



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

---

Instituto de Investigaciones Químico  
Biológicas

Crecimiento de los cultivos celulares de  
tabaco NT-1 por insulina a través de la ruta  
de señalización PI3K/TOR

TESIS

Para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q. F. B. Rocio Peña Correa

Asesora:

D. C. Elda María Beltrán Peña

Morelia, Michoacán; México. Agosto de 2011

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I.- ANTECEDENTES</b>	2
1.1 Transducción de señales	2
1.2 La insulina, hormona de mamíferos	2
1.3 Rutas de señalización disparadas por la insulina en los mamíferos	3
1.4 Cascada de señales PI3K/TOR en mamíferos	5
1.5 Regulación del crecimiento en plantas	8
1.6 Componentes de la cascada PI3K/TOR en plantas	10
1.7 Crecimiento celular	13
1.8 El ciclo celular	15
1.9 El ciclo celular en plantas	17
1.9.1 Maquinaria del ciclo celular de las plantas	17
1.9.2 Regulación de la transición G1/S en plantas	19
1.9.3 Transición G2/M en vegetales	20
1.9.4 Citocinesis	20
1.10 Factores de transcripción E2F en plantas	21
1.11 La insulina en plantas	22
<b>II.- MODELO DE ESTUDIO</b>	23
2.1 Origen de la línea TBY-2	23
2.2 Características principales de los cultivos TBY-2	24
2.3 Crecimiento de los cultivos TBY-2 y NT-1	24
2.4 Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares	27
2.5 Requerimientos hormonales generales de los cultivos celulares vegetales	27
2.6 Primeros estudios realizados con los cultivos TBY-2	28

	<b>Página</b>
<b>III.- JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>IV.- HIPÓTESIS</b>	29
<b>V.- OBJETIVO GENERAL</b>	30
<b>VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	30
<b>VII.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
7.1 Estrategia experimental general	31
7.2 Mantenimiento de la línea celular de <i>Nicotiana tabacum</i> NT-1	31
7.3 Preparación del inóculo	32
7.4 Cinéticas de crecimiento	32
7.5 Determinación del peso seco	33
7.6 Número de células	33
7.7 Índice mitótico (IM)	34
7.8 Tamaño celular	34
7.9 Ensayo de viabilidad	34
7.10 Obtención de núcleos y determinación del contenido de DNA	35
7.11 Extracción de RNA	35
7.12 RT-PCR	36
7.13 Análisis de datos	38
<b>VIII.- RESULTADOS</b>	39
8.1 Cinética de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina	39
8.2 Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 en la fase logarítmica	40
8.3 Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los cultivos suplementados con insulina	42

	<b>Página</b>
8.4 Efecto del LY294002 sobre el crecimiento de los cultivos suplementados con insulina	45
8.5 Efecto del inhibidor LY294002 y de la insulina sobre la viabilidad celular	48
8.6 Efecto de la insulina sobre el contenido de DNA y la expresión de genes del ciclo celular en los cultivos celulares NT-1	49
<b>IX.- DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
9.1 Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1	53
9.2 Efecto de la insulina sobre el crecimiento	55
9.3 La insulina estimula el crecimiento de los cultivos celulares NT-1 a través de la cascada PI3K/TOR	56
9.4 Efectos de la inhibición de la cinasa PI3K	58
9.5 Participación de la insulina sobre la regulación de genes del ciclo celular y la endoreduplicación	59
<b>X.- CONCLUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>XI.- PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>XII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>63</b>
<b>XIII.- ANEXOS</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Encendido de las cascadas de transducción de señales en respuesta a la insulina	4
<b>Figura 2.</b> Ruta de señalización de mTOR en las células de mamíferos	7
<b>Figura 3.</b> Rutas que controlan el tamaño de los órganos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
<b>Figura 4.</b> El ciclo celular	16
<b>Figura 5.</b> Reguladores del ciclo celular vegetal	19
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de células TBY-2, morfología y frecuencia de la división celular	25
<b>Figura 7.</b> Crecimiento, índice mitótico y morfología de las células NT-1	26
<b>Figura 8.</b> Efecto de la insulina sobre el crecimiento de las células de tabaco en cultivos en suspensión	40
<b>Figura 9.</b> Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos de tabaco en la fase logarítmica	41
<b>Figura 10.</b> Efecto de la insulina sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 en la fase logarítmica	42
<b>Figura 11.</b> Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento inducido por la insulina en los cultivos NT-1	43
<b>Figura 12.</b> Efecto de la rapamicina sobre el tamaño celular de los cultivos de tabaco suplementados con I 1.23 en la fase logarítmica	44
<b>Figura 13.</b> Efecto de la rapamicina sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 12.3 en la fase logarítmica	45
<b>Figura 14.</b> Efecto del LY294002 sobre el crecimiento inducido por la insulina en las células de tabaco NT-1	46
<b>Figura 15.</b> Efecto del LY294002 sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 1.23 en la fase logarítmica	47
<b>Figura 16.</b> Efecto del LY294002 sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 12.3 en la fase logarítmica	48

