



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

**VÍA GLUCOSA-ZmTOR EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO  
CELULAR DURANTE LA GERMINACIÓN EN MAÍZ**

TESIS

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

PRESENTA

**VÍCTOR HUGO DÍAZ GRANADOS**

CDMX

2020





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**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor: LUZ DEL CARMEN CASTELLANOS ROMÁN</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor: AURORA LARA NÚÑEZ</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: JAVIER AXOSCO MARÍN</b>

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

LABORATORIO 114, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Aurora Lara Núñez

### **SUSTENTANTE:**

Víctor Hugo Díaz Granados

## Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química** por darme la oportunidad de formarme académica y profesionalmente, y por permitirme crecer personalmente.

A la **Dra. Aurora Lara Núñez** por invitarme a ser parte de su grupo de investigación, por su apoyo y asesoramiento, y por hacer todo lo posible para proveerme todo lo necesario para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Jorge Vázquez Ramos** y al **Dr. Elpidio García Ramírez** por sus consejos y apoyo.

A la **Dra. Luz del Carmen Castellanos Román** y al **Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre** por el tiempo dedicado a revisar este trabajo y por sus críticas y consejos.

Al **Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo** por el asesoramiento y el apoyo prestados a lo largo de este proyecto.

A los siguientes proyectos de financiamiento por hacer posible los ensayos experimentales de este proyecto:

Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9130

Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP) 5000-9124

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN205219

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA204817

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CB A1-S-9076

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Figuras y tablas</b> .....	3
<b>Resumen</b> .....	5
<b>1. Introducción</b> .....	6
1.1 El maíz.....	6
1.2 La semilla de maíz.....	7
1.3 La germinación.....	10
1.4 El ciclo celular.....	12
1.5 Regulación del ciclo celular.....	14
1.6 TOR.....	16
1.7 Activación de TOR.....	18
1.8 Inhibición de TOR.....	19
1.9 Las vías de señalización de TOR.....	20
1.10 La vía glucosa-TOR durante la germinación.....	23
1.11 Citometría de flujo.....	24
<b>2. Antecedentes</b> .....	26
2.1 Azúcares en la germinación de maíz.....	26
2.2 TOR en maíz.....	26
2.3 Citometría de flujo en el estudio del ciclo celular.....	28
<b>3. Justificación</b> .....	29
<b>4. Hipótesis</b> .....	30
<b>5. Objetivos</b> .....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos particulares.....	30
<b>6. Metodología</b> .....	30
6.1 Material biológico.....	30
6.1.1 Ejes embrionarios de maíz.....	30
6.1.2 Hojas de jitomate.....	31
6.1.3 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	31
6.2 Métodos.....	31
6.2.1 Imbibición de ejes embrionarios de maíz.....	31
6.2.2 Pulso de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU).....	32
6.2.3 Extracción de núcleos celulares.....	32
6.2.4 Microscopía óptica.....	32
6.2.5 Tinción con Alexa-Fluor 488 y 7-AAD.....	32
6.2.6 Análisis por citometría de flujo.....	33
6.2.7 Análisis estadístico.....	33
<b>7. Resultados y discusión</b> .....	33
7.1 Estandarización de la extracción y tinción de núcleos.....	33
7.1.1 Buffer de extracción de núcleos.....	34

7.1.2 Condiciones de filtración y tinción con PI.....	35
7.1.3 Condiciones de fijación y centrifugación.....	36
7.1.4 Condiciones finales de extracción de núcleos de ejes embrionarios.....	37
7.2 Estandarización del análisis por citometría de flujo.....	38
7.3 Análisis del contenido de DNA de células de ejes embrionarios de maíz.....	40
7.4 Estandarización del análisis de síntesis <i>de novo</i> de DNA.....	42
7.4.1 Pulso de 5-etinil-2'-deoxiduridina (EdU).....	42
7.4.2 Cambios en la tinción de DNA.....	43
7.4.3. Validación del análisis citométrico de proliferación celular.....	44
7.5 Efecto de glucosa-ZmTOR en la proliferación de células del RAM..	45
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>49</b>
<b>9. Anexos.....</b>	<b>50</b>
<b>10. Referencias.....</b>	<b>53</b>

## Abreviaturas

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>AF488</b>	Alexa-Fluor 488
<b>AsTORi</b>	Inhibidores del sitio activo de TOR
<b>AZD</b>	AZD8055
<b>CAK</b>	Cinasa activadora de CDK
<b>CDK</b>	Cinasas dependientes de ciclinas
<b>CKS</b>	Subunidad regulatoria de CDK
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>Cyc</b>	Ciclina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E2F</b>	Factor de unión a promotor E2 de adenovirus
<b>Edu</b>	5-Etínil-2'-deoxiuridina
<b>FAT</b>	Dominio FRAP-ATM-TTRAP
<b>FATC</b>	Dominio FAT del carboxilo terminal
<b>FKBP12</b>	Proteína 12 de unión a FK506
<b>FRB</b>	Dominio de unión a FKB-rapamicina
<b>HEAT</b>	Dominio Huntington, EF3, subunidad A de la PP2A y TOR1
<b>ICK</b>	Inhibidores de CDK
<b>IF</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>KRP</b>	Proteína relacionada a KIP
<b>LST8</b>	Proteína pequeña 8 letal con SEC13

<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>RAM</b>	Meristemo apical de la raíz
<b>RBR</b>	Proteína relacionada a Rb
<b>RAPTOR</b>	Proteína asociada reguladora de TOR
<b>RICTOR</b>	Compañero de TOR insensible a rapamicina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPS6</b>	Proteína ribosomal S6
<b>S6K</b>	Cinasa de la proteína ribosomal S6
<b>SAM</b>	Meristemo apical del brote
<b>SnRK</b>	Cinasa relacionada a SNF1
<b>SnRK1<math>\alpha</math></b>	Subunidad catalítica de SnRK1
<b>TOR</b>	Target of Rapamycin
<b>TORC1</b>	TOR Complex I
<b>TORC2</b>	TOR Complex II
<b>uORF</b>	Marco de lectura abierto rio arriba



## Figuras y tablas

**Figura 1.** Clasificación taxonómica del maíz.

**Figura 2.** Árbol filogenético de gramíneas diploides.

**Figura 3.** Anatomía general de la semilla de maíz.

**Figura 4.** Anatomía del eje embrionario de maíz.

**Figura 5.** Curso temporal de toma de agua de la semilla durante la germinación de maíz.

**Figura 6.** Temporalidad del ciclo celular en maíz.

**Figura 7.** Esquema general de las fases del ciclo celular.

**Figura 8.** Representación de los complejos heterodiméricos que regulan el ciclo celular.

**Figura 9.** Complejos de TOR presentes en eucariontes.

**Figura 10.** Estructura tridimensional del complejo TORC1.

**Figura 11.** Estímulos reguladores de TORC1.

**Figura 12.** Vías de señalización de TOR mejor caracterizadas en plantas.

**Figura 13.** Representación gráfica de un análisis por citometría de flujo.

**Figura 14.** Efecto de vía glucosa-ZmTOR en la morfología de ejes embrionarios.

**Figura 15a.** Histograma típico de contenido de DNA.

**Figura 15b.** Gráfica de puntos para el análisis del ciclo celular con EdU.

**Figura 16.** Microscopia óptica de núcleos provenientes de ejes embrionarios de maíz.

**Figura 17a.** Histograma con picos pocos definidos.

**Figura 17b.** Histograma con picos asimétricos.

**Figura 17c.** Histograma con picos simétricos bien definidos.

**Figura 18a.** Pulso de un detector de citómetro de flujo.

**Figura 18b.** Gráfica de puntos para diferenciar *singlets* de *doublets*.

**Figura 19a.** Discriminación de *doublets*.

**Figura 19b.** Región correspondiente a los núcleos.

**Figura 19c.** Región de núcleos con fluorescencia.

**Figura 19d.** Histograma de contenido de DNA de células de ejes embrionarios de maíz.

**Figura 20.** Ecuación para calcular contenido de DNA a partir de estándares.

**Figura 21a.** Histograma de contenido de DNA de PBMC de humanos.

**Figura 21b.** Histograma de contenido de DNA de núcleos de maíz.

**Figura 21c.** Histograma de contenido de DNA de núcleos de maíz y jitomate.

**Figura 22a.** Control sin teñir.

**Figura 22b.** Control con 7-AAD.

**Figura 22c.** Control con EdU/AF488.

**Figura 23.** Gráficas representativas de las repeticiones técnicas de la validación del análisis de síntesis *de novo*.

**Figura 24.** Efecto de la vía glucosa-TOR en la síntesis *de novo* de DNA.

**Figura 25a.** Gráfica representativa del análisis de núcleos en fase S.

**Figura 25b.** Efecto de la vía glucosa-TOR en la progresión de la fase S.

**Tabla 1.** Composición del medio de imbibición de cada tratamiento.

**Tabla 2.** Condiciones idóneas para la extracción de núcleos para análisis por citometría de flujo.

## Resumen

La germinación es un proceso vital que permite el establecimiento de una planta. Comienza con la entrada de agua a una semilla madura, lo que permite el despertar metabólico de sus células, y termina con la primera ronda exitosa de división celular. Una germinación exitosa está estrechamente relacionada con el ciclo celular, que es un proceso molecular cuya progresión es unidireccional y está altamente regulada, y que tiene como finalidad la formación de dos células hijas genéticamente idénticas. Existe una gran variedad de factores que regulan la progresión del ciclo celular a diferentes niveles, y formando parte de algunas de estas redes de regulación se encuentra la cinasa maestra Target of Rapamycin (TOR).

TOR, a través de la fosforilación de una gran variedad de blancos moleculares, interconecta las señales medioambientales con el metabolismo de las células. Se ha demostrado que TOR está conservada en plantas como un único complejo TORC1 y que juega un papel importante en todas sus etapas de desarrollo, desde la germinación hasta la senescencia. También se sabe que, en general, esta cinasa es activada por la presencia de nutrientes y factores de crecimiento, e inhibida por estrés y falta de energía. En este sentido, se ha encontrado evidencia que muestra la importancia de la glucosa como señalizador de la vía TOR. En *Arabidopsis thaliana*, a través del uso de inhibidores específicos de TOR como el AZD8055 (AZD), se ha encontrado que la señalización por glucosa-TOR favorece el crecimiento de las raíces y la expresión de genes implicados en la fase S del ciclo celular, lo que sugiere una alteración en la temporalidad del ciclo celular. Sin embargo, en maíz existen pocos estudios enfocados al efecto de TOR sobre el ciclo celular durante la germinación.

Este proyecto se creó con el objetivo de analizar la influencia de la vía glucosa-TOR en el contenido y la síntesis *de novo* de DNA durante la germinación de maíz, como medida de su efecto en la temporalidad del ciclo celular, y, después de estandarizar las metodologías necesarias para el análisis por citometría de flujo, se encontró que la vía glucosa-TOR promueve que un mayor número de células del meristemo apical de la raíz proliferen, pero no afecta la temporalidad del ciclo celular.

# 1. Introducción

## 1.1 El maíz

El maíz es la especie más importante de México. Desde su domesticación, hace miles de años, proporcionó a los grupos humanos cantidades de alimento aptas para el desarrollo y el establecimiento de las culturas mesoamericanas puesto que del maíz derivaron gran parte de las características económicas, sociales y religiosas de los pueblos que se asentaron en esta región del continente. Hoy en día sigue siendo el principal alimento de los mexicanos y ocupa cerca de la mitad de la superficie cultivada del país (Vela, 2019).

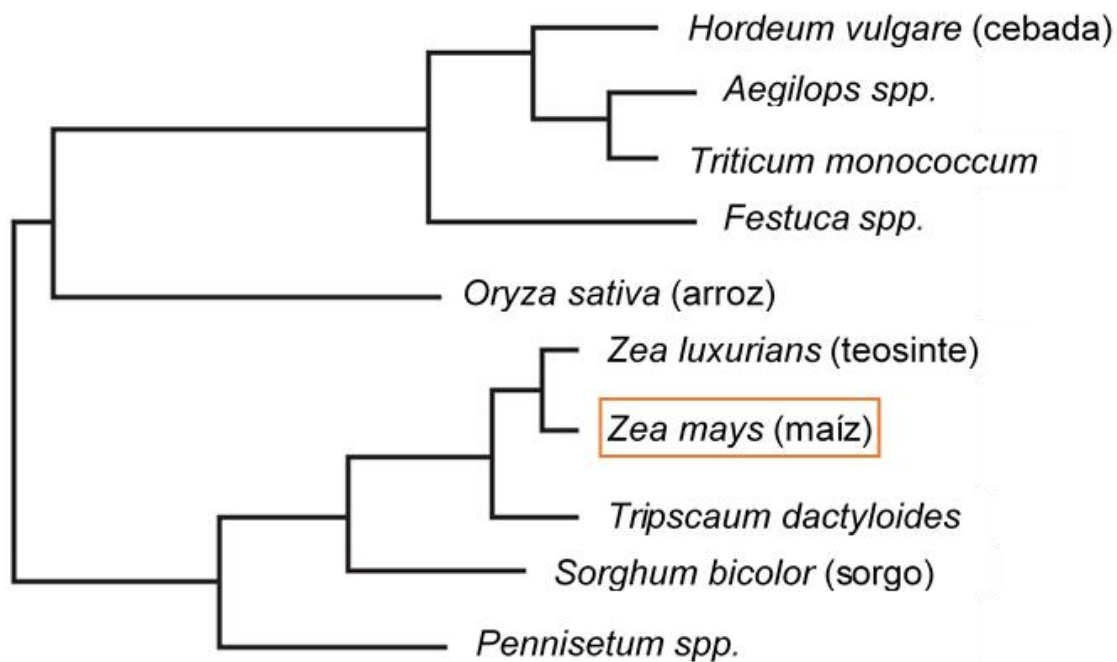
Reino – *Plantae* – Plantas  
Subreino – *Tracheobionta* – Plantas vasculares  
Superdivisión – *Spermatophyta* – Plantas con semilla  
División – *Magnoliophyta* – Plantas con flores  
Clase – *Liliopsida* – Plantas monocotiledóneas  
Subclase – *Commelinidae*  
Orden – *Cyperales*  
Familia – *Poaceae* – Gramíneas  
Género – *Zea*  
Especie – *Zea mays*

**Figura 1.** Clasificación taxonómica del maíz.

El maíz (*Zea mays*) es una planta anual, monocotiledónea y diploide. Es una gramínea perteneciente a la familia *Poaceae* (Figura 1), cuyo origen se remonta a hace 55-70 millones de años en la región que luego se conocería como Mesoamérica. No existe un ancestro directo del maíz, sin embargo, su pariente más cercano es el teosinte (Figura 2) (Scott & Emery, 2016). Debido a que el maíz sólo se conoce como especie cultivada, mientras el teosinte es una especie silvestre, el consenso general es que el maíz es una forma domesticada del teosinte y que sus

diferencias morfológicas son el resultado de la selección humana a lo largo del proceso de domesticación (Doebley, 2004).

Hoy en día, el maíz es el cultivo más importante del planeta; no sólo es utilizado como fuente de alimento, tanto para humanos como para ganado, sino también es indispensable para la producción de diversos productos industriales tales como plásticos biodegradables, adhesivos y biocombustibles, entre muchas otras cosas (Scott & Emery, 2016). Además, tiene un valor agregado como modelo botánico por excelencia para el estudio de temas tan diversos como la domesticación de plantas, evolución del genoma, fisiología del desarrollo, epigenética, resistencia a plagas, heterosis, genética cuantitativa y genómica comparativa (Strable & Scanlon, 2009).

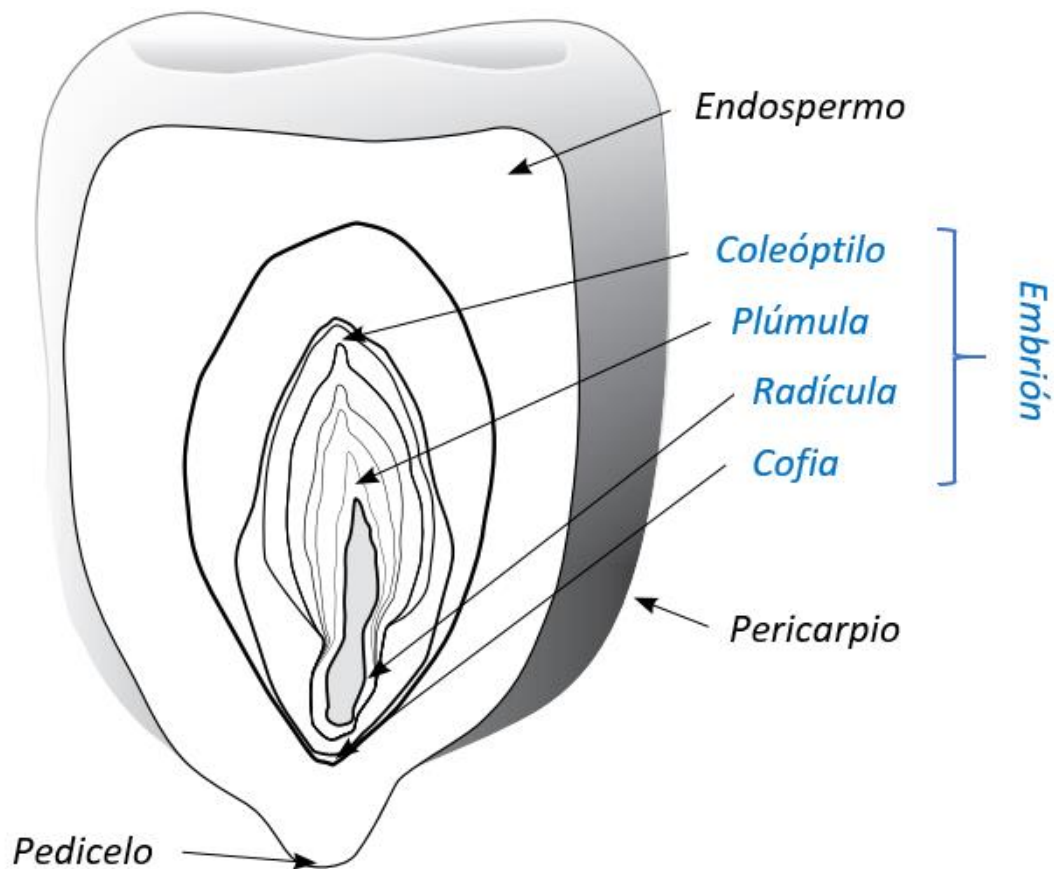


**Figura 2.** Árbol filogenético de gramíneas diploides. Modificado de (Scott & Emery, 2016).

## 1.2 La semilla de maíz

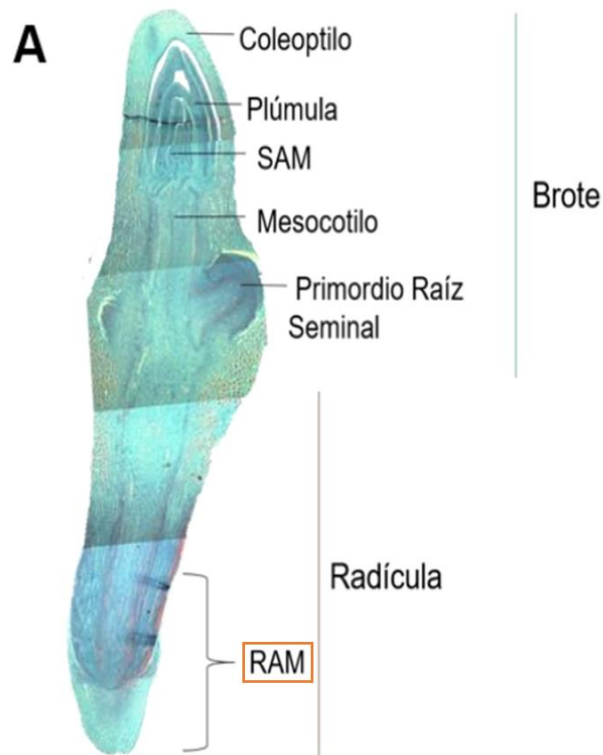
El grano maduro de maíz (cariósido) está formado por tres estructuras principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 3). El pericarpio es la capa más

externa del grano, es rígido y transparente, y contiene al endospermo y al embrión; esta estructura proviene de la pared celular ovárica y por lo tanto es genéticamente idéntica al ancestro materno. Por otro lado, el endospermo y el embrión contienen material genético tanto del ancestro materno como del paterno y representan la siguiente generación. El endospermo contribuye aproximadamente con el 85% del peso del grano, y es la fuente de alimento del embrión durante varios días después de la germinación gracias a que está compuesto principalmente de granos de almidón y cuerpos proteicos (Vincent, 2012). Finalmente, en el embrión se encuentran las células meristemáticas (altamente proliferativas) que darán lugar a las estructuras de la planta adulta.



