como resultado de la fosforilación por parte de TOR, a su vez estimulada por condiciones favorables de desarrollo, resulta en proliferación y crecimiento celular aumentados (Dinkova *et al.*, 2007). El abatimiento en la cantidad de proteínas totales en los medios descritos en la figura 19 hablaría acerca

del efecto que el AZD ejerce sobre TOR a nivel proteína, ya que dicha disminución de los niveles proteicos podría deberse a la inhibición de dicho estimulador de síntesis de proteínas, confirmando que lo observado en el resto de los análisis es debido a este hecho.

Los azúcares son reconocidos mayormente como sustratos metabólicos, pero éstos también tienen una importante función señalizadora. En plantas, existe evidencia de que la glucosa estimula el desarrollo en general del individuo (Singh *et al.*, 2014). Líneas de *Arabidopsis* con la expresión de algunos componentes del complejo de TOR afectada, muestran perturbaciones en el metabolismo de varios carbohidratos, incluyendo la sacarosa, el almidón y la rafinosa. Existen más datos que sugieren que la actividad de cinasa de TOR, que controla procesos biológicos como traducción de RNAs específicos y la autofagia, está directamente regulada por carbohidratos solubles (Dobrenel *et al.*, 2013).

En este grupo de trabajo se han hecho ya algunos estudios que demuestran que la glucosa (y la sacarosa) ejerce un efecto diferencial a lo largo del desarrollo del maíz, modificando los niveles proteicos de algunos marcadores del ciclo celular (Ayub-Miranda, 2015; García-Ayala, 2015), los patrones celulares y la síntesis de DNA *de novo* en zonas meristemáticas, y la morfología típica de ejes embrionarios (Lara-Núñez *et al.*, 2017). Así mismo, ya se ha observado que la vía de señalización de TOR estaría igualmente modificada por la acción de la glucosa, de acuerdo a los datos todavía no publicados de Flores-Sánchez (figuras 17 y 18).

El hecho de que los niveles proteicos de algunas ciclinas tipo D se hayan visto modificados diferencialmente entre los tratamientos con y sin glucosa e inhibición de TOR pone de manifiesto la relación antes mencionada. Las células de los meristemas son las primeras en ser reactivadas y se encuentran inicialmente en G1. En maíz la fase S comienza hacia las 12 horas de imbibición y las primeras figuras mitóticas son observadas alrededor de las 24 horas (Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Estos datos deberán ser tomados en cuenta al momento de observar la modificación

de los niveles proteicos a lo largo del estudio. Dependiendo de su mecanismo de degradación, las ciclinas D podrían ser constitutivamente inestables durante todo el ciclo celular, o solo durante algunas fases de éste. Estos mecanismos aun no son muy claros, aunque existe evidencia de que está involucrada la vía ubiquitina-proteosoma, y en efecto, la mayoría de las ciclinas D poseen secuencias denominadas PEST (un péptido señal asociado a la degradación de proteínas por esta vía) en su estructura (Godínez-Palma *et al.*, 2014).

Ya que el ciclo celular solo puede seguir adelante gracias al constante recambio de las ciclinas, éstas son rápidamente degradadas mediante la vía ubiquitinación-proteosoma. La reacción de ubiquitinación es seguida por la duplicación del DNA y la división celular. Estos dos procesos son regulados por dos complejos conocidos como SCF (Skp1/cullin/F-box-related complex) y el APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome). El complejo SCF permite a la célula pasar de la fase G1 a la fase S, mientras que el complejo APC/C controla el pase de la fase G2 a la fase M. A la par, la expresión de genes de CDKs está siendo promovida, y las proteínas ayudan con la regulación de sus respectivas vías (Tank y Thaker, 2011).

9. Conclusiones

- La cantidad de proteína total a lo largo de los tiempos analizados en los ejes control se afectó por la incorporación de AZD-8055, sugiriendo que existe inhibición de actividad de cinasa de TOR en el estudio. La glucosa es capaz de amortiguar el efecto del mismo inhibidor.
- La abundancia proteica de las ciclinas D3, D4 y D5;3, además de CDKA, se modificó diferencialmente en presencia o ausencia de AZD-8055 y/o glucosa, poniendo de manifiesto la influencia de estos elementos en la germinación. La abundancia de otras proteínas relacionadas al ciclo celular, CYCB1;2 y PCNA no se modificó significativamente.

