



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

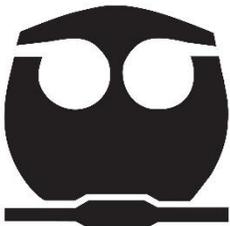
Expresión de genes de la ruta *de novo* y de salvamento
de nucleótidos en tejidos de maíz expuestos a agentes
genotóxicos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Milton Bryan Novelo Carmona



Director de Tesis
Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Ciudad Universitaria, CDMX,
2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Raquel Ortega Muñoz
Vocal: Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
1er. Suplente: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
2do. Suplente: Dr. Samuel Canizales Quinteros

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica

Facultad de Química, UNAM

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Asesor del tema

M. en C. María Manuela Nájera Martínez

Asesor Técnico

Milton Bryan Novelo Carmona

Sustentante

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
A. Proceso fisiológico de la germinación del maíz (<i>Zea mays</i>).....	3
1. Síntesis de DNA durante la germinación y su regulación en el ciclo celular.....	4
B. Biosíntesis de nucleótidos en plantas.....	4
1. Síntesis <i>de novo</i> de purinas.....	6
2. Síntesis <i>de novo</i> de pirimidinas.....	8
3. Ruta de salvamento de purinas.....	11
4. Ruta del salvamento de pirimidinas.....	12
C. Ribonucleótido reductasa.....	13
1. Mecanismo de reducción de la ribonucleótido reductasa.....	15
2. Regulación de la actividad de la RNR.....	18
D. Timidina cinasa.....	19
1. Timidina cinasa 1.....	20
2. Regulación de la TK1 durante el ciclo celular.....	20
3. Regulación de la TK1 por efectores.....	20
4. Mecanismo de reacción de la timidina cinasa.....	21
E. Daño en el DNA.....	22
1. Respuesta celular al daño.....	23
2. Mecanismos de reparación de DNA en plantas.....	24
3. Reparación de ruptura de doble cadena.....	25
4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	26

F. Agentes genotóxicos.....	27
1. Zeocina (Zeo).....	28
2. Hidroxiurea (HU).....	29
3. Ciprofloxacino (Cip).....	30
G. Función de la ribonucleótido reductasa en plantas.....	31
1. Ribonucleótido reductasa.....	31
2. Regulación de la expresión de RNRs en el ciclo celular.....	34
3. Función de la RNR en la reparación del DNA.....	34
H. Función de la Timidina cinasa de plantas.....	36
1. Función de la TK1 en la reparación del DNA.....	37
III. HIPÓTESIS.....	39
IV. OBJETIVOS.....	39
A. Objetivo General.....	39
B. Objetivos Particulares.....	39
V. MATERIALES Y MÉTODOS	40
A. Desinfección y siembra de semillas de maíz.....	40
B. Preparación de medio agar con agente genotóxico e imbibición de las semillas.....	40
C. Extracción de RNA total.....	41
1. Análisis electroforético del RNA total.....	42
2. Calibración por densitometría.....	43
D. Reacción RT-PCR.....	43
E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
F. Caracterización de la respuesta ante el estrés genotóxico.....	47

VI. RESULTADOS	48
A. Evaluación de la integridad del RNA.....	48
B. Determinación de las condiciones para evaluar los niveles de transcritos de los genes <i>ZmRNR1</i> y <i>ZmTK1</i>	49
C. Efecto de la zeocina sobre la expresión de los genes <i>ZmRNR1</i> y <i>ZmTK1</i>	49
D. Efecto de la hidroxiaurea sobre la expresión de los genes <i>ZmRNR1</i> y <i>ZmTK1</i>	51
E. Efecto del ciprofloxacino sobre la expresión de los genes <i>ZmRNR1</i> y <i>ZmTK1</i>	53
F. Efecto de los agentes genotóxicos sobre el crecimiento de la raíz primaria.....	55
VII. DISCUSIÓN	57
A. Expresión y función de la <i>RNR1</i> en la reparación del DNA en plantas.....	57
B. Expresión y función de la <i>TK1</i> en la reparación del DNA en plantas.....	59
C. Respuesta mediada en maíz por ATM y ATR.....	61
D. Regulación y síntesis de <i>ZmRNR1</i> y <i>ZmTK1</i> durante el ciclo celular.....	61
E. Ensayo de toxicidad.....	62
VIII. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	63
IX. REFERENCIAS	65
X. ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de los genotóxicos.....	41
Tabla 2. Mezcla de reacción de RT.....	44
Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR.....	45
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos para PCR.....	46
Tabla 5. Condiciones de amplificación de los genes.....	46
Tabla 6. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de zeocina.....	77
Tabla 7. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de hidroxurea.....	77
Tabla 8. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de ciprofloxacino.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura anatómica y proceso de germinación de la semilla de maíz.....	3
Figura 2. Ruta biosintética <i>de novo</i> de purinas en plantas.....	8
Figura 3. Ruta biosintética <i>de novo</i> de de pirimidinas en plantas.....	10
Figura 4. Ruta del salvamento de purinas en plantas.....	11
Figura 5. Ruta del salvamento de pirimidinas en plantas.....	12
Figura 6. Estructura y conformación del heterodímero de las subunidades $\alpha_2\beta_2$ de la holoenzima ribonucleótido reductasa clase Ia.....	14
Figura 7. Reacción de formación del radical tirosilo.....	15
Figura 8. Mecanismo de reducción de la RNR clase I.....	17
Figura 9. Enzimas implicadas en la formación de dTTP.....	19
Figura 10. Mecanismo de reacción de la TK1.....	21

Figura 11. Vía de señalización de respuesta al daño en el DNA.....	23
Figura 12. Reparación de la ruptura de doble cadena.....	26
Figura 13. Reparación por escisión de nucleótidos.....	27
Figura 14. Estructura química de la zeocina.....	28
Figura 15. Mecanismo de acción de las bleomicinas.....	29
Figura 16. Estructura química de la hidroxurea.....	29
Figura 17. Estructura química del ciprofloxacino.....	30
Figura 18. Integridad de los RNAs ribosomales.....	48
Figura 19. Efecto de la zeocina en la inducción de genes.....	50
Figura 20. Efecto de la hidroxurea en la inducción de genes.....	52
Figura 21. Efecto del ciprofloxacino en la inducción de genes.....	54
Figura 22. Medición de las raíces expuestas a los genotóxicos.....	55
Figura 23. Medición de las raíces expuestas a HU.....	56
Figura 24. Características fenotípicas de la germinación en HU.....	56
Figura 25. Patrón de expresión de <i>AtRNR1</i> en respuesta a HU y a bleomicina.....	58
Figura 26. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de <i>ZmTK1</i>	78

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

α	Subunidad mayor de la RNR	cDNA	DNA complementario
β	Subunidad menor de la RNR	Cip	Ciprofloxacino
λ	Longitud de onda	<i>cls8</i>	Mutante de RNR de <i>Arabidopsis</i>
AICAR	AIR 4-carboxiamida	cm	Centímetro
AIR	Ribonucleótido 5-aminoimidazol	CMP	Citidina monofosfato
AMP	Adenosina monofosfato	CP	Carbamoilfosfato
ANOVA	Análisis de varianza	CTP	Citidina trifosfato
ASL	Adenilsuccinato liasa	CpTK1	TK1 cloroplástica de Maíz
ASS	SAMP sinetasa	<i>cptk1</i>	Mutante de CpTK1
Atasa	Amidotransferasa	dADP	Desoxi-adenosin difosfato
ATM	Ataxia telangiectasia mutada	dADP	Desoxi-adenosin difosfato
ATPARP1	Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	dCK	Desoxi-citidina cinasa
ATPARP2	Poli(ADP-ribosa) polimerasa 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	dGK	Desoxi-guanosina cinasa
ATR	Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3	dCDP	Desoxi-citidina difosfato
AtRNR1	Gen de ribonucleótido reductasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	dCMP	Desoxi-citidina monofosfato
AtTK1a	Timidina cinasa 1a de <i>Arabidopsis thaliana</i>	dCTP	Desoxi-citidina trifosfato
AtTK1b	Timidina cinasa 1b de <i>Arabidopsis thaliana</i>	DEPC	Dietil pirocarbonato
<i>Attso2</i>	Mutante de TSO2	dGDP	Desoxi-guanosin difosfato
A_{260}	Absorbancia a la longitud de onda de 260 nm	dGTP	Desoxi-guanosin trifosfato
BLM	Bleomicina	DHO	Dihidroorotato
CA	Carbamoilaspartato	DHODH	Dihidroorotato
CAIR	4-carboxi ribonucleótido imidazol	Deshidrogenasa	Deshidrogenasa
		dNK	Desoxi-nucleósido cinasa
		dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
		DSB	Ruptura de doble cadena del DNA
		dTDP	Desoxi-timidina difosfato

dTMP	Desoxi-timidina monofosfato	IMP	Inosina monofosfato
dTTP	Desoxi-timidina trifosfato	IMPDH	IMP deshidrogenasa
dUDP	Desoxi-uridina difosfato	IR	Radiación ionizante
dUTP	Desoxi-uridina trifosfato	LiCl	Cloruro de litio
dUMP	Desoxi-uridina monofosfato	M	Concentración molar
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético	mg	Miligramos
EROs	Especies reactivas de Oxígeno	Mg ²⁺	Magnesio 2+
ETOH	Etanol	Mn ^{II} ₂ -Y·	Radical tirosil Dimanganeso
FAD	Flavín adenín Dinucleótido	m/v	Concentración porcentual
FAICAR	Ribonucleótido 5-formaminoimidazol-4-carboxiamida	NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidado)
FCI	Fenol-cloroformo-isoamílico	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido)
Fe ^{II} ₂ -Y·	Radical tirosil diférrico	NDK	Nucleósido difosfato
FGAM	Formilglicinamida	NDP	Ribonucleótidos difosfato
FGAMS	FGAR sintetasa	NER	Reparación por escisión de nucleótidos
FGAR	Ribonucleótido Formilglicinamida	NHEJ	Unión de extremos no homólogos
FGRAM	Ribonucleótido formilglicina amida	OMP	Orotato monofosfato
GAR	Ribonucleótido Glicinamida	PCET	Transferencia electrónica acoplada a protones
GART	GAR transformilasa	Pi	Fosfato inorgánico
GMP	Guanosina Monofosfato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
GMPS	GMP sintetasa	PPi	Pirofosfato inorgánico
GoTaq	DNA polimerasa comercial de Promega	PRA	Fosforribosilamina
GTP	Guanosina trifosfato	PRPP	Fosforribosil Pirofosfato
GyrA	Subunidad A de la girasa	RNApol	RNA polimerasa
HU	Hidroxiurea	RNR	Ribonucleótido reductasa
IGK	Inosina/Guanosina	RNR1	Ribonucleótido

RNR2A	reductasa 1 Gen ribonucleótido reductasa 2A	TSO2	Gen de la subunidad RNR2
<i>rnr2a</i>	Mutante de RNR2A	<i>tso2-1</i>	Mutante de TSO2
RNR2B	Gen ribonucleótido reductasa 2B	TTP	Timidina trifosfato
<i>rnr2b-1</i>	Mutante de RNR2B	UDP	Uridina difosfato
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa reversa	UK	Uridina cinasa
S·	Radical cisteinilo	UMP	Uridina monofosfato
SAICAR	Ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxiamida	UTP	Uridina trifosfato
SAM	S-adenosilmetionina	UV-B	Luz ultravioleta B
SAMP	Adenilsuccinato	UV-C	Luz ultravioleta C
SH	Cisteína	v/v	Concentración porcentual volumen/volumen
SOG1	Gen supresor de respuesta a radiación gamma	XMP	Xantosina Monofosfato
ssDNA	DNA de cadena sencilla	WT	Cepa silvestre
TAE	Buffer de tris, acetato y EDTA	Y·	Radical tirosilo
TK	Gen de timidina cinasa	Zeo	Zeocina
TK1	Gen de timidina cinasa 1	ZmEF1a	Factor de elongación EF1a de maíz
<i>tk1a</i>	Mutante de TK1a	ZmRNR1	Ribonucleótido reductasa 1 de maíz
<i>tk1b</i>	Mutante de TK1b	ZmTK1	Timidina cinasa de maíz
TK2	Gen de timidina cinasa 2	10F-THF	10-Formil Tetrahidrofurano
TMPK	Timidilato cinasa		

I. RESUMEN

La biosíntesis de nucleótidos está conformada por dos rutas que mantienen el aporte de las pozas de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) requeridos para la síntesis de DNA. La primera es la biosíntesis *de novo*, la cual genera nucleótidos a partir de fosforribosil-pirofosfato, aminoácidos y CO₂. La segunda es la vía de salvamento, en la que se reciclan nucleósidos y bases libres preformadas provenientes del catabolismo de ácidos nucleicos. La ribonucleótido reductasa (RNR) participa en la ruta *de novo* de nucleótidos que cataliza la eliminación del grupo hidroxilo del C2' del anillo de ribosa de los ribonucleótidos para formar desoxirribonucleótidos. Dado que actúa sobre los cuatro nucleótidos, esta enzima juega un papel crítico en la capacidad de sintetizar DNA. En la vía de salvamento de nucleósidos de pirimidina, la timidina cinasa (TK1) cataliza la fosforilación de timidina para formar el nucleótido desoxitimidina monofosfato (dTMP). Los genes de ambas enzimas se expresan tanto en tejidos diferenciados como proliferativos, lo que sugiere que, además de participar en la replicación, tienen una función en los eventos de reparación de DNA. Para la reparación de distintos daños de DNA, se requiere síntesis de este ácido nucleico ya que el aporte de dNTPs es fundamental, por lo que la hipótesis de este trabajo es que si los genes *RNR1* y *TK1* de maíz participan en respuesta a estrés genotóxico, entonces inducirán su expresión en presencia de agentes que provocan daño en el DNA. Para responder esta pregunta de investigación, se implementó un modelo de estudio en el que las raíces de plántulas de maíz de 36 h se expusieron a tres agentes genotóxicos, zeocina, hidroxiiurea y ciprofloxacino, que tienen distintos mecanismos de acción. La exposición a zeocina indujo la expresión (20%) de *ZmTK1* a las 6 h y de *ZmRNR1* (40 %) a las 24 h. La hidroxiiurea provocó la inducción de 50%, tanto de *ZmRNR1* como de *ZmTK1* a las 6 h de

exposición, pero con patrones distintos pues a las 12 h se mantuvo esta inducción únicamente para *ZmRNR1*. El ciprofloxacino solamente indujo la expresión de *ZmRNR1* desde las 6 h de exposición. La inducción de la expresión de estos genes a tiempos muy cortos de exposición de los agentes genotóxicos apoya la hipótesis de que sus productos (*ZmRNR1* y *ZmTK1*) participan en el aporte de nucleótidos requeridos para los eventos de reparación de DNA.

II. INTRODUCCIÓN

A. Proceso fisiológico de la germinación del maíz (*Zea mays*)

La germinación de las semillas es un proceso de diferenciación en el que las células cambian su metabolismo de un estado dormante a uno de completa actividad, a través de una secuencia de eventos moleculares que transforman el embrión heterótrofo en un organismo autótrofo (Georgieva et al., 1993). Esta activación implica el reinicio de la expresión génica a partir del estado quiescente del embrión, para establecer un programa funcional génico que abarca la reestructuración de la membrana, reacciones metabólicas productoras de energía, y la síntesis de macromoléculas, que permiten a las células dividirse (Jiménez-López et al., 2011).

La germinación inicia con la imbibición o recaptura de agua por la semilla seca y termina con la elongación (protrusión de la radícula) a partir de la semilla (Jiménez-López et al., 2011) (Figura 1).

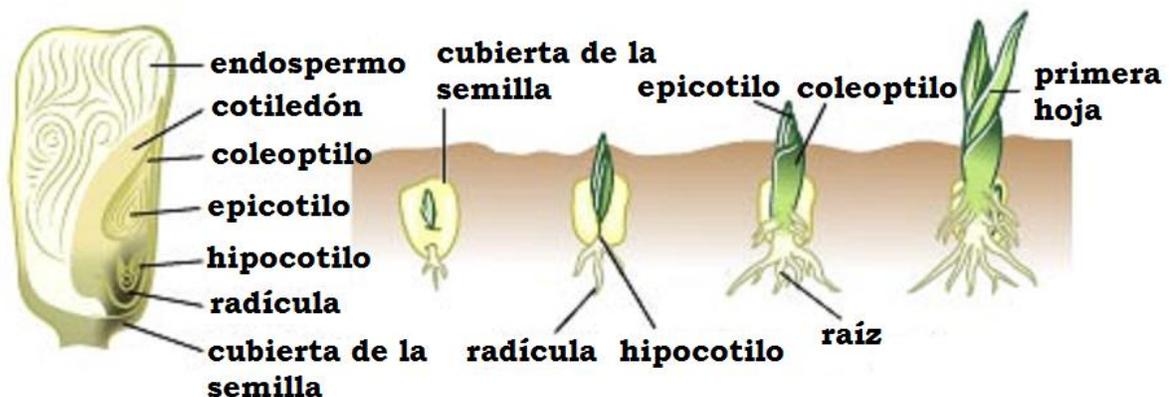


Figura 1. Estructura anatómica y proceso de germinación de la semilla de maíz. Tomada de Merriam-Webster, 2006.

La imbibición se describe en tres fases: en la fase I la semilla reinicia su proceso metabólico, en la fase II entra en una fase lag de alta actividad metabólica de recaptura de agua para que en la fase III ocurra la protrusión de la radícula (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006), para la cual, se requiere la ruptura del endospermo y de la semilla (Holdsworth, 2011).

1. Síntesis de DNA durante la germinación y su regulación en el ciclo celular

Durante las primeras horas de imbibición en maíz, ocurre la síntesis reparativa del DNA nuclear, así como la replicación de los genomas organelares (Georgieva et al., 1993; Zlatanova et al., 1987), y a partir de las 14 h las células meristemáticas entran en la fase S del ciclo celular, que comienza con la replicación del DNA. Este proceso, medido por la incorporación de timidina tritiada, alcanza un máximo a las 40 horas (Baíza et al, 1988). Posterior al tiempo de inicio de la replicación comienza la protrusión de la radícula, aproximadamente a las 20 horas de imbibición, y a las 36 horas, en un lote de semillas más del 80% de éstas han germinado (Baíza et al, 1988).

Una limitante en la síntesis reparativa y replicativa del DNA es un adecuado aporte y balance de nucleótidos (Kafer et al., 2004).

B. Biosíntesis de nucleótidos en plantas

Los nucleótidos, además de ser las unidades monoméricas que forman a los ácidos nucleicos, funcionan como precursores directos de la síntesis de vitaminas (riboflavina, tiamina y folatos; Herz et al., 2000; Hanson and Gregory, 2002), para coenzimas como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), flavín adenín dinucleótido (FAD), y S-adenosilmetioina (SAM), también para UTP y UDP que están

involucrados en el metabolismo de sacarosa y UDP-glucosa, este último es un precursor de la síntesis de celulosa (Lim and Bowles, 2004).

Los procesos de síntesis y degradación de nucleótidos de purinas y pirimidinas son requeridos para el metabolismo primario, secundario y expresión génica, además abarcan la mayoría de procesos bioquímicos y celulares requeridos para el crecimiento celular (Zrenner et al., 2006). Las reacciones enzimáticas involucradas en su biosíntesis pueden seguir dos vías: síntesis *de novo* y ruta de salvamento (Clausen et al., 2012; Zrenner et al., 2006).

La síntesis *de novo* ocurre a partir de precursores sencillos como aminoácidos y CO₂, mientras que la ruta de salvamento de purinas recicla nucleósidos y/o bases libres formadas durante la degradación de ácidos nucleicos. Para las pirimidinas, se reciclan solamente los nucleósidos, siendo el uracilo la única base que es rescatada directamente (Zrenner et al., 2006). Esta diferencia resulta en requerimientos energéticos distintos, por ejemplo, en el caso de los nucleótidos de purinas se consumen cinco moléculas de ATP para la síntesis *de novo*, mientras que para la ruta de salvamento únicamente se requiere una para la formación del nucleótido monofosfato correspondiente (Moffatt et al., 2002). Para el caso de la síntesis *de novo* de pirimidinas también se requieren cinco moléculas de ATP para formar CTP y seis para dTTP (Stasolla et al., 2003).