**Figura 3.** Anatomía general de la semilla de maíz. Modificado de (Belfield & Brown, 2008).

El embrión se organiza en dos tejidos bien definidos: el escutelo y el eje embrionario. El escutelo permite digerir y absorber al endospermo durante el crecimiento del embrión. Por otro lado, el eje embrionario está conformado de manera muy general, por la raíz primaria (radícula) en su extremo basal y por el brote en su extremo apical (Figura 4). En la radícula se encuentra el meristemo apical de la raíz (RAM), que es una zona de división celular que contiene células en constante proliferación que son empujadas continuamente hacia una zona de elongación en la que dejan de dividirse y comienzan a aumentar su tamaño rápidamente (Bizet *et al.*, 2015). Las células presentes en el RAM darán lugar a la raíz principal y son de suma importancia en el estudio del ciclo celular durante la germinación porque son las primeras células que comienzan a dividirse.



**Figura 4.** Anatomía del eje embrionario de maíz. Modificado de (Romero-Sánchez, 2019).

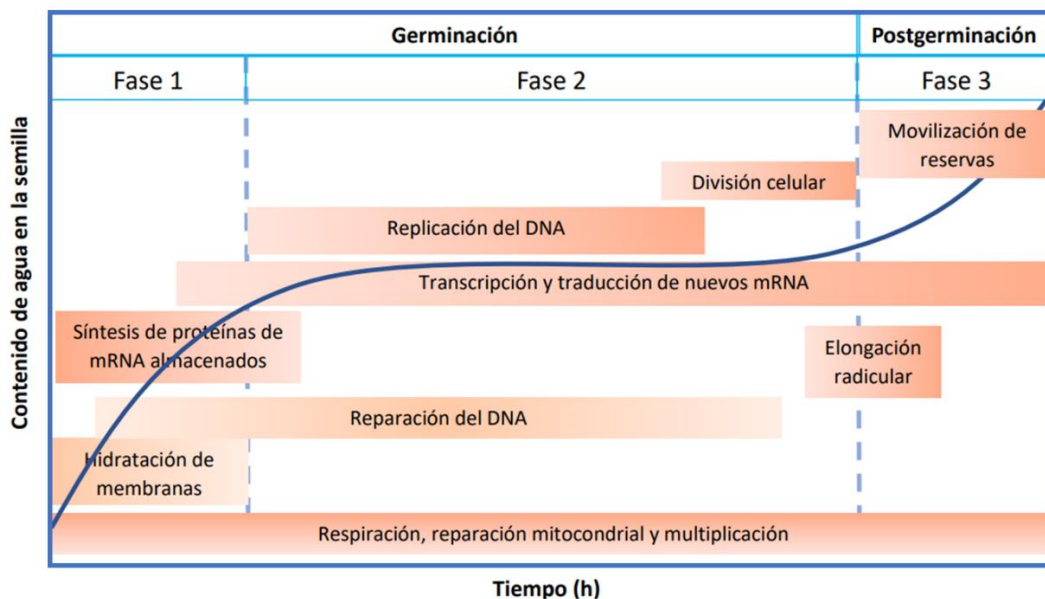
Por otro lado, el brote contiene al coleóptilo, que sirve como cubierta protectora de la plúmula y es lo primero que protruye de la tierra. La plúmula es la parte del brote que se extenderá por encima del coleóptilo y en la cual hay de cuatro a cinco pequeñas hojas. En el brote también está presente el mesocotilo, estructura que crece rápidamente durante la germinación y que permite que el coleóptilo y las hojas que contiene emerjan de la tierra (Vincent, 2012). Por último, en el brote también se encuentran el meristemo apical del brote (SAM), que presenta una población de células embrionarias pluripotenciales que formarán todos los órganos aéreos de la planta (Leiboff *et al.*, 2015), y el meristemo del primordio que dará origen a las raíces seminales.

### 1.3 La germinación

El papel esencial de una semilla es producir descendencia y asegurar la supervivencia de la especie. Es por ello que, a lo largo de la evolución, las plantas han ideado estrategias para asegurarse la germinación exitosa de las semillas (Nonogaki, 2014). Por definición, la germinación de una semilla comienza con la toma de agua y termina con la protrusión del embrión a través de las estructuras que lo rodean (Nonogaki *et al.*, 2010). Desde un punto de vista molecular, adoptado en el grupo de trabajo, la germinación involucra el despertar metabólico de la semilla y la reanudación de sus procesos de desarrollo, culmina cuando las células en este estado metabólicamente activo terminan exitosamente la primera ronda de división celular (Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003).

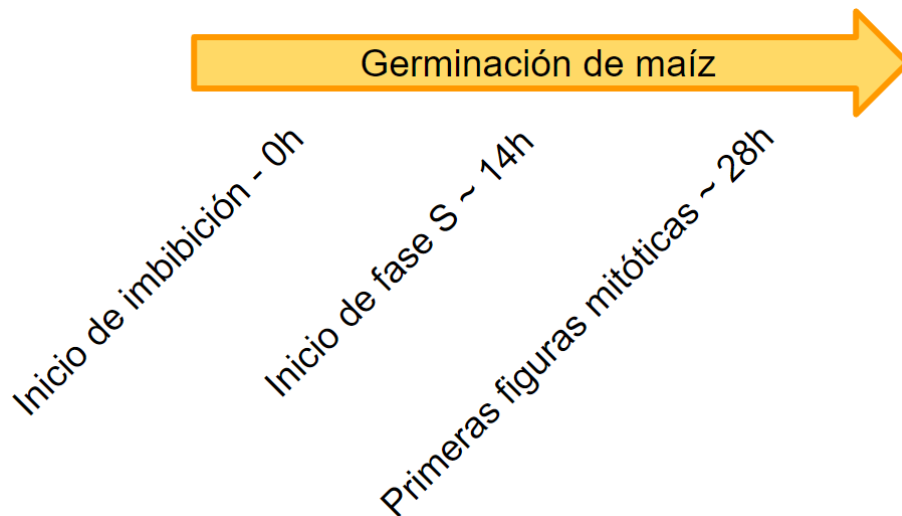
Durante la germinación la semilla debe recuperarse rápidamente de la desecación sufrida en el proceso de maduración de la semilla, reestablecer su metabolismo, completar eventos celulares esenciales para permitir la protrusión del embrión y prepararse para el subsecuente crecimiento de la plántula. Un esquema muy útil para representar estos procesos es el curso temporal de toma de agua de la semilla (Figura 5) (Nonogaki *et al.*, 2010).





**Figura 5.** Curso temporal de toma de agua de la semilla durante la germinación. Modificado de (Nonogaki *et al.*, 2010).

En una primera fase, se presenta una rápida toma de agua que permite la hidratación de las membranas celulares y el inicio de la reparación de diversos componentes celulares y del DNA dañados por el estrés producido durante el proceso de desecación de la semilla. Además, en esta primera etapa también se degradan o traducen RNA mensajeros (mRNA) almacenados en la semilla seca. La siguiente fase se caracteriza por una toma de agua limitada que provoca que el contenido de agua se mantenga constante. Durante esta etapa los procesos de reparación iniciados en la primera fase continuarán, y comenzará la transcripción y traducción de mRNA *de novo*. Es en esta fase cuando comienza y termina la replicación del DNA, lo que permite la división celular hacia el final de la etapa, marcando el fin de la germinación. La tercera fase se considera post-germinativa y en ella se presenta otra rápida toma de agua. En esta última etapa se movilizan las reservas de carbohidratos desde los tejidos de almacenamiento hacia el eje embrionario y comienza la elongación de la radícula (Nonogaki *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Temporalidad del ciclo celular en maíz.

En el caso particular del maíz, se ha observado que las células entran en la fase S aproximadamente 14 h después del inicio de la imbibición y que las primeras figuras mitóticas se pueden observar a partir de las primeras 28 h (Figura 6) (Baíza *et al.*, 1989).

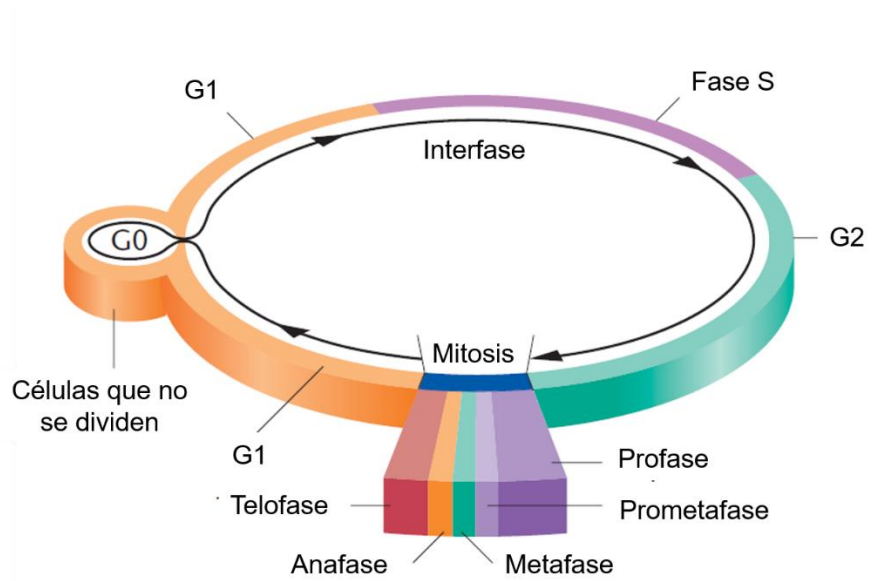
#### 1.4 El ciclo celular

Un proceso estrechamente relacionado con la proliferación celular y el crecimiento de cualquier ser vivo, es el ciclo celular, por lo cual su estudio en la germinación de las plantas es de vital importancia.

El ciclo celular es una serie de eventos moleculares unidireccionales, altamente regulados, cuyo propósito es la formación de dos células hijas con genomas idénticos.

Los procesos implicados en el ciclo celular se dividen en dos etapas: la interfase, conformada a su vez por las fases G1, G2 y S, y la mitosis, dividida en profase, metafase, anafase y telofase (Figura 7). En la fase G1 (Gap1) la célula percibe las condiciones nutricionales y medioambientales en las que se encuentra, crece hasta un tamaño apropiado para la división celular y decide si es capaz de llevar a cabo la ronda de división celular. Si las condiciones son adecuadas, la célula prosigue a la fase S, en la que ocurre la duplicación de su genoma. En la fase G2 (Gap2) se

verifica que la duplicación del material genético se haya realizado completamente y sin errores, y es en este punto cuando la célula se prepara para la división celular (Garza-Aguilar *et al.*, 2014; Vázquez-Ramos & Sánchez, 2003). La mitosis comienza con la profase, etapa en la que se condensa la cromatina para formar los cromosomas (unión de dos cromátidas hermanas), y ocurre tanto la ruptura de la envoltura celular como el inicio del ensamblaje del huso mitótico. Durante la metafase los cromosomas migran y se alinean en el plano ecuatorial de la célula guiados por el huso mitótico. En la anafase, una vez alineados correctamente los cromosomas, las cromátidas hermanas se separan y migran hacia polos opuestos. Finalmente, durante la telofase una nueva envoltura nuclear se forma alrededor de cada conjunto de cromosomas, los cuales a su vez se descondensan. La formación de las dos células hijas se completa gracias a la citocinesis, proceso por el cual se divide el citoplasma formando dos células, cada una con un núcleo con material genético idéntico (Garza-Aguilar *et al.*, 2014; Klug *et al.*, 2012).



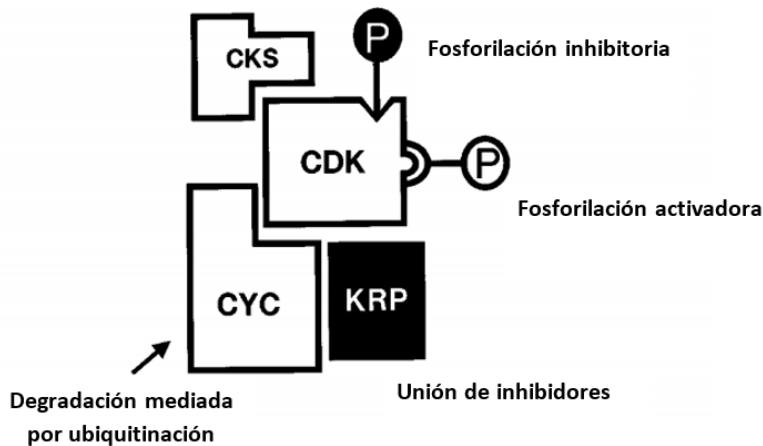
**Figura 7.** Esquema general de las fases del ciclo celular (Klug *et al.*, 2012).

## 1.5 Regulación del ciclo celular

Debido a que las plantas forman sus tejidos apilando células como bloques de construcción, se requiere un control espacio-temporal altamente optimizado de la división y la expansión celular para llevar a cabo de manera correcta la morfogénesis y diferenciación de cada órgano.

En los eucariontes, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) son los reguladores centrales del ciclo celular. La progresión unidireccional del ciclo celular es establecida por la actividad periódica de las CDK, que es mayor generalmente en las transiciones G1/S y G2/M, y que está directamente asociada con la fosforilación de una gran variedad de proteínas, lo que finalmente promueve el inicio de la replicación del DNA y de la mitosis, respectivamente. En este sentido, la modificación de la actividad de las CDK, a través de control transcripcional, interacciones proteína-proteína, modificaciones postraduccionales o degradación proteica, es el punto central de la regulación del ciclo celular. En plantas se han identificado ocho tipos de CDK (CDKA a CDKG y CDK-like cinasas), pero sólo CDKA y CDKB regulan directamente el ciclo celular (Inagaki & Umeda, 2011).

La actividad de estas CDKs está regulada especialmente por su interacción con ciclinas (Cyc) y otras proteínas que pueden funcionar como inhibidores o activadores (Figura 8). Las ciclinas, que se expresan específicamente en determinadas fases del ciclo celular, activan a las CDK interactuando directamente con ellas, y se ha establecido que la progresión a través del ciclo está controlada por la formación de diferentes complejos Cyc/CDK. Mientras que los complejos de las CDKA se encuentran presentes durante la fase S y las transiciones G1/S y G2/M, los complejos de las CDKB funcionan principalmente en G2/M. En el caso de las ciclinas, las ciclinas D (CycD) controlan G1/S, las CycA la fase S y G2/M, y las CycB controlan G2/M y las transiciones en las fases de la mitosis (Dante *et al.*, 2014). Además de las ciclinas, otro tipo de proteínas conocidas como subunidad reguladora de CDK (CKS) regulan la actividad de las CDK al favorecer la interacción entre los complejos de CDK y sus distintos sustratos.



**Figura 8.** Representación de los complejos heterodiméricos que regulan el ciclo celular. Modificado de (Dewitte & Murray, 2003).

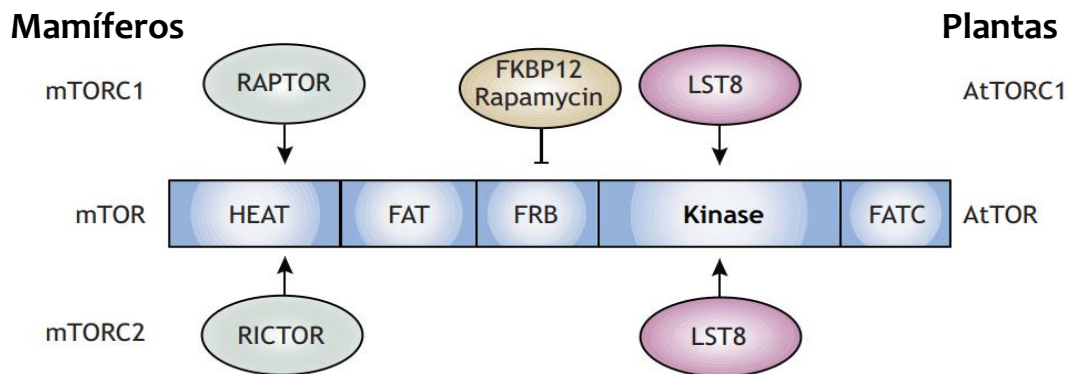
En contraste a las ciclinas, los inhibidores de CDK (ICK) regulan negativamente la actividad de las CDKs al unirse directamente con ellas o con las ciclinas e impedir su interacción (Inagaki & Umeda, 2011). Debido a su limitada homología con la familia Kip/Cip de inhibidores de CDK de mamíferos, en plantas reciben el nombre de proteínas relacionadas a Kip (KRP). La función inhibitoria de las KRP está íntimamente relacionada con el retraso en la progresión del ciclo celular y con procesos de endorreduplicación, en los cuales la célula duplica su material genético, pero no lleva a cabo la división celular.