	<b>Página</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto de la insulina y el LY294002 sobre la viabilidad de las células NT-1	49
<b>Figura 18.</b> Efecto de la insulina y los inhibidores LY294002 y rapamicina sobre el contenido de DNA nuclear de las células NT-1 en suspensión	50
<b>Figura 19.</b> Efecto de la insulina sobre la expresión de genes del ciclo celular	51
<b>Figura 20.</b> Citometría de flujo de los núcleos de células tratadas con I 12.3 y LY294002	52

---

## RESUMEN

La insulina además de regular los niveles de glucosa en mamíferos, controla en metazoarios el crecimiento, desarrollo, longevidad y respuestas de estrés entre otros procesos. También se ha demostrado que la insulina y los factores de crecimiento parecidos a la insulina disparan la activación de cascadas de señalización como la PI3K/mTOR, que regula el crecimiento en respuesta a niveles energéticos y nutritivos, a través de la síntesis de proteínas. Además, se ha reportado que esta ruta estimula la transición del ciclo celular G1/S al promover la síntesis de la ciclina D. Varios participantes de dicha cascada se han identificado en plantas y diversos estudios sugieren que la ruta PI3K/TOR podría regular el crecimiento vegetal de forma similar al de los mamíferos. Por otra parte, desde el descubrimiento de la insulina en mamíferos se han realizado varios estudios que muestran la presencia de sustancias similares a la insulina en plantas. Asimismo, se ha demostrado que la insulina promueve la germinación y el crecimiento en maíz a través de la activación de la cascada de señalización PI3K/TOR. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar de qué forma afecta la insulina el crecimiento de los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* NT-1, evaluar el tipo de crecimiento estimulado y la activación de la ruta PI3K/TOR. Los resultados obtenidos mostraron que 1.23 nM de insulina promueve el crecimiento por proliferación celular a través de la activación de la cinasa PI3K, mientras que la concentración de 12.3 nM podría regular negativamente dicha ruta.

---

## I.- ANTECEDENTES

### 1.1 Transducción de señales

Una célula contiene un elaborado sistema de proteínas que la habilitan para responder a señales de otras células. El sistema incluye receptores, cinasas, fosfatasa, proteínas de unión a GTP y una gran cantidad de componentes intracelulares que permiten la señalización. Las células continuamente se adaptan para responder a las señales extracelulares mediante sistemas de redes complejas (Alberts et al., 2008).

En organismos multicelulares la célula está expuesta a una gran cantidad de señales diferentes de su ambiente que pueden actuar en múltiples combinaciones. La célula por lo tanto, debe responder a este desconcierto selectivamente de acuerdo a sus características adquiridas a través de la especialización celular progresiva en el curso de su desarrollo. La vía específica por la cual una célula reacciona a su ambiente varía de acuerdo al grupo de receptores que posee, a través de los cuales detecta un subgrupo particular de señales disponibles. La respuesta dependerá de la maquinaria intracelular mediante la cual integra e interpreta la información que recibe. Así, una sola molécula de señalización frecuentemente tiene efectos diferentes en células blanco distintas. Los procesos celulares complejos tales como la supervivencia y la proliferación, son generalmente estimulados por combinaciones específicas de señales más que por una señal única. En particular, algunos componentes en las cascadas de señalización funcionan como dispositivos de integración a múltiples entradas de señalización, produciendo respuestas reguladas para alcanzar el efecto biológico deseado (Alberts et al., 2008).