La alta demanda de nucleótidos en células durante las etapas de desarrollo y división es cubierta por la síntesis *de novo* (Zrenner et al., 2006). En otras etapas de desarrollo, como durante la maduración del embrión de abeto, es la ruta del salvamento la principal vía que aporta dNTPs (Ashihara et al., 2001). Y durante la germinación de la semilla de *Arabidopsis* ambas rutas contribuyen (Jung et al., 2009; Stasolla et al., 2003).

Debido a las diferencias químicas estructurales entre purinas y pirimidinas, la síntesis *de novo* de los nucleótidos se lleva a cabo a través de diferentes reacciones enzimáticas y precursores (Kafer et al., 2004).

1. Síntesis *de novo* de purinas

Inicia a partir de los aminoácidos glicina, glutamina y aspartato, además de dióxido de carbono y 5-fosforribosil-pirofosfato (PRPP). (Figura 2) (Stasolla et al., 2003; Zrenner et al., 2006). La reacción inicial es la formación de fosforribosilamina (PRA) a partir de PRPP y glutamina, catalizada por la enzima PRPP-amidotransferasa (Atasa). Enseguida, la GAR sintetasa conjuga una glicina a PRA para formar ribonucleótido glicinamida (GAR). La GAR es transformada por la GAR transformilasa (GART), que utiliza 10F-THF para generar ribonucleótido formilglicinamida (FGAR). La siguiente reacción es catalizada por la ribonucleótido formilglicinamida sintetasa (FGAMS) para formar FGAM. Este intermediario es procesado por la AIR sintetasa que cierra el anillo de cinco miembros, para generar al ribonucleótido 5-aminoimidazol (AIR).

AIR sufre una reacción de carboxilación por la AIR carboxilasa para formar 4-carboxi ribonucleótido imidazol (CAIR). Se añade un aspartato utilizando otra molécula de ATP para formar el ribonucleótido N-succinil-5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxiamida (SAICAR) mediante SAICAR sintasa. Posteriormente, el fumarato se libera, generando ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR), catalizado por adenilosuccinato liasa (ASL). La enzima bifuncional AICAR formiltransferasa forma el ribonucleótido 5-formaminoimidazol-4-carboxamida (FAICAR), y el anillo de seis átomos es cerrado a través de

una deshidratación catalizada por la IMP ciclohidrolasa. Se forma así el intermediario inositol monofosfato (IMP).

A partir del IMP existen dos rutas, una para la formación de AMP y la otra para GMP. Para AMP se sustituye el grupo carboxilo C6 por un grupo amino provisto por aspartato y una molécula de GTP donadora de fosfato para formar adenilsuccinato (SAMP). Esta reacción es catalizada por la SAMP sintetasa (ASS). Finalmente, la ASL libera el fumarato para formar AMP.

Para la formación de GMP se oxida el IMP y se añade un grupo amino proveniente de una glutamina, formando XMP mediante la IMP deshidrogenasa (IMPDH), que usa NAD^+ como aceptor de hidrógeno. La reacción final es catalizada por GMP sintetasa (GMPS) para generar GMP (Zrenner et al., 2006).

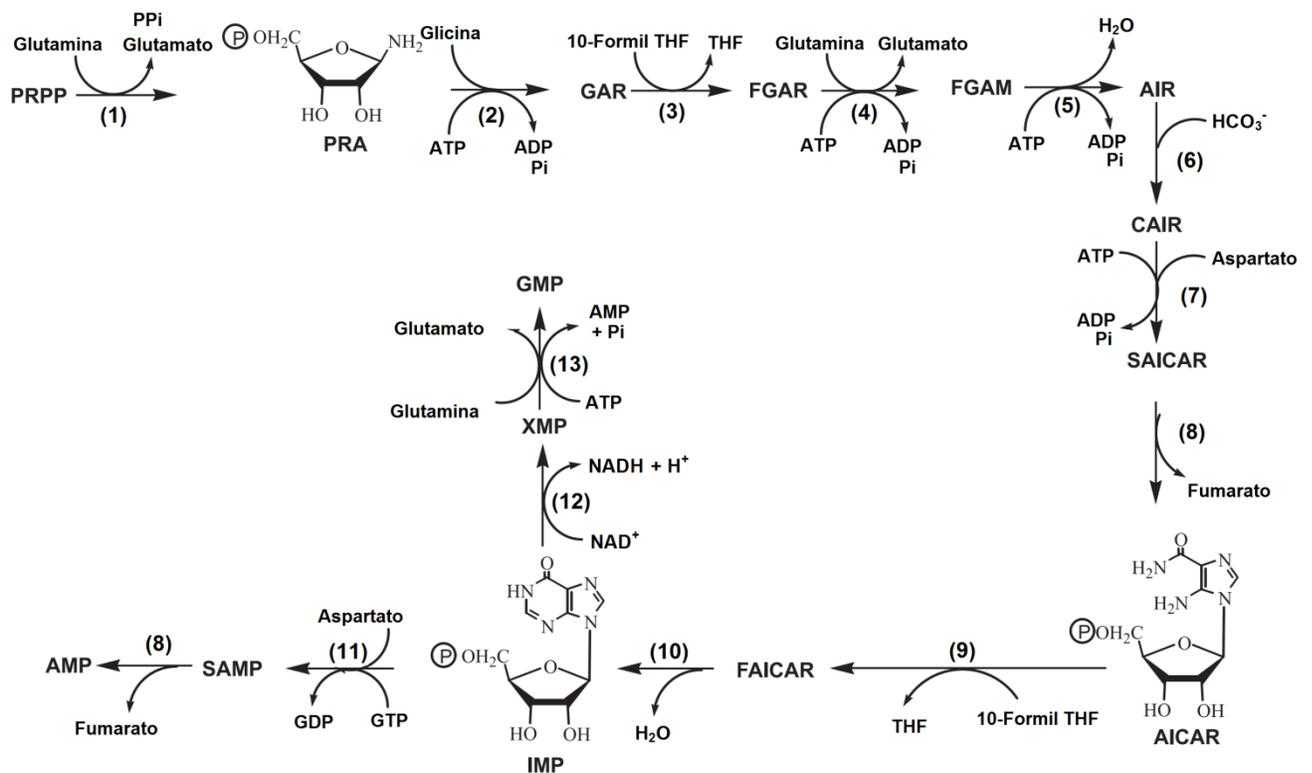


Figura 2. Ruta biosintética *de novo* de purinas en plantas. Metabolitos: PRA, 5-fosforribosil amina; GAR, ribonucleótido glicinamida; FGAR,

ribonucleótido formilglicinamida; FGRAM, ribonucleótido formilglicina amidina; AIR, ribonucleótido 5-aminoimidazol; CAIR, ribonucleótido 5-aminoimidazol 4-carboxilato; SAICAR, ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-N-succinocarboxiamida, AICAR, ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxiamida; FAICAR, ribonucleótido 5-formamidoimidazol-4-carboxiamida; SAMP, adenilsuccinato; XMP, xantosina-5´ monofosfato. Las enzimas mostradas son: (1) amido fosforribosil transferasa, (2) GAR sintetasa, (3) GAR formil transferasa, (4) FGAM sintetasa, (5) AIR sintetasa, (6) AIR carboxilasa, (7) SAICAR sintetasa, (8) adenilsuccinato liasa, (9) AICAR formil transferasa, (10) IMP ciclohidrolasa, (11) SAMP sintetasa, (12) IMP deshidrogenasa, (13) GMP sintetasa (Tomado de Stasolla et al., 2003).

2. Síntesis *de novo* de pirimidinas

Esta vía también es conocida como la ruta del orotato; requiere seis reacciones enzimáticas que inician a partir de carbamoilfosfato (CP), aspartato y PRPP hasta formar UMP, que funciona como intermediario para la síntesis de CTP y dTTP (Figura 3).

En la reacción inicial, la carbamoilfosfato sintasa transfiere el grupo amino de la glutamina al carbonato, en presencia de dos moléculas de ATP para generar CP. La aspartato transcarbamoilasa cataliza la condensación de CP con aspartato para formar carbamoilaspartato (CA). En la tercera reacción, catalizada por la dihidroorotasa, ocurre una ciclación del CA. Subsecuentemente, se forma orotato por la dihidroorotato deshidrogenasa. El orotato se condensa con PRPP a través de orotato fosforribosiltransferasa generando OMP, el cual es finalmente descarboxilado por orotidilato descarboxilasa formando uridina-5´-monofosfato (UMP) (Zrenner et al., 2006). A partir de la UDP se sintetizan el resto de pirimidinas de la siguiente manera:

Síntesis de CTP: La UDP es fosforilada por una nucleósido difosfato cinasa y la CTP sintetasa cataliza la transaminación a partir de glutamina para formar CTP.

Síntesis de dTTP: La ribosa de la UDP es reducida por la RNR, para generar dUDP, que tras una fosforilación por la nucleósido difosfato cinasa, genera dUTP. La dUTP pirofosfatasa lo hidroliza para formar dUMP, que es metilado por la timidilato sintasa para producir dTMP. Este intermediario es fosforilado dos veces sucesivas por el nucleósido monofosfato cinasa y nucleósido difosfato cinasa, hasta llegar a dTTP (Stasolla et al., 2003).

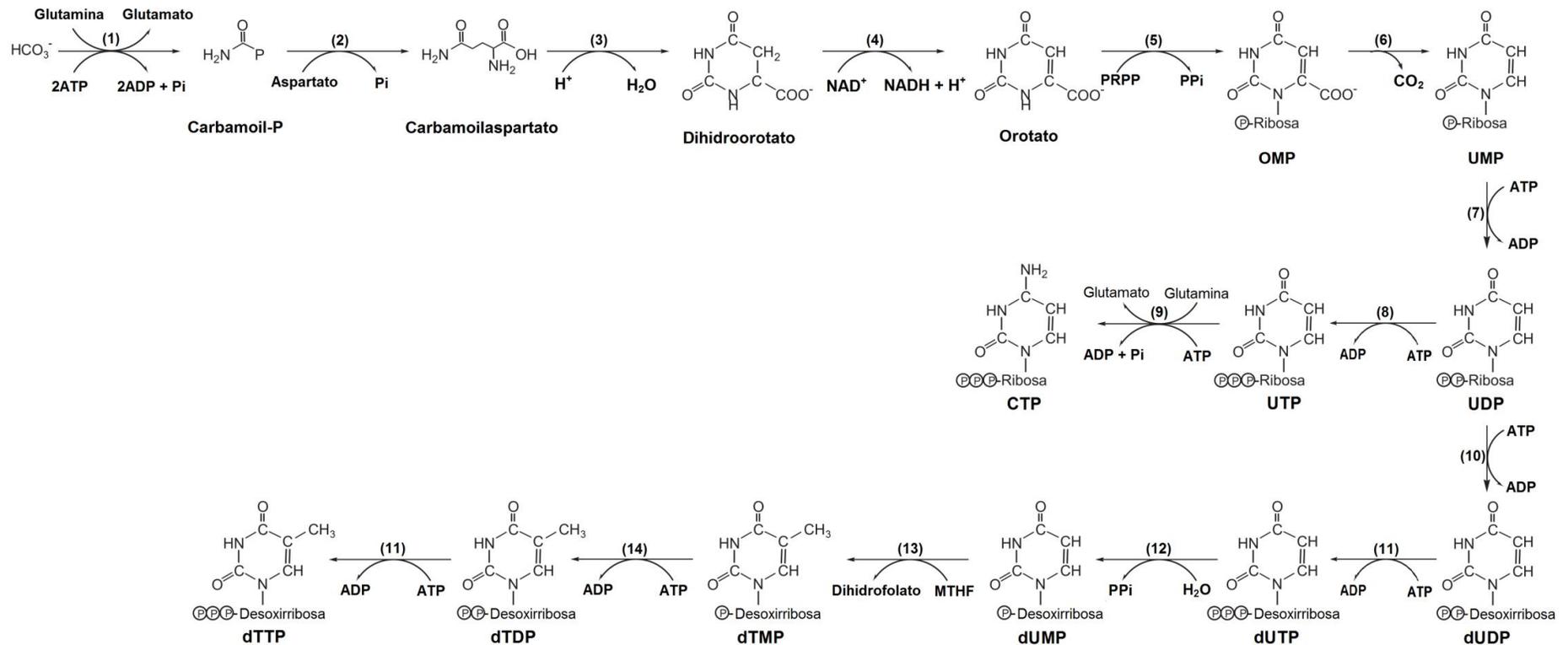


Figura 3. Ruta biosintética *de novo* de nucleótidos de pirimidina en plantas. Las enzimas de la vía: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarbamoilasa, (3) dihidroorotasa, (4) dihidroorotato deshidrogenasa, (5)-(6) UMP sintasa (orotato fosforribosiltransferasa más orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), (7) UMP cinasa, (8) nucleósido difosfato cinasa, (9) CTP sintetasa, (10) ribonucleótido reductasa, (11) nucleósido difosfato cinasa, (12) dUMP pirofosfatasa, (13) timidilato sintasa, (14) nucleósido monofosfato cinasa (Modificado de Stasolla *et al.*, 2003).

3. Ruta de salvamento de purinas

Las bases purinas pueden ser recicladas directamente a sus nucleótidos monofosfato respectivos por la acción de las enzimas adenina fosforribosiltransferasa y guanina/hipoxantina fosforribosiltransferasa (Figura 4).

La otra vía parte también de las bases, pero consiste en dos etapas; primero mediante la formación del nucleósido correspondiente por la incorporación de ribosa-1-P, catalizada por una fosforilasa específica, seguido de la fosforilación por una cinasa o una fosfotransferasa para generar el nucleótido monofosfato (Figura 4) (Stasolla et al., 2003).

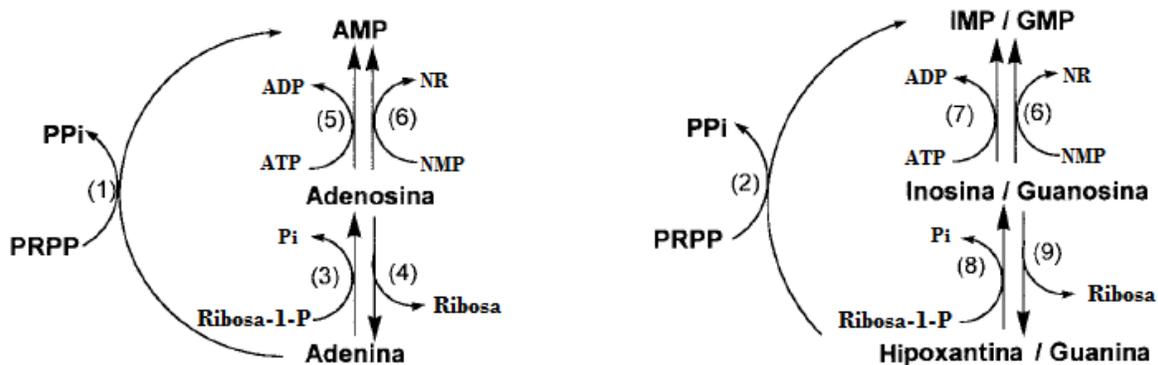


Figura 4. Ruta del salvamento de purinas en plantas. Las enzimas mostradas son: (1) Adenina fosforribosiltransferasa. (2) Hipoxantina/guanina fosforribosiltransferasa. (3) Adenosina fosforilasa. (4) Adenosina nucleosidasa. (5) Adenosina cinasa. (6) Nucleósido fosfotransferasa no específica. (7) Inosina/guanosina cinasa. (8) Inosina/guanosina fosforilasa. (9) Inosina/guanosina nucleosidasa (Tomado de Stasolla et al., 2003).

4. Ruta del salvamento de pirimidinas

En plantas, las vías de salvamento de pirimidinas ocurren tanto en el citosol como en los organelos (Zrenner et al., 2006). Los nucleósidos uridina, citidina, desoxicitidina, desoxiuridina y timina son fosforilados a sus nucleótidos respectivos por nucleósidos cinasas específicas como uridina/citidina cinasa, desoxicitidina cinasa y timidina cinasa. El uracilo es la única base pirimidínica que se puede reciclar directamente con la participación de uracil fosforribosiltransferasa y PRPP (Zrenner et al., 2006). Figura 5.

Al igual que en la ruta del salvamento de purinas hay una nucleósido fosfotransferasa no específica que participa en el salvamento de nucleósidos (Tomado de Stasolla et al., 2003).

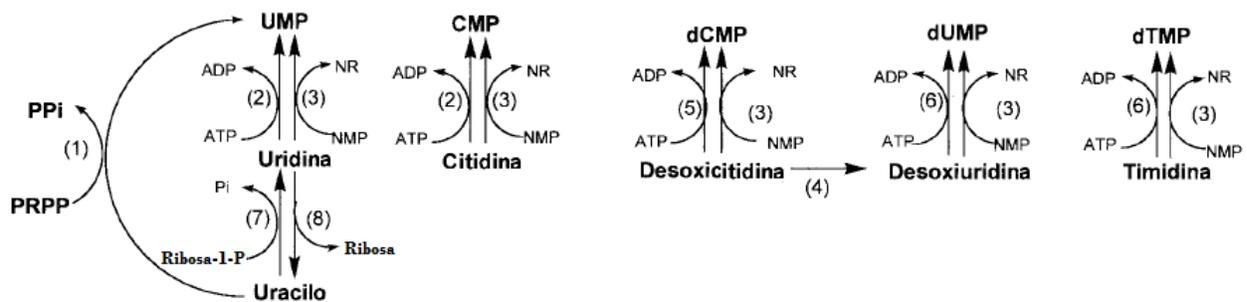


Figura 5. Ruta del salvamento de pirimidinas en plantas. (1) Uracilo fosforribosiltransferasa. (2) Uridina/Citidina cinasa. (3) Nucleósido fosfotransferasa no específica. (4) Desoxicitidina desaminasa. (5) Desoxicitidina cinasa. (6) Timidina cinasa. (7) Uridina fosforilasa. (8) Uridina nucleosidasa (Tomado de Stasolla et al., 2003).

C. Ribonucleótido reductasa

La ribonucleótido reductasa (RNR), también conocida como ribonucleósido difosfato reductasa (EC 1.17.4.1) (Elledge and Davis, 1987) participa en la biosíntesis *de novo* de los cuatro desoxiribonucleótidos y es responsable de mantener el balance en las pozas NTP/dNTP. (Eriksson et al, 1997; Reichard, 1988). Esta enzima cataliza la sustitución del grupo OH de la posición 2' del anillo del ribonucleótido por un hidrógeno a partir de una reacción que implica la formación de un radical tirosilo (Nordlund and Reichard, 2006).

El control celular de los niveles de dNTPs es un proceso crítico que compromete la estabilidad genómica por su implicación en la replicación y reparación óptima del DNA. Niveles anormales de dNTPs favorecen las mutaciones pues el exceso de nucleótidos facilita su incorporación errónea durante la polimerización del DNA. Además, el exceso de dNTPs disminuye la actividad correctora de la exonucleasa de las DNA polimerasas replicativas, lo que repercute en su fidelidad (Zhang et al., 2014).

Existen tres clases de ribonucleótidos reductasas de acuerdo con el mecanismo empleado para generar el radical y que son:

Clase I: son dependientes de oxígeno y están presentes tanto en eucariontes como en eubacterias. Contienen un cluster di-nuclear metálico formado por hierro o manganeso. Están conformadas estructuralmente por dos subunidades α (sitio activo) y dos β (sitio catalítico). Únicamente utilizan nucleótidos 5'-difosfato como sustrato. (Zhang et al., 2014; Cotruvo and Stubbe, 2011). Las ribonucleótidos reductasas de clase I se dividen en subgrupos en base a la identidad del cluster metálico (Stubbe and Cotruvo, 2011):

Clase Ia: Contiene un radical tirosil diférrico ($\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{-Y}\cdot$). Se encuentra en la mayoría de eucariontes, y también en algunos procariontes. La Figura 6 muestra la conformación estructural de este tipo de RNR.