10. Perspectivas

La regulación de estas proteínas ciclinas y CDKs se encuentra a nivel de numerosas vías. Además de las mencionadas a lo largo del texto, se podría añadir que las ciclinas D responden a estímulos de hormonas como auxinas, citocininas y ácido abscísico, además de sus proteínas inhibidoras en complejo con CDKs, las KRP (Garza-Aguilar *et al.*, 2017). Ya que todos estos elementos entran en juego, resulta complicado afirmar mediante qué vía los niveles de estas proteínas están siendo afectadas, o si cada una hace alguna contribución a lo observado. La vía glucosa-TOR debe tener uno de los papeles más importantes en la progresión del ciclo celular y en el desarrollo en general de la planta debido a los numerosos procesos celulares que están bajo su regulación, por lo que se sugiere que se realicen estudios más extensos y se empleen técnicas más detalladas que permitan el análisis de esta vía a diferentes niveles.

11. Referencias

- Alencar N, Innecco R, Gomes E *et al.* (2012). *Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of Cereus jamacaru D.C. ssp. jamacaru (Cactaceae)*. Annals of the Brazilian Academy of Sciences 84(3), 823-832.
- Ayub-Miranda MF (2015). *Caracterización de las ciclinas ZmCYCB1;2 y ZmCYCB2;1 en ejes embrionarios durante la germinación de maíz* (tesis de licenciatura). UNAM. México, D.F.
- Baena-González E, Hanson J (2017). *Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators*. Current Opinion in Plant Biology 35, 152-157.
- Bewley J (1997). *Seed Germination and Dormancy*. American Society of Plant Physiologists Vol. 9, 1055-1066.
- Betz C, Hall M (2013). *Where is mTOR and what is it doing there?* JBS 203(4), 563–574.
- Bradford M (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72(1-2), 248-254.
- Buendía-Monreal M, Rentería-Canett I, Guerrero-Andrade O, Bravo-Alberto CE, Martínez-Castilla L, García E, Vázquez-Ramos JM (2011) *The family of maize D-type cyclins: genomic organization, phylogeny and expression patterns*. Physiol Plant 143(3), 297-308.
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footitt S *et al.* (2008). *Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis*. The Plant Journal 53(2), 214–224.
- CIBIOGEM (2014). *Maíz*. [en línea] [Fecha de consulta: 27 de julio de 2018]. Disponible en <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/maiz>.
- Dante R, Larkins B, Sabelli P (2014). *Cell cycle control and seed development*. Frontiers in Plant Science 5, 493.

- Dante R, Sabelli P, Nguyen H, Leiva-Neto J, Tao Y, Lowe K, Hoerster G, Gordon-Kamm W, Jung R, Larkins B (2014). *Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: evidence for differential expression and functional specialization*. *Planta* 239(2), 493–509.
- Davies PJ (2010) *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*. In: Davies P.J. (eds) *Plant Hormones*. Springer, 1-15.
- den Boer B, Murray J (2010). *Triggering the cell cycle in plants*. *Trends in Cell Biology* 10, 245-250.
- Deng K, Yu L, Zheng X, Zhang K, Wang W, Dong P, Zhang J, Ren M (2016). *Target of Rapamycin Is a Key Player for Auxin Signaling Transduction in Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 7, 291.
- Deprost D, Truong N, Robaglia C, Meyer C (2004). *An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326(4), 844-50.
- Desvoyes B, de Mendoza A, Ruiz I, Gutiérrez C (2014). *Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division*. *Journal of Experimental Botany* 65(10), 2657-2666.
- Dimova DK, Dyson NJ (2005). *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. *Oncogene* 24(17), 2810-2826.
- Dinkova T, Reyes de la Cruz H, García-Flores C, Aguilera R, Jiménez-García LF, Sánchez de Jiménez, E (2007). *Dissecting the TOR–S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation*. *Physiologia Plantarum* 7(6), 675–677.
- Dobrenel T, Mancera E, Forzani C, Azzopardi M, Davanture M *et al.* (2016). *The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6*. *Frontiers in Plant Science* 7, 1611.
- Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clément G, Moreau M, Sormani R, Robaglia C, Meyer C (2013). *Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR?* *Frontiers in Plant Science* 15(4), 93.

- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2015). *El maíz en la nutrición humana*. Colección FAO: alimentación y nutrición [en línea] [Fecha de consulta: 02 de junio de 2018]. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm>.
- Feldman M, Shokat K (2010). *New Inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR Pathway: Insights into mTOR Signaling from a New Generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs)*. *Current topics in microbiology and immunology* 347, 241-262.
- Foster KG, Fingar DC (2010). Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *The Journal of Biological Chemistry* 285(19), 14071-1477.
- García-Ayala BB (2015). *Influencia de los carbohidratos en el ciclo celular durante la germinación del maíz* (tesis de licenciatura). UNAM. México, D.F.
- Garrocho-Villegas V, Aguilar R, Sánchez de Jiménez E (2013). *Insights into the TOR-S6K Signaling Pathway in Maize (Zea mays L.). Pathway Activation by Effector-Receptor Interaction*. *Biochemistry* 52(51), 9129–9140.
- Garza-Aguilar SM, Lara-Núñez A, García-Ramírez E, Vázquez-Ramos JM (2017). *Modulation of CycD3;1-CDK complexes by phytohormones and sucrose during maize germination*. *Physiologia Plantarum* 160(1), 84-97.
- Gibson SI (2004). *Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network*. *Journal of Experimental Botany* 55(395), 253-64.
- Godínez-Palma SK, García E, Sánchez L, Rosas F, Vázquez-Ramos JM (2013). *Complexes of D-type cyclins with CDKs during maize germination*. *Journal of Experimental Botany* 64(18), 5661–5671.
- Gutiérrez R, Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2005). *Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination*. *Plant Cell Physiology* 46,166–173.
- Henriques R, Magyar Z, Bögre L (2013). *S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in Arabidopsis*. *Plant signaling and behavior* 8(6).

- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N et al. (2002). *Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action*. Cell 110(2),177-89.
- Herrera I, Sánchez MD, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM (2000) *Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination: Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins*. Physiologia Plantarum 110, 127–134.
- Hosney, RC (1991). *Principios de ciencia y tecnología de los cereales*. Acribia Editorial.
- Ji J, Dyson N (2010). *Interplay Between Cyclin-Dependent Kinases and E2F-Dependent Transcription*. Cell Cycle Deregulation in Cancer.
- Kim Y, Kim S, Shin Y, Hur Y, Kim W et al. (2014). *Ribosomal Protein S6, a Target of Rapamycin, Is Involved in the Regulation of rRNA Genes by Possible Epigenetic Changes in Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry 289(7), 3901-3912.
- Koch K (2004). *Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development*. Current Opinion in Plant Biology 7(3), 235-246.
- Lara-Núñez A, de Jesús N, Vázquez-Ramos JM (2008). *Maize D4;1 and D5 cyclin proteins in germinating maize. Associated kinase activity and regulation by phytohormones*. Physiologia Plantarum 132(1), 79-88.
- Lara-Núñez A, García-Ayala B, Garza-Aguilar S, Flores-Sánchez J, Sánchez-Camargo V, Bravo-Alberto C, Vázquez-Santana S, Vázquez-Ramos JM (2017). *Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination*. Plant Physiology and Biochemistry 113, 20-31.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S (2014). *Sugar signals and the control of plant growth and development*. Journal of Experimental Botany 65(3), 799-807.
- Lomanto-Díaz LD, Ortiz-Cala OD, Bretón-Pinto CO, Gómez-Lizcano AI, Mesa-Cornejo VM (2003). *El ciclo celular*. MEDUNAB 6(16), 21-29.

- Ma XM, Blenis J (2009). *Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10(5),307-138.
- Mahfouz M, Kim S, Delauney A, Verma D (2006). *Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals*. Plant Cell 18(2), 477-90.
- Menges M, Samland A, Planchais S, Murray J (2006). *The D-Type Cyclin CYCD3;1 Is Limiting for the G1-to-S-Phase Transition in Arabidopsis*. The Plant Cell 18, 893–906.
- Montané MH, Menand B (2013). *ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change*. Journal of Experimental Botany 64(14), 4361–4374.
- Moreau M, Sormani R, Menand B, Veit B, Robaglia C, Meyer C (2010). *Chapter 15 - The TOR Complex and Signaling Pathway in Plants*. The Enzymes XXVII, 285-302.
- Nakabayashi K, Bartsch M, Xiang Y, Miatton E, Pellengahr S *et al.* (2012). *The Time Required for Dormancy Release in Arabidopsis Is Determined by DELAY OF GERMINATION1 Protein Levels in Freshly Harvested Seeds*. The Plant Cell 24(7), 2826–2838.
- Nannas NJ, Dawe RK (2015). *Genetic and Genomic Toolbox of Zea mays*. Genetics 199(3), 655–669.
- Nonogaki H, Bassel G, Bewley J (2010). *Germination—Still a mystery*. Plant Science 179(6), 574-581.
- Paliwal R, Granados G, Lafitte H, Violic A (2001). *El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción*. FAO, Roma.
- Pinzón C, Serrano M, Sanabria M (2009). *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos*. Ciencias de la Salud, Colombia 7(2), 47-66.
- Polit J, Kaźmierczak A, Walczak-Drzewiecka A (2012). *Cell cycle-dependent phosphorylation of pRb-like protein in root meristem cells of Vicia faba*. Protoplasma 249(1), 131–137.