Finalmente, la actividad de las CDKs también puede ser regulada a través de fosforilaciones activadoras e inhibitorias. Las cinasas activadoras de CDK (CAK) fosforilan un residuo de treonina presente en el bucle-T (*T-loop*) de las CDK, este bucle es una región conservada en las CDKs que restringe el acceso del sustrato y el ATP a su sitio catalítico, y requiere de la fosforilación de la treonina-160 para cambiar su conformación y permitir que la cinasa fosforile a sus blancos moleculares. En plantas se han identificado dos tipos de CAK: CDKD y CDKF. Por el contrario, la cinasa WEE1 inhibe la actividad de las CDK al fosforilar los residuos de treonina-14 y tirosina-15 presentes en el amino terminal de las CDKs. En levaduras y mamíferos la fosfatasa CDC25 es la responsable de eliminar estas fosforilaciones inhibitorias y por lo tanto activar a las CDK. Sin embargo, en plantas

no se ha encontrado un homólogo directo de esta proteína, aunque no se descarta la presencia de un equivalente funcional (Dewitte & Murray, 2003).

## 1.6 TOR

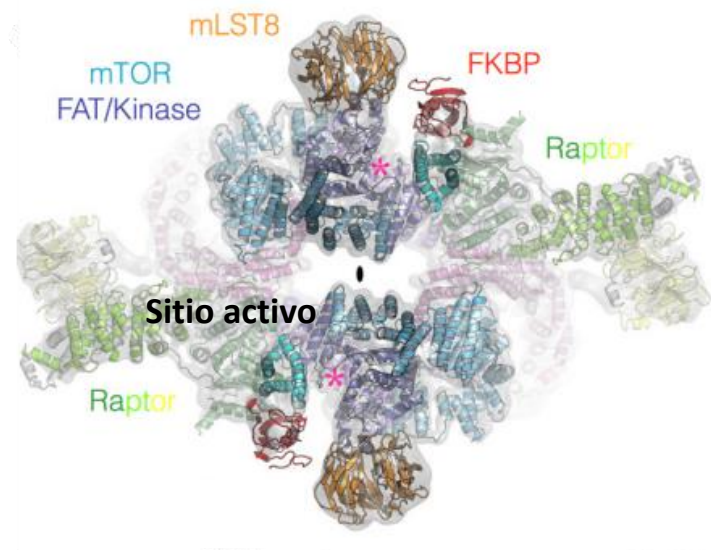
La regulación del ciclo celular no se restringe únicamente a la modulación de la actividad de los complejos Cyc/CDK. La supervivencia de todo ser vivo requiere de un balance bien coordinado entre la proliferación/crecimiento celular y la disponibilidad de energía y nutrientes. Nueva evidencia apunta a que las redes de señalización, encargadas de responder a los estímulos externos a los que están expuestos los organismos, se interconectan estrechamente con las redes metabólicas, y que juntas juegan un papel primordial en los programas de desarrollo y respuesta a cambios ambientales y de estrés. En el centro de estas redes se ha encontrado una cinasa maestra conocida como *Target of Rapamycin* (TOR), presente en todos los eucariontes, desde levaduras y algas unicelulares, hasta plantas y animales.



**Figura 9.** Complejos de TOR presentes en eucariontes. Modificado de (Shi *et al.*, 2018).

TOR es una serina/treonina cinasa altamente conservada que presenta cinco dominios: repeticiones en tándem HEAT (Huntington, EF3, subunidad A de la PP2A y TOR1), FAT (FRAP-ATM-TTRAP), FRB (unión a FKB-rapamicina), dominio cinasa y FATC (FAT del carboxilo terminal) (Shi *et al.*, 2018). En la mayoría de los eucariontes, TOR forma dos complejos proteicos que son estructural y funcionalmente distintos: TOR Complex I (TORC1) y TOR Complex II (TORC2), los cuales difieren en las proteínas regulatorias que se les asocian (Figura 9).

TORC1 se compone principalmente de TOR, RAPTOR (proteína asociada reguladora de TOR) y LST8 (proteína pequeña 8 letal con SEC13). Mientras que TORC2 tiene como componentes a TOR, RICTOR (compañero de TOR insensible a rapamicina) y LST8. Debido a que RAPTOR y LST8 se encuentran conservados en todas las especies de eucariontes, pero RICTOR está ausente en plantas, se sugiere que TORC1 está presente en plantas, pero no TORC2 (Leene *et al.*, 2019).



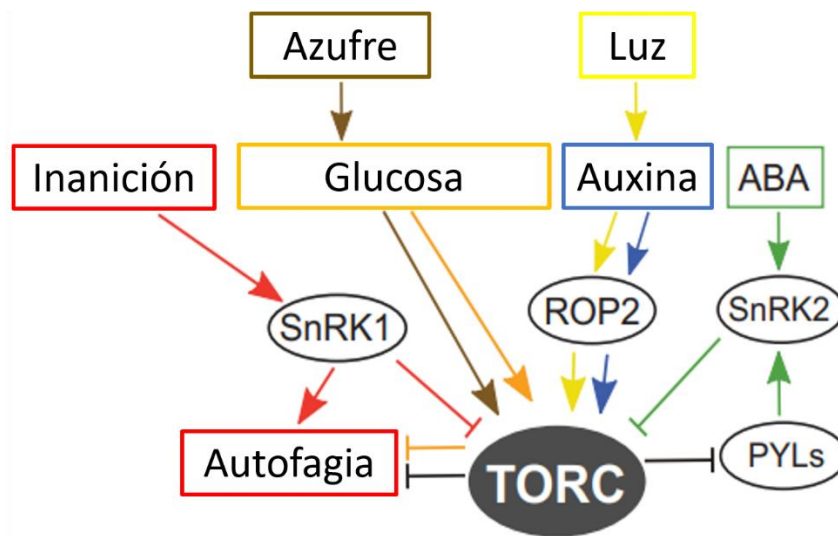
**Figura 10.** Estructura tridimensional del complejo TORC1. El sitio activo se indica con un asterisco rosa. Modificado de (Aylett *et al.*, 2015).

En años recientes, a través de microscopía crioelectrónica de alta resolución, se ha resuelto la estructura tridimensional del complejo TORC1 de mamíferos (mTORC1), sugiriendo que dos mTORC1 se dimerizan para formar una estructura de aproximadamente 1000 KDa en forma de rombo, con los dominios de cinasa al centro de la estructura y RAPTOR y LST8 formando los ejes largo y corto del rombo, respectivamente (Figura 10). Los resultados también sugieren que RAPTOR es el principal responsable de la estabilidad del dímero (Aylett *et al.*, 2015). Estudios hechos en levadura demostraron que TORC2, por su parte, también forma un dímero con forma de rombo y que RICTOR es fundamental para la estabilidad del complejo (Gaubitz *et al.*, 2016). En plantas, a pesar de que no se ha resuelto la estructura de TORC1, se ha demostrado que los dominios de TOR de arroz

(OsTOR) y las subunidades de OsTORC1 son capaces de complementar mutantes de levaduras, y esta evidencia hace suponer que la estructura de TORC1 en plantas es similar a las de los complejos presentes en mamíferos y levaduras (Maegawa *et al.*, 2015).

### 1.7 Activación de TOR

En general, TORC1 es activado por nutrientes y factores de crecimiento, pero inactivado por carencia de energía, inanición y estrés. En plantas, la glucosa, la luz y las fitohormonas juegan un papel esencial en la activación de TORC1 (Figura 11).



**Figura 11.** Estímulos reguladores de TORC1. Modificado de (Caldana *et al.*, 2019).

Aún no se ha podido elucidar el mecanismo por el cual la glucosa promueve la actividad de TORC1, pero se ha sugerido que este carbohidrato podría promover la dimerización de TORC1, proceso que en mamíferos es necesario para su traslocación y activación en la membrana de los endosomas, a través del complejo Tel2-Tti1-Tti2(TTT)-RUVBL1/2 que es sensible a glucosa y energía; a pesar de que en plantas no se ha encontrado evidencia de que exista dicho complejo, el genoma de *Arabidopsis* contiene genes que codifican para ortólogos putativos de Tel2, Tti1, Tti2 y RUBVL que podrían formar un complejo (TTT)-RUVBL1/2 encargado de la dimerización y activación de TORC1. La glucosa también puede activar a TOR de manera indirecta mediante la inactivación de la cinasa sensora de glucosa y energía



denominada cinasa 1 relacionada a SNF1 (SnRK1), complejo heterodimérico altamente conservado en plantas, que reprime a TOR en condiciones de estrés e inanición y cuya actividad es inhibida en presencia de glucosa (Shi *et al.*, 2018).

La glucosa es capaz de activar a TOR por sí sola en células del RAM, pero requiere de la presencia de luz para activarlo en las células del SAM. La evidencia actual sugiere que la luz activa a TOR mediante la estimulación de la biosíntesis de fitohormonas conocidas como auxinas. En conjunto, la luz y las auxinas activan a la GTPasa denominada proteína 2 relacionada a Rho (ROP2) (Li *et al.*, 2017), una vez activada, ROP2 interacciona directamente con TOR, formando un complejo que promueve tanto la fosforilación de TOR en la serina-2448, como su asociación a endosomas, lo que resulta en su activación (Schepetilnikov *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudios recientes apuntan a que otros nutrientes tales como los aminoácidos, el nitrógeno, los fosfatos y el azufre tienen un papel importante en la activación de TOR (Shi *et al.*, 2018).

### 1.8 Inhibición de TOR

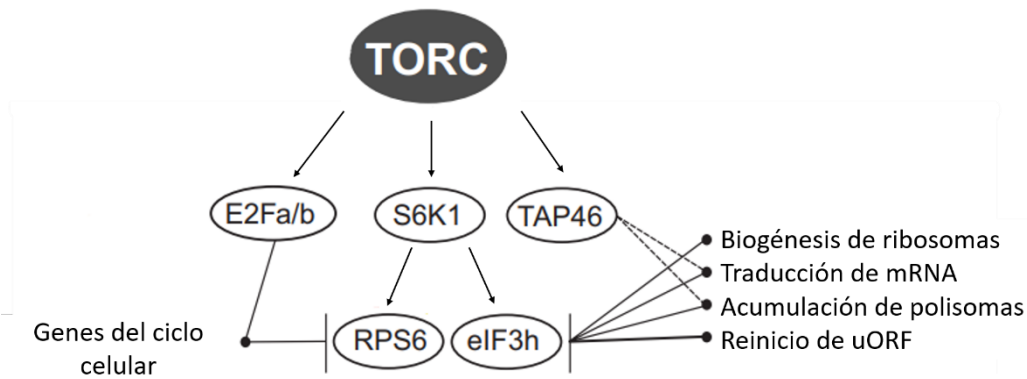
TOR le debe su nombre a la rapamicina, metabolito antifúngico aislado por primera vez de la actinobacteria *Streptomyces hygroscopicus* presente en una muestra de suelo de la Isla de Pascua (Li *et al.*, 2014). En animales y levaduras, la rapamicina puede inhibir específicamente a TORC1, pero no a TORC2 y su efecto inhibitorio se debe a la formación de un complejo proteico específico en el que la rapamicina forma uniones no covalentes, entre la propil-isomerasa conocida como proteína 12 de unión a FK506 (FKBP12) y el dominio FRB de TOR. Se cree que esta unión provoca la disociación de RAPTOR del complejo TORC1 o que puede bloquear la interacción con algunos de sus sustratos. En contraste, las plantas terrestres han demostrado ser insensibles a la rapamicina a concentraciones efectivas en mamíferos y levaduras. Estudios de doble híbrido en levadura han probado que FKBP12 de *Arabidopsis* es incapaz de formar un complejo con rapamicina y TOR; sin embargo, TOR de *Arabidopsis* (AtTOR) puede formar el complejo con la rapamicina en presencia de FKBP12 de humanos, lo que sugiere que en *Arabidopsis*,

y en las plantas en general, FKBP12 ha sufrido cambios a lo largo de la evolución para prevenir la formación del complejo inhibitor de la rapamicina (Xiong & Sheen, 2012). A pesar de que en los últimos años se ha demostrado que la rapamicina puede inhibir la actividad de AtTOR cuando se agrega en altas concentraciones a medios líquidos de protoplastos o plántulas (Xiong & Sheen, 2014), para el estudio de la vía de señalización de TOR en plantas, se han desarrollado inhibidores sintéticos conocidos como inhibidores del sitio activo de TOR (asTORi) con resultados satisfactorios. Las estructuras químicas de los asTORi son variadas, pero todos son capaces de unirse directamente al dominio cinasa de TOR, compitiendo con el ATP. Algunos ejemplos de asTORi utilizados en la actualidad son TORIN1, KU63794 y AZD8055, siendo este último el inhibidor más eficaz (Xiong *et al.*, 2016).

De manera fisiológica, TORC1 es inhibido por estímulos de falta de energía o de estrés. Las principales responsables de este efecto son las SnRK1/2, complejos proteicos ortólogos de las AMPK de mamíferos, que se comportan como las reguladoras maestras del metabolismo en condiciones de carencia de energía. Estudios en *Arabidopsis* reportaron que la subunidad catalítica de SnRK1 (SnRK1 $\alpha$ ) inactiva a TORC1 interaccionando y fosforilando a RAPTOR, lo que provoca su disociación del complejo (Nukarinen *et al.*, 2016). Por su parte, SnRK2 también es capaz de fosforilar a RAPTOR por una vía dependiente de la fitohormona de estrés llamada ácido abscísico (ABA), la cual activa a SnRK2 en condiciones de estrés (Shi *et al.*, 2018).

### 1.9 Las vías de señalización de TOR

TOR participa en diversos procesos celulares, tales como la biogénesis de ribosomas, la traducción de mRNA, la acumulación de polisomas y la modulación del ciclo celular y de la autofagia (Figura 12) (Caldana *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Vías de señalización de TOR mejor caracterizadas en plantas. Modificado de (Caldana *et al.*, 2019).

Una de las funciones más estudiadas de TOR es su control de la síntesis de proteínas, el cual lleva a cabo principalmente a través de la fosforilación de la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), proteína esencial en la regulación de la traducción. TORC1 fosforila y activa a S6K, que una vez activada, fosforila a la proteína ribosomal S6 (RPS6), componente de la subunidad ribosomal 40S. Aunque aún no se sabe con exactitud el mecanismo exacto por el que la vía TORC1-S6K-RPS6 regula la traducción proteica, algunos estudios indican que la fosforilación de RPS6 aumenta su afinidad por determinados mRNA, lo que podría sugerir un aumento en la eficiencia de la traducción (Chen *et al.*, 2018). TOR también fosforila y regula la abundancia proteica de la subunidad regulatoria de la fosfatasa PP2A denominada TAP46. Se ha determinado que la disrupción de la expresión de esta subunidad provoca defectos globales en la traducción y una disminución de la acumulación de polisomas, pero aún no se sabe si este efecto tiene alguna relación con S6K.

Adicionalmente, TOR participa en la traducción selectiva de mRNA específicos que contienen marcos de lectura en su región 5'-UTR, mejor conocidos como marcos de lectura río arriba (uORF). Los uORF están presentes en más del 30% de los mRNA de eucariontes y se ha observado que reprimen su traducción. En *Arabidopsis*, el reinicio de la traducción después de la represión por un uORF depende de la fosforilación de la subunidad h del factor 3 de inicio de la traducción de eucariontes (eIF3h), blanco molecular putativo de S6K. Se sabe que TOR, en respuesta al

estímulo por auxinas, fosforila a S6K y esto promueve la fosforilación de eIF3h y el reinicio de la traducción de mRNA de factores de respuesta a auxinas que presentan uORF (Shi *et al.*, 2018). Se cree que mediante el control traduccional de factores de transcripción involucrados en reprogramación metabólica y crecimiento, TOR podría regular las redes metabólicas dependiendo del estímulo que lo active (Caldana *et al.*, 2019).

En lo que respecta al ciclo celular, estudios en *Arabidopsis* han demostrado que la activación de TOR, previa estimulación por glucosa (vía glucosa-TOR), promueve la expresión de genes relacionados con la fase S del ciclo celular bajo el control de los factores de transcripción conocidos como factores de unión a promotor E2 de adenovirus (E2F) (Xiong *et al.*, 2013). Un proceso importante en la transición G1/S es la inactivación del represor denominado proteína relacionada a Rb (RBR). Esta inactivación ocurre a través de la fosforilación de múltiples residuos de RBR por los complejos CycD/CDKA, lo que resulta en la liberación de factores E2F unidos a RBR y permite la transcripción de genes requeridos para la replicación del DNA (Ahmad *et al.*, 2019). Se ha encontrado que TOR fosforila directamente a E2F y que la vía glucosa-TOR promueve una reprogramación del transcriptoma de los meristemos, siendo hasta el 95% de los genes regulados a la alta genes blanco de E2F. Esto sugiere que la fosforilación de E2F por TOR podría ser clave para la activación, estimulada por glucosa, de genes de la fase S, en una vía independiente de la vía convencional Cyc/CDK/RBR (Xiong *et al.*, 2013).

La vía TOR también regula otros procesos anabólicos a través de la modificación postraduccional de enzimas involucradas en vías metabólicas relacionadas con crecimiento biosintético, siendo el metabolismo de lípidos el caso más estudiado.

Finalmente, TOR regula procesos de autofagia y de crecimiento a través de su interacción con las SnRK, cinasas involucradas en la regulación metabólica en condiciones de estrés. La autofagia, proceso de degradación y reciclaje de componentes celulares, es regulada negativamente por TOR, pero en respuesta a estímulos de inanición y estrés osmótico es activada gracias a la represión de TOR mediada por SnRK1. De manera similar, cuando no hay señales de estrés, TOR

promueve el crecimiento inhibiendo la vía de señalización de ABA, fitohormona involucrada en la respuesta a estrés abiótico. Mediante la fosforilación e inactivación de los receptores de esta fitohormona, TOR inhibe la activación de SnRK2 regulada positivamente por ABA. Por el contrario, en condiciones de estrés, ABA estimula la activación de SnRK2, la cual a su vez fosforila a RAPTOR, provocando la desestabilización de TORC1 y la inhibición del crecimiento (Caldana *et al.*, 2019).

En resumen, la vía TOR regula positivamente los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas en respuesta a estímulos favorables tales como luz y presencia de glucosa o factores de crecimiento, pero es inhibida por estímulos desfavorables tales como la falta de energía y distintos tipos de estrés.

### 1.10 La vía glucosa-TOR durante la germinación

Los azúcares sirven como indicadores clave del estado energético de las plantas. Debido a que los procesos de desarrollo y crecimiento demandan una gran cantidad de energía, la habilidad de percibir niveles de azúcar es esencial para la supervivencia de las plantas. En años recientes se le ha encontrado a los azúcares un papel como moléculas señalizadoras que va más allá de su función como fuente de carbono y energía. Los niveles de azúcares afectan la actividad de reguladores tales como las SnRK, las hexocinasas o TOR y provocan cambios en el transcriptoma y el proteoma que llevan a la estimulación o represión, dependiendo del azúcar en cuestión y de sus niveles, de procesos como la proliferación y la diferenciación celular (Lastdrager *et al.*, 2014).

En años recientes, se han llevado a cabo estudios exhaustivos que demuestran el papel esencial de TOR en el desarrollo de las plantas, desde la embriogénesis y la activación de los meristemas, hasta la elongación de pelos radiculares, el crecimiento de hojas, la floración y la senescencia.