Clase Ib: Requiere un radical tirosil dimanganeso ($\text{Mn}^{\text{III}}_2\text{-Y}\cdot$), está presente en procariontes únicamente.

Clase Ic: Utilizan un cofactor $\text{Mn}^{\text{IV}}\text{Fe}^{\text{III}}$, solamente se encuentra en procariontes.

Clase II: está presente en microorganismos aerobios y anaerobios, la enzima es independiente de oxígeno y utiliza cobalamina (vitamina B12) que contiene cobalto como cofactor.

Clase III: existe únicamente en microorganismos anaerobios, es sensible a oxígeno y requiere un centro hierro-azufre para su actividad catalítica (Zhang et al., 2014).

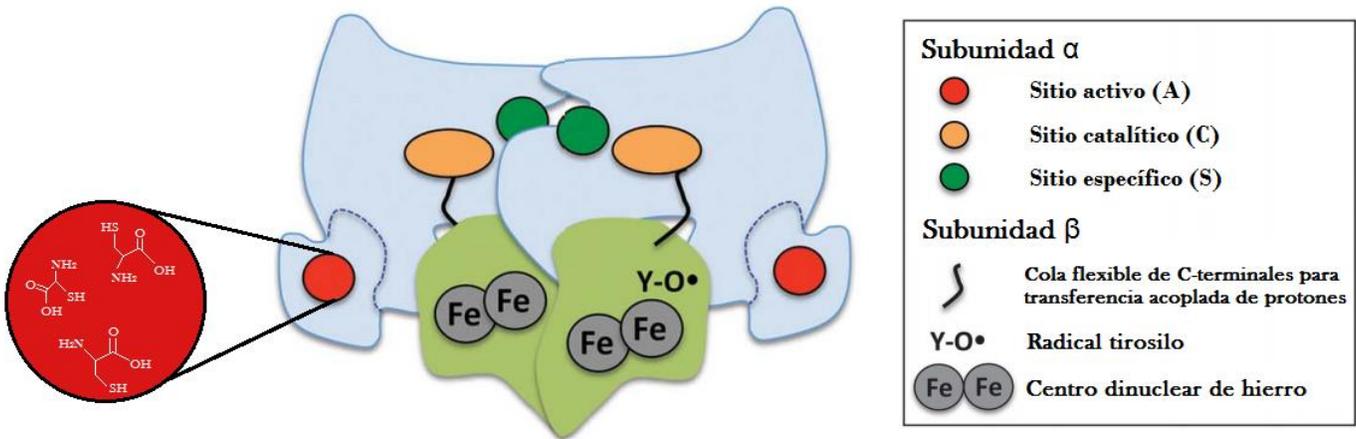


Figura 6. Estructura y conformación del heterodímero de las subunidades $\alpha_2\beta_2$ de la holoenzima ribonucleótido reductasa clase Ia. El sitio activo regula la actividad enzimática mediante interacciones con dATP y ATP que son inhibidores o estimulantes, respectivamente. En el sitio catalítico ocurre la reducción del ribonucleótido y el sitio específico designa la especificidad del sustrato (Modificado de Aye et al., 2014).

Por unificación de la nomenclatura, el gen codificante de la subunidad α es llamado *RNR1* y el gen *RNR2* es el responsable de codificar la subunidad β (R2 o subunidad menor) (Eriksson et al., 1997).

1. Mecanismo de reducción de la ribonucleótido reductasa

El mecanismo catalítico de las RNR es complejo; en el caso de las RNR clase 1a, comprende tres etapas:

1) Activación de la subunidad β

En una de las subunidades β el centro diférrico se encuentra próximo a la cadena de tirosina. Tanto el metal como el aminoácido se oxidan para generar como producto el radical tirosilo Figura 7 (Zhang et al., 2014).



Figura 7. Reacción de formación del radical tirosilo a partir de tirosina, Fe^{II} y oxígeno diatómico.

2) Oxidación de las cisteínas en la subunidad α

El radical tirosilo, mediante una cadena de transferencia electrónica acoplada a protones (PCET), intercambia su electrón libre por un protón con una cisteína (SH) de la subunidad α . El radical cisteinilo (S \cdot) formado es el que inicia la reacción de reducción (Cotruvo and Stubbe, 2011; Aye et al., 2014).

3) Reducción del anillo de la ribosa en la posición 2´

El cisteinilo inicia la reducción del sustrato abstrayendo el protón de la posición C3´ del nucleótido (b) (Fig. 8; marcado en rojo). (c y d) El oxígeno pierde un protón que le permite formar una doble ligadura en la posición C3´, a la vez que el OH en C2´ toma el protón de una cisteína, por lo que es liberado como una molécula de H₂O para alcanzar mayor estabilidad. La liberación de H₂O enseguida forma un carbocatión y una cisteína con carga negativa que (e) forma un enlace disulfuro con la tercera cisteína, para lo que libera el hidruro que se une al carbocatión que genera la posición 2´ reducida. (f) El radical favorece que el oxígeno en C3´ tome un protón, con el que finalmente se genera la desoxirribosa. (g) En la última etapa, los dos residuos de cisteína restantes, unidos mediante un enlace disulfuro, son reducidos otra vez por una tioredoxina o glutaredoxina. Se regenera el hidrógeno de la posición 3´. Figura 8. (Cotruvo and Stubbe, 2011).

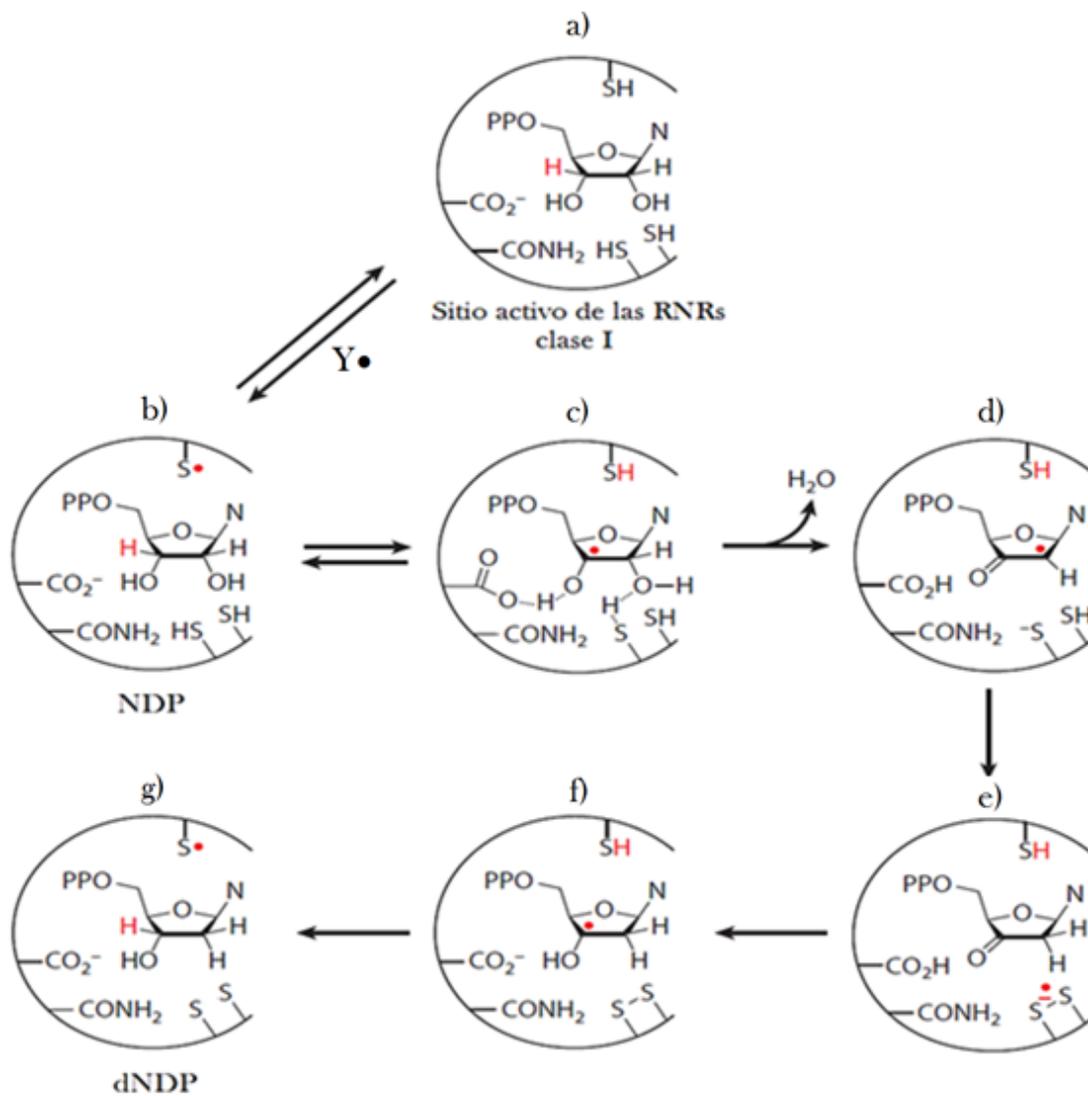


Figura 8. Mecanismo de reducción propuesto de la ribonucleótido reductasa clase I. En el sitio activo, durante la primera etapa catalítica, una cisteína (SH) es oxidada en un radical cisteinilo (S^\bullet) por un radical tirosilo (Y^\bullet). Tomada de Cotruvo and Stubbe, 2011.

2. Regulación de la actividad de la RNR.

La RNR está regulada por diferentes mecanismos, principalmente, el alostérico y el oligomérico, así como por los niveles y localización de las subunidades (Aye et al., 2014).

La regulación alostérica se adapta rápidamente si hay una perturbación de los niveles de dNTPs, involucra efectores que se pueden unir a dos sitios alostéricos distintos en la subunidad α (Aye et al., 2014; Zhang et al., 2014). El sitio de especificidad (S) es regulado por la unión de efectores positivos como ATP, dTTP o dGTP, cuya función es modificar la selectividad de la enzima según el efector para reducir únicamente el sustrato requerido (Aye et al., 2014; Eriksson et al., 1979; Brown and Reichard, 1969).

El sitio activo (A) regula la actividad enzimática por oligomerización mediante interacciones con ATP y dATP. Mientras que altos niveles de ATP mantienen la conformación $\alpha_2\beta_2$ que es activa, dATP funciona como un regulador negativo, que en altos niveles induce un estado de hexamerización de α que genera una conformación $\alpha_6\beta_2$, la cual es inactiva enzimáticamente (Aye et al., 2014). El efecto general de inhibición de dATP es revertido en presencia de ATP (Eriksson et al., 1979).

D. Timidina cinasa

La timidina cinasa (ATP:timidina 5'-fosfotransferasa; EC 2.7.1.21; TK) es una desoxirribonucleósido cinasa específica que cataliza la reacción inicial de la ruta del salvamento de nucleótidos de timina; transfiere un fosfato del ATP al -OH en la posición 5' (Pedroza-García et al., 2015; Clausen et al., 2012). Las fosforilaciones sucesivas son llevadas a cabo rápidamente por la timidilato cinasa (TMPK) y por la nucleósido difosfato cinasa (NDK) que forman dTDP y dTTP, respectivamente (Stasolla et al., 2003; Figura 9).

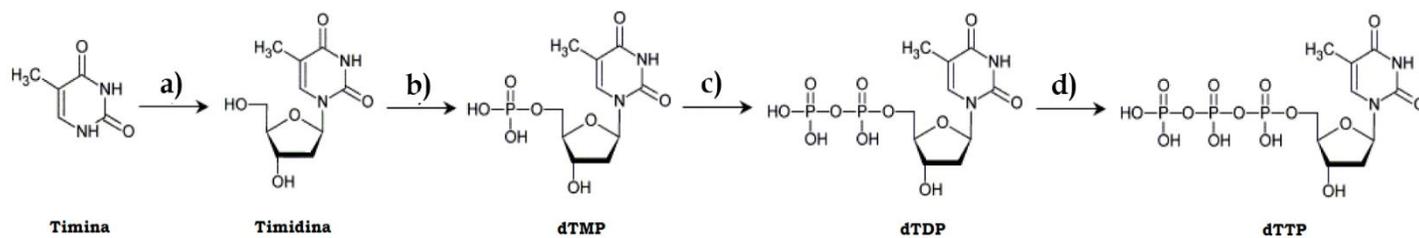


Figura 9. Enzimas implicadas en la formación de dTTP. a) Nucleósido fosforilasa; b) Timidina cinasa 1; c) dTMP cinasa; d) Nucleósido difosfato cinasa. Adaptado de Dobrovolsky et al., 2003 y Stasolla et al., 2003.

En base a la secuencia de aminoácidos, las desoxirribonucleósido cinasas se pueden dividir en tres grupos; la TK1 forma parte de un grupo por sí sola por su alta especificidad, las pertenecientes a mamíferos abarcan un segundo grupo de cinasas inespecíficas (dCK, dGK, TK2, dNK), y un tercer grupo formado por las virales (Eriksson et al., 2002), que son inespecíficas ya que tienen la capacidad de fosforilar la timidina de manera múltiple, así como una amplia variedad de análogos de nucleósidos y emplea nucleótidos trifosfato diferentes al ATP, como donador de fosfato (Evans et al., 1998).

1. Timidina Cinasa 1

La TK1 posee la especificidad más alta de las desoxirribonucleósido cinasas, los únicos sustratos que puede fosforilar son únicamente desoxitimidina y desoxiuridina como se muestra en la figura 5 (reacción 6). Preferentemente, las moléculas donadoras de fosfato son ATP y dATP, sin embargo, una menor proporción son obtenidos por GTP, dGTP, CTP, dCTP, UTP, dUTP (Eriksson et al., 2002).

2. Regulación de la TK1 durante el ciclo celular

La expresión del gen de la TK1 humana está regulada durante el ciclo celular. Durante la fase G_0 no hay actividad enzimática, y cuando la célula entra a la fase G_1 , se detecta actividad, que continúa en aumento hasta llegar a la fase S, donde se incrementa hasta ocho veces y concurre con la síntesis de DNA. En la mitosis la actividad disminuye. Los niveles de actividad enzimática son consistentes con los del RNAm y la proteína (Eriksson et al., 2002; Mikulitis et al., 1996).

En mamíferos (humanos y murinos), se ha demostrado un mecanismo post-traducciona l que regula los niveles de TK1 en la célula. En los últimos 40 aminoácidos de la secuencia del carboxilo terminal del polipéptido hay una señal que determina la degradación de la proteína entre la metafase y la citocinesis. La eliminación de esta región inhibe su degradación y estabiliza su expresión durante todo el ciclo celular, incluso en células quiescentes (Kauffman & Kelly, 1991).

3. Regulación de la TK1 por efectores

Otro mecanismo de regulación de la TK1 citosólica humana es a nivel de la actividad enzimática por su estado de oligomerización. En ausencia de ATP o a bajas concentraciones de éste, la TK1 forma un homodímero con baja actividad enzimática. Mientras que, en presencia

de ATP, dos dímeros se asocian para formar un tetrámero, el cual posee una actividad catalítica mayor (Munch-Petersen et al., 1993).

Otra forma de regulación de la TK1 humana es mediante su interacción con dTTP, el cual ejerce una regulación negativa de su actividad (Munch-Petersen, 1984), que se propone que es debido a que se une al sitio de unión del nucleósido (Birringer et al., 2005).

4. Mecanismo de reacción de la timidina cinasa

En la catálisis de la TK1, participa el ácido glutámico 98 que actúa como una base al abstraer el protón de la posición 5'-OH del desoxirribonucleósido. El oxígeno adquiere una carga negativa que favorece el ataque nucleofílico sobre el fosfato y de la molécula de ATP. Se requiere Mg^{2+} como contraión y la arginina 60 para estabilizar el estado de transición (Figura 10) (Eriksson et al., 2002; Welin et al., 2004).

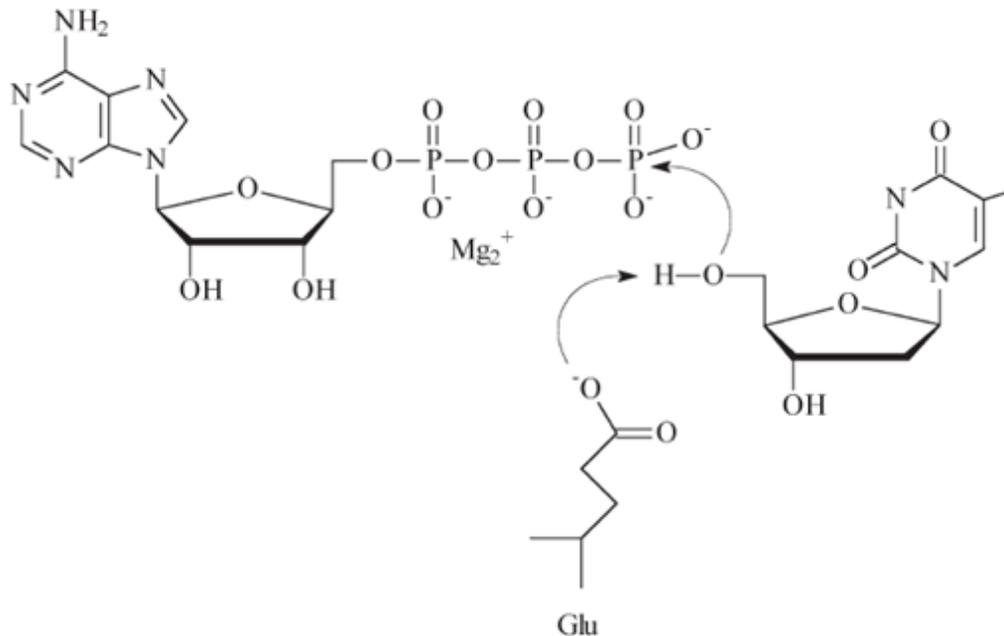


Figura 10. Mecanismo de reacción de las desoxirribonucleósido cinasas. (Modificado de Eriksson et al., 2002).

E. Daño en el DNA

Las células de plantas, como las de otros organismos, son afectadas por el componente UV-B (λ 280 – 315 nm) de la radiación solar. Éste causa daño oxidativo y formación de dímeros de pirimidina en el DNA, lo que resulta en retraso en el crecimiento y desarrollo. Los daños en el DNA provocan varios efectos fisiológicos y bioquímicos como una tasa reducida en la síntesis de proteínas, daños en las membranas celulares y oxidación de proteínas fotosintéticas. El DNA dañado que no es reparado causa inestabilidad del genoma lo que conduce al deterioro general de la función celular y eventualmente a la muerte celular (Tuteja et al., 2009).

Además de la radiación solar, el otro agente genotóxico al que están expuestas las células de plantas son las especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs se generan endógenamente por el transporte oxidativo de electrones en la mitocondria y cloroplasto, o exógenamente en respuestas a estrés biótico o abiótico (Britt, 1999). Las EROs pueden inducir varios tipos de daño en el DNA que incluyen la oxidación de bases (8-oxoguanina), sitios abásicos en los que se rompe un enlace N-glicosídico, y la formación de aductos por la reacción con lípidos peroxidados (Tuteja et al., 2001; Tuteja et al., 2009).

El daño al DNA también juega un papel importante en el envejecimiento de las semillas. Adicionalmente al efecto mutagénico, la persistencia del daño en las bases tiene una influencia inhibitoria del crecimiento. Muchos tipos de daño actúan como bloques en el progreso de las polimerasas de DNA y de RNA (Britt, 1996). En células de plantas se conservan muchos mecanismos de respuesta de daño al DNA que inicialmente se caracterizaron en mamíferos.

1. Respuesta celular al daño

Cuando las células perciben que el DNA está dañado, activan una vía de transducción de señales que detiene o retrasa el progreso del ciclo celular y promueve la reparación del DNA. Esta respuesta requiere de proteínas que perciben el DNA dañado y de cinasas de proteínas efectoras que transducen la señal. Las dos proteínas que participan en señalización son Ataxia telangiectasia mutada (ATM) y Rad3-relacionada (ATR), Figura 11. (Tuteja, et al., 2009).