### 1.2 La insulina, hormona de mamíferos

En metazoarios las hormonas se sintetizan en tejidos específicos que se conocen como glándulas endocrinas y se segregan directamente al torrente sanguíneo para transmitir y controlar la actividad de las células diana. Las hormonas suelen estimular actividades metabólicas en tejidos situados a distancia del órgano secretor, y son activas a concentraciones extraordinariamente bajas del orden de micro a picomoles (Mathews et al., 2002).

---

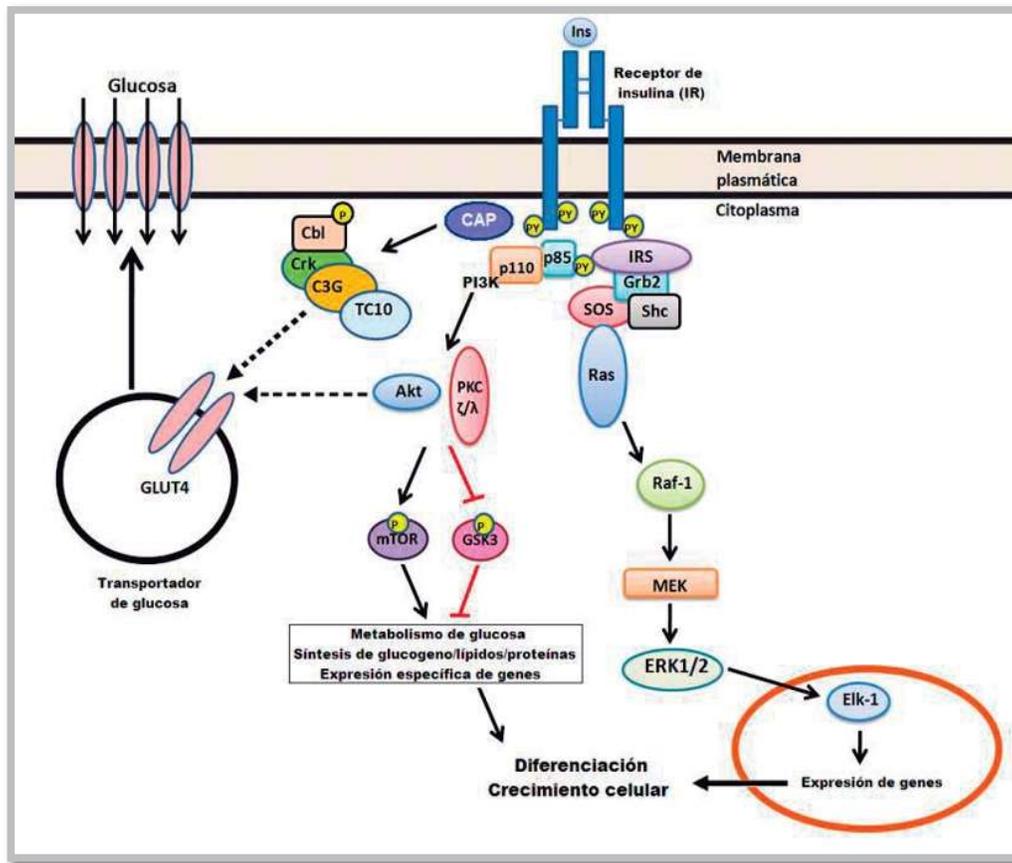
Tal es el caso de la insulina, que es una proteína de 5.8 kDa, se sintetiza en las células  $\beta$  del páncreas en respuesta a altos niveles de glucosa sanguínea. La forma más sencilla de describir las diversas acciones de la insulina es que señala el estado de ingesta y por lo tanto impulsa: (1) la captación de sustratos combustibles en algunas células, (2) el almacenamiento de combustibles (lípidos y glucógeno) y (3) la biosíntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) (Mathews et al., 2002). Los efectos específicos de la insulina consisten en el aumento en la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, la activación de la glucólisis en el hígado, el aumento de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado y tejido adiposo, la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado, el aumento de la síntesis de glucógeno en el hígado y el músculo, el incremento en la captación de aminoácidos con la consiguiente activación de la síntesis de proteínas musculares y la inhibición de la degradación proteica. Debido a estos impulsos en la biosíntesis es apropiado considerar a la insulina como una hormona del crecimiento (Saltiel y Kahn, 2001). El mecanismo por el cual la insulina estimula la captación de glucosa en las células musculares y adiposas es mediante la translocación del transportador de glucosa Glut4 de una poza a la membrana plasmática (Chang et al., 2004).