Gracias al análisis del tamaño de los meristemas, la entrada de las células a la fase S y los cambios en el transcriptoma, se ha demostrado que la vía glucosa-TOR activa un gran grupo de genes involucrados en el ciclo celular y en múltiples rutas anabólicas, mientras que reprime grupos de genes involucrados en rutas

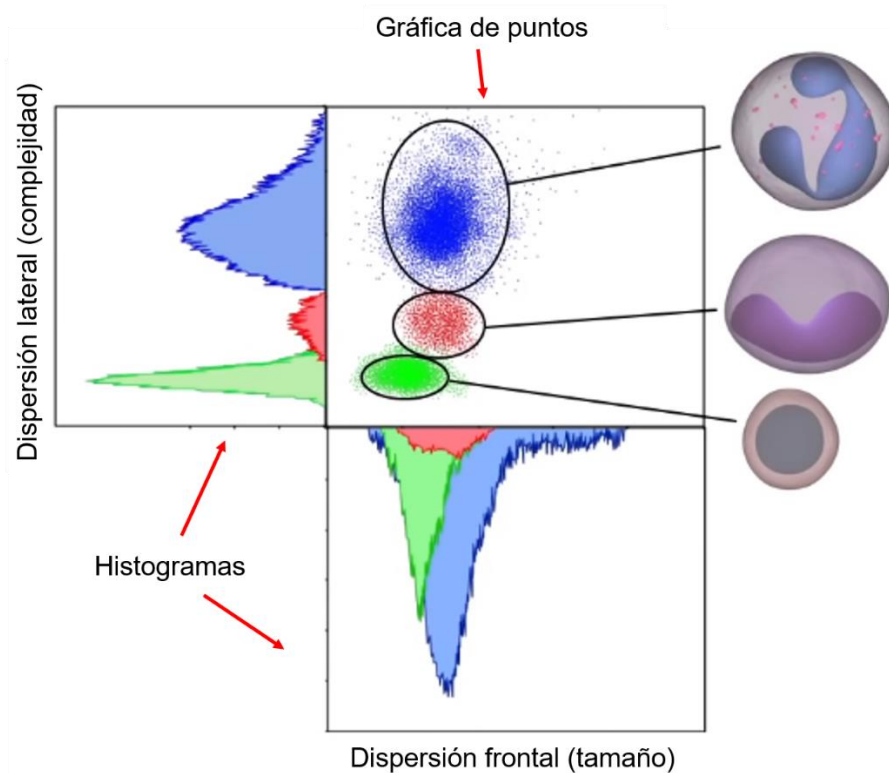
catabólicas. Esta reprogramación transcripcional permite la transición del desarrollo heterotrófico al autotrófico y promueve un rápido crecimiento de la raíz. En conjunto con otras señales como luz y auxinas, la vía glucosa-TOR promueve la activación de los meristemos y del primordio de la hoja, permitiendo así los primeros procesos en el establecimiento de una planta adulta (Shi *et al.*, 2018). Sin embargo, existen pocos estudios centrados en elucidar el papel de TOR durante la germinación y todavía menos estudios cuyo modelo de estudio sea el maíz.

### 1.11 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica capaz de medir las propiedades ópticas y de fluorescencia de una célula individual (o cualquier otra partícula como microorganismos, núcleos y preparaciones cromosómicas) que esté suspendida en una solución salina y pase a través de una fuente de luz. La citometría de flujo permite analizar y diferenciar las células de acuerdo con su tamaño, complejidad y fluorescencia, la cual comúnmente deriva de tinciones o anticuerpos marcados. El fundamento de la citometría yace en la dispersión de la luz o la emisión de fluorescencia que produce una célula cuando pasa enfrente de un láser con determinada longitud de onda y, de esta manera, los detectores de un citómetro pueden obtener información bioquímica, biofísica y molecular de las partículas que analizan. En este sentido, la dispersión de la luz está directamente relacionada con la morfología de la célula y la hay de dos tipos: dispersión frontal y dispersión lateral. La dispersión frontal es directamente proporcional al tamaño de la célula y la dispersión lateral a su complejidad interna (también conocida como granularidad). Es así como con estos dos parámetros un citómetro puede separar diferentes poblaciones celulares dentro de una muestra de acuerdo con sus características morfológicas (Figura 13). Por otro lado, una célula puede ser marcada con fluorocromos que se unen específicamente a determinados componentes de la célula o con anticuerpos fusionados a fluorocromos. Cuando estas células marcadas pasan a través del láser, los fluorocromos se excitan y emiten una señal captada por los detectores del citómetro, y esta señal brinda información dependiendo de qué se haya marcado en la célula, ya sea dentro de ella o en su membrana.

La información que obtiene un citómetro la representan de dos formas principales, si sólo se está analizando una característica de la célula, el resultado se muestra como un histograma en la que se gráfica el número de eventos contra el parámetro estudiado, mientras que, si se estudian más de dos características, el resultado se representa como una gráfica de puntos en la que en cada eje se grafica el valor de cada parámetro (Figura 13).

La citometría de flujo permite analizar desde células completas hasta determinados organelos, cromosomas y contenido de DNA, RNA y proteínas, además de ser útil en el estudio de procesos como el ciclo celular, la proliferación celular, el potencial de membrana y una larga lista de otros fenómenos (Adan *et al.*, 2017).



**Figura 13.** Representación gráfica de un análisis por citometría de flujo. Modificado de (Brauneis, 2015).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Azúcares en la germinación de maíz

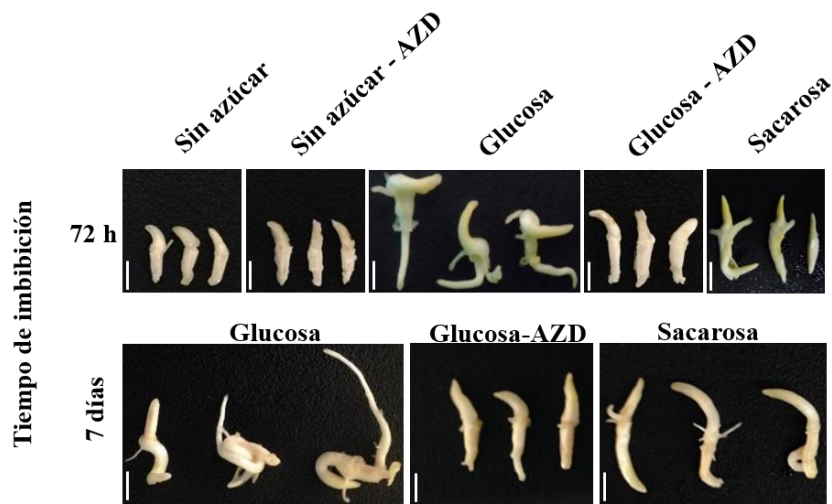
Estudios realizados en el grupo de trabajo han demostrado que la presencia de azúcares tiene diferentes efectos en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Los azúcares afectan la morfología de los ejes embrionarios y el tamaño de sus células del RAM, y los resultados sugieren que el efecto es diferencial dependiendo del azúcar, así, mientras la glucosa promueve proliferación, la sacarosa promueve diferenciación. También se encontró que los azúcares son capaces de modificar tanto la expresión como la abundancia proteica de diversos marcadores del ciclo celular, aunque algunos parecieran no responder a los estímulos ni de sacarosa ni de glucosa. Por otro lado, estudios de microscopia utilizando un análogo de la timidina conocido como 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) demostraron que la glucosa y la sacarosa son capaces de estimular la síntesis *de novo* de DNA en células del RAM, siendo la glucosa el azúcar que promueve una mayor síntesis (Lara-Núñez *et al.*, 2017).

### 2.2 TOR en maíz

De acuerdo con estudios realizados con anterioridad en el laboratorio, en maíz existe una copia del gen que codifica para la cinasa TOR (ZmTOR), que presenta una alta conservación en los dominios típicos de TOR encontrados en mamíferos y *Arabidopsis*.

Estudios de la influencia de la vía glucosa-ZmTOR en la morfología, peso y tamaño de ejes embrionarios de maíz durante la germinación revelaron que después de un estímulo con glucosa, los ejes embrionarios presentaban un crecimiento significativo y una morfología enrollada característica; mientras que ejes embrionarios tratados sin azúcares, con sacarosa o con glucosa pero en presencia del inhibidor de TOR, AZD, presentaban un crecimiento menor y no mostraban la morfología enrollada (Figura 14), sugiriendo que la vía glucosa-ZmTOR tiene un efecto positivo en el crecimiento de ejes embrionarios durante la germinación.





**Figura 14.** Efecto de vía glucosa-ZmTOR en la morfología de ejes embrionarios. Modificado de (Flores-Sánchez, 2019).

En este sentido, el análisis del tamaño de las células del RAM de ejes embrionarios demostró que las células de los ejes tratados con glucosa eran más pequeñas y más numerosas en comparación con los demás tratamientos, lo que sugiere que la vía glucosa-TOR estimula la proliferación celular en este tejido (Flores-Sánchez, 2019).

En el grupo de trabajo también se ha estudiado la influencia que tiene la vía glucosa-ZmTOR en la expresión y abundancia proteica de ciertos marcadores del ciclo celular tales como ciclinas, CDK y KRP. Se ha encontrado que la vía glucosa-TOR regula diferencialmente la expresión de estos marcadores, regulando a la alta genes como el de *ZmCycD4;2* y a la baja otros como el de *ZmCDKA;1*, mientras que otros genes como el mismo *ZmTOR* no se encuentra bajo la regulación de esta vía o parecieran estar sometidos a una regulación más compleja en la que no sólo está involucrada la vía TOR, como en el caso de *ZmKRP3* (Flores-Sánchez, 2019). A nivel de abundancia proteica también se ha observado una regulación diferencial, favoreciendo la abundancia de proteínas como la CycD3, pero provocando un efecto contrario en la abundancia de proteínas como CycD4, mientras que proteínas como PCNA parecieran no estar reguladas por la vía glucosa-ZmTOR. Adicionalmente, en el grupo de trabajo también se analizó el efecto de esta vía sobre los niveles de

proteína total de ejes embrionarios de maíz, encontrándose que los ejes tratados con glucosa tienen niveles de proteína mayores, mientras que la inhibición de ZmTOR provoca una disminución en la cantidad de proteína total (López-López, 2018). Un estudio de la fosforilación de RPS6, apunta a que este efecto podría deberse a la vía TOR/S6K/RPS6, como ya se ha reportado en otros modelos de estudio (Lara-Núñez, datos no publicados).

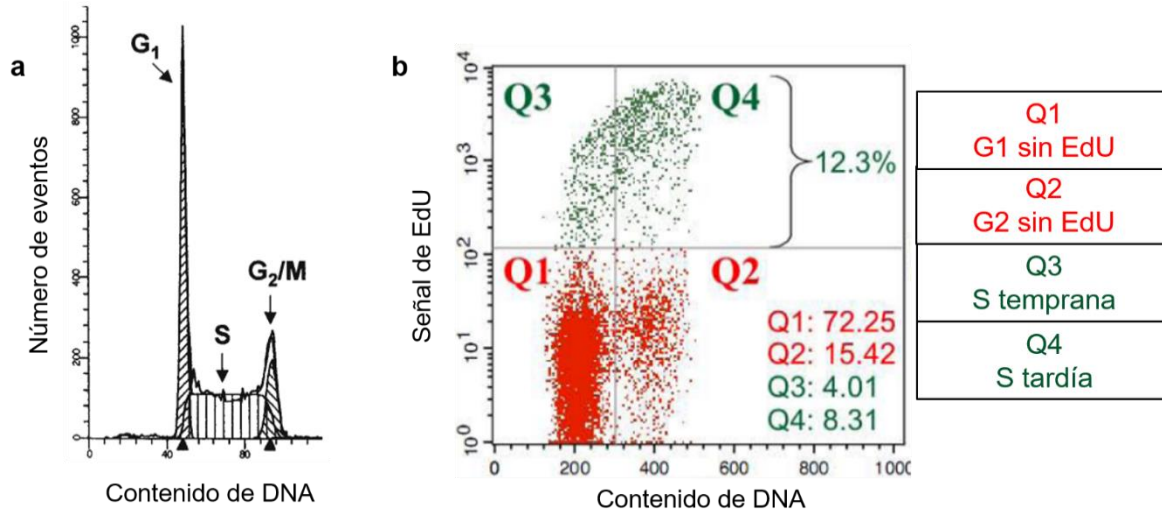
Estudios de la síntesis *de novo* de DNA han demostrado que la vía glucosa-ZmTOR estimula la síntesis de DNA, lo que implica que las células se encuentran en la fase S, mientras que la ausencia de glucosa o la inhibición de ZmTOR provocan una disminución significativa de la síntesis de DNA (Flores-Sánchez, 2019). Sin embargo, un estudio más detallado de las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células del RAM permitiría discernir si el aumento en la síntesis de DNA se debe a que la temporalidad del ciclo celular se ve afectada por la vía glucosa-ZmTOR.

### 2.3 Citometría de flujo en el estudio del ciclo celular

A lo largo de las últimas tres décadas se ha desarrollado una gran variedad de métodos de citometría de flujo para analizar la progresión del ciclo celular. Uno de los primeros acercamientos y el más utilizado hasta la fecha se basa en la medición, a un tiempo determinado, del contenido total de DNA presente en las células, utilizando algún fluorocromo capaz de unirse al DNA. El análisis del contenido total de DNA revela el porcentaje de células que se encuentran en fase G0/G1, S o G2/M y se observa como un histograma con dos picos bien definidos, el primero representando a las células en la fase G0/G1 y el segundo a las células en la fase G2/M (Figura 15a) (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004).

Una aproximación más fina es aquella en la que se utiliza el análogo de base nitrogenada conocido como 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU), al cual se le puede adicionar un fluorocromo mediante una sencilla reacción, y que permite la detección de células que están sintetizando DNA *de novo*, teniendo como fundamento que las DNA polimerasas incorporarán el EdU en el DNA, y la fluorescencia del fluorocromo permitirá diferenciar a las células replicando el DNA de las que no lo están haciendo.

Estos análisis permiten identificar dos poblaciones celulares bien definidas (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M) separando, además, las poblaciones de células que ya comenzaron o reiniciaron la fase S, de las que aún no (Figura 15b) (Kotogány *et al.*, 2010).



**Figura 15. a)** Histograma típico de contenido de DNA. Modificado de (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004). **b)** Gráfica de puntos para el análisis del ciclo celular con EdU. En rojo las poblaciones de células que no incorporaron EdU, en verde las que incorporaron EdU y por ende han reiniciado la fase S. Modificado de (Kotogány *et al.*, 2010).

### 3. Justificación

Se sabe que la glucosa estimula la proliferación de las células del meristemo apical de la raíz. Se ha propuesto que esta estimulación podría deberse a cambios en la temporalidad de las fases del ciclo celular durante la germinación en maíz, y que la cinasa maestra ZmTOR sería un mediador de este efecto, por lo que será importante analizar cómo cambia la temporalidad del ciclo celular al estimular o reprimir la vía glucosa-ZmTOR; desarrollando para ello un protocolo que permita analizar por citometría de flujo la ploidía y la *síntesis de novo* de DNA de las células del meristemo apical de la raíz.

## 4. Hipótesis

La estimulación por glucosa de la vía ZmTOR durante la germinación, acelerará la temporalidad de las fases del ciclo celular aumentando el porcentaje de células en las fases S y G2/M, mientras que la inhibición de su actividad de cinasa con AZD8055, impedirá el avance del ciclo celular aumentando el porcentaje de células en G0/G1.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la estimulación por glucosa de la cinasa ZmTOR, y de la inhibición de su actividad de cinasa por el inhibidor AZD8055, en el contenido y síntesis *de novo* de DNA de células provenientes de meristemos apicales de la raíz (RAM).

### 5.2 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica para el análisis del contenido de DNA a través de citometría de flujo en células de RAM.
- Estandarizar la técnica para el análisis de síntesis *de novo* de DNA en células de RAM.
- Determinar el contenido de DNA en células de RAM de ejes embrionarios de maíz.
- Determinar el porcentaje de proliferación celular en células de RAM a diversos tiempos de imbibición bajo diferentes tratamientos.

## 6. Metodología

### 6.1 Material biológico

#### 6.1.1 Ejes embrionarios de maíz

Se extrajeron ejes embrionarios a partir de semillas de maíz (*Zea mays*) variedad Chalqueño, cosecha 2018 y 2019. Se almacenaron en oscuridad, a 4°C, por no más

de 4 días previos a su procesamiento. Cada tratamiento requirió triplicados con 80 ejes embrionarios.

### 6.1.2 Hojas de jitomate

Se pesaron 50 mg de tejido de hojas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Saladette. El tejido fue recolectado el mismo día de su procesamiento.

### 6.1.3 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se recolectaron aproximadamente 5 mL de sangre periférica de un sujeto voluntario. La muestra fue procesada el mismo día de su recolección.

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Imbibición de ejes embrionarios de maíz

Los ejes embrionarios extraídos se desinfectaron con una solución de NaClO al 0.4% durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con abundante agua desionizada estéril y se dejaron secar durante algunos minutos sobre un papel filtro estéril.

<b>Tratamientos</b>			
<b>Control</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Glucosa + AZD</b>
Amortiguador de imbibición* + 120 mM glucosa	Amortiguador de imbibición + 2% m/v sacarosa	Amortiguador de imbibición + 90 mM glucosa	Amortiguador de imbibición + 90 mM glucosa + 30 µM AZD8055
*Composición del buffer de imbibición: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub>			

**Tabla 1.** Composición del medio de imbibición de cada tratamiento

En condiciones de esterilidad, se colocaron 80 ejes embrionarios por muestra en cajas Petri y se embebieron durante 0, 9, 18 y 24 h con los distintos medios de imbibición (Tabla 1) a 25°C, protegidos de la luz.

Antes de la imbibición, los ejes embrionarios tratados con AZD8055 se sometieron a periodos de vacío de 5 minutos, seguidos de periodos de descanso de 30 segundos, hasta llegar a 30 minutos totales.

#### 6.2.2 Pulso de 5-Etini-2'-deoxiuridina (EdU)

Se embebió a los ejes por 3 h y luego se les sometió a un pulso de EdU de 45 minutos. Para ello se preparó una solución de 20  $\mu$ M EdU, utilizando el medio de imbibición de cada tratamiento. El pulso se realizó en condiciones de vacío, siguiendo un procedimiento similar al del tratamiento con AZD8055 descrito previamente, pero el tiempo total fue de 45 minutos.