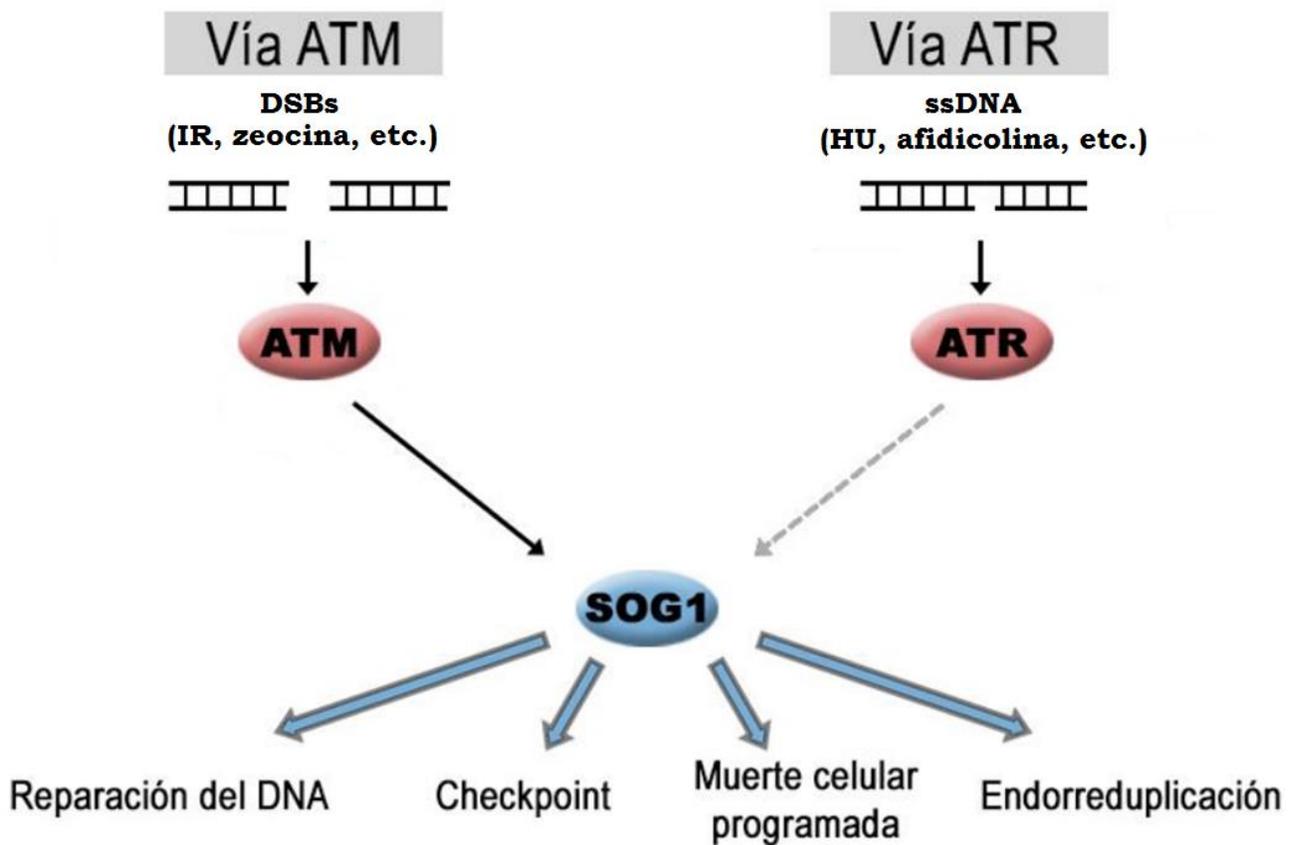


Figura 11. Vía de señalización de respuesta al daño en el DNA. (Modificado de de La Rosa, 2019).

Estas vías se caracterizaron originalmente en células de mamíferos y están bien conservadas en células de plantas. ATM es activada en respuesta a rupturas de doble cadena (Garcia et al., 2003), mientras que ATR es activada por ruptura de una cadena (Roa et al., 2009) y por diferentes tipos de lesiones en el DNA (Cliby et al., 1998). ATM transduce señales que culminan en la activación de genes involucrados en el metabolismo, reparación y estructuración de la cromatina (Fulcher and Sablowski, 2009; Culligan et al., 2006). Mutantes de *Arabidopsis* en este gen, son hipersensibles a radiaciones gamma (Adachi et al., 2009).

La señalización de ATR se genera en presencia de estrés replicativo (bloqueo de las horquillas de replicación) o durante la reparación de doble cadena. En *Arabidopsis*, una mutante *knockout* de ATR es sensible a agentes bloqueadores de la replicación como la hidroximetilurea (Adachi et al., 2009).

Las dos vías convergen en SOG1 (Suppressor of Gamma Response 1), que es un factor de transcripción específico de plantas que controla las respuestas de daño al DNA mediante la expresión de distintos genes efectores de diferentes mecanismos celulares (Yoshiyama et al., 2013).

2. Mecanismos de reparación de DNA en plantas

La acumulación de daño no solo imposibilita la división celular, sino que también conlleva una muerte celular eventual. Por esta razón, distintos mecanismos de reparación del DNA son requeridos en los tejidos de todas las plantas para contender con los diferentes tipos de daño (Britt, 1996).

3. Reparación de ruptura de doble cadena

Cuando ambas cadenas se encuentran dañadas, la información faltante no puede ser reconstituida fácilmente por una hebra complementaria (Gorbunova and Levy, 1999). Las rupturas de doble cadena pueden ser reparadas por recombinación homóloga (HR) o por vía de reparación por unión de extremos no homólogos (Non-homologous end-joining; NHEJ), también llamada recombinación ilegítima (Orel et al., 2003; Figura 12).

- **Unión de extremos no homólogos (NHEJ)**

Involucra la unión de los extremos de dos cadenas rotas que no presentan complementariedad. Como los extremos de DNA no son compatibles para la religación directa, una endonucleasa elimina algunos nucleótidos en una de las cadenas y las DNA polimerasas reparativas sintetizan en esa región para generar extremos compatibles que son ligados. Por lo general, cuando opera este mecanismo de reparación se producen inversiones, deleciones, translocaciones e inserciones (Britt, 1999; Lans et al., 2012).

- **Recombinación homóloga (RH)**

Para que opere este mecanismo, se requiere el apareamiento de las secuencias dañadas con secuencias intactas de una cromátida hermana homóloga o con alta similitud que las reemplaza (Păques and Haber, 1999; Britt, 1999) sintetizando DNA para completar la cadena (Britt, 1996).

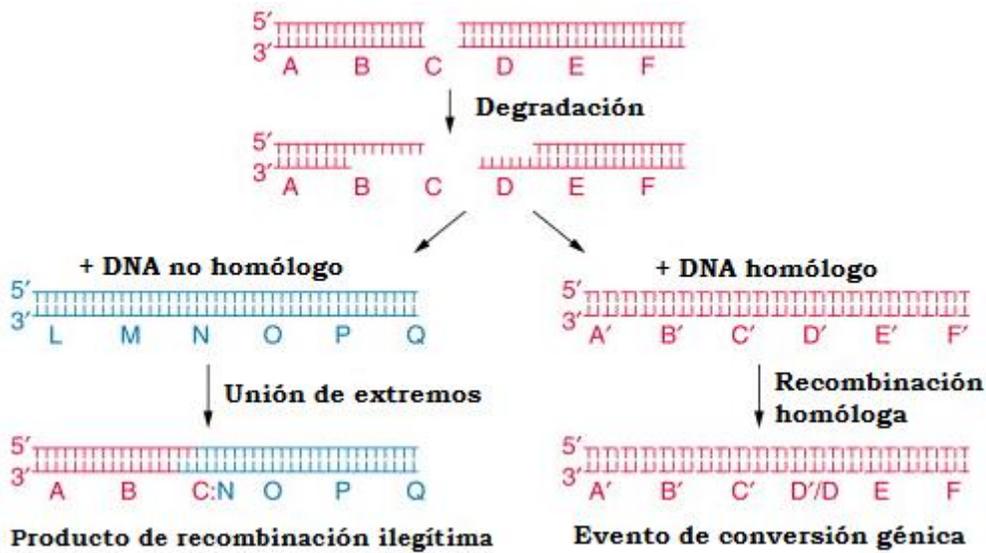


Figura 12. Reparación de la ruptura de doble cadena. Se muestran las dos vías de reparación A) Reparación de extremos no homólogos B) Reparación mediada por recombinación. Tomado de Britt, 1999.

4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

En la reparación por escisión de nucleótidos, una vez que es reconocido el daño, endonucleasas XP cortan en sitios adyacentes 3' y 5' al sitio dañado. Una helicasa contribuye a separar el oligonucleótido que contiene la región dañada, y ocurre síntesis de DNA empleando la cadena intacta como molde (Britt, 1999), Figura 13.

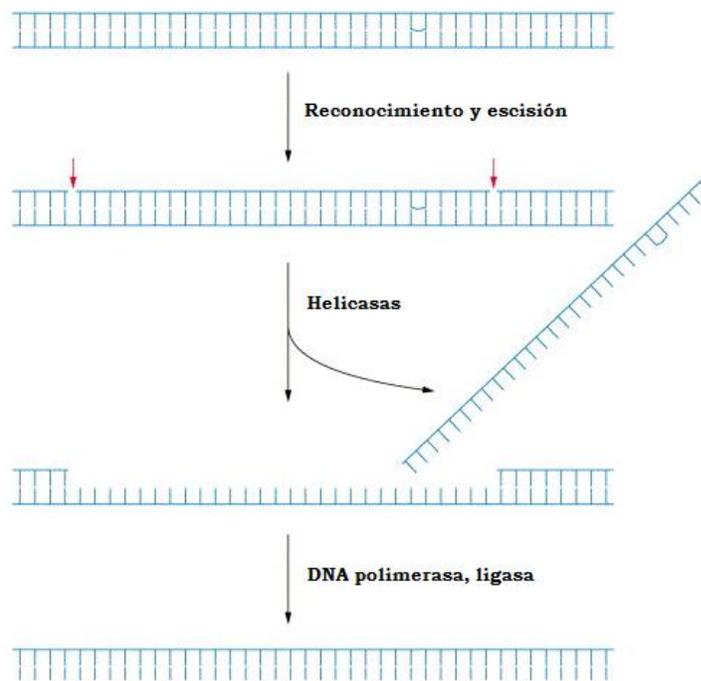


Figura 13. Reparación por escisión de nucleótidos. Tomada de Britt, 1999.

En los tres mecanismos de reparación descritos arriba se requiere síntesis de DNA por lo que el aporte de dNTPs provistos, tanto por la ruta *de novo* como por la ruta de salvamento, es fundamental para mantener la integridad del genoma.

F. Agentes genotóxicos

Para estudiar tanto las vías de señalización que operan en la percepción del daño al DNA, como los mecanismos de reparación en plantas, se emplean agentes genotóxicos con distintos modos de acción. A continuación, se describen tres de éstos que fueron empleados en este trabajo.

1. Zeocina (Zeo)

La zeocina es un compuesto derivado de las bleomicinas y fleomicinas (Figura 14) (Povirk, 1995).

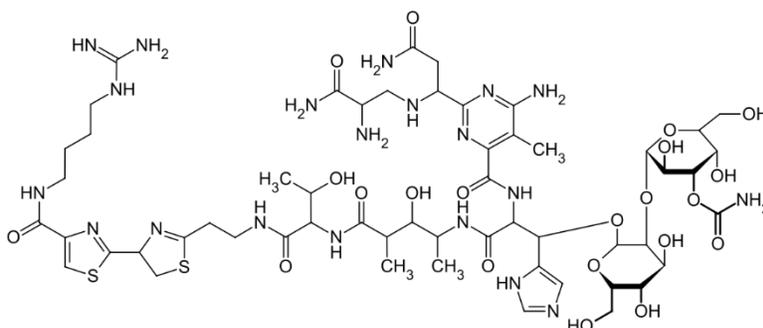


Figura 14. Estructura química de la zeocina.

Las bleomicinas son antibióticos glicopeptídicos producidos por el actinomiceto *Streptomyces verticillus* (Dumas et al., 1994). Posee propiedades antitumorales (Palwai and Eriksson, 2011) cuya actividad depende de la formación de complejos con oxígeno y hierro (II) que le permite actuar sobre el DNA, generando cortes en las dos cadenas.

La estructura química de las bleomicinas consiste en cuatro dominios: el dominio de unión a metales interacciona con el surco menor del DNA, que es responsable de la activación del oxígeno y la abstracción de un hidrógeno del DNA. Se genera un radical libre en la posición 4' de la desoxirribosa, que tras una reacción consecutiva del radical en la hebra opuesta genera la ruptura del enlace entre los C3' y C4' de la pentosa en ambas cadenas (Figura 15). (Povirk, 1995; Steighner and Povirk, 1990).

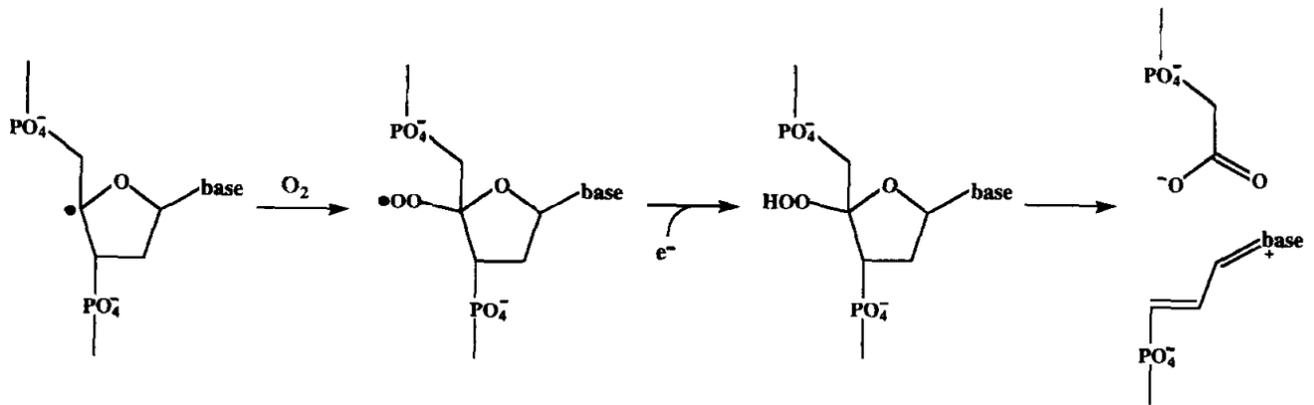


Figura 15. Mecanismo de acción propuesto de las bleomicinas de ruptura del anillo de la desoxirribosa (Tomado de Povirk, 1995).

2. Hidroxiurea (HU)

También conocida como hidroxicarbamida, es una molécula que ha sido utilizada ampliamente en terapia para tratar diferentes tipos de cáncer (Singh and Xu, 2016; Madaan, et al., 2012; Kennedy, 1992) (Figura 16) por su acción bloqueadora de la replicación celular (Elledge and Davis, 1990).

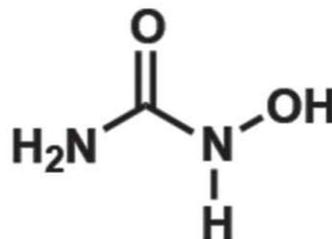


Figura 16. Estructura química de la hidroxiurea. Tomado de Champman and Kinsella, 2011.

Funciona como agente quelante de metales e inactivador de radicales libres, por lo que carece de especificidad y puede inhibir a varias metaloenzimas como la anhidrasa carbónica, o metaloproteinasas (Aye et al., 2014).

Uno de sus blancos es la RNR pues reacciona tanto con los radicales tirosilo como con el núcleo diférrico de la subunidad β que genera una perturbación estructural que la inactiva (Aye et al., 2014; Zhang et al., 2014). La consecuencia de la inhibición es reducción en los niveles de dNTPs que normalmente se producen en la fase G1/S del ciclo celular, lo que provoca que la DNA polimerasa se quede sin sustratos para completar la horquilla de replicación (Koç et al., 2004). El detenimiento del avance de las horquillas de replicación causa la formación de regiones a lo largo del genoma con DNA de cadena sencilla (DNAss), que es reconocido como daño, lo que activa la vía de señalización de ATR. Estas regiones son susceptibles de ruptura y de estabilidad genómica. En cultivos celulares de maíz y otras especies vegetales, este inhibidor ha sido utilizado como agente sincronizador del ciclo celular porque acumula las células en la fase G1 (Doležel et al., 1999).

3. Ciprofloxacino (Cip)

Es una quinolona fluorada (fluoroquinolona) empleada como antibiótico pues inhibe a la DNA girasa bacteriana (Figura 17; Aldred et al., 2014). En plantas, la inhibición ocurre en la girasa organelar, principalmente cloroplástica.

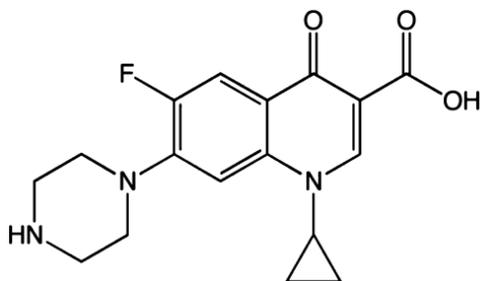


Figura 17. Estructura química del ciprofloxacino. Tomado de Aldred et al., 2014.

La girasa es una topoisomerasa tipo II capaz de modular el estado topológico del DNA mediante la eliminación de la tensión que se acumula enfrente de las horquillas de replicación y/o complejos de transcripción a través de rupturas de doble cadena y su subsecuente reacción de ligación. Para mantener la integridad genómica, la enzima forma enlaces covalentes transitorios entre los sitios activos de residuos de tirosina y el extremo 5' generado (Aldred et al., 2014; Vos et al., 2011).

Dos moléculas de ciprofloxacino se unen no covalentemente al sitio activo de escisión y ligación de la subunidad GyrA de la girasa. Al interactuar con la proteína, las moléculas de ciprofloxacino se intercalan en el DNA, de tal manera que actúan como bloqueadores físicos de la ligación, incrementando la concentración del complejo enzimático en estado de escisión activado (Aldred et al., 2014). Estas interacciones provocan que los enlaces fosfodiéster cortados por la topoisomerasa no sean regenerados por lo que queda el DNA dañado.

G. Función de la ribonucleótido reductasa en plantas.

Muchos estudios se han centrado sobre la expresión de los genes que codifican estas enzimas y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ha aportado información sobre su función a partir del análisis de mutantes.

1. Ribonucleótido reductasa

En *A. thaliana* la subunidad α es codificada por el gen de copia única *RNR1*, mientras que la subunidad β es codificada por tres genes: *TSO2*, *RNR2A* y *RNR2B* (Wang and Liu, 2006). En *Nicotiana tabacum* existen dos genes *RNR1* y uno *RNR2* (Chabouté et al., 1998). El genoma

de *Oryza sativa* contiene dos genes homólogos de la subunidad α (*RNRL1* y *RNRL2*) y dos de β (*RNRS1* y *RNRS2*) (Yoo et al., 2009).

En *Arabidopsis*, el gen *RNR1* se expresa en las primeras hojas, ápices y carpelos, en contraste con la baja expresión en cotiledones, hojas caulinares adultas y hojas senescentes (Garton et al., 2007). En la planta de arroz, la expresión de los genes *RNRL1*, *RNRL2* y *RNRS1* ocurre en los tejidos proliferativos de las plantas de arroz (Yoo et al., 2009).

En plantas de arroz, se han caracterizado las líneas *V3* y *St1* que son mutantes de los genes *RNRL1* y *RNRL2*, respectivamente. Estas plantas son deficientes en la síntesis de clorofila por lo que muestran hojas cloróticas durante los primeros estadios del desarrollo y también reducción en la viabilidad de semillas (Yoo et al., 2009). Las mutantes de estos genes en plantas de tabaco muestran una deficiencia de clorofila en hojas durante etapas tempranas del desarrollo (Archer and Bonnett, 1987).