### **1.3 Rutas de señalización disparadas por la insulina en los mamíferos**

La señalización de la insulina se lleva a cabo a través del receptor de la insulina (IR), el cual fosforila a sustratos intracelulares que incluyen: a la familia de los sustratos del receptor de la insulina (IRS-1 al 4); las proteínas Gab-1 (proteína de unión 1 asociada a GRB2); Cbl (protooncogen); APS (proteína adaptadora con dominios PH y SH2) e isoformas de Shc (proteína con dominios de homología Src). Una vez fosforiladas las proteínas antes mencionadas, interactúan con una serie de moléculas efectoras o adaptadoras que presentan dominios de homología 2 Src (SH2), de esta manera se activan diferentes cascadas de señalización río abajo (Fig. 1) (Chang et al., 2004; Saltiel y Kahn, 2001).

Una de las rutas de señalización de la insulina comprende la activación del IR, el cual estimula la fosforilación de Cbl que se asocia con la proteína adaptadora de Cbl (CAP). Las proteínas Cbl-CAP se translocan a la membrana plasmática donde forman

un complejo con las proteínas C3G y TC10. Una vez activa TC10 proporciona una señal secundaria al transportador de glucosa Glut4 (Saltiel y Kahn, 2001).



**Figura 1. Encendido de las cascadas de transducción de señales en respuesta a la insulina.** El receptor de insulina es una tirosina cinasa que se autofosforila, la cual cataliza la posterior fosforilación de proteínas de la familia IRS, Shc y Cbl. Estas proteínas interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, lo que resulta en el encendido de diversas rutas de señalización, incluyendo la activación de PI3K y de las cinasas río abajo dependientes de PIP3, Ras en la cascada de las MAPK, y Cbl/CAP para la activación de TC10. Estas rutas, actúan en una manera concertada para coordinar la regulación del tráfico vesicular, síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas y expresión de genes que resultan en la regulación del metabolismo de glucosa, lípidos y de proteínas. Las flechas representan activación, las barras inhibición y las líneas discontinuas una relación que aún no ha sido descrita completamente (Modificado de Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Otra ruta activada por acción de la insulina es a través de la cinasa del 3 fosfatidilinositol (PI3K), la cual se enciende cuando el IRS es fosforilado y permite el anclaje de PI3K cerca de la membrana plasmática. La activación de PI3K puede

---

transmitir múltiples señales mediante el incremento en la concentración del fosfatidilinositol-3, 4, 5- trifosfato (PIP3) en la membrana plasmática, para que se recluten varias enzimas como la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1) que fosforila y activa a Akt/PKB (Chang et al., 2004).

La insulina también incrementa la síntesis de proteínas (esta ruta será descrita más adelante) a través de la activación de la cinasa blanco de la rapamicina (mTOR) (Saltiel y Kahn, 2001). Además, mTOR regula una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales, tales como el crecimiento celular y supervivencia integrando señales intracelulares y extracelulares que incluyen a factores de crecimiento, nutrientes, niveles de energía y estrés celular (Fig. 1) (Yang y Guan, 2007).