#### 6.2.3 Extracción de núcleos celulares

De los ejes embrionarios embebidos se cortaron los meristemos apicales de la raíz (RAM) y se trocearon en una caja Petri con 1.5 mL de buffer de extracción de núcleos (manitol 200 mM, MES 10 mM pH 5.8, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, espermina 10 mM, EDTA 2.5 mM, DTT 2.5 mM, Triton X-100 0.05 %v/v y NaN<sub>3</sub> 0.05% m/v) hasta obtener un extracto blanco. El extracto se pasó a través de un filtro de 30  $\mu$ m, se colocó en un tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 100 g durante 5 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. Debe tomarse en consideración que el buffer de extracción de núcleos debe almacenarse a 4°C y utilizarse lo más frío posible, además, la extracción de los núcleos debe llevarse a cabo sobre una cama de hielo. Para extraer núcleos provenientes de hojas de jitomate se siguió el mismo procedimiento, y los PBMC se aislaron de sangre periférica con una columna de Ficoll.

#### 6.2.4 Microscopia óptica

Previo a la centrifugación del punto anterior, se tomaron 100  $\mu$ L del extracto, se tiñeron con 1  $\mu$ L de yoduro de propidio (PI) y se incubó durante 10 minutos. Esta muestra se observó en un microscopio óptico (AmScope Microscopes) para determinar la integridad de los núcleos extraídos.

#### 6.2.5 Tinción con Alexa-Fluor 488 y 7-AAD

El pellet proveniente del extracto de núcleos se resuspendió en 100  $\mu$ L de *Click-iT Fixative Solution* (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit) y se

incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad total. Después de la incubación se agregaron 400  $\mu$ L de PBS 1X y se centrifugó a 100 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 500  $\mu$ L de *Click-it reaction cocktail* (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Flow Cytometry Assay Kit) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad total. Después de la incubación se agregaron 300  $\mu$ L de PBS 1X y se centrifugó en las condiciones mencionadas previamente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 500  $\mu$ L de PBS 1X y se agregaron 2.5  $\mu$ L de RNAasa A y 12.5  $\mu$ L de 7-AAD (FlowCellec MitoDamage Kit), se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad total.

#### 6.2.6 Análisis por citometría de flujo

Para cada tratamiento se realizó un análisis por citometría de flujo del contenido y síntesis *de novo* de DNA de 10,000 núcleos provenientes de RAM de ejes embrionarios utilizando el citómetro de flujo CytoFLEX S (Beckman Coulter). Además de los tratamientos mencionados con anterioridad, también se utilizaron controles específicos para la técnica de citometría de flujo, a saberse, un control con núcleos celulares sin ninguna tinción, uno con núcleos sólo teñidos con Alexa Fluor 488 y otro con núcleos sólo teñidos con 7-ADD. Los resultados fueron analizados con el software FlowJo (Becton Dickinson).

#### 6.2.7 Análisis estadístico

Se realizaron tres triplicados biológicos para cada tratamiento y los datos fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía, seguida de una prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas con  $P < 0.05$ .

## 7. Resultados y discusión

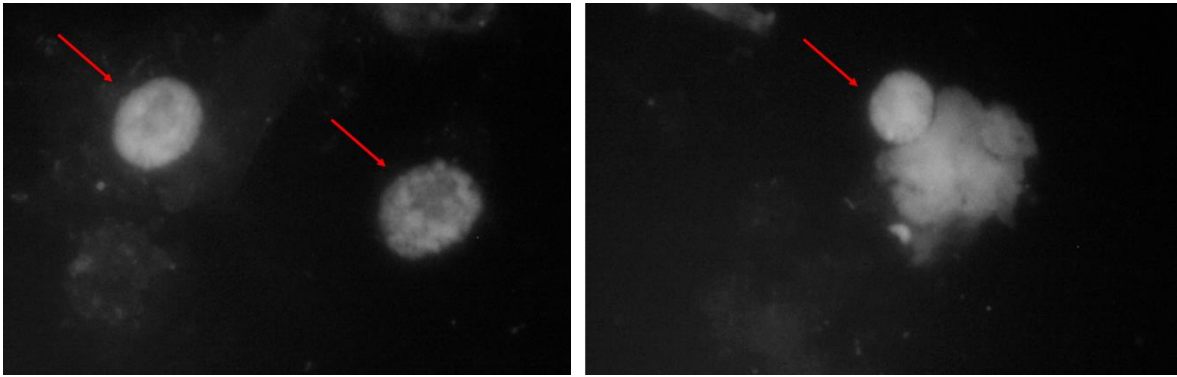
### 7.1 Estandarización de la extracción y tinción de núcleos

Debido a que aún no se han desarrollado protocolos para el análisis por citometría de flujo de células provenientes de ejes embrionarios de maíz, uno de los objetivos primordiales de este proyecto fue la estandarización de las metodologías implicadas en un análisis citométrico, desde la extracción de núcleos intactos, hasta el tipo y la concentración de los fluorocromos con los que se tiñe el DNA.

### 7.1.1 Buffer de extracción de núcleos

El primer paso fue la búsqueda de un buffer capaz de extraer núcleos de manera eficiente y en buenas condiciones, puesto que se necesitan al menos 10,000 núcleos para que el análisis citométrico tenga validez y es deseable que permanezcan intactos debido a que si la membrana nuclear se daña, se pierde DNA, lo que provoca que el citómetro no los detecte o que la detección sea imprecisa, con cantidades de DNA inferiores a las reales, provocando interferencias al analizar en qué fase del ciclo celular se encuentran las células que contenían esos núcleos (Riccardi & Nicoletti, 2006). Dadas las consideraciones anteriores, se optó por implementar un método que implicara un manejo mínimo de las muestras. Se seleccionó de la literatura un buffer de extracción de núcleos que ya había sido utilizado para el análisis citométrico de núcleos provenientes de hojas de jitomate, con buenos resultados (Ozbingol *et al.*, 1999). Este buffer contiene compuestos que les confieren estabilidad a los núcleos: la espermina estabiliza la cromatina, el manitol evita que los núcleos formen agregados, el EDTA secuestra iones bivalentes que actúan como cofactores de las nucleasas, el NaCl y KCl mantienen una fuerza iónica adecuada para los núcleos, el MES sirve como regulador de pH y el Triton X-100 disminuye la tendencia de los restos celulares a agregarse a los núcleos. Sin embargo, aún había de ser probado en maíz, puesto que un buffer de extracción de núcleos no es de uso universal, debido a las diferencias anatómicas y de composición química entre distintas especies de plantas (Doležel & Bartoš, 2005), además de que en este estudio se trabajó con ejes embrionarios y no hojas. Para evaluar la capacidad de este buffer para extraer núcleos intactos, se hizo una tinción de DNA con yoduro de propidio (PI) y se observaron los núcleos al microscopio. Los resultados (Figura 16) mostraron que este buffer era capaz de extraer núcleos en buenas condiciones, aunque aún se observaban restos celulares con cierta fluorescencia, por lo que había que encontrar la manera de reducir estos restos al mínimo para evitar que interfirieran en el análisis por citometría de flujo.





**Figura 16.** Microscopía óptica de núcleos provenientes de ejes embrionarios de maíz. (100X). Los núcleos se señalan con flechas rojas. Se observa la presencia de restos celulares con fluorescencia.

### 7.1.2 Condiciones de filtración y tinción con PI

Un análisis preliminar en el citómetro de flujo mostró que las condiciones aún no eran las ideales, en el histograma de contenido de DNA no se observan los dos picos característicos de células en fase G1 o G2 (Figura 17a). Esto podría deberse a la interferencia por restos celulares presentes en el extracto o por condiciones de tinción inadecuadas. Por ello, se hicieron modificaciones en el protocolo inicial.

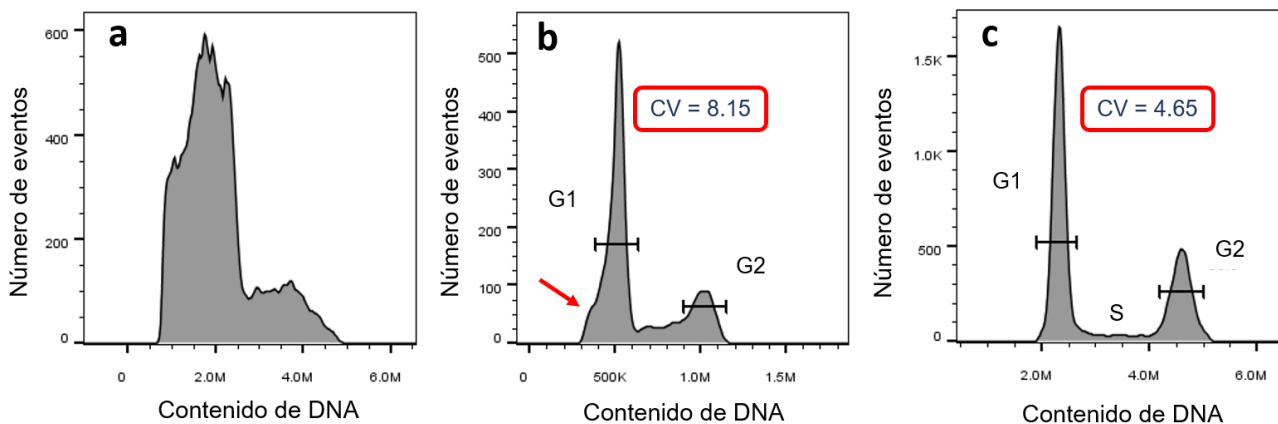
Como primera modificación se probaron nuevas condiciones de filtración y tinción con PI. Este fluorocromo es ampliamente utilizado para el análisis del contenido de DNA por citometría de flujo, porque permite análisis rápidos y confiables gracias a que se une estequiométricamente al DNA y emite una señal intensa fácil de captar, pero también se ha observado que puede unirse en menor medida a restos celulares, lo que puede provocar errores en el análisis (Riccardi & Nicoletti, 2006). Por ello, los cambios se enfocaron en disminuir los restos celulares, los que por sí mismos también puede presentar una leve autofluorescencia, y en encontrar la concentración y tiempo de incubación adecuado para la tinción con PI. De esta manera, se cambió de una filtración con una malla de 100  $\mu\text{m}$  a una con 30  $\mu\text{m}$  para eliminar los restos de mayor tamaño y se decidió cambiar la concentración de PI de 10 ng/mL a 50  $\mu\text{g/mL}$  con la adición de RNAasa a 5  $\mu\text{g/mL}$ , protocolo de tinción ya reportado previamente en estudios en plantas (Doležel *et al.*, 2007). Gracias a estas modificaciones, se obtuvo un histograma de contenido de DNA con dos picos bien definidos (Figura 17b). Sin embargo, los resultados aún no eran del todo ideales.

En el estudio del contenido de DNA existen al menos tres parámetros que permiten determinar si los resultados obtenidos son válidos: el primero es que en el eje de contenido de DNA del histograma el valor promedio del pico de G2 debe ser el doble del valor de pico de G1; el segundo es que los picos deben tener una forma simétrica, y el tercero, que la variación en los picos debe ser mínima, recordando que estas gráficas muestran la información obtenida de 10,000 núcleos. Esta variación se estima con el coeficiente de variación (CV) del pico G1, que en estudios en plantas debe ser menor al 5.0% (Doležel & Bartoš, 2005). En la figura 17b se observa que el histograma obtenido cumple el primero de los parámetros, pero no los otros dos. A pesar de que los picos están definidos y se puede hacer una clara distinción entre las células en G1 y G2, el pico de G1 muestra una pequeña falda a la izquierda que lo hace asimétrico, estas faldas suelen indicar que hay núcleos dañados que están perdiendo cierta cantidad de DNA y la presencia de esta falda, a su vez, provoca que la variación aumente y el CV sea mayor de 5.0%. Estos resultados indicaban que había que hacer otros ajustes en el protocolo para evitar que se dañaran los núcleos.

### 7.1.3 Condiciones de fijación y centrifugación

Inicialmente el protocolo contemplaba una fijación de los ejes embrionarios con formaldehído, previa a la extracción de núcleos, puesto que se ha observado que la fijación hace la extracción de núcleos más eficiente y permite una mejor tinción (Doležel *et al.*, 2007). Sin embargo, se decidió eliminar del protocolo la fijación porque implicaba que los ejes embrionarios se sometieran a vacío, ya que el formaldehído no difunde fácilmente a través del tejido denso de los ejes. Este periodo de vacío, sumado a los otros periodos de vacío usados en otras etapas del protocolo podría generar un estrés en las células que comprometería su integridad y dañaría a los núcleos. También se cambiaron las condiciones de centrifugación y se pasó de usar 1000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, a usar 100 g durante 5 minutos a 4°C, como ya se había reportado para extracción de núcleos de hojas de jitomate. Esto se hizo con la intención de evitar que los núcleos se dañaran por una velocidad excesiva de centrifugación. La figura 17c muestra que

estos cambios finales dieron resultados, puesto que se obtuvo un histograma con picos bien definidos, simétricos y con un CV del pico G1 menor a 5.0%.



**Figura 17.** a) Histograma con picos pocos definidos. b) Histograma con picos asimétricos. CV del pico G1 mayor a 5.0%. La falda señalada con la flecha roja es resultado de núcleos dañados. c) Histograma con picos simétricos bien definidos. CV del pico G1 menor a 5.0%

#### 7.1.4 Condiciones finales de extracción de núcleos de ejes embrionarios

Además de los ajustes detallados en los puntos anteriores, también se realizó una determinación del número de ejes embrionarios necesarios para obtener una cantidad aceptable de núcleos, y se encontró que, si se utiliza el eje embrionario completo, se requieren 20 ejes por muestra, mientras que, si sólo se utiliza el RAM, se requieren 80 ejes embrionarios. En la tabla 2 se resumen las condiciones ideales para la extracción de núcleos de ejes embrionarios de maíz.

Parámetro	Condición
Buffer de extracción	Özbingöl, 1999
Filtro	30 µm
Centrifugación	100 g
Concentración de PI (RNAasa)	50 µg/mL (5 µg/mL) 10 minutos
#Ejes embrionarios*	20
*80 si sólo se ocupa el RAM	

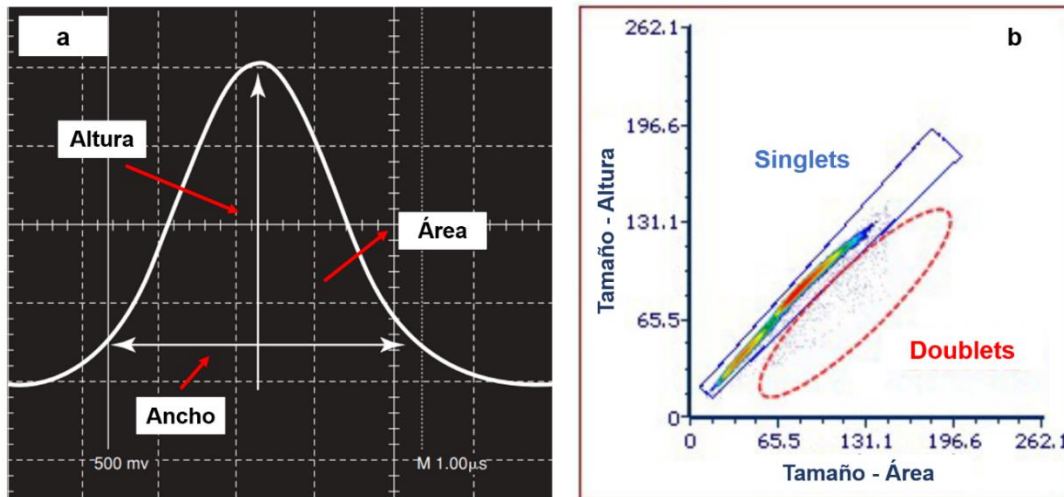
**Tabla 2.** Condiciones idóneas para la extracción de núcleos para análisis por citometría de flujo.

## 7.2 Estandarización del análisis por citometría de flujo

La obtención de las imágenes del estudio citométrico preliminar requirieron también de la optimización del protocolo de análisis en el citómetro. Cuando se corre una muestra nunca antes analizada, se deben ajustar los parámetros del citómetro para encontrar y diferenciar la población de interés. Para un estudio del ciclo celular se sigue un protocolo de análisis bien establecido: en primer lugar, se debe separar la señal de los núcleos individuales (*singlets*) de la señal de los que se agregan y pasan por el láser del citómetro como dos núcleos pegados (*doublets*). Para ello se usa una función del citómetro conocida como “pulsos”, estos pulsos se refieren a la manera en la que los detectores del citómetro integran la dispersión de la luz provocada por la célula y existen tres tipos: área, altura y ancho (Figura 18a) (Hoffman, 2009). La curva mostrada en la figura 18a representa el cambio en el potencial eléctrico que sufre el detector del citómetro cuando una célula dispersa la luz del láser. Usualmente en citometría se utiliza el pulso de área, pero cuando se quieren descartar los *doublets* se utilizan tanto el pulso de altura como el de ancho. Para descartar los *doublets* se gráfica un parámetro, normalmente tamaño, pero en un eje se gráfica el pulso de altura y en el otro el de área (Figura 18b), los *singlets* forman una línea recta y todo lo que se salga de esta tendencia lineal son *doublets*. La figura 19a muestra la discriminación de *doublets* que se hizo para la muestra de núcleos de ejes embrionarios de maíz, sólo la región señalada representa los *singlets* y lo demás se compone principalmente de restos celulares presentes en la muestra.