Subunidad α

En *Arabidopsis* se caracterizó una mutante puntual que tiene transición G > A que resulta en un cambio de la glicina 718 por ácido glutámico en la subunidad α de la RNR1. La mutante se nombró *cls8-1* por su fenotipo de hojas rugosas (*crinkled leaves 8*). Además de la morfología anormal de hojas y flores, presenta un tamaño reducido de raíz y hojas cloróticas. La deficiencia enzimática se refleja en los niveles de dTTP y dATP, que son significativamente menores que en las plantas silvestres. Estas mutantes tienen un menor número de copias de genoma en los cloroplastos, y estos organelos muestran un mayor tamaño.

Subunidad β

Los genes *TSO2* y *RNR2B* se expresan en raíces, rosetas, hojas caulinares, tallos y flores de plantas de *Arabidopsis* y contrasta con *RNR2A* cuyo transcrito no se detecta en raíces. La transcripción de *TSO2* ocurre predominantemente en la fase S del ciclo celular (Wang and Liu, 2006).

La mutante *tso2-1* de *Arabidopsis* corresponde a una mutación recesiva de una sustitución del ácido aspártico 49 por una asparagina, que afecta la unión con la subunidad α . Las plantas muestran una reducción significativa en los niveles de los cuatro dNTPs en flores. La mutante no presenta diferencias con las plantas silvestre en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, se observan diferencias a partir de la aparición de la quinta hoja de roseta, en órganos florales y silicuas que son pálidos, más delgados, con textura áspera y morfología irregular en hojas y flores. Asimismo, su fertilidad también está reducida (Wang and Liu, 2006).

El gen *TSO2* es similar en identidad a *RNR2B*, en contraste con *RNR2A*, el cual es diferente estructuralmente. *TSO2* provee suficiente actividad de RNR para el desarrollo normal de la planta, sin embargo, *RNR2B* tiene la capacidad de salvar mutantes *tso2-1*. En las dobles mutantes *tso2-1 rnr2a-1*, las plantas no se desarrollan más allá de la salida de la cuarta hoja. En estas mutantes, es tan alto el daño acumulado en el DNA que se disparan mecanismos de muerte celular programada. Las plantas doble mutantes *tso2-1 rnr2b-1* muestran letalidad embrionaria. En presencia de la mutante *tso2-1* es esencial la función de *RNR2A* y/o de *RNR2B* (Wang and Liu, 2006).

2. Regulación de la expresión de RNRs en el ciclo celular

En un cultivo de células de tabaco sincronizado con afidicolina la actividad y expresión génica de ambas subunidades están reguladas y correlacionadas durante el ciclo celular, los niveles de RNA mensajero se incrementan durante la transición G1/S, alcanzando una fluctuación máxima de niveles de transcrito en la fase S (Chabouté et al., 1998).

La adición de agentes bloqueadores de la síntesis de DNA, como hidroxurea y mimosina, generan un incremento en los niveles de transcrito de RNR, lo que sugiere un mecanismo de regulación por retroalimentación, ya que la expresión está ligada a los niveles de DNA sintetizado y la inducción de RNR ocurre al inicio de la replicación cuando se forman las horquillas de replicación (Chabouté et al., 1998; Philipps et al., 1995).

3. Función de la RNR en la reparación del DNA

Por su función en el aporte de dNTPs, la RNR participa en las vías de respuesta de daño al DNA que requieren síntesis reparativa. En este sentido se ha estudiado la respuesta a nivel transcripcional a agentes genotóxicos, así como el efecto de estos en mutantes *RNR*.

AtTSO2 tiene una inducción fluctuante entre 1.5 y 8.5 h en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con bleomicina (1 μ M). El gen *AtRNR1* también se induce a partir de 1.5 h, pero en un menor grado que *AtTSO2* y con una cinética de aumento constante (Roa et al., 2009).

Las mutantes *Attso2* de *Arabidopsis* muestran hipersensibilidad a bleomicina 10 μ M después de 8 días de exposición al genotóxico, en comparación con el crecimiento y desarrollo de las plantas silvestres. Estos resultados sugieren que el gen *AtTSO2* está involucrado en la respuesta al daño por ruptura de doble cadena (Roa et al., 2009).

La expresión de los genes *RNR* también se induce por estrés replicativo causado por HU. En plántulas silvestres de 17 días de *Arabidopsis*, tratadas con HU 1 mM, se presenta una inducción fluctuante con un pico máximo a la primera hora de ambas subunidades de ribonucleótido reductasa durante tiempos medidos con RT-PCR cuantitativo entre 0 y 8 h (Roa et al., 2009).

Plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medio suplementado con HU 1 mM presentan una disminución en la longitud de la raíz del 40 % a las tres semanas de germinadas en el genotóxico (Culligan et al., 2004) y a los cinco días de transferidas al genotóxico (De Schutter et al., 2007). En plántulas de 15 días de *Arabidopsis* germinadas en presencia de HU 1 mM hay desarrollo lento y la mutante *rnr2a* muestra mayor sensibilidad al genotóxico. A concentraciones más altas (3 y 6 mM), las mutantes mueren mientras que las plantas silvestres sobreviven. Esto demuestra la importancia del gen *rnr2a* durante la respuesta a estrés replicativo (Roa et al., 2009).

En la planta de arroz silvestre germinada en HU 2 mM, la biogénesis del cloroplasto se detiene sin afectación de la replicación del genoma nuclear durante la división celular de hojas en desarrollo que no afecta el crecimiento general de la planta, aunque las hojas se vuelven cloróticas. El retardo en el crecimiento se vuelve severo a medida que la concentración de HU incrementa progresivamente hasta 8 mM. En contraste, la mutante *V3 (rnr1)* bajo las mismas condiciones presenta un crecimiento retardado más severo. En ausencia de HU, esta mutante es albina durante etapas intermedias de su desarrollo, sin embargo, en HU 2 mM carece de síntesis de clorofila (Yoo et al., 2009).

H. Función de la Timidina cinasa de plantas

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes parálogos de la timidina cinasa 1, *TK1a* y *TK1b* (Clausen et al., 2012). El genoma de maíz sólo tiene un gen que codifica para la TK1, una proteína de localización cloroplástica (Le Ret et al., 2019). En maíz la actividad de la timidina cinasa está asociada a la fase S del ciclo celular (Georgieva et al., 1994).

La *TK1a* de *Arabidopsis* se expresa en todos los tejidos, y en plántulas de 7 días se induce la expresión de *AtTK1a* por luz UV-C (Pedroza-García et al., 2015), un tipo de daño al DNA consistente en el entrecruzamientos entre pirimidinas que impiden la replicación (Jiang et al., 1997). La sobreexpresión de *TK1a* confiere tolerancia a este tipo de estrés genotóxico y favorece su reparación en condiciones de oscuridad, lo que apoya su función en la reparación de DNA (Pedroza-García et al., 2014). El gen *TK1b* también se expresa en todos los tejidos de la planta, pero a diferencia de *TK1b*, su expresión no es inducida por luz UV-C.

En *Arabidopsis*, las mutantes sencillas de *AtTK1a* y *AtTK1b* tienen un fenotipo de desarrollo indistinguible al de las plantas silvestres, lo que sugiere que los dos genes son redundantes. Plantas que son homocigotas para la mutación *tk1b* y heterocigotas *TK1a/tk1a* son más pequeñas que las plantas silvestres y muestran clorosis en los cotiledones y hojas. En cambio, mutantes homocigota *tk1a* y heterocigotas *TK1b/tk1b* tienen un fenotipo normal. La doble mutante (*tk1a/tk1a; tk1b/tk1b*) tiene un fenotipo albino y las plántulas se desarrollan muy lentamente (Clausen et al., 2012). Presenta un bajo número de plastídios, que están poco diferenciados y reducción en las copias del genoma cloroplástico (Le Ret et al., 2019).

En maíz, la mutante homocigota *tk1* es fenotípicamente albina y la planta muere a las pocas semanas de desarrollo. Tiene deficiencias en la

replicación del genoma cloroplástico y en la traducción con la reducción en los niveles de proteínas de los fotosistemas (Le Ret et al., 2019).

1. Función de la TK en la reparación del DNA

Tanto los datos de expresión de la TK como el fenotipo de las mutantes en respuesta a agentes genotóxicos apoyan la función de esta enzima en la vía de salvamento de nucleótidos en los eventos de reparación del DNA.

En plántulas silvestres de dos semanas de *Arabidopsis* el tratamiento con bleomicina por 1 h provoca ruptura de doble cadena en el DNA, determinado por el ensayo cometa. El daño es reparado si se permite un periodo de recuperación en ausencia del genotóxico (Menke et al., 2001). La zeocina, otro agente que causa ruptura de doble cadena induce la expresión del gen *TK1a* en plántulas de *Arabidopsis* y la sobreexpresión de TK1a confiere tolerancia al genotóxico (Pedroza-García et al., 2015). Consistente con estos datos es que la mutante *tk1a* de *Arabidopsis* es hipersensible a zeocina (Pedroza-García et al., 2019).

El ciprofloxacino es un antibiótico que induce rupturas del DNA organelar. Plantas de *Arabidopsis* crecidas en ciprofloxacino presentan una reducción de su crecimiento, hojas verdaderas cloróticas, reducción del número de cloroplastos y mitocondrias, morfología desorganizada de cloroplastos con alteraciones en los arreglos de tilacoides (Evans-Roberts et al., 2015; Cappadocia et al., 2010). La mutante *tk1b* de *Arabidopsis* es hipersensible a este compuesto pues presenta reducción en el número de copias del DNA cloroplástico, demostrando que la TK1b tiene una función importante en la replicación y reparación del genoma cloroplástico (Le Ret et al., 2019). Asimismo, la mutante *tk1b* expuesta a ciprofloxacino 0.25 y 0.5 μ M presenta reducción en la longitud de sus raíces casi del doble que las plantas silvestres (Pedroza-García et al., 2019).

Asimismo, la mutante *tk1b* de *Arabidopsis* expuesta a HU 2 mM exhibe una reducción drástica en la longitud de raíces en comparación con el tipo silvestre (Pedroza-García et al., 2019).

La TK1 y RNR están relacionadas por sus reguladores, deben actuar de manera coordinada, ya que la TK1 contribuye con la síntesis de dTTP, el cual regula el sitio alostérico específico de la RNR, que estimula la conversión de GDP a dGDP e inhibe la conversión de CDP a dCDP (Segura-Peña et al., 2007). A su vez, la RNR favorece la síntesis de dTTP, el cual regula negativamente a la TK1. Además, ambas dependen de ATP como efector positivo (Thelander and Reichard, 1979). En plantas ambas reacciones se llevan a cabo en los cloroplastos.

III. HIPÓTESIS

Dado que la ribonucleótido reductasa (RNR1) y la timidina cinasa (TK1) de maíz aportan desoxinucleótidos trifosfato a través de su participación en la ruta *de novo* y del salvamento de la biosíntesis de nucleótidos, respectivamente, se inducirá su expresión para la reparación del DNA como respuesta al estrés genotóxico.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Estudiar el patrón de expresión de la ribonucleótido reductasa (*ZmRNR1*) y timidina cinasa (*ZmTK1*) de maíz en respuesta a diferentes agentes genotóxicos.

B. Objetivos particulares

1. Estudiar el patrón de expresión por RT-PCR punto final de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1* en radículas de maíz expuestas a los agentes genotóxicos zeocina, hidroxurea y ciprofloxacino en función del tiempo.
2. Establecer un modelo experimental que permita medir los niveles de expresión de ambos genes en raíces de maíz expuestas a los agentes genotóxicos posterior a su germinación.
3. Determinar el tipo de ruta de síntesis de nucleótidos seguido por la célula de acuerdo con el tipo de daño generado por cada genotóxico en función del tiempo de exposición.
4. Caracterizar la respuesta al estrés genotóxico mediante un ensayo de elongación radicular en semillas de maíz expuestas a zeocina, hidroxurea y ciprofloxacino.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Desinfección y siembra de semillas de maíz

Se emplearon semillas de maíz raza "Chalqueño", adquiridas en Chalco, Estado de México. A éstas se les cortó manualmente el pedicelo. Las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (0.5 %; v/v) y se agitaron durante 2 min, enseguida se introdujeron en agua estéril y se agitaron durante 1 min para eliminar el hipoclorito de sodio. Se realizaron un total de tres lavados con agua estéril. Las semillas se dejaron secar en una caja Petri dentro de una campana de flujo laminar por dos minutos y se sembraron en agar (0.7 %; m/v), sobre la superficie del medio y se incubaron a 28 °C por 36 h en oscuridad.

B. Preparación de medio agar con agente genotóxico e imbibición de las semillas

Los agentes genotóxicos utilizados fueron zeocina (Invitrogen), hidroxiurea (SIGMA) y ciprofloxacino (SIGMA).

Para la preparación del medio, se añadieron los agentes genotóxicos en 360 mL (correspondientes a cinco cajas de Petri de 70 mL cada una para cada tratamiento) de agar al 0.7% para obtener las concentraciones que se indican en la tabla 1.

Para la preparación de las concentraciones menores y mayores de hidroxiurea se añadieron 6.8 mg y 13.6 mg en 360 mL de agar al 0.7 %, es decir, 0.25 mM y 0.5 mM, respectivamente.

Tabla 1. Concentración de genotóxicos empleados en este trabajo.

Genotóxico	Concentración stock	Concentración menor	Concentración mayor
Zeocina	88 M	10 μ M	20 μ M
Hidroxiurea*	-	0.25 mM	0.5 mM
Ciprofloxacino	0.05 M	1.0 μ M	1.5 μ M

*Se adicionó sólido.

Transcurridas 36 h desde la siembra se transfirieron 50 semillas que tuvieron una protrusión de radícula entre 1 y 3 cm de longitud a cajas Petri con agar suplementado con el agente genotóxico. Las cajas se incubaron a 28°C y para la extracción de RNA se tomaron muestras de 1 cm de raíz a partir de la punta a las 3, 6, 12, 24 y 48 h de exposición. Las raíces se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

C. Extracción de RNA total

Las muestras de raíces se pesaron, se colocaron en un mortero estéril y se congelaron con N₂ líquido. Se añadió Trizol™ (Invitrogen) en proporción 3:1 con relación a la masa del tejido y se pulverizó con el pistilo hasta obtener una mezcla homogénea con adición paulatina de N₂ líquido para evitar la degradación del RNA. La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se transfirió a tubos microfuga y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo microfuga estéril, se le agregaron 200 μ L de FCI (Fenol-Cloroformo-Isoamílico 25:24:1), se agitó por 15 segundos y cada tubo se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

La fase acuosa se transfirió a un tubo microfuga estéril y se le agregaron 400 μ L de cloroformo, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5

min a 4 °C. El sobrenadante se separó y se le adicionaron otros 400 µL de cloroformo para centrifugarse nuevamente a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se separó en un tubo de microfuga estéril y se le agregó un volumen de isopropanol, se mezcló muy bien y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez incubado se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

El sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1 mL de EtOH al 70 %, se centrifugó otra vez durante 5 min, se decantó el sobrenadante y el botón se secó a temperatura ambiente por 5 min. El botón se disolvió en 500 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 167 µL de LiCl 8 M y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Una vez incubado, la muestra se centrifugó 15 min a 4 °C. El botón se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 500 µL de EtOH al 95 % y 25 µL de acetato de sodio 3 M y se incubó toda la noche a -70 °C.

Después de este periodo de incubación, se centrifugó a 13,000 rpm 20 min a 4 °C, posteriormente se lavó con 1 mL de EtOH al 70% dos veces. Se eliminó el EtOH residual y el botón se secó a temperatura ambiente durante 10 min y se resuspendió en 40 µL de H₂O-DEPC; el RNA total se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000 y se almacenó a -70 °C.

1. Análisis electroforético del RNA total

La integridad del RNA total se evaluó mediante análisis de electroforesis en un gel de agarosa (2.5 %). Para su preparación, se fundió la agarosa en 20 mL de H₂O-DEPC, se le agregó 0.4 mL de solución TAE-DEPC 50X y 20 µL de bromuro de etidio (0.5 µg/µL) como agente intercalante de ácidos nucleicos para visualizar el RNA al ser expuesto ante luz ultravioleta. Como amortiguador de corrida se utilizaron 500 mL de solución TAE-DEPC 1X. Cada muestra se preparó

añadiendo 1 µg de RNA en un volumen total de 10 µL (2 µL de amortiguador de carga GoTaq y c.b.p 8 µL de H₂O-DEPC). Se dejó correr durante 45 min a 88 V. El gel se visualizó en un transiluminador UV y se digitalizó en un sistema ChemiDoc™ MP para su análisis por densitometría.

2. Calibración por densitometría

Para asegurar que la cantidad de RNA total fuera la misma para cada muestra, era indispensable realizar una calibración densitométrica, donde se utilizó el software ImageJ que calcula la intensidad de las bandas de los RNAs ribosomales (18S y 28S). Como criterio de aceptación, la diferencia entre los valores de densitometría de las bandas de RNAr no debe ser mayor a 14%. En caso de ser diferentes, se calcula el volumen que se debe cargar y se repite el análisis densitométrico hasta que la diferencia entre todas las muestras esté en ese intervalo.

D. Reacción RT-PCR

Se preparó la mezcla de reacción que se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT).

Reactivo	Volumen por reacción (µL)	Concentración final
Buffer ImProm II™ (5X)	4	1x
MgCl₂ 25 mM	2.4	4 mM
dNTPs 10 mM	1	0.66 mM
Transcriptasa reversa ImProm II™	1	
H₂O-DEPC c.b.p. 15 µL	6.6	
	15	Volumen final

A partir de 1 µg de RNA se sintetizó cDNA mediante la reacción de transcriptasa reversa (kit ImProm-II Promega). El RNA se mezcló con 1 µL de Oligo dTNV (500 µg/µL) cuya secuencia es:

5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3', y H₂O-DEPC hasta un volumen final de 10 µL, la mezcla se mantuvo a 70°C durante 5 min y se mantuvo en 4°C por 5 min. Posteriormente, se mezclaron los 10 µL de RNA molde con los 15 µL de la mezcla de reacción preparada previamente. El termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp System 9700) se programó con las siguientes temperaturas: 25 °C 5 min, 42 °C 60 min y 70 °C 15 min para inactivar la RT. Finalmente el cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Mediante la técnica de PCR se pueden amplificar secuencias *in vitro* de DNA de forma exponencial a partir del molde de DNA o cDNA. Se emplean oligonucleótidos específicos que acotan la región a amplificar por una DNA polimerasa termoestable. Las etapas que se llevan a cabo durante la reacción son: desnaturalización (94 °C), alineamiento (55 - 65 °C) y elongación (72 °C) del DNA molde.

Se tomó 1 µL de cDNA y se mezcló con 4 µL de H₂O estéril, se mantuvo la mezcla en hielo (4 °C) mientras se preparó la mezcla de reacción. Se utilizó el kit GoTaq® DNA Polimerasa Promega. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Composición y concentración final de la mezcla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reactivo	Volumen para 1 reacción μL	Concentración final
Go Taq React Buffer 5x Green Promega	4	1x
dNTPs 10 mM	0.4	0.27 mM
Oligo For 10 μM	1	0.67 μM
Oligo Rev 10μM	1	0.67 μM
Taq Polimerasa 5U/μL	0.2	1 U
H₂O	8.4	c.b.p. 15 μL
	15	Volumen final

Una vez preparada la mezcla de reacción (Tabla 3) se combinaron estos 15 μL con los 5 μL de cDNA- H₂O, se agitó en el vórtex y los tubos de PCR con las muestras se colocaron en el termociclador (Applied Biosystems, GeneAmp System 9700) y se establecieron las condiciones de amplificación para cada gen. Se amplificaron los transcritos *ZmTK1*, *ZmRNR1* y *ZmEF1a*, las condiciones de amplificación se presentan en la tabla 5. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 2.5% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se empleó el sistema ChemiDoc™ MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 4. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *ZmTK1*, *ZmRNR* y *ZmEF1a*.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' → 3')	Amplicón (pb)
<i>ZmTK1</i>	For: GGATCCGCCGCTGCGGCTCAG	620
	Rev: GAATTCGGCGGCTTGTCAAGGTCCAA	
<i>ZmRNR1</i>	For: TGTGTCGAACCTGCACAAGA	378
	Rev: TCACCGACGCTTTTCAATGC	
<i>ZmEF1α</i>	For: TGGGCCCTACTGGTCTTACTACTGA	135
	Rev: ACATACCCACGCTTCAGATCCT	

El tamaño de los amplicones se obtuvo a partir de la secuencia de cada gen en la base de datos NCBI. Los oligonucleótidos se diseñaron con ayuda del software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir de las secuencias de cDNA de cada uno de los genes (Tabla 4). El área de la densidad de las bandas de los amplicones se cuantificó mediante el software ImageJ.