Finalmente, la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es estimulada por insulina mediante la fosforilación de IRS que interactúa con la proteína adaptadora Grb2, la cual se une con la proteína de intercambio SOS en la membrana plasmática para la activación de Ras, que opera como un “interruptor” molecular a través de la activación de Raf, MEK (MAPKK) y ERK (MAPK). Una vez que ERK se activa, puede trasladarse al núcleo donde cataliza la fosforilación de factores de transcripción, iniciando un programa que dirige la proliferación y diferenciación celular (Fig. 1) (Saltiel y Kahn, 2001).

#### **1.4 Cascada de señales PI3K/TOR en mamíferos**

El receptor de la insulina es una cinasa tetramérica transmembranal formada por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ . La insulina y los factores de crecimiento tipo insulina (IGF), son capaces de activar la ruta PI3K/mTOR uniéndose al receptor para provocar un cambio conformacional que incrementa su actividad de cinasa, y fosforila así al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) (Haselbacher et al., 1979). La proteína IRS-1 interactúa con la cinasa PI3K y permite la fosforilación del lípido de membrana fosfatidilinositol-4, 5- difosfato (PIP2), convirtiéndolo en fosfatidilinositol-3, 4, 5- trifosfato (PIP3). El PIP3 en altas concentraciones actúa como segundo mensajero al proporcionar la señal para que se recluten hacia la membrana plasmática las proteínas cinasas: PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de 3 fosfoinositol) y Akt también llamada