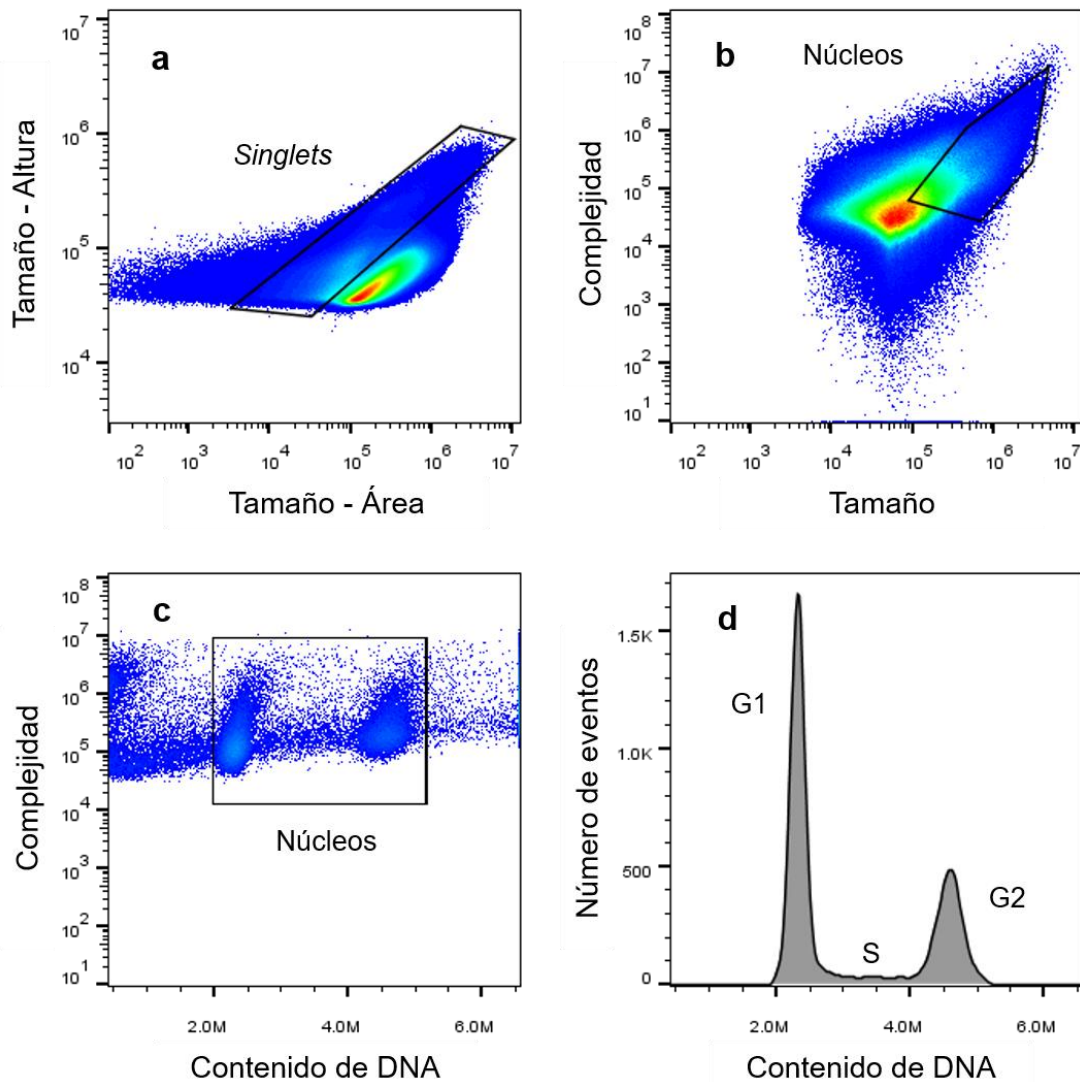
El siguiente paso fue encontrar, dentro de los *singlets*, la población de núcleos de interés. Para ello se hizo una gráfica de puntos en la que se representaba la complejidad contra el tamaño (Figura 19b). En muestras ya analizadas con anterioridad suele ser fácil saber en qué parte de la gráfica aparecen los núcleos estudiados, pero en el caso de una muestra analizada por primera vez, en esta gráfica se debe delimitar cuidadosamente la región que corresponde a los núcleos que se desea estudiar. Para ello, se usó otra gráfica como apoyo, en ella se graficó la complejidad contra el contenido de DNA, que representa la intensidad de la señal del fluorocromo con el que se tiñó el DNA (Figura 19c). Al utilizar esta gráfica

complementaria se puede determinar qué regiones de la gráfica “complejidad contra tamaño” presentan partículas con fluorescencia, que por ende tienen DNA marcado con el fluorocromo y corresponden a los núcleos.



**Figura 18. a)** Pulso de un detector de citómetro de flujo. Modificado de (Hoffman, 2009). **b)** Gráfica de puntos para diferenciar *singlets* de *doublets*. Encerrados en un ovalo rojo se indican los *doublets* que no siguen la tendencia lineal de los *singlets*, encerrados en un rectángulo azul. Modificado de (Bushnell, 2018).

Finalmente, con el uso de la gráfica “complejidad contra contenido de DNA” se discriminó de forma más fina la región correspondiente a los núcleos. En esta gráfica también se observaron dos poblaciones nucleares bien definidas, la de los núcleos de células que estaban en G0/G1 y la de los núcleos de células en G2/M, y con esta información se generó un histograma de contenido de DNA (Figura 19d) en el que se puede estudiar la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular.



**Figura 19.** **a)** Discriminación de *doublets*. Todo lo que está fuera de la región indicada con un rectángulo son partículas formando agregados. **b)** Región correspondiente a los núcleos. Todo lo que está fuera de la región indicada son restos celulares individuales. **c)** Región de núcleos con fluorescencia. **d)** Histograma de contenido de DNA de células de ejes embrionarios de maíz.

### 7.3 Análisis del contenido de DNA de células de ejes embrionarios de maíz

Para validar el protocolo anterior se estimó la cantidad absoluta de DNA (en picogramos) de los núcleos extraídos, y se comparó con los resultados ya reportados en la literatura, gracias a que ya se sabe que el maíz es una especie diploide con un contenido de DNA de 5.43 pg (variedad CE-777). Para evaluar la cantidad de DNA de determinada especie o variedad de planta, se utilizan

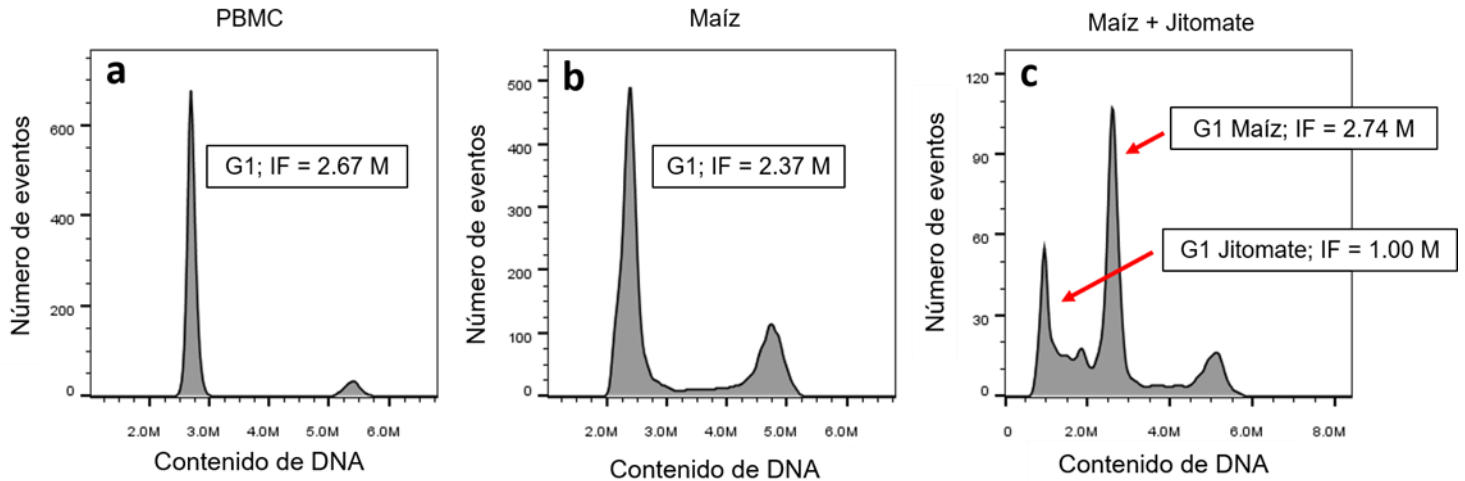
estándares, es decir, muestras con un contenido de DNA ya conocido. El estándar puede ser externo o interno, en el primer caso, la muestra y el estándar se analizan por separado y luego se comparan a través de un software de análisis; en el segundo caso, la muestra y el estándar se tratan simultáneamente, los núcleos se extraen, se tiñen y se analizan en el citómetro como si se tratara de una sola muestra (Doležel *et al.*, 2007). En este trabajo se utilizaron ambos tipos de estándar para evaluar la cantidad de DNA presente en núcleos de maíz variedad Chalqueño.

$$\text{Contenido de DNA muestra} = (\text{Contenido de DNA referencia}) \left( \frac{\text{IF G1 muestra}}{\text{IF G1 referencia}} \right)$$

**Figura 20.** Ecuación para calcular contenido de DNA a partir de estándares.

Para el estándar externo se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto voluntario, y para el estándar interno se utilizaron núcleos provenientes de hojas de una planta de jitomate variedad Saladette, la cual se cultivó en el laboratorio específicamente para este ensayo. Se sabe que los leucocitos humanos tienen aproximadamente 6.0 pg de DNA, mientras que el jitomate tiene alrededor de 1.96 pg (Doležel *et al.*, 2007). Para calcular el contenido de DNA del maíz a partir de los estándares, se utilizó una ecuación que compara la intensidad de fluorescencia (IF) de los picos de G1 de la muestra y de los estándares (Figura 20).

Los resultados obtenidos en el citómetro de flujo (Figura 21) permitieron estimar, con el control externo, que la variedad de maíz Chalqueño tiene alrededor de 5.33 pg de DNA, mientras que con el control interno se obtuvo un valor muy similar de 5.37 pg de DNA, resultados a su vez, parecidos a los reportados en la literatura.



**Figura 21.** a) Histograma de contenido de DNA de PBMC de humanos. b) Histograma de contenido de DNA de núcleos de maíz. La IF del pico G1 de este histograma fue comparada con la IF del pico G1 de los PBMC para calcular el contenido de DNA de los núcleos de maíz. c) Histograma de contenido de DNA de núcleos de maíz y jitomate. Las IF de los picos G1 de cada planta fueron comparadas para calcular el contenido de DNA de los núcleos de maíz.

#### 7.4 Estandarización del análisis de síntesis *de novo* de DNA

Una vez estandarizadas las condiciones para la determinación de contenido de DNA, se implementó una técnica adicional que permitiera cuantificar el porcentaje de células sintetizando DNA *de novo*. Esta técnica, conocida como análisis de proliferación celular, es capaz de discernir entre las células que se encuentran en una fase S activa y las células que aún no han reiniciado el ciclo celular, discriminación esencial para nuestro modelo de estudio, puesto que se ha observado que en la semilla seca de maíz, alrededor del 82% de los núcleos se encuentran en la fase G1 y el 17% en la fase G2 (Sanchez *et al.*, 2005), por lo que es importante hacer una distinción de las células que están avanzando en el ciclo celular de las que no.

##### 7.4.1 Pulso de 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU)

Para llevar a cabo este análisis se seleccionó un kit comercial que ya se había utilizado en el laboratorio para estudios de microscopía óptica, con resultados exitosos (Flores-Sánchez, 2019). El fundamento de este kit es la incorporación al



DNA de un análogo de timina (EdU) al que se le puede acoplar un fluorocromo, en este caso Alexa-Fluor 488 (AF488).

El paso crítico de esta técnica es el tiempo de incubación o pulso de EdU al que se someten los ejes embrionarios. Inicialmente se decidió hacer un pulso, previo a la imbibición de los ejes, de 45 minutos, tiempo recomendado por el kit para tejidos densos como en el caso de ejes embrionarios de maíz. Sin embargo, se observó que esto comprometía la viabilidad de los ejes que mostraban un tamaño menor después de ser embebidos, en comparación con el tamaño que lo ejes presentaban en ensayos realizados con anterioridad. Debido a que el pulso se hace al vacío, porque el EdU no entra fácilmente al tejido de los ejes embrionarios, se temía que esto estuviera comprometiendo la integridad de las células y por lo tanto la viabilidad del eje, por lo que se decidió hacer el pulso hacia las 3 horas después de la imbibición de los ejes, tiempo en el que las células ya han reiniciado diversos procesos celulares, pero aún no comienzan la síntesis de DNA (Baíza *et al.*, 1989). Se presumía que a este tiempo los ejes embrionarios serían capaces de soportar mejor el estrés del vacío, sin que comenzaran a sintetizar DNA en ausencia de EdU. Tras esta modificación se observó que los ejes embrionarios crecían con normalidad.

#### 7.4.2 Cambios en la tinción de DNA

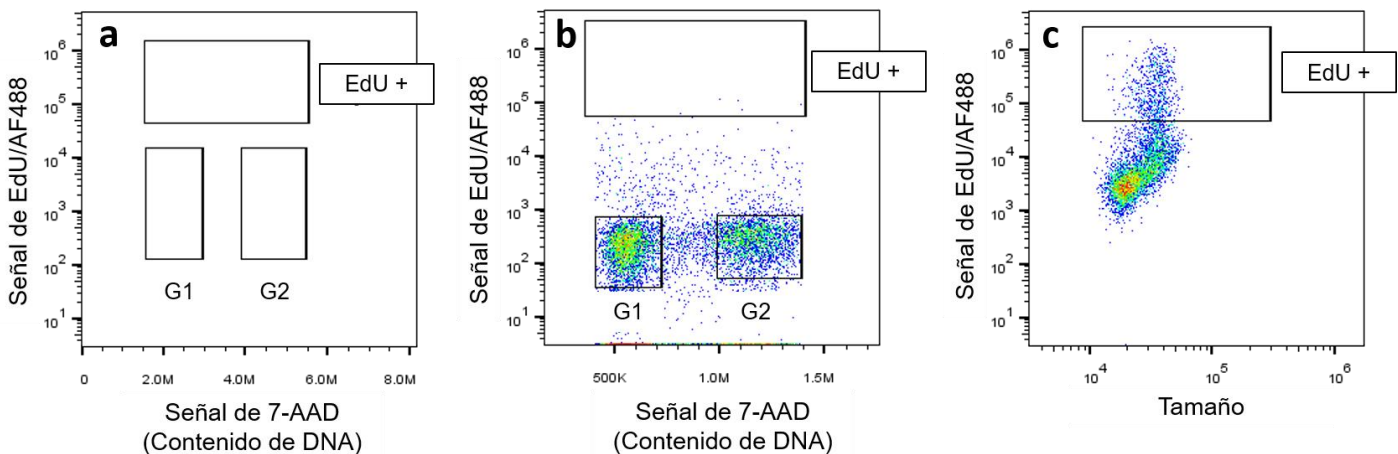
La validación de esta técnica requería de al menos tres repeticiones técnicas (análisis en el citómetro de flujo), cada una con tres repeticiones biológicas (utilizando 80 ejes embrionarios por cada una) en las que el porcentaje de células en la fase S tuviera un CV menor al 20.0%. Sin embargo, una serie de pruebas insatisfactorias en las que no se observaban las poblaciones celulares esperadas hicieron que se replanteara el uso de PI como tinción de DNA. Esto debido a que la longitud de emisión del PI es muy similar a la del AF488, fluorocromo acoplado al EdU, lo que provocaba que en el citómetro se mezclaran las señales de emisión y el equipo fuera incapaz de determinar correctamente de qué fluorocromo era la señal que estaba recibiendo. A pesar de que los citómetros tienen la capacidad de lidiar con este tipo de problemas, el traslape de las señales de PI y AF488 era tan

grande que no fue posible corregirlo. Se cambió de PI a 7-AAD, un fluorocromo utilizado para teñir DNA con propiedades similares al PI, pero con una señal de emisión que se traslapa mucho menos con la de AF488. Una vez realizado este cambio de tinción, se realizaron las repeticiones para la validación de la técnica.

#### 7.4.3 Validación del análisis citométrico de proliferación celular

El punto crucial en el análisis de proliferación fue encontrar la población de núcleos que habían incorporado EdU (EdU positiva). Para ello se utilizaron tres controles; el primero fue un control sin teñir, en el que se analizaron núcleos sin ningún fluorocromo. Lo que se esperaba con este control era descartar que los núcleos tuvieran algún nivel de autofluorescencia que interfiriera con el análisis. La figura 22a muestra que efectivamente los núcleos no presentaban autofluorescencia detectable en una gráfica de puntos de “señal de EdU/AF488 contra señal de 7-AAD”. El siguiente control fue analizar núcleos teñidos sólo con 7-AAD. Este control permitiría determinar qué poblaciones en la gráfica “señal de EdU/AF488 contra señal de 7-AAD” eran positivas para EdU. En la figura 22b se observa que a lo largo del eje de las abscisas los núcleos teñidos con 7-AAD, se agruparon en las poblaciones características de núcleos en G1 y G2, y que a lo largo del eje de las ordenadas (el de la fluorescencia dada por EdU/AF488) también presentaban cierta fluorescencia, pero como estos núcleos no fueron tratados con AF488, esta fluorescencia no se debía a la incorporación de EdU, sino a cierta señal remanente de 7-AAD que entra en el canal de Edu/AF488, por lo que a la región donde se observaban poblaciones nucleares se le denominó EdU negativa, y todo lo que estuviera por encima de estos núcleos sería considerado EdU positivo. El tercer control, de células teñidas únicamente con AF488, permitió de nueva cuenta delimitar qué región de la gráfica representaba núcleos que incorporaron EdU (Figura 22c).

Una vez delimitadas cuidadosamente las diferentes poblaciones celulares, se hicieron las repeticiones. En las gráficas de puntos de la figura 23 se observan tres poblaciones nucleares bien establecidas, núcleos EdU negativos en G1 y G2, y núcleos EdU positivos que por ende se encuentran en la fase S. Este porcentaje de núcleos EdU positivos debe variar poco entre las distintas repeticiones, teniendo como límite un CV de 20.0%, como ya se mencionó antes. La figura 23 muestra gráficas de puntos representativas de cada repetición técnica. El CV entre repeticiones es menor a 20.0% (19.3%), por lo que los resultados obtenidos con esta técnica son confiables. Es importante mencionar que debido a que estas repeticiones no se realizaron el mismo día, las poblaciones pueden recorrerse levemente en el eje de las abscisas. Gracias a que en estos análisis se mide el porcentaje de células en la fase S y no el contenido de DNA, esto no representa un problema.

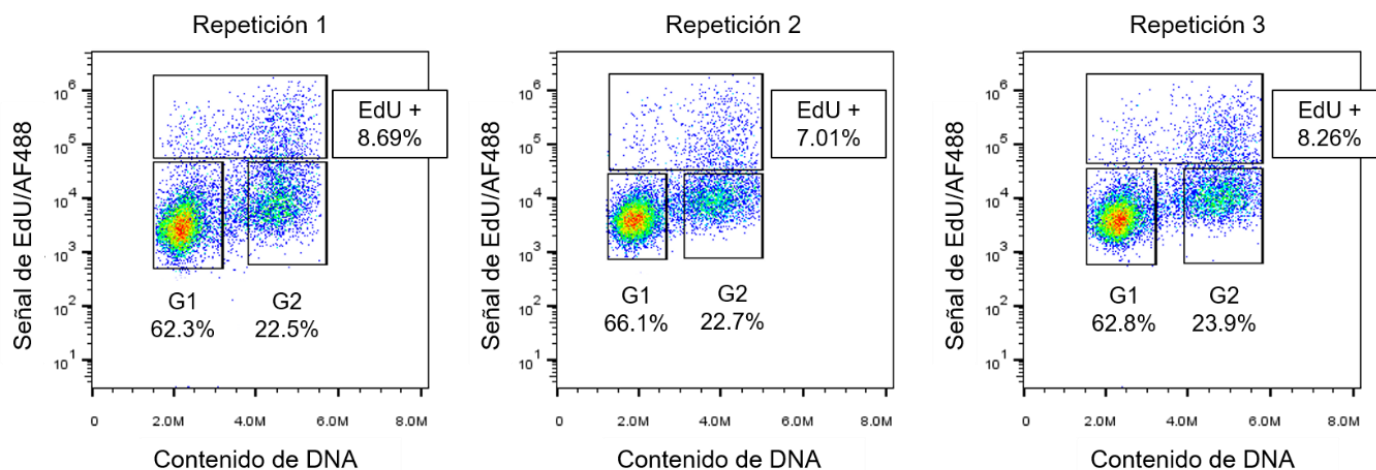


**Figura 22.** a) Control sin teñir. No se observan poblaciones nucleares. b) Control con 7-AAD. Todas las poblaciones nucleares que aparecen son EdU negativas. Por encima de ellas todo será EdU positivo. c) Control con EdU/AF488. De las poblaciones celulares que se observan, sólo las que entran en la región EdU positiva, delimitada en el inciso anterior, incorporaron EdU.