Tabla 5. Condiciones de amplificación para los transcritos de los genes estudiados.

Gen	Temperatura de desnaturalización (°C)	Temp. de alineam. (°C)	Temperatura de elongación (°C)	Conc. en PCR de Primers (μM)	# de ciclos
<i>ZmTK1</i>	94	55	72	0.4 μM	35
<i>ZmRNR1</i>	94	60	72	0.5 μM	29
<i>ZmEF1α</i>	94	65	72	0.5 μM	30

Se realizaron dos y en algunos casos tres réplicas biológicas para la expresión de genes mediante RT-PCR.

F. Caracterización de la respuesta ante el estrés genotóxico

Se desinfectaron y germinaron las semillas como se describió en la sección (A) de materiales y métodos. Se seleccionaron las semillas que tenían una longitud de 2 cm que posteriormente se transfirieron al medio con el agente genotóxico, se midió la longitud total de la raíz a 40 semillas de cada tratamiento para evaluar diferencias en el tamaño de la raíz comparada con los controles. Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas en la longitud de la raíz.

VI. RESULTADOS

A. Evaluación de la integridad del RNA

Para todas las muestras se evaluó la integridad del RNA mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (2.5%). La Figura 18 muestra un gel en el que se observan íntegras las bandas de los RNA ribosomales (28S y 18S), indicador de la integridad del RNA extraído. Asimismo, como parámetro de calidad se determinó la relación de A_{260}/A_{280} y los valores estuvieron en el intervalo comprendido entre 1.8 y 2.0. También estos geles nos ayudaron a calibrar las muestras de RNA a partir de los datos de concentración que estuvieron en un rango entre 282 ng/ μ L y 2.156 μ g/ μ L (ANEXO; tablas 6, 7 y 8).

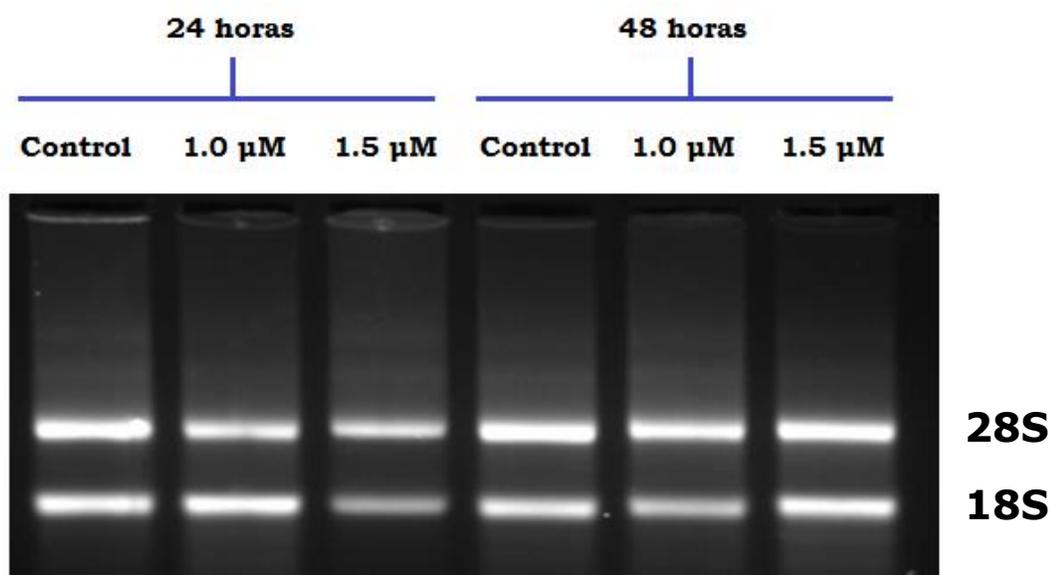


Figura 18. Gel de agarosa (2.5%) representativo de las muestras de RNA de raíces de plántulas de maíz expuestas a ciprofloxacino para evaluar la integridad del RNA total. Las bandas superior e inferior corresponden a los RNA ribosomales 28S y 18S, respectivamente.

B. Determinación de las condiciones para evaluar los niveles de transcritos de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*

Se hicieron pruebas preliminares para determinar las condiciones óptimas de amplificación de los cDNAs de los dos genes de estudio, y del gen *EF1 α* , para hacer el análisis densitométrico de la intensidad de las bandas. Se realizó una titulación de ciclos para cada uno de ellos; la curva de calibración de *ZmTK1* se muestra en ANEXOS, Figura 26. Las condiciones para *ZmRNR1* y *ZmEF1 α* que se emplearon fueron establecidas por SanJuan-Badillo y Nájera Martínez (Comunicación personal). Estas condiciones se resumen en la tabla 5 de la sección de materiales y métodos.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación, estudiamos los efectos de los tres agentes genotóxicos sobre la expresión de los dos genes en radículas de maíz expuestas por distintos tiempos.

C. Efecto de la zeocina sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*

Mediante la técnica de RT-PCR punto final se detectaron los amplicones de cDNA correspondientes a los dos genes de estudio y al gen normalizador en todos los tiempos y tratamientos (Fig. 19A). El análisis densitométrico de las bandas de los amplicones muestra que el transcrito del gen *ZmRNR1* aumentó aproximadamente un 20 % a las 6 h con ambas concentraciones de zeocina y de un 15 % a 23 % de incremento con respecto al control a las 24 h. En cambio, el gen *ZmTK1* no mostró inducción en las primeras horas, e incluso se observa una reducción en su nivel a las 12 h en presencia del genotóxico (Fig. 19B). Observamos una fluctuación con picos máximos a las 6 h y 24 h para *ZmRNR1* del 20 % en ambas concentraciones y una inducción entre el 20 % y 40 % de *ZmTK1* a las 24 h (Fig. 19C).

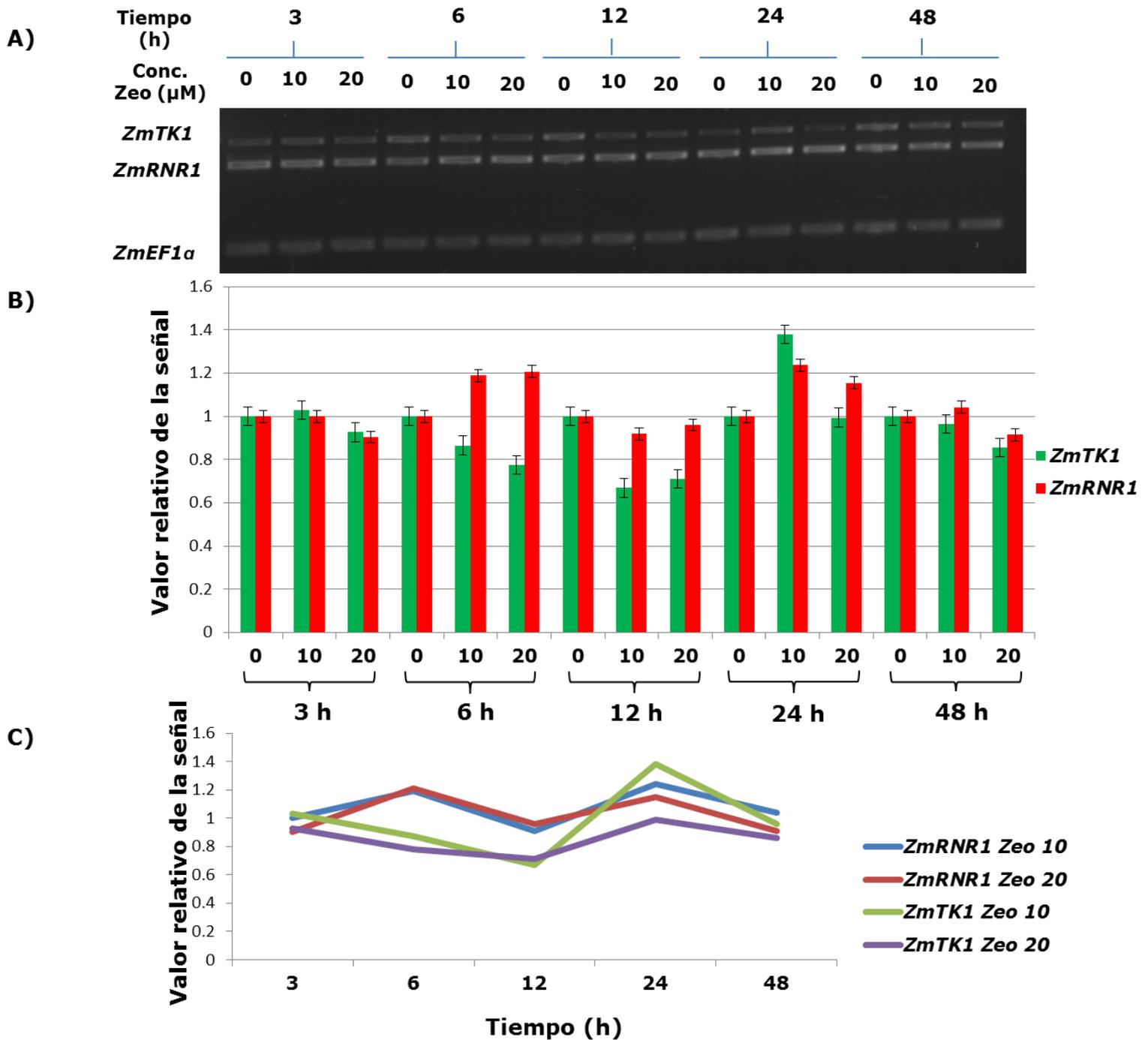


Figura 19. Efecto de la zeocina (10 μM y 20 μM) sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*. A) Gel de agarosa que muestra la separación de los amplicones de cDNA correspondientes a *ZmRNR1*, *ZmTK1* y *ZmEF1 α* **B)** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los amplicones. **C)** Gráfica de la fluctuación de la intensidad de los amplicones entre 3 y 48 h.

D. Efecto de la hidroxiaurea sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*

El segundo agente genotóxico estudiado fue la hidroxiaurea, que se probó a dos concentraciones (0.25 mM y 0.5 mM). Los resultados de la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1* se muestran en la Fig. 20. El análisis densitométrico de las bandas de los amplicones muestra que el gen *ZmRNR1* tuvo una inducción de aproximadamente 55 % a las 6 y 12 h en la concentración de 0.5 mM. También la expresión del gen *ZmTK1* se indujo a tiempos tempranos pues los niveles máximos de transcrito se incrementaron un 80 % a las 6 h a la concentración de 0.25 mM y un 60 % a 0.5 mM HU. Esta inducción fue temporal pues a las 12 h, los niveles de transcrito de *ZmTK1* disminuyeron aproximadamente 40 % con respecto al control (Fig. 20B y C).

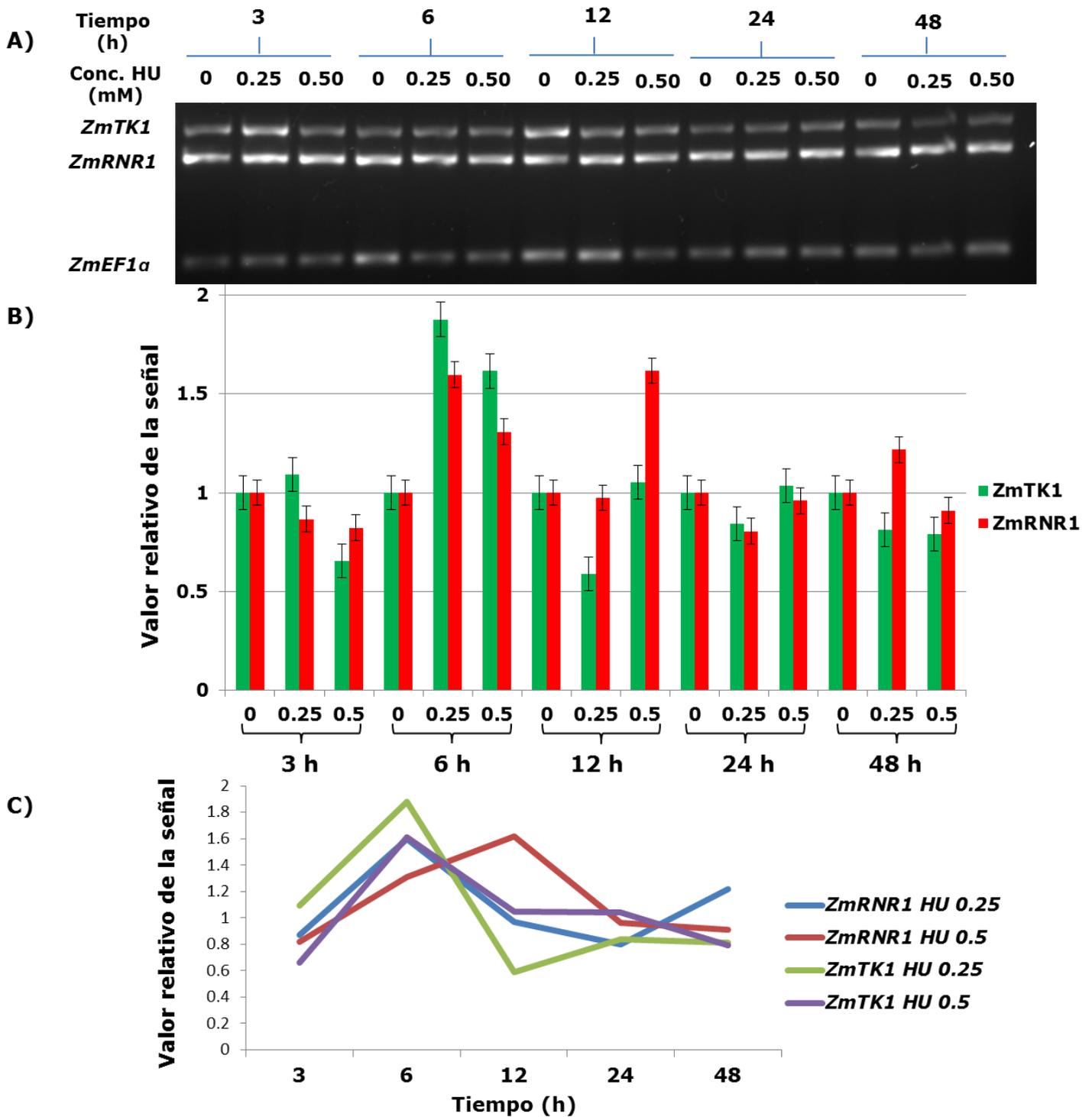


Figura 20. Efecto de la hidroxiurea (0.25 mM y 0.5 mM) sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*. A) Gel de agarosa que muestra la separación de los amplicones de cDNA correspondientes a *ZmRNR1*, *ZmTK1* y *ZmEF1α* **B)** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los amplicones. **C)** Gráfica de la fluctuación de la intensidad de los amplicones entre 3 y 48 h.

E. Efecto del ciprofloxacino sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*

Los resultados del efecto de Cip (1 μM y 1.5 μM) se muestran en la Fig. 21A. El análisis densitométrico de las bandas de los amplicones muestra que la expresión del gen *ZmTK1* no tuvo cambios significativos a lo largo del periodo de estudio a ninguna concentración de Cip respecto a los controles. Los niveles de transcrito del gen *ZmRNR1* aumentaron 10 % a las 6 h para ambas concentraciones y la mayor inducción (25 %) se observó a las 12 h con la concentración más alta de Cip (Fig. 21B). Se observó un patrón de fluctuación para el gen *ZmRNR1* con un máximo y mínimo de inducción a las 12 h para las concentraciones de 1.5 μM y 1.0 μM , respectivamente (Fig. 21C).

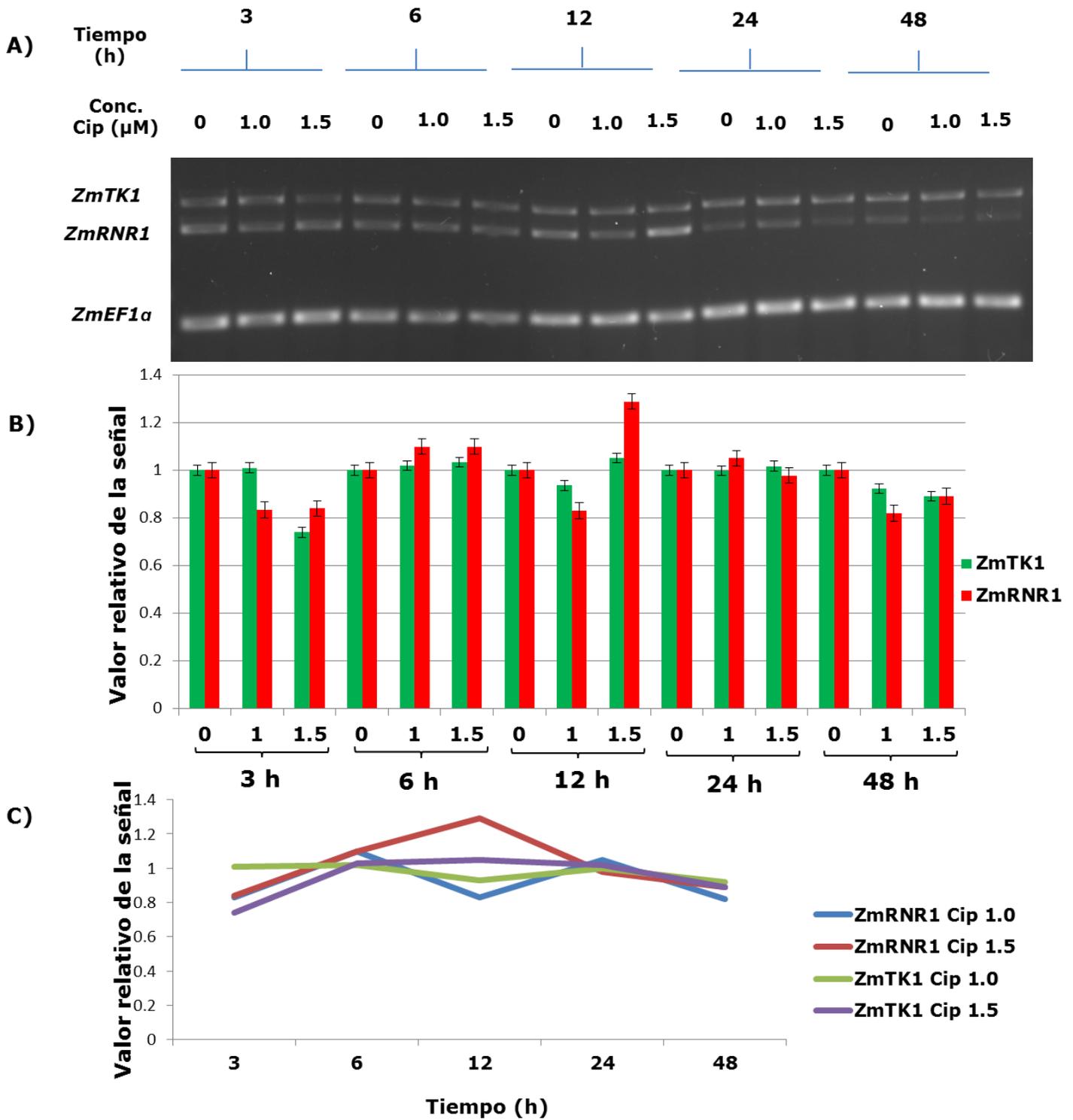


Figura 21. Efecto del ciprofloxacino (1.0 μM y 1.5 μM) sobre la expresión de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1*. A) Gel de agarosa de la separación de los amplicones de cDNA correspondientes a *ZmRNR1*, *ZmTK1* y *ZmEF1 α* **B)** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los amplicones. **C)** Gráfica de la fluctuación de la intensidad de los amplicones entre 3 y 48 h.