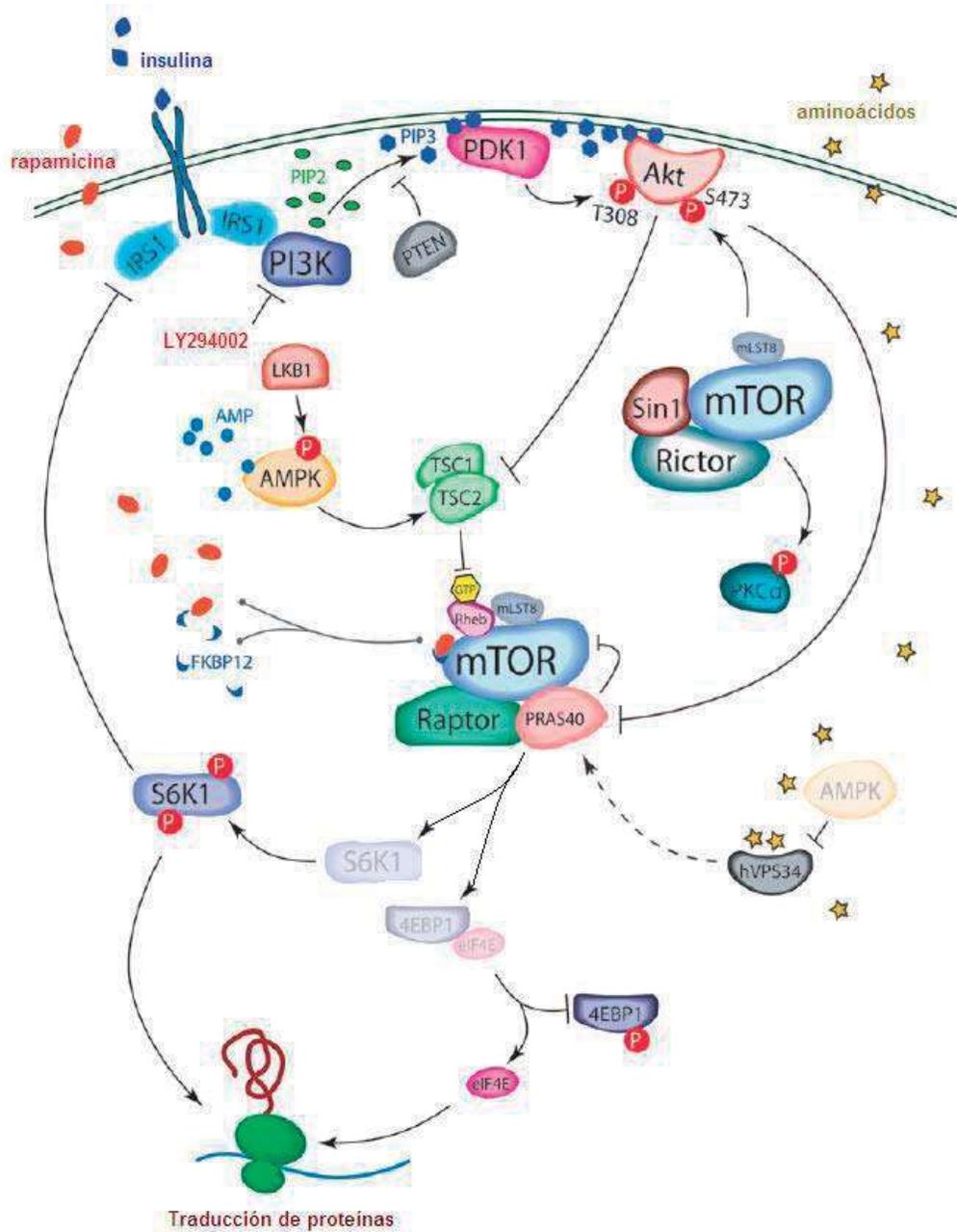
---

PKB (proteína cinasa B) a través de su dominio PH (homología pleckstrina) (Fig. 2) (Saltiel y Kahn, 2001; Jastrzebski et al., 2007; Yang y Guan, 2007).

Posteriormente, Akt fosforila en múltiples sitios a la proteína 2 del complejo de esclerosis tuberosa (TSC2), que en condiciones basales se encuentra unido a TSC1 (Potter et al., 2002; Inoki et al., 2002). TSC2 presenta actividad de GAP (proteína activadora de GTPasa) sobre Rheb (una GTPasa pequeña homóloga de Ras enriquecida en cerebro), transformándola de su forma activa (unida a GTP) a la inactiva (unida a GDP), siendo así TSC2 un inhibidor de Rheb (Tee et al., 2003). Por lo tanto, al desacoplar el complejo TSC1/2 se establece la interacción de Rheb en su forma activa con el complejo mTORC1 que estimula la actividad de cinasa de mTOR. mTORC1 está formado por mTOR, Raptor, PRAS40 y mLST8, es sensible a la rapamicina y es el encargado de integrar señales de crecimiento y metabolismo (Fig. 2) (Virgilio y Loewith, 2006; Ma y Blenis, 2009; Loewith et al., 2002).

Los blancos de la cinasa mTOR son: 1) la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K1) que se encarga de fosforilar a la proteína S6 de la subunidad 40S del ribosoma. Los ribosomas fosforilados en S6 reclutan a mRNAs que codifican para los componentes del aparato traduccional como las proteínas ribosomales y los factores de elongación (Jefferies et al., 1997) y 2) la proteína de unión al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP1), la cual al ser fosforilada libera al factor de inicio de la traducción (eIF4E) y permite la formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F (formado por eIF4A, eIF4E y eIF4G). Las actividades de los dos blancos de mTOR promueven un incremento en la síntesis de proteínas que se relaciona con un efecto positivo sobre el crecimiento celular (Fig. 2) (Schalm et al., 2003).

La ruta PI3K/mTOR además de activarse por señales extracelulares como la insulina e IGF también recibe señales intracelulares para su activación o inhibición, de acuerdo al nivel energético y nutritivo (aminoácidos) (Jastrzebski et al., 2007). Debido a que la biogénesis ribosomal y la traducción de proteínas son los procesos principales que consumen gran cantidad de energía celular, mTORC1 debe ser capaz de percibir los niveles de ATP y detener la traducción de proteínas cuando sea necesario. Una proteína implicada en estos procesos es la cinasa activada por AMP (AMPK) que monitorea los niveles de AMP/ATP (Yang y Guan, 2007).



**Figura 2. Ruta de señalización de mTOR en las células de mamíferos.** A través de TSC1/2-Rheb, mTORC1 integra señales de niveles de energía celular y factores de crecimiento para regular la traducción de proteínas a través de la fosforilación de S6K1 y 4EBP1. S6K1 fosforilado (activo) inhibe la función de IRS1 y así atenúa la señalización de insulina/PI3K. El complejo mTORC2 incluye a mTOR, Rictor, Sin1 y mLST8 y controla la estructura y supervivencia celular a través de la regulación de PKC $\alpha$  y Akt; la regulación río arriba de mTORC2 se desconoce. Las flechas representan activación, las barras inhibición y las líneas discontinuas una relación que aún no ha sido descrita completamente (Modificado de Yang y Guan, 2007).

---

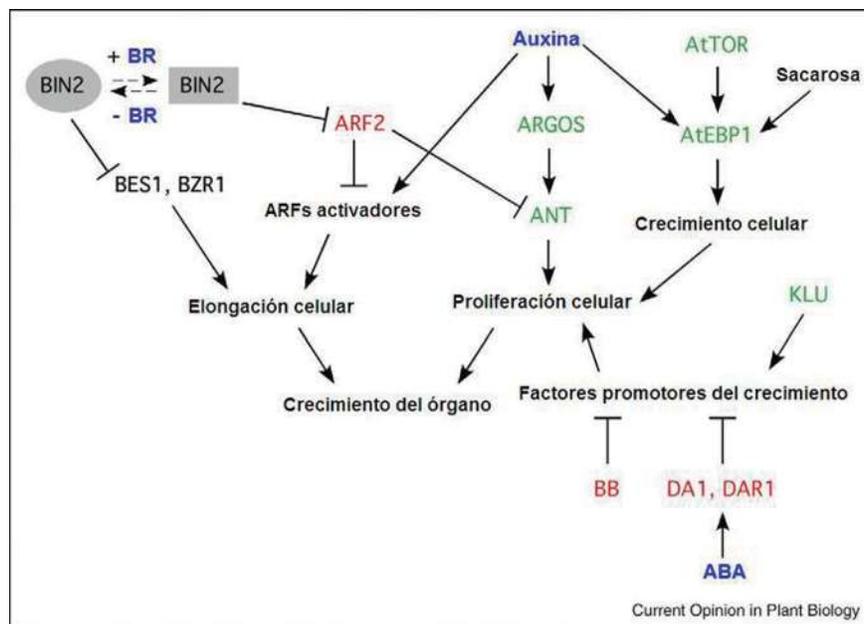
Cuando el AMP se incrementa por estrés energético, este se une a la AMPK activándola para fosforilar a TSC2 y estimular su actividad GAP hacia Rheb, de tal forma que desregula a mTORC1 y promueve la desfosforilación de S6K1 y 4EBP1 (Inoki et al., 2003). Por otro lado, se ha encontrado que la cinasa de lípidos perteneciente a la clase III de PI3K (hVPS34) es activada por la estimulación con aminoácidos e inhibida por AMPK, y ha sido relacionada con la activación de S6K1, lo cual sugiere una función importante de la percepción de aminoácidos en la señalización de mTORC1 (Fig. 2) (Byfield et al., 2005; Nobukuni et al., 2005).

Como se observa en la Fig. 2, la cascada de señalización PI3K/mTOR se ha establecido con el uso de inhibidores de algunos de sus componentes como: el LY294002 y la rapamicina. El LY294002 inhibe a la cinasa PI3K al enlazarse directamente a la proteína bloqueando su actividad (Vlahos et al., 1994), mientras que la rapamicina, macrólido segregado por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* inhibe la actividad de mTOR al unirse a la proteína de unión al inmunosupresor FK506 (FKBP12) formando un complejo ternario con mTOR (rapamicina-FKBP12-mTOR) que bloquea la fosforilación de los blancos de mTOR: S6K1 y 4EBP1. Inicialmente la rapamicina se identificó como un poderoso antifúngico (Vezina et al., 1975), sin embargo, después se demostró que presentaba propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas, por lo cual se ha utilizado ampliamente en trasplantes de órganos y quimioterapia para sarcomas (Yang y Guan, 2007).

### 1.5 Regulación del crecimiento en plantas

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado varias proteínas que promueven o restringen el crecimiento, sin embargo, los genes que participan como reguladores clave del tamaño de los órganos pertenecen a rutas independientes (Fig. 3) (Krizek, 2009). Entre los genes promotores del crecimiento se encuentra *ARGOS* (gen regulado por auxinas), que actúa río arriba de *AINTEGUMENTA* (*ANT*) un miembro de la familia de factores de transcripción AP2/ERF. *ARGOS* y *ANT* presentan un efecto positivo sobre el crecimiento de la planta, sin embargo, la expresión de *ATN* es regulada negativamente por *ARF2* (factor de respuesta a auxina). *KLUH* (*KLU*) codifica para la monooxigenasa del citocromo P450 y funciona como un promotor del crecimiento atípico, debido a que la expresión de *KLU* no se relaciona estrictamente con regiones de

la planta en proliferación (meristemos), sino que se expresa en la base y periferia de los pétalos. Se ha sugerido que KLU probablemente actúa generando señales móviles que estimulan el crecimiento; una hipótesis es que la señal dependiente de KLU participaría en un mecanismo de control del crecimiento para regular el tamaño final del órgano (Krizek, 2009; Harashima y Schnittger, 2010). Otro promotor del crecimiento es la proteína de unión al receptor del factor de crecimiento epidermal ErbB-3 (EBP1) que regula la proliferación celular. La expresión de *EBP1* es sobrerregulada por sacarosa y coregulada con genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis de proteínas, como las proteínas ribosomales y factores de inicio de la traducción. Además, se ha sugerido que dicha proteína puede participar en la misma ruta de señalización que la cinasa TOR (Fig. 3), esta última en plantas regula el crecimiento celular en respuesta a señales ambientales en forma similar al papel de la cinasa TOR en mamíferos (Krizek, 2009).



**Figura 3. Rutas que controlan el tamaño de los órganos en *Arabidopsis thaliana*.** Las auxinas promueven el crecimiento a través de ARGOS y ANT mientras que ARF2 regula negativamente la expresión de ANT. ARF2 es regulado negativamente por BIN2 permitiendo la integración de las rutas de señalización de auxinas y brasinoesteroides (BR). La especificidad del blanco de BIN2 puede ser regulada por BR. KLU promueve el crecimiento, a través de la producción de una nueva señal promotora, mientras que BB, DA1 y DAR1 lo restringen a través de la regulación negativa de factores promotores del crecimiento aún no definidos. AtTOR y AtEBP1 regulan la síntesis de macromoléculas y el crecimiento celular para promover el crecimiento del órgano. Las hormonas vegetales se muestran en azul, las proteínas que promueven el crecimiento en verde y aquellas que lo restringen en rojo (Krizek, 2009).

---

Por otro lado, se conocen varios represores del crecimiento que son proteínas asociadas con la regulación de la actividad proteica por medio de la ubiquitina. Uno de ellos es una ligasa E3 de la ubiquitina BIG BROTHER (BB) que restringe el periodo de proliferación celular dentro de los órganos en desarrollo, probablemente mediando la degradación de los factores que estimulan el crecimiento (Harashima y Schnittger, 2010). Los niveles proteicos de BB son altos en meristemos florales y flores jóvenes, disminuyen durante el desarrollo floral y su expresión no depende de las hormonas vegetales (Krizek, 2009). Finalmente, otro factor que restringe el crecimiento es DA1, un receptor de ubiquitina que une a proteínas mono y poliubiquitinadas. DA1 es un miembro de una pequeña familia de proteínas DAR (relacionadas a DA1), de las cuales al menos DAR1 actúa con DA1 para inhibir el crecimiento y su expresión es sobrerregulada después de la exposición de plántulas al ácido abscísico (ABA) (Fig. 3) (Krizek, 2009; Harashima y Schnittger, 2010).

### **1.6 Componentes de la cascada PI3K/TOR en plantas**

Ortólogos potenciales de varios de los componentes de la cascada de señalización PI3K/TOR como PI3K, PDK1, TOR, S6K y S6 están presentes en las plantas. En *Arabidopsis* se ha identificado un tipo de cinasa PI3K que pertenece a la