### 7.5 Efecto de glucosa-ZmTOR en la proliferación de células del RAM

Una vez se estandarizaron todas las técnicas necesarias, se procedió a analizar el efecto de la vía glucosa-ZmTOR en la proliferación de células presentes en el meristemo apical de la raíz (RAM) de ejes embrionarios de maíz durante la

germinación. Para ello se embebieron los ejes en tres tratamientos, uno con sacarosa, otro con glucosa y un tercero con glucosa en presencia del inhibidor específico de TOR, AZD8055, durante 9, 18 y 24 h.

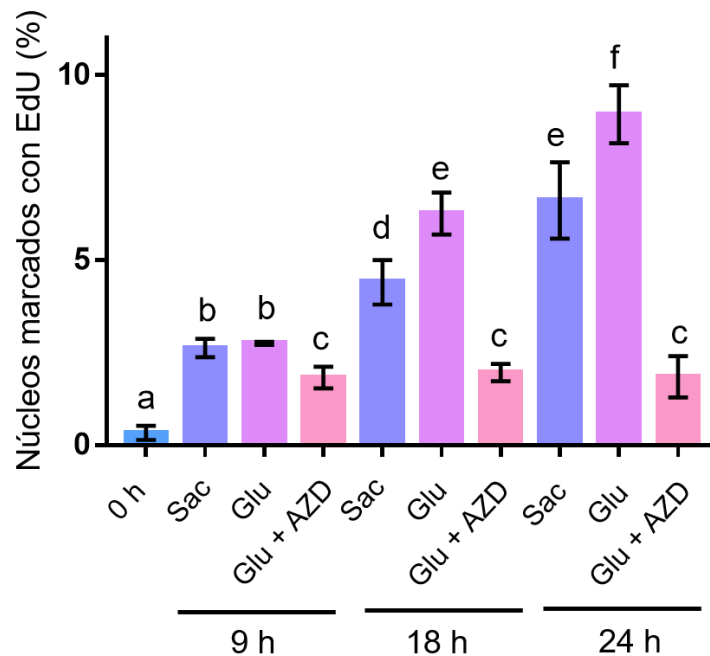


**Figura 23.** Gráficas representativas de las repeticiones técnicas de la validación del análisis de síntesis *de novo*. Los porcentajes promedio de las repeticiones presentan un CV menor al 20.0%

Se observó que a tiempos tempranos como 9 horas no hay diferencias significativas en el porcentaje de núcleos incorporando EdU (en fase S) entre ejes tratados con glucosa y sacarosa. Sin embargo, a partir de las 18 horas y más marcadamente a las 24 horas, se observó un mayor porcentaje de núcleos en fase S en los ejes tratados con glucosa. Por el contrario, en todos los tiempos analizados, se observa un porcentaje mínimo de núcleos en fase S en los ejes tratados con AZD8055 (Figura 24). Adicionalmente, se realizó un análisis con núcleos provenientes de ejes embrionarios sin embeber, esto para descartar que el EdU estuviera uniéndose inespecíficamente a otras estructuras nucleares y que la señal no se debiera a la síntesis de DNA. Como se esperaba, el porcentaje de núcleos incorporando EdU en estos ejes es despreciable.

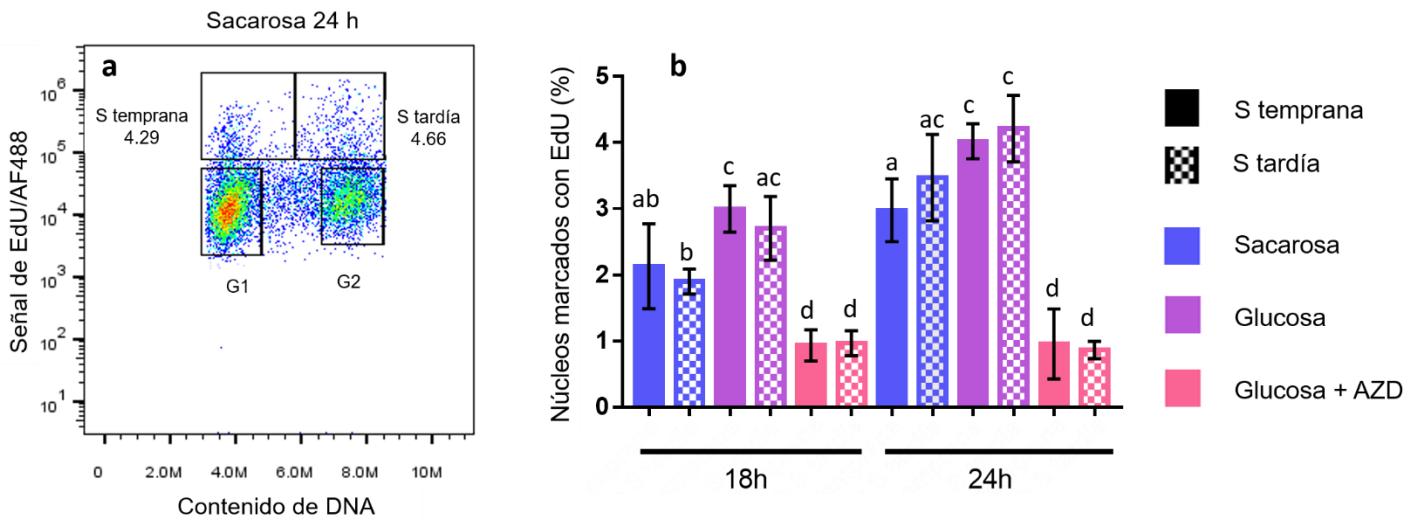
Los resultados anteriores muestran que la vía glucosa-ZmTOR tiene un efecto positivo en la cantidad de células del RAM que entran a la fase S. Estos datos son consistentes con otros ya reportados con anterioridad en los que se ha observado por microscopia, que la glucosa estimula la proliferación de las células del RAM de ejes embrionarios de maíz y que este efecto depende de la actividad de TOR

(Flores-Sánchez, 2019; Lara-Núñez *et al.*, 2017). El mecanismo por el cuál la glucosa favorece la proliferación aún no se ha elucidado del todo. En *Arabidopsis* se ha reportado que la estimulación por glucosa provoca que TOR fosforile y active a la familia de factores transcripcionales E2F, lo que induce una regulación a la alta de sus genes blanco, los cuales codifican para proteínas implicadas en la fase S del ciclo celular (Xiong *et al.*, 2013). La reciente caracterización en maíz de estos factores transcripcionales (Sánchez-Camargo, datos no publicados) abre la puerta a la posibilidad de que este sea el mecanismo implicado en la estimulación de la proliferación por la vía glucosa-ZmTOR. Sin embargo, es probable que el mecanismo sea más global, puesto que la activación de TOR por azúcares promueve procesos anabólicos en detrimento de los procesos catabólicos (Rodríguez *et al.*, 2019), lo que favorecería la disposición de las células a comenzar una ronda de ciclo celular.



**Figura 24.** Efecto de la vía glucosa-TOR en la síntesis *de novo* de DNA. Ejes tratados con sacarosa (Sac), glucosa (Glu) y glucosa en presencia de AZD (Glu + AZD). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones con 10,000 núcleos cada una. Letras diferentes indican una diferencia estadística significativa con  $P < 0.05$ .

Los resultados también muestran que en presencia de AZD8055 existe un porcentaje basal de núcleos sintetizando DNA *de novo*, muy similar para todos los tiempos. La inhibición de ZmTOR provoca una disminución en la proliferación celular, pero esta disminución no es total. Esto podría deberse a síntesis *de novo* de DNA por eventos de reparación de daño, o quizá podría sugerir que la glucosa es capaz de estimular una proliferación celular basal independiente de la vía ZmTOR.



**Figura 25. a)** Gráfica representativa del análisis de núcleos en fase S. Resultados para el tratamiento con sacarosa a las 24 h. **b)** Efecto de la vía glucosa-TOR en la progresión de la fase S. Cada barra representa el promedio de tres repeticiones con 10,000 núcleos cada una. Letras diferentes indican una diferencia estadística significativa con  $P < 0.05$ .

En la figura 24 se observa que la cantidad de núcleos sintetizando DNA a las 24 h con sacarosa es igual que a las 18 h con glucosa. Esto sugería una posible alteración de la temporalidad del ciclo celular, puesto que parecía que con glucosa las células estaban avanzando al menos 6 h más rápido a través del ciclo celular. Para probar esta suposición se decidió analizar en qué etapa de la fase S se encontraban los núcleos EdU positivos. Para determinar si los núcleos se encontraban en la fase S temprana o fase S tardía, se dividió la población de núcleos EdU positivos en dos partes: los núcleos con un contenido de DNA similar a la fase G1, se consideraron como núcleos en la fase S temprana, mientras que los núcleos

con contenido de DNA similar a la fase G2 se consideraron en la fase S tardía (Figura 24a) (Lee *et al.*, 2010). Este análisis demostró que, tanto para los tratamientos con sacarosa como con glucosa, a las 18 h la tendencia era que las células se encontraban ligeramente en mayor proporción en la fase S temprana, mientras que, a las 24 h, también para ambos tratamientos, la tendencia se revertía y las células se encontraban ligeramente en mayor proporción en la fase S tardía. El hecho de que las células progresaran a través de la fase S con la misma tendencia para ambos tratamientos descartaba la suposición de que con glucosa las células estuvieran avanzando más rápidamente a través del ciclo celular. Estos resultados sugieren que los efectos que tiene la vía glucosa-ZmTOR en el crecimiento y la morfología de los ejes embrionarios, observados con anterioridad, se deben a una mayor cantidad de células proliferando en determinado momento. Sin embargo, hacen falta estudios para determinar detalladamente cómo es que este incremento favorece el desarrollo de los ejes embrionarios, aunque lo más probable es que la glucosa impacte favorablemente una gran variedad de procesos además de la estimulación de la síntesis *de novo* de DNA.

## 8. Conclusiones

Se implementó un protocolo experimental, que permite el análisis del contenido de DNA y la síntesis *de novo* de DNA de células provenientes del RAM de ejes embrionarios de maíz a través de citometría de flujo.

La vía glucosa-TOR aumenta la proporción de células del RAM que se comprometen a sintetizar DNA *de novo* en ejes embrionarios de maíz, pero no altera la temporalidad de las fases del ciclo celular.

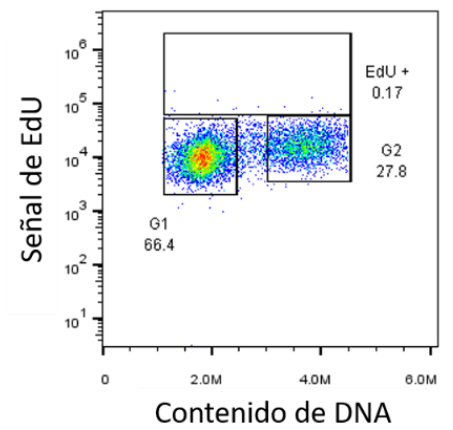
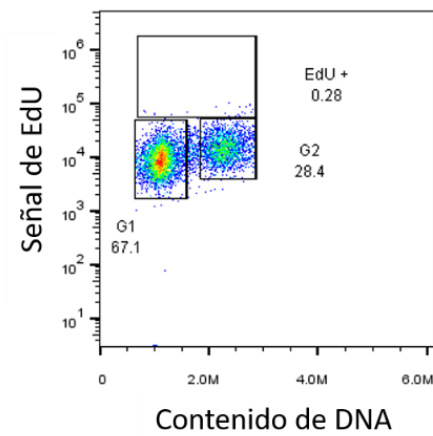
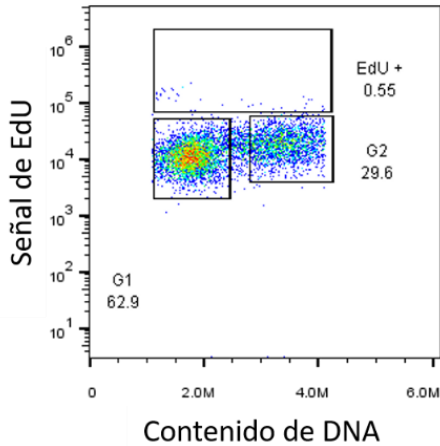
Aún hacen falta estudios que permitan elucidar detalladamente, el mecanismo exacto por el cual la vía glucosa-TOR provoca un aumento de las células sintetizando DNA *de novo* en los ejes embrionarios de maíz y cómo es que este incremento, impacta en el desarrollo de ejes embrionarios de maíz durante la germinación.



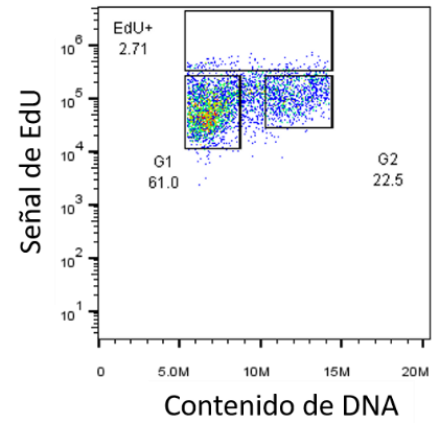
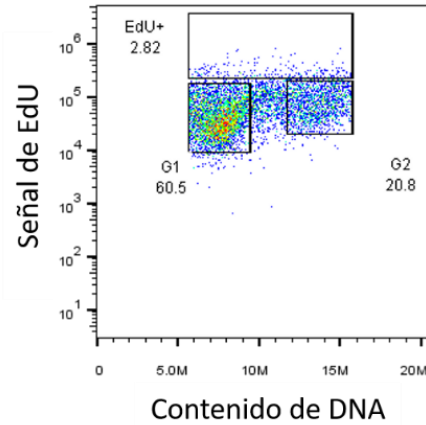
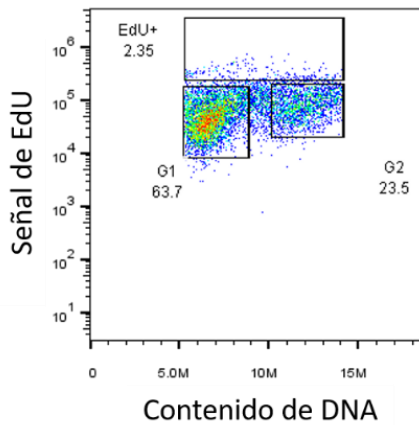
## 9. Anexos

### Anexo 1. Repeticiones del análisis de proliferación celular

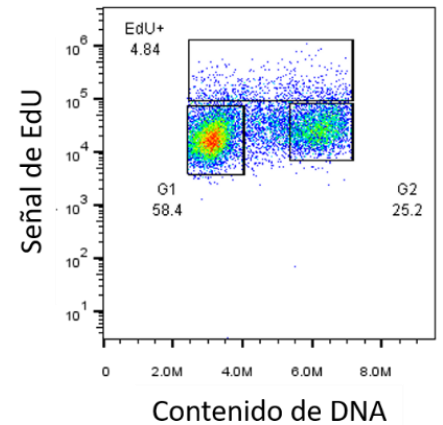
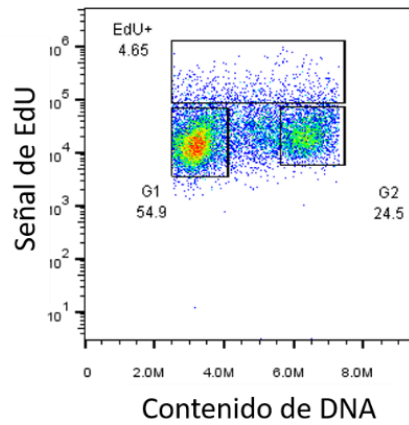
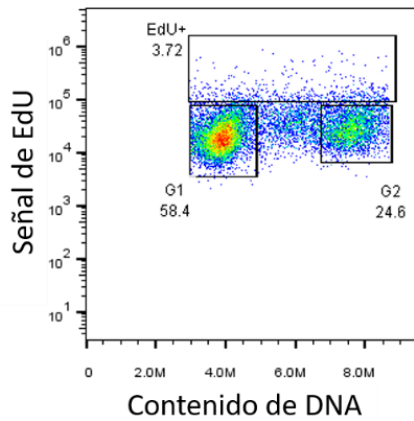
#### Experimento: 0h



#### Experimento: Sac 9h

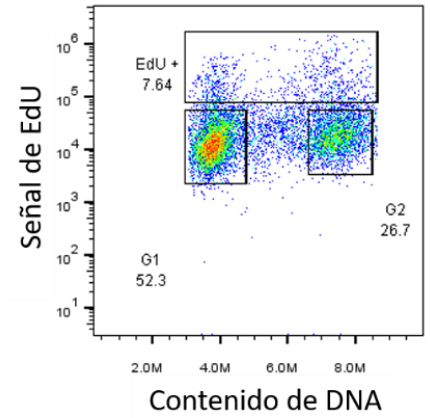
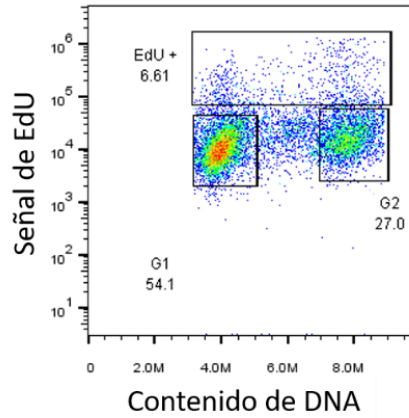
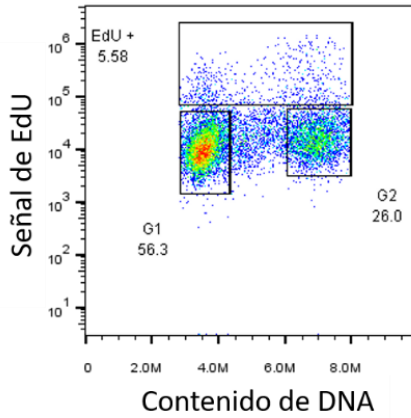