- Quiroz-Figueroa F, Vázquez-Ramos JM (2006). *Expression of maize D-type cyclins: comparison, regulation by phytohormones during seed germination and description of a new D cyclin*. *Physiologia Plantarum* 128(3), 556-568.
- Reinhard C, Thomas G, Kozma S (1992). *A single gene encodes two isoforms of the p70 S6 kinase: Activation upon mitogenic stimulation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(9), 4052–4056.
- Ren M, Venglat P, Oiu S, Feng L, Cao Y et al. (2012). *Target of Rapamycin Signaling Regulates Metabolism, Growth, and Life Span in Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24(12), 4850-4874.
- Reyes J, Jiménez-García LF, González MA, Vázquez-Ramos JM (1991). *Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize*. *Seed Science Research* 1(2), 113-117.
- Reyes H, Aguilar R, Sánchez-Jiménez E (2004). *Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70^{S6K}*. *Biochemistry* 43(2), 533–539.
- Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B (2015). *TOR signalling in plants*. *Biochemical Journal* 470, 1–14.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy J, Murray J (2002). *Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression*. *Molecular and Cellular Biology* 20(13), 4513-4521.
- Robaglia C, Thomas M, Meyer C (2012). *Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases*. *Current Opinion in Plant Biology* 15(3), 301-7.
- Sabelli PA, Dante RA, Nguyen HN, Gordon-Kamm WI, Larkins BA (2014). *Expression, regulation and activity of a B2-type cyclin in mitotic and endoreduplicating maize endosperm*. *Frontiers in Plant Science* 5, 561.
- Sánchez-Jiménez MP, Torres A, Boniotti M, Gutiérrez C, Vázquez J (2002). *PCNA protein associates to Cdk-A type protein kinases in germinating maize*. *Plant Molecular Biology* 50(2), 167–175.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruiz M, Díaz-pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S (2012). *Early carbon mobilization and radicle*

- protrusion in maize germination*. Journal of Experimental Botany 63(12), 4513–4526.
- Shen W (2002). *The plant E2F–Rb pathway and epigenetic control*. Trends in Plant Science 7(11), 505-11.
 - Singh M, Gupta A, Laxmi A (2014). *Glucose control of root growth direction in Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany 65(12), 2981–2993.
 - Strzalka W, Ziemienowicz A (2011). *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation*. Annals of Botany 107(7), 1127–1140.
 - Trigo Y, Lechuga J (2002) *El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo*. *Análisis Económico*. Análisis Económico XVII (36) [en línea], [Fecha de consulta: 07 de junio de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41303610>
 - Tank JG, Thaker VS (2011). *Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle*. Biologia Plantarum 55 (2), 201-212.
 - Tchevkina E, Komelkov A (2012). *Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways*. Protein Phosphorylation in Human Health.
 - Vázquez-Ramos JM, Sánchez-Jiménez MP (2003). *The cell cycle and seed germination*. Seed Science Research 13(2), 113-130.
 - Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975). *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. The Journal of Antibiotics 28(10), 721-6.
 - Wurzinger B, Nukarinen E, Nägele T, Weckwerth W, Teige M (2018). *The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles*. Plant Physiology 176, 1085–1094.
 - Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J (2013). *Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems*. Nature 496(7444), 181-6.

- Xiong Y, Sheen J (2012). *Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Signaling in Plants*. *Journal of Biochemical Chemistry* 287(4), 2836-2842.
- Xiong Y, Sheen J (2014). *The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism*. *Plant Physiology* 164, 499–512.