F. Efecto de los agentes genotóxicos sobre el crecimiento de la raíz primaria.

La determinación de las concentraciones de los genotóxicos empleadas para estudiar la expresión de los genes se basaron en datos de la literatura (Pedroza-García et al., 2019 y Pedroza-García, comunicación personal), correspondientes de *A. thaliana*, para los cuales se realizaron ensayos previos en el laboratorio para determinar las concentraciones que inducían la respuesta de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1* en maíz. También evaluamos si estos compuestos afectaban el desarrollo mediante la medición de la longitud de la raíz primaria de las semillas post-germinación.

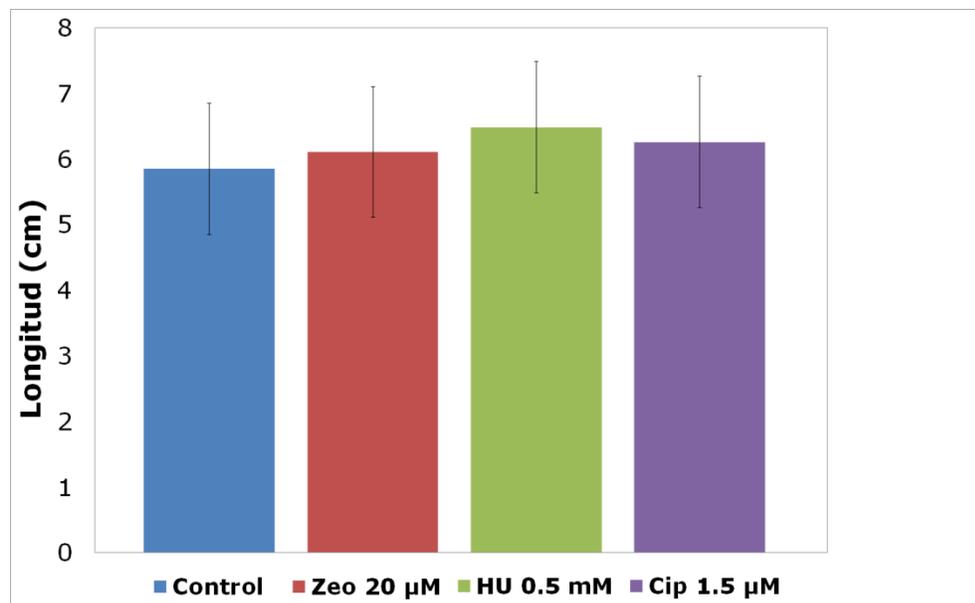


Figura 22. Longitud de las raíces a las 24 h de exposición a Zeo (20 µM), HU (0.5 mM) y Cip (1.5 µM).

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en la longitud de las raíces a las 24 h de exposición, se repitió el ensayo para hidroxiiurea con una concentración mayor (5 mM) a diferentes tiempos como se muestra en la figura 23, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la longitud de las raíces medidas en comparación con el control. En cambio, se observó un desarrollo acelerado de las raíces secundarias (Figura 24).

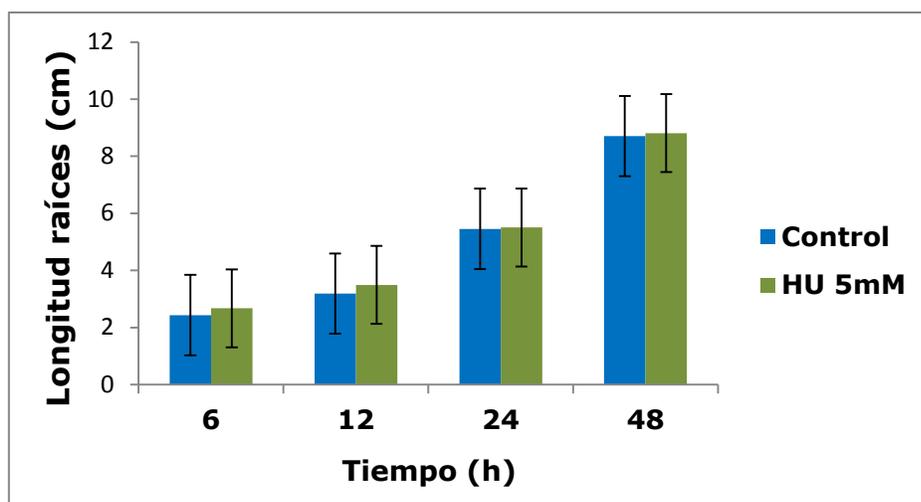


Figura 23. Longitud de las raíces a diferentes tiempos de exposición en hidroxiiurea.

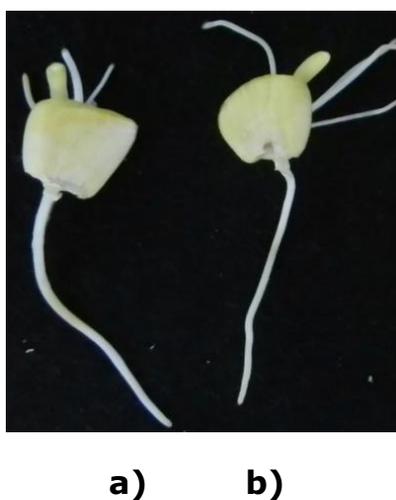


Figura 24. Semillas representativas de (a) control y (b) HU 5 mM a las 24 h de germinación.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se estableció un modelo para estudiar el efecto de agentes genotóxicos sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de nucleótidos en raíces de plántulas de maíz. Encontramos que los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1* tienen una expresión diferencial en respuesta a los agentes genotóxicos empleados. A las 6 h de exposición a zeocina se observó una inducción de *ZmRNR1*, mientras que a hidroxiurea se indujeron ambos genes. A las 12 h se mantuvo únicamente la expresión de *ZmRNR1* a hidroxiurea y a las 24 h se observó inducción de *ZmTK1* con zeocina. Con ciprofloxacino sólo presentó indujo a *ZmRNR1* entre las 6 y 24 h.

Los resultados sugieren que tanto la vía *de novo* de síntesis de nucleótidos, como la vía de salvamento aportan dNTPs que se requieren en la síntesis reparativa del DNA llevada a cabo por las DNA polimerasas.

A. Expresión y función de la *RNR1* en la reparación del DNA en plantas.

En la exposición a zeocina e hidroxiurea se observó un patrón dependiente del tiempo de imbibición en la inducción de *ZmRNR1*, que de manera similar se ha descrito en la literatura como una fluctuación periódica de ambas subunidades en plántulas del tipo silvestre de *A. thaliana* expuestas a hidroxiurea y bleomicina (Roa et al., 2009). La hidroxiurea (1 mM) induce la expresión de ambas subunidades en plántulas silvestres de *Arabidopsis* durante tiempos comprendidos entre 0 y 8 h, y el pico de inducción del gen *RNR1* se alcanza a las 8 h. (Figura 25A; Roa et al., 2009).

Por su parte la bleomicina 10^{-6} M induce la expresión de *AtRNR1* a partir de 1.5 h pero en un menor grado que *AtTSO2* y con una cinética de aumento constante (Figura 25B; Roa et al., 2009).

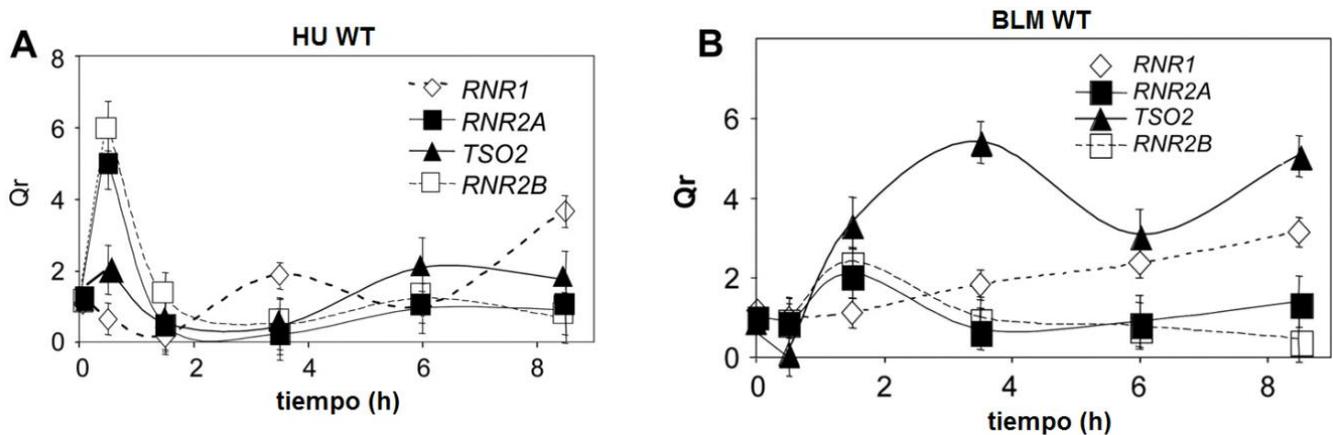


Figura 25. Patrón de expresión de *AtRNR1* en plántulas de *A. thaliana* de 17 días en respuesta a HU 1 mM y bleomicina 10^{-6} M medidos mediante RT-PCR. Tomado de Roa et al., 2009.

Estudios en la literatura de la doble mutante de *Arabidopsis tso2-1 rnr2a-1* exhibe incremento en el daño al DNA medido mediante el ensayo cometa (Wang and Liu, 2006), debido a que la falta de nucleótidos detienen la síntesis de DNA que conlleva a la disociación del complejo de replicación que resulta en cortes de cadena sencilla que pueden ser procesadas como rupturas de doble cadena (Aguilera and Gómez-González, 2008), consistente con este ensayo, se detectó la expresión de *ATPARP1* y *ATPARP2* durante la germinación de estas mutantes en *A. thaliana* (Wang and Liu, 2006), que son marcadores moleculares asociados a la reparación del daño al DNA (Doutriaux et al., 1998; Lamb et al., 2012), por lo que la falta del aporte de nucleótidos conlleva a un tipo de daño al DNA que puede ser revertido por la RNR1.

Otras evidencias de la función de la RNR en el mantenimiento de la integridad del genoma del plastidio, demostró que la mutante *cls8-1* de *A. thaliana* en condiciones de homocigosis presenta una reducción en el número de copias del genoma cloroplástico y una menor cantidad de cloroplastos aunque de mayor tamaño. En estas mutantes, los niveles de dTTP y dATP son significativamente menores que en plantas silvestres, las hojas y flores presentan una morfología anormal, además de clorosis (Garton et al., 2007).

De la misma manera, en mutantes de plantas de arroz y tabaco de los genes *RNRL1* y *RNRL2*, se observó una deficiencia en la síntesis de clorofila que afecta la coloración de las hojas durante los primeros estadios del desarrollo (Yoo et al., 2009; Archer and Bonnett, 1987).

En un ensayo de toxicidad en plántulas silvestres y mutantes *AtTSO2* de *A. thaliana* a los 8 días de exposición a bleomicina se demostró que las mutantes son más sensibles a medida que aumenta la concentración, este resultado sugiere que el gen *AtTSO2* está involucrado en la respuesta al daño de ruptura de doble cadena (Roa et al., 2009).

B. Expresión y función de la *TK1* en la reparación del DNA en plantas.

En la exposición a hidroximetilurea se observó un patrón dependiente del tiempo en la inducción de *ZmTK1*, que de manera similar se ha descrito como una fluctuación periódica de *ZmTK1* durante la germinación de maíz, cuya expresión se detiene al final de la replicación del DNA (Georgieva et al., 1993). Se sospecha que en las plántulas tratadas con HU se presentó una inducción de *ZmTK1* a las 6 h debido a

que la inhibición de la función de la RNR1 propicia que se sinteticen nucleótidos por la vía del salvamento para compensar esta carencia durante la reparación y replicación del DNA, lo que sugiere que tanto la vía *de novo* como la vía del salvamento participan de manera coordinada para aportar dNTPs requeridos en los procesos de reparación del DNA.

Dado que el genoma de maíz contiene solamente un gen *TK1*, éste podría cumplir las funciones de los dos genes (*TK1a* y *TK1b*) de *Arabidopsis*, se tienen indicios de que la *TK1* de maíz cumple la función de *TK1b*. *ZmTK1* es esencial para el mantenimiento de la integridad del genoma cloroplástico (Le Ret et al., 2018), al igual que *TK1b* es necesaria para la integridad del genoma organelar como se demostró en plántulas de *Arabidopsis* mutantes homocigotas (*tk1b*) tratadas con ciprofloxacino que mostraron ser hipersensibles en comparación con las del tipo silvestre ya que no se desarrollaron y presentaron hojas cloróticas. De la misma manera, se probaron mutantes *tk1a* tratadas con la misma concentración de ciprofloxacino, donde no se observó hipersensibilidad (Pedroza-García et al., 2019). En concordancia con este resultado, Le Ret et al (2019) demostraron que en hojas de mutantes sencillas de la *TK1* cloroplástica de *Arabidopsis* (*tk1b*) y maíz (*cptk1*) el número de copias de DNA cloroplástico es menor para las mutantes en presencia de ciprofloxacino en comparación con las del tipo silvestre, lo que comprueba que la *TK1* cloroplástica de maíz, además de ser indispensable en la replicación del DNA del genoma cloroplástico, está implicado en la reparación que es dependiente de la ruta del salvamento de nucleótidos en cloroplastos. Sin embargo, en este trabajo encontramos que el Cip no indujo la expresión de *ZmTK1* a los tiempos estudiados. Esto se podría explicar por el tejido empleado, pues las

raíces de plántulas de maíz no tienen todavía cloroplastos maduros sino plastidios en desarrollo.

Por otro lado, encontramos que la zeocina, que provoca la ruptura de la doble cadena de DNA, indujo la expresión de *ZmTK1*, lo que es consistente con la función análoga de AtTK1a en el mantenimiento del genoma nuclear (Pedroza-García et al., 2019).

C. Respuesta mediada en maíz por ATM y ATR

En *Arabidopsis*, tanto RNR1 como TK1, responden en la vía de respuesta de daño al DNA mediado por las cinasas ATM y ATR, que convergen en SOG1, como se muestra en la figura 11 (Yoshiyama et al., 2013). Mediante análisis bioinformáticos se han encontrado secuencias ortólogas SOG1-like con motivos conservados en la región C-terminal en otras plantas como *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Sorghum bicolor* (Yoshiyama, 2015), lo que sugiere que en maíz la respuesta de daño al DNA mediada por ATM y ATR para activar SOG1 ocurre de la misma manera que en *Arabidopsis*.

D. Regulación y síntesis de ZmRNR1 y ZmTK1 durante el ciclo celular.

La inducción de los genes *ZmRNR1* y *ZmTK1* a las 6 h en respuesta al estrés genotóxico concuerda con el tiempo de síntesis máxima de DNA replicativo que ocurre a las 40 h desde la imbibición en agua en maíz, de acuerdo a Baíza et al., 1989, ya que desde la imbibición en agua más las seis h de exposición en los genotóxicos, se tiene un tiempo de 42 h que coincide con la replicación máxima del

DNA. De la misma manera, en la planta de tabaco los niveles de transcrito de los genes *RNR1* y *RNR2* se inducen en la transición G1/S, por lo que la expresión de RNR está correlacionada con la síntesis de DNA durante la fase S (Chabouté et al., 1998).

En la planta de tabaco, la adición de HU cuando la replicación está ocurriendo resulta en un aumento de los niveles de RNAm de RNR que se sugiere que facilitan la reparación del DNA aumentando los niveles de dNTPs (Chabouté et al., 1998).

Es posible que se requiera cierto nivel de actividad de RNR a través del ciclo celular para mantener un nivel de dNTPs para la reparación del DNA. Hay un incremento en los niveles de transcrito de RNR en la transición G2/M que puede estar relacionada al requerimiento de dNTPs para la síntesis y reparación de DNA durante la fase premitótica (Chabouté et al., 1998).

E. Ensayo de toxicidad

No se observó una disminución en la longitud de las raíces de maíz germinadas en presencia de los diferentes genotóxicos durante diferentes tiempos como se esperaba en comparación con ensayos de toxicidad evaluados en *A. thaliana* (Menke et al., 2001; Culligan et al., 2004; Cappadocia et al., 2010). Aunque el ensayo de longitud de la raíz es un parámetro de genotoxicidad, es menos sensible que un ensayo bioquímico. A pesar de no detectar diferencias significativas en la longitud de la raíz primaria, la inducción de los genes *ZmRNR1* y/o *ZmTK1* para los distintos agentes nos permite afirmar que las concentraciones empleadas provocaron daños en el DNA de las células de raíz.

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

Tanto la vía *de novo* como la del salvamento de síntesis de nucleótidos participan de manera diferenciada para aportar dNTPs requeridos en los procesos de síntesis y reparación del DNA como respuesta a diferentes tipos de estrés genotóxico en maíz.

Se estableció un modelo experimental que permitió medir los niveles de expresión de ambos genes en raíces de maíz expuestos a los agentes genotóxicos después de su germinación.

El gen *ZmRNR1* se induce a las 6 h en respuesta a estrés genotóxico causado por zeocina, hidroxiiurea y ciprofloxacino, a las 12 h por hidroxiiurea y a las 24 h por zeocina. El ciprofloxacino presentó ligera inducción entre 6 y 24 h a diferentes concentraciones.

El gen *ZmTK1* se induce a las 6 h únicamente en presencia de hidroxiiurea, a las 24 h se induce por zeocina

Tanto la vía *de novo* como la vía de salvamento de síntesis de nucleótidos se activan en respuesta de daño al DNA en maíz.

No se observaron diferencias significativas en la longitud de las raíces germinadas en los diferentes agentes genotóxicos.

Perspectivas

Cuantificar los niveles de transcritos por qRT-PCR y asociarlos con la magnitud del daño al DNA.

Analizar la función de la TK de maíz mediante un ensayo de complementación en la TK1a y TK1b de *Arabidopsis* para evaluar su similitud funcional.

Determinar mediante ensayos cometa la existencia de daño en el DNA por estos tres genotóxicos y detección de marcadores moleculares como *ATPARP1* y *ATPARP2* asociados a la reparación del daño al DNA de plantas.

IX. REFERENCIAS

- Abraham, R.** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 15:2177-2196.
- Adachi, S; Minamisawa, K; Okushima, Y; Inagaki, S; Yoshiyama, K; Kondou, Y; Kaminuma, E; Kawashima, M; Toyoda, T; Matsui, M; Kurihara, D; Matsunaga, S; and Umeda, M.** (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 108:10004-10009.
- Aguilera, A; Gómez-González, B.** (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 9:204-217.
- Aldred, K; Kerns, R; and Osheroff, N.** (2014) Mechanism of quinolone action and resistance. *Journal of the American Chemical Society*, 53:1565-1574.
- Archer, E; and Bonnett, H.** (1987) Characterization of a virescent chloroplast mutant in tobacco. *Plant Physiology*, 83:920-925.
- Arnér, E; and Eriksson, S.** (1995) Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacology & Therapeutics*, 67:155-186.
- Ashihara, H; Loukanina, N; Stasolla, C; and Thorpe, T.** (2001) Pyrimidine metabolism during somatic embryo development in white spruce (*Picea glauca*), *Journal of Plant Physiology*, 158:613-621.
- Aye, Y; Li, M; and Long, M.** (2014) Ribonucleotide reductase and cancer: biological mechanisms and targeted therapies. *Oncogene*, 34:2011-2021.
- Baíza, A; Vázquez, J; and de Jiménez, E;** (1989) DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology*, 135:416-421.
- Birringer, M; Claus, M; Folkers, G; Kloer, D; Schulz, G; and Scapozza, L.** (2005) Structure of a type II thymidine kinase with

bound dTTP. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579:1376-1382.

Bornemann, C; Drude, K; and Follmann, H. (1996) Deoxyribonucleotide synthesis in green algae. Cell cycle fluctuation of ribonucleotide reductase is only moderate in the unicellular, exosymbiotic green algae, *Chlorella sp.* pbi. *Journal of Plant Physiology*, 148:657-661.

Bostock, J; Miller, K; O'Neill, A; and Chopra, I. (2003) Zeocin resistance suppresses mutation in hypermutable *Escherichia coli*. *Microbiology*, 149:815-816.

Britt, A. (1996) DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:75-100.

Britt, A. (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science*, 4:20-25.

Brown, N; and Reichard, P. (1969) Ribonucleoside diphosphate reductase: formation of active and inactive complexes of proteins B1 and B2. *Journal of Molecular Biology*, 46:25-38.

Burger, R; Peisach, J; and Horwitz, S. (1981) Activated bleomycin: a transient complex of drug, iron and oxygen that degrades DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 256:11636-11644.

Burma, S; Chen, B; Murphy, M; and Kurimasa, A. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276:42462-42467.

Cappadocia, L; Maréchal, A; Parent, J; Lepage, E; Sygusch, J; and Brisson, N. (2010) Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in *Arabidopsis* organelle genome repair. *Plant Cell*, 22:1849-1867.

Chabouté, M; Combettes, B; Clément, B; Gigot, C; and Philipps, G. (1998) Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Molecular Biology*, 38:797-806.

- Champman, T; and Kinsella, T.** (2011) Ribonucleotide reductase inhibitors: a new look at an old target for radiosensitization. *Frontiers in Oncology*, [10.3389/fonc.2011.00056](https://doi.org/10.3389/fonc.2011.00056).
- Clausen, A; Girandon, L; Ali, A; Knecht, W; Rozpedowska, E; Sandrini, M; Andreasson, E; Munch-Petersen, B; and Piškur, J.** (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 279:3889-3897.
- Cliby, W; Roberts, C; Cimprich, K; Stringer, C; Lamb, J; Schreiber, S; and Friend, S.** (1998) Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *European Molecular Biology Organization Journal*, 17:159-169.
- Cotruvo, J; and Strubbe, J.** (2011) Class I Ribonucleotide Reductases: Metallocofactor Assembly and Repair *In Vitro* and *In Vivo*. *Annual Review of Biochemistry*, 80:733-767.
- Culligan, K; Robertson, C; Foreman, J; Doerner, P and Britt, A.** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant Journal*, 48:947-961.
- Culligan, K; Tissier, A; and Britt, A.** (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16:1091-1104.
- Datta, K; Marsh, L; and Marcus, A.** (1983) Early growth of wheat embryonic axes and the synthesis of RNA and DNA. *Plant Physiology*, 72:394-397.
- De La Rosa Ortega Luis Fernando.** (2019) Participación de la timidina cinasa de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta de daño al DNA. *Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.*
- De Schutter, K; Joubès, J; Cools, T; Verkest, A; Corellou, F; Babiychuk, E; Van Der Schueren, E; Beeckman, T; Kushnir, S; Inzé, D; and De Veylder, L.** (2007) *Arabidopsis* WEE1 kinase

controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *The Plant Cell*, 19:211-225.

Doležel, J; Čihaličva, J; Weiserovia, J; and Lucretti, S. (1999) Cell cycle synchronization in plant root meristems. *Methods in Cell Science*, 21:95-107.

Doutriaux, M; Coutreau, F; Bergounioux, C; and White, C. (1998) Isolation and characterization of the RAD51 and DMC1 homologs from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 257:283-291.

Dumas, P; Bergdoll, M; Cagnon, C; and Masson, J. (1994) Crystal structure and site-directed mutagenesis of a bleomycin resistance protein and their significance for drug sequestering. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 13:2483-2492.

Elledge, S; and Davis, R. (1987) Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Molecular and Cellular Biology*, 7:2783-2793.

Eriksson, M; Uhlin, U; Ramaswamy, S; Ekberg, M; Regnström, K; Sjöberg, B; and Eklund, H. (1997) Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure*, 5:1077-1092.

Eriksson, S; Munch-Petersen, B; Johansson, K; Eklund, H. (2002) Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59:1327-1346.

Eriksson, S; Thelander, L; and Akerman, M. (1979) Allosteric regulation of calf thymus ribonucleoside diphosphate reductase. *Biochemistry*, 18:2948-2952.

Evans, J; Lock, K; Levine, B; Champness, J; Sanderson, M; Summers, W; McLeish, P; and Buchan, A. (1998) Herpesviral thymidine kinases: laxity and resistance by design. *Journal of General Virology*, 79:2083-2092.

Evans-Roberts, K; Mitchenall, L; Wall, M; Leroux, J; Mylne, J; and Maxwell, A. (2015) *DNA gyrase is the target for the quinolone*

drug ciprofloxacin in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 291:3136-3144.

Fairman, J; Wijerathna, S; Ahmad, M; Xu, H; Nakano, R; Jha, S; Prendergast, J; Welin, M; Flodin, S; Roos, A; Nordlund, P; Li, Z; Walz, T; and Dealwis, C. Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18:316-322.

Finch-Savage, W; and Leubner-Metzger, G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171:501-523.

Fulcher, N and Sablowski, R. (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Plant Biology*, 106:20984-20988.

Garcia, V; Bruchet, H; Camescasse, D; Granier, F; Bouchez, D; and Tissiera, A. (2003) *AtATM* is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *The Plant Cell*, 15:119-132.

Garton, S; Knight, H; Warren, G; Knight, M; and Thorlby, G. (2007) *crinkled leaves 8* – A mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase – leads to defects in leaf development and chloroplast division in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 50:118-127.

Georgieva, E; López-Rodas, G; Hittmair, A; Feichtinger, H; Brosch, G; and Loid, P. (1993) Maize embryo germination. *Planta*, 192:118-124.

Gorbunova, V; and Levy, A. (1997) Non-homologous DNA end joining in plant cell is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Research*, 25:4650-4657.

Gorbunova, V; and Levy, A. (1999) How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends in Plant Science*, 4:263-269.

Hanson, A; and Gregory, J. (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:244-249.

- Hazra, S; Sabini, E; Ort, S; Konrad, M; and Lavie, A.** (2009) Extending thymidine kinase activity to the catalytic repertoire of human deoxycytidine kinase. *Biochemistry*, 48:1256-1263.
- Herz, S; Eberhard, S; and Bacher, A.** (2000) Biosynthesis of riboflavin in plants. The *ribA* gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry*, 53:723-731.
- Holdsworth, M; Finch-Savage, W; Grappin, P; and Job, D.** (2008) Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends in Plant Science*, 13:7-13.
- Hurd, H; Roberts, C; and Roberts, J.** (1987) Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Molecular and Cellular Biology*, 7:3673-3677.
- Jiang, C; Yen, C; Cronin, K; Mitchell, D; and Britt, A.** (1997) UV- and gamma-radiation sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 147:1401-1409.
- Jiménez-López, S; Mancera-Martínez, E; Donayre-Torres, A; Rangel, C; Uribe, L; March, S; Jiménez-Sánchez, G; and Sánchez de Jiménez, E.** (2011) Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant & Cell Physiology*, 52:1719-1733.
- Jung, B; Florchinger, M; Kunz, H; Traub, M; Wartenberg, R; Jeblick, W; Neuhaus, H; and Mohlmann, T.** (2009) Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21:876-891.
- Kafer, C; Zhou, L; Santoso, D; Guirgis, A; Weers, B; Park, S; and Thornburg, R.** (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9:1611-1625.
- Kauffman, M; and Kelly, T.** (1991) Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis. *Molecular and Cellular Biology*, 11:2538-2546.

- Kennedy, B.** (1992) The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Seminars in Oncology*, 19:21-26.
- Kirik, A; Salomon, S; and Puchta, H.** (2000) Species-specific double-strand break repair and genome evolution in plants. *European Molecular Biology Organization Journal*, 19:5562-5566.
- Koç, A; Wheeler, L; Mathews, C; and Merrill, G.** (2004) Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:223-230.
- Lamb, R; Citarelli, M; and Teotia, S.** (2012) Functions of the poly (ADP-ribose) polymerase superfamily in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69:175-189.
- Lans, H; Marteijn, J; and Vermeulen, W.** (2012) ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. *Epigenetics & Chromatin*, 5:1-14.
- Le Ret, M; Belcher, S; Graindorge, S; Wallet, C; Koechler, S; Erhardt, M; Williams-Carrier, R; Barkan, A; and Gualberto, J.** (2018) Efficient replication of the plastid genome requires an organellar thymidine kinase. *Plant Physiology*, 178:1643-1656.
- Lim, E; and Bowles, D.** (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *European Molecular Biology Organization Journal*, 23:2915-2922.
- Lovatt, C; and Cheng, A.** (1984) Aspartate carbamoyltransferase, site of end-product inhibition of the orotate pathway in intact cells of *Cucurbita pepo*. *Plant Physiology*, 75:511-515.
- Madaan, K; Kaushhik, D; and Verma, T.** (2012) Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12:19-29.
- McClarty, G; Chan, A; and Wright, J.** (1986) Hydroxyurea-induced conversion of mammalian ribonucleotide reductase to form hypersensitive to bleomycin. *Cancer Research*, 46:4516-4521.
- Menke, M; Chen, I; Angelis, K; and Schubert, I.** (2001) DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the

comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutation Research*, 493:87-93.

Merriam-Webster (2006) Merriam-Webster's dictionary and thesaurus. *Merriam Webster's Collegiate Dictionary*.

Mikulitis, W; Hengstschläger, M; Sauer, T; and Wintersberger, E. (1996) Overexpression of thymidine kinase mRNA eliminates cell cycle regulation of thymidine kinase enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:853-860.

Moffatt, B; and Ashihara, H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 1:e0018.

Munch-Petersen, B; (1984) Differences in the kinetic properties of thymidine kinase isoenzymes in unstimulated and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 64:173-85.

Munch-Petersen, B; Cloos, L; Tyrsted, G; and Eriksson, S. (1991) Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:9032-9038.

Munch-Petersen, B; Tyrsted, G; and Cloos, L. (1993) Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:15621-15625.

Nordlund P; and Reichard P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry*, 75:681-706.

O'Neal, T; and Naylor, A. (1976) Some regulatory properties of Pea Leaf Carbamoyl Phosphate Synthetase. *Plant Physiology*, 57:23-28.

Osakabe, K; Yoshioka, T; Ichikawa, H; and Toki, S. (2002) Molecular cloning and characterization of RAD51-like genes from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 50:71-81.

Orel, N; Kyryk, A; and Puchta, H. (2003) Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-

strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *The Plant Journal*, 35:604-612.

Palwai, V; and Eriksson, L. (2011) Molecular dynamics simulations exploring the interactions between DNA and metalated bleomycin. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2:170-182.

Păques, F; and Haber, J. (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:349-404.

Pedroza-García, J; Nájera, M; de la Paz, M; and Plasencia, J. (2015) *Arabidopsis thaliana* thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Molecular Biology*, 87:303-315.

Pedroza-García, J; Nájera, M; Mazubert, C; Aguilera, P; Drouin, J; Sánchez, S; Gualberto, J; Raynaud, C; and Plasencia, J. (2019) Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity. *The Plant Journal*, 97:430-446.

Philipps, G; Clément, B; and Gigot, C. (1995) Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 358:67-70.

Povirk, L. (1995) DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes, *Mutation Research*, 355:71-89.

Reichard, P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 57:349-374.

Reichard, P. (2002) Ribonucleotide reductases: the evolution of allosteric regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397:149-155.

Roa, H; Lang, J; Culligan, K; Keller, M; Holec, S; Cognat, V; Marie-Hélène, M; Houlné, G; and Marie-Edith, C. (2009)

Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 151:461-471.

Rofougaran, R; Vodnala, M; and Hofer, A. (2006) Enzymatically active mammalian ribonucleotide reductase exists primarily as an $\alpha_6\beta_2$ octamer. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:27705-27711.

Sandrini, M; and Piškur. (2005) Deoxyribonucleoside kinases: two enzyme families catalyze the same reaction. *Trends in Biochemical Sciences*, 30:225-228.

Schubert, I; Pecinka, A; Mesiter, A; Schubert, V; Klatte, M; and Jovtchev, G. (2004) DNA damage processing and aberration formation in plants. *Cytogenetics and Genome Research*, 104:104-108.

Segura-Peña, D; Lutz, S; Monnerjahn, C; Konrad, M; and Lavie, A. (2007) Binding of ATP to TK1-like enzymes is associated with a conformational change in the quaternary structure. *Journal of Molecular Biology* 369:129-141.

Sherley, J; and Kelly T. (1988) Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of the enzyme from HeLa cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:375-382.

Siebert, R; Puchta, H. (2002) Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome, *The Plant Cell*, 14:1121-1131.

Singh, A; and Xu, J. (2016) The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*, 10.3390/7110099.

Stasolla, C; Katahira, R; Thorpe, A; and Ashihara, H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160:1271-1295.

Steighner, R; and Povirk, L. (1990) Bleomycin-induced DNA lesions at mutational hot spots: implications for the mechanism of double-strand cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 87:8350-8354.

- Stubbe, J; and Cotruvo, J.** (2011) Control of metallation and active co factor assembly in class Ia and Ib ribonucleotide reductases: diiron or dimanganese? *Current Opinion in Chemical Biology*, 15:284-290.
- Thelander, L; and Reichard, P.** (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annual Review of Biochemistry*, 48:133-158.
- Tuteja, N; Ahmad, P; Panda, B; and Tuteja, R.** (2009) Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research*, 681:134-149.
- Tuteja, N; Singh, M; Misra, M; Bhalla, P. and Tuteja, R.** (2001) Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36:337-397.
- Vassilev, L; and Russev, G.** (1984) Hydroxyurea treatment does not prevent initiation of DNA synthesis in Ehrlich ascites tumour cells and leads to the accumulation of short DNA fragments containing the replication origins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 781:39-44.
- Vos, S; Tretter, E; Schmidt, B; and Berger, J.** (2011) All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12:827-841.
- Wang, C; and Liu, Z.** (2006) *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA repair, and plant development. *The Plant Cell*, 18:350-365.
- Wang, L; and Eriksson, S.** (2000) Cloning and characterization of full-length mouse thymidine kinase 2: the N-terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria. *Biochemical Journal*, 351:469-476.
- Wang, L; Munch-Petersen, B; Herrstöm Sjöberg, A; Hellman, U; Bergman, T; and Jörnvall, H; et al.** (1999) Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterization of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 443:170-174.

- Welin, M; Kosinska, U; Mikkelsen, N; Carnrot, C; Zhu, C; Wang, L; Eriksson, S; Munch-Petersen, B; and Eklund, H.** (2004) Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 101:17970-17975.
- Wessler, S; Tarpley, A; Purugganan, M; Spell, M; and Okagaki, R.** (1990) Filler DNA is associated with spontaneous deletions in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 87:8731-8735.
- Xu, J; Zhang, L; Yang, D; Li, Q; and He, Z.** (2015) Thymidine kinases share a conserved function for nucleotide salvage and play an essential role in *Arabidopsis thaliana* growth and development. *New Phytologist*, 10.1111/nph.13530.
- Yoo, S; Cho, S; Sugimoto, H; Li, J; Kusumi, K; Koh, H; Iba, K; and Paek, N.** (2009) Rice *Virescent3* and *Stripe1* encoding the large and small subunits of ribonucleotide reductase are required for chloroplast biogenesis during early leaf development. *Plant Physiology*, 150:388-401.
- Yoshiyama, K; Kobayashi, J; Ogita, N; Ueda, M; Kimura, S; Maki, H; and Umeda, M.** (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 14:817-822.
- Yoshiyama, K.** (2015) SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes & Genetic Systems*, 90:209-216.
- Zhang, C; Liu, G; and Huang, M.** (2014) Ribonucleotide reductase metallocofactor: assembly, maintenance and inhibition. *Frontiers in Biology (Beijing)*, 9(2):104-113.
- Zlatanova, J; Ivanov, P; Stoilov, M; Chimshirova, K; and Stanchev, B.** (1987) DNA repair precedes replicative synthesis during early germination in maize. *Plant Molecular Biology*, 10(2):139-144.
- Zrenner, R; Stitt, M; Sonnewald, U; and Boldt, R.** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57:805-36.

X. ANEXOS

Tabla 6. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de zeocina.

Muestras de zeocina	Concentración (ng/μL)
Control 3h	1038.0
10 μM	740.0
20 μM	1176.0
Control 6h	584.0
10 μM	417.7
20 μM	852.3
Control 12h	282.4
10 μM	1176.1
20 μM	886.4
Control 24h	2067.0
10 μM	587.7
20 μM	1829.5
Control 48h	530.7
10 μM	290.8
20 μM	282.3

Tabla 7. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de hidroxurea.

Muestras de hidroxurea	Concentración (ng/μL)
Control 3h	292.0
0.25 mM	1716.4
0.50 mM	2021.1
Control 6h	1269.0
0.25 mM	435.8
0.50 mM	1091.7
Control 12h	1249.9
0.25 mM	886.1
0.50 mM	1489.4
Control 24h	1741.8
0.25 mM	639.1
0.50 mM	880.0
Control 48h	959.1
0.25 mM	922.2
0.50 mM	1171.8

Tabla 8. Concentración de RNA para la calibración de las muestras de ciprofloxacino.

Muestras de ciprofloxacino	Concentración (ng/ μ L)
Control 3h	366.5
1.0 μM	296.6
1.5 μM	289.9
Control 6h	1677.3
1.0 μM	2155.7
1.5 μM	274.1
Control 12h	688.0
1.0 μM	510.4
1.5 μM	354.1
Control 24h	2106.7
1.0 μM	2104.8
1.5 μM	1753.0
Control 48h	1093.8
1.0 μM	1537.5
1.5 μM	896.1

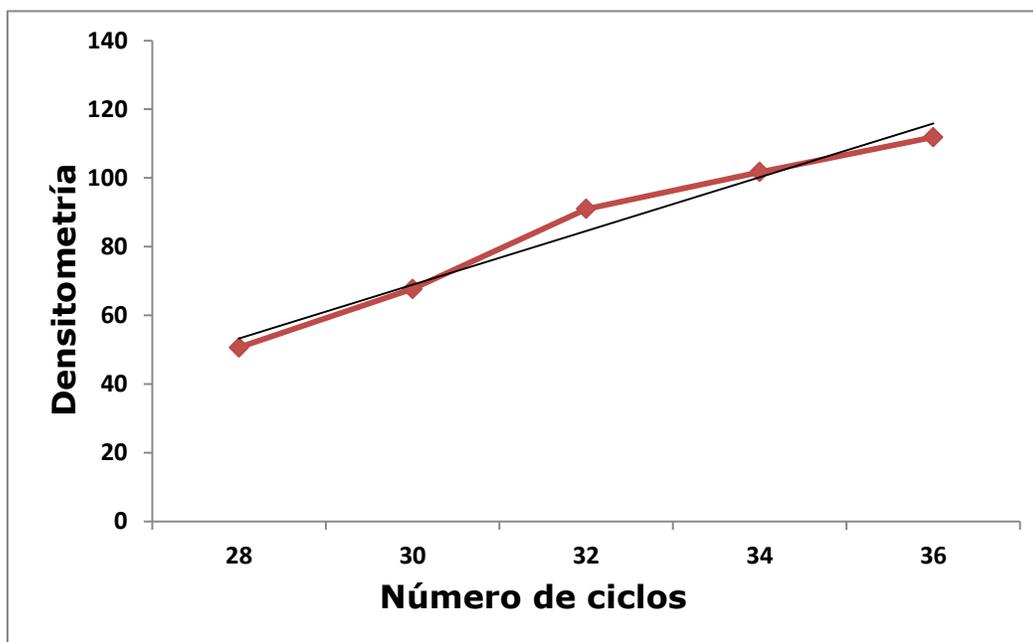


Figura 26. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de *ZmTK1*. La parte lineal se encuentra entre los 34 y 36 ciclos.