#### Experimento: Sac 18h

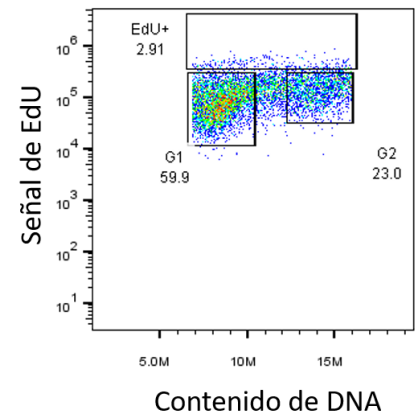
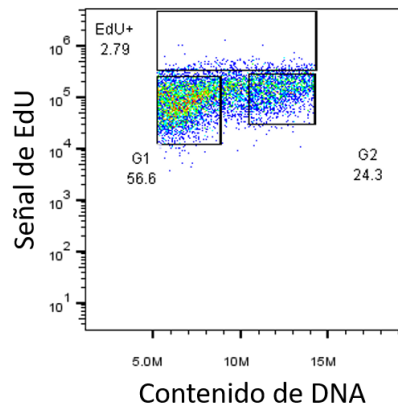
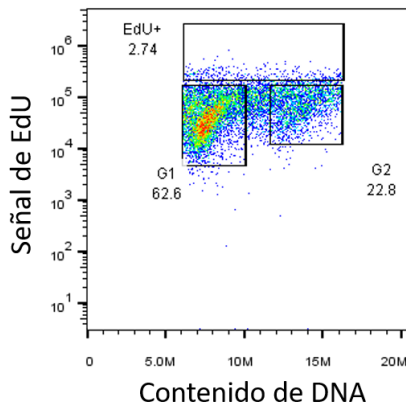




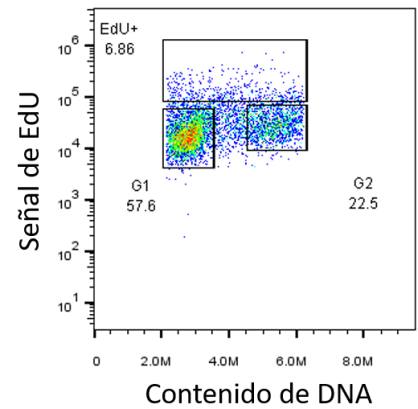
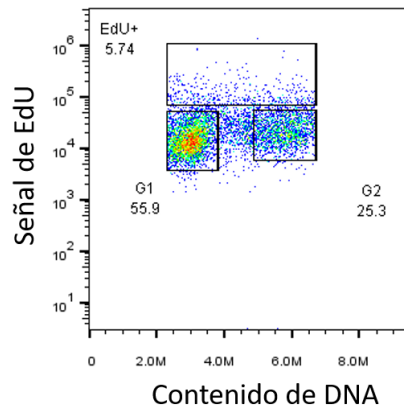
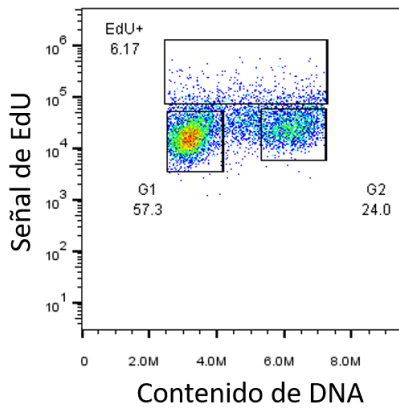
Experimento: **Sacarosa 24h**



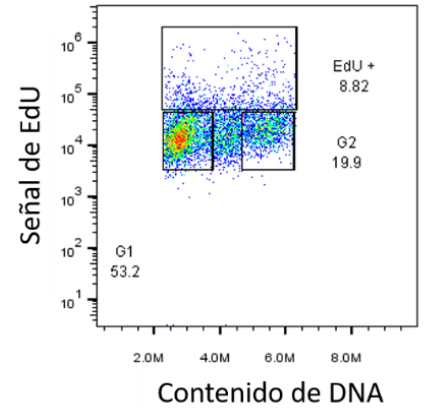
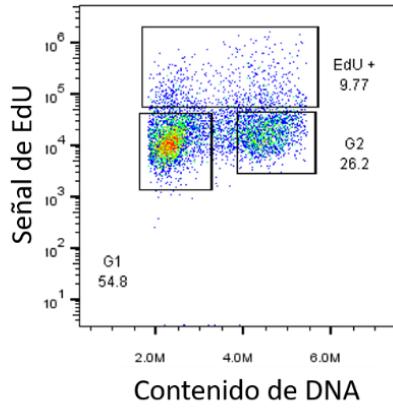
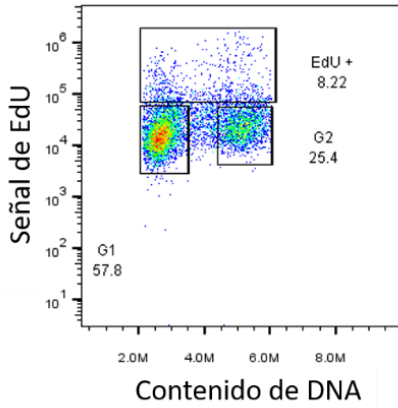
Experimento: **Glu 9h**



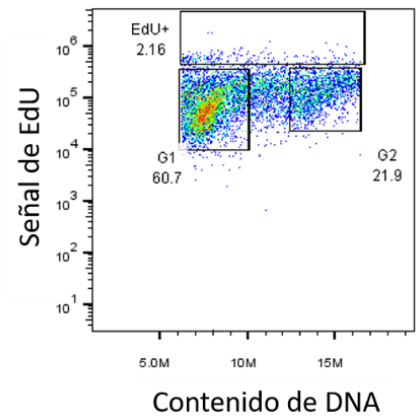
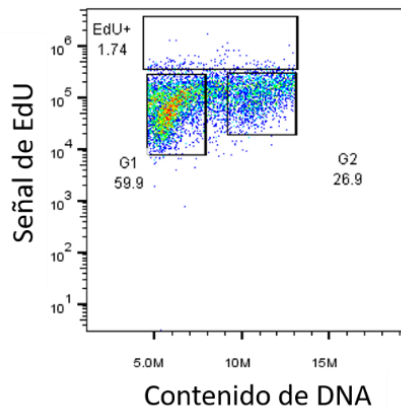
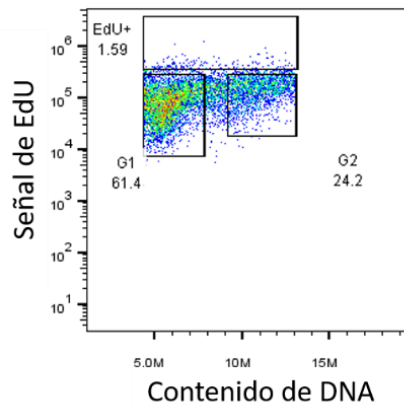
Experimento: **Glu 18h**



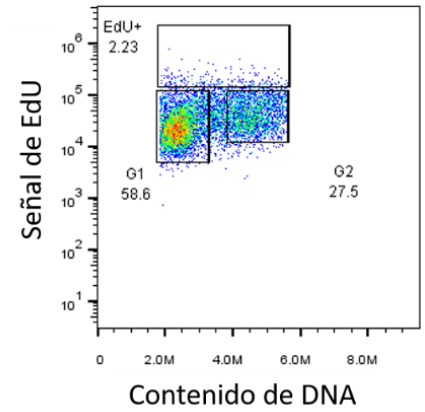
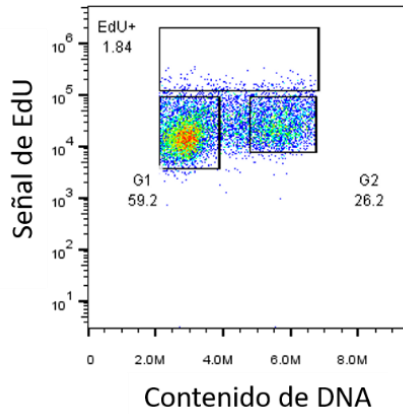
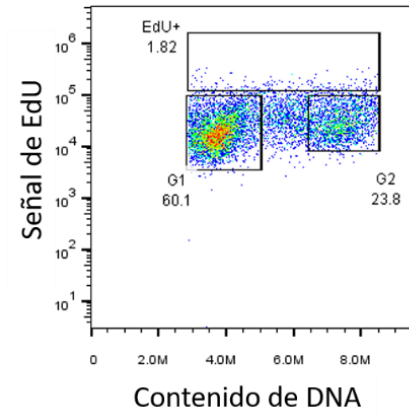
Experimento: **Glucosa 24h**

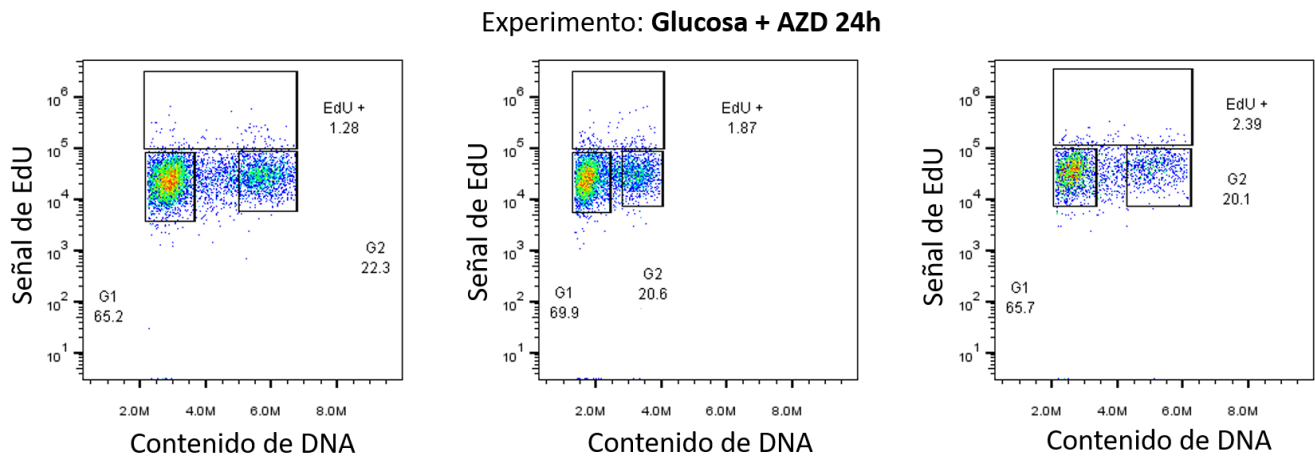


Experimento: **Glu + AZD 9h**



Experimento: **Glu + AZD 18h**





## 10. Referencias

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: Basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Ahmad, Z., Magyar, Z., Bögre, L., & Papdi, C. (2019). Cell cycle control by the target of rapamycin signalling pathway in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2275-2284. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz140>
- Aylett, C. H. S., Sauer, E., Imseng, S., Boehringer, D., Hall, M. N., Ban, N., & Maier, T. (2015). Architecture of human mTOR complex 1. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aaa3870>
- Baíza, A. M., Vázquez-Ramos, J. M., & Sánchez de Jiménez, E. (1989). DNA Synthesis and Cell Division in Embryonic Maize Tissues during Germination. *Journal of Plant Physiology*, 135(4), 416-421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5)

- Belfield, S., & Brown, C. (2008, mayo 29). *Field crop manual: Maize—A guide to upland production in Cambodia*. ACIAR - Australian Centre for International Agricultural Research. <https://www.aciar.gov.au/node/9381>
- Bizet, F., Hummel, I., & Bogeat-Triboulot, M.-B. (2015). Length and activity of the root apical meristem revealed in vivo by infrared imaging. *Journal of Experimental Botany*, 66(5), 1387-1395. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru488>
- Brauneis, A. (2015, octubre). *Flow Cytometry Animation*. StarCellBio. [https://www.youtube.com/watch?list=PLZhxzzyMIQIHhQ2TOGm3HNLA04ZsTmOLW&v=EQXPJ7eeesQ&feature=emb\\_title](https://www.youtube.com/watch?list=PLZhxzzyMIQIHhQ2TOGm3HNLA04ZsTmOLW&v=EQXPJ7eeesQ&feature=emb_title)
- Bushnell, T. (2018, febrero). How to Perform Doublet Discrimination In Flow Cytometry. *Excyte. Expert Cytometry*. <https://expert.cheekyscientist.com/how-to-perform-doublet-discrimination-in-flow-cytometry/>
- Caldana, C., Martins, M. C. M., Mubeen, U., & Urrea-Castellanos, R. (2019). The magic «hammer» of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 70(8). <https://doi.org/10.1093/jxb/ery459>
- Chen, G.-H., Liu, M.-J., Xiong, Y., Sheen, J., & Wu, S.-H. (2018). TOR and RPS6 transmit light signals to enhance protein translation in deetioliating *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(50), 12823-12828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809526115>
- Dante, R. A., Sabelli, P. A., Nguyen, H. N., Leiva-Neto, J. T., Tao, Y., Lowe, K. S., Hoerster, G. J., Gordon-Kamm, W. J., Jung, R., & Larkins, B. A. (2014). Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm:

- Evidence for differential expression and functional specialization. *Planta*, 239(2), 493-509. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1990-1>
- Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2003). The Plant Cell Cycle. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 235-264. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134836>
- Doebley, J. (2004). The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 37-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>
- Doležel, J., & Bartoš, J. (2005). Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95(1), 99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233-2244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- Flores-Sánchez, J. (2019). *Efecto de la vía Glucosa-ZmTOR en la germinación de maíz* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/mayo/0788243/Index.html>
- Garza-Aguilar, S. M., Sánchez-Camargo, V. A., Godínez-Palma, S. K., & Lara-Núñez, A. (2014). Avances recientes en el estudio del ciclo celular en plantas. *Revista de Educación Bioquímica*, 33(2).
- Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., & Loewith, R. (2016). TORC2 Structure and Function. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(6), 532-545. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.001>
- Hoffman, R. A. (2009). Pulse Width for Particle Sizing. *Current Protocols in Cytometry*, 50(1). <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0123s50>

- Inagaki, S., & Umeda, M. (2011). Chapter Seven—Cell-Cycle Control and Plant Development. En K. W. Jeon (Ed.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 291, pp. 227-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386035-4.00007-0>
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2012). *Concepts of Genetics* (10th Edition). Pearson Education. <https://www.pearson.com/us/higher-education/program/Klug-Concepts-of-Genetics-Plus-Mastering-Genetics-with-Pearson-e-Text-Access-Card-Package-12th-Edition/PGM1226214.html>
- Kotogány, E., Dudits, D., Horváth, G. V., & Ayaydin, F. (2010). A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-5>
- Lara-Núñez, A., García-Ayala, B. B., Garza-Aguilar, S. M., Flores-Sánchez, J., Sánchez-Camargo, V. A., Bravo-Alberto, C. E., Vázquez-Santana, S., & Vázquez-Ramos, J. M. (2017). Glucose and sucrose differentially modify cell proliferation in maize during germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 113, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.01.018>
- Lastdrager, J., Hanson, J., & Smeekens, S. (2014). Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 799-807. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert474>
- Lee, T.-J., Pascuzzi, P. E., Settlege, S. B., Shultz, R. W., Tanurdzic, M., Rabinowicz, P. D., Menges, M., Zheng, P., Main, D., Murray, J. A. H., Sosinski, B., Allen, G. C., Martienssen, R. A., Hanley-Bowdoin, L., Vaughn, M. W., & Thompson,

- W. F. (2010). Arabidopsis thaliana Chromosome 4 Replicates in Two Phases That Correlate with Chromatin State. *PLoS Genetics*, 6(6), e1000982. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000982>
- Leene, J. V., Han, C., Gadeyne, A., Eeckhout, D., Matthijs, C., Cannoot, B., Winne, N. D., Persiau, G., Slijke, E. V. D., Cotte, B. V. de, Stes, E., Bel, M. V., Storme, V., Impens, F., Gevaert, K., Vandepoele, K., Smet, I. D., & Jaeger, G. D. (2019). Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nature Plants*, 5(3), 316-327. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>
- Leiboff, S., Li, X., Hu, H.-C., Todt, N., Yang, J., Li, X., Yu, X., Muehlbauer, G. J., Timmermans, M. C. P., Yu, J., Schnable, P. S., & Scanlon, M. J. (2015). Genetic control of morphometric diversity in the maize shoot apical meristem. *Nature Communications*, 6(1), 8974. <https://doi.org/10.1038/ncomms9974>
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: One drug, many effects. *Cell metabolism*, 19(3), 373-379. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., & Xiong, Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), 2765-2770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114>
- López-López, J. M. (2018). *Influencia de mTOR y glucosa sobre el ciclo celular en maíz durante la germinación* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0780620/Index.html>

- Maegawa, K., Takii, R., Ushimaru, T., & Kozaki, A. (2015). Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(5), 2019-2030. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1056-0>
- Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination—Emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00233>
- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Nukarinen, E., Nägele, T., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Mair, A., Landgraf, R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W., & Weckwerth, W. (2016). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Scientific Reports*, 6(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/srep31697>
- Ozbingol, N., Corbineau, F., Groot, S. P. C., Bino, R. J., & Come, D. (1999). Activation of the cell cycle in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during osmoconditioning as related to temperature and oxygen. *Annals of Botany*. [http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=472959598A04811FA23CD63D25DC9FC6?request\\_locale=en&recordID=US201302938319&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=](http://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=472959598A04811FA23CD63D25DC9FC6?request_locale=en&recordID=US201302938319&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&centerString=&enableField=)



- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. En A. H. Schönthal, *Checkpoint Controls and Cancer* (Vol. 281, pp. 301-312). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, 1(3), 1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Rodriguez, M., Parola, R., Andreola, S., Pereyra, C., & Martínez-Noël, G. (2019). TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model? *Plant Science*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110220>
- Romero-Sánchez, D. I. (2019). *Inmunolocalización de marcadores del ciclo celular durante la germinación del maíz* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0794430/Index.html>
- Sanchez, M. d. I. P., Gurusinghe, S. H., Bradford, K. J., & Vázquez-Ramos, J. M. (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany*, 56(412), 515-523. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri029>
- Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., & Ryabova, L. A. (2017). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO Journal*, 36(7), 886-903. <https://doi.org/10.15252/emj.201694816>

- Scott, M. P., & Emery, M. (2016). Maize: Overview. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00022-6>
- Shi, L., Wu, Y., & Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: Conservation and innovation. *Development*, 145(13), dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>
- Strable, J., & Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Vázquez-Ramos, J. M., & Sánchez, M. de la P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research*, 13(2), 113-130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>
- Vela, E. (2019). Cultivos mesoamericanos. Las especies que México dio al mundo. *Arqueología Mexicana*, 84, 42-45.
- Vincent, P. L. D. (2012). *Zea Mays (Maize, Corn)*. En eLS. *John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003687.pub2>
- Xiong, F., Dong, P., Liu, M., Xie, G., Wang, K., Zhuo, F., Feng, L., Yang, L., Li, Z., & Ren, M. (2016). Tomato FK506 Binding Protein 12KD (FKBP12) Mediates the Interaction between Rapamycin and Target of Rapamycin (TOR). *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01746>
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose–TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), 181-186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>

Xiong, Y., & Sheen, J. (2012). Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2836-2842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.300749>

Xiong, Y., & Sheen, J. (2014). The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *Plant Physiology*, 164(2), 499-512. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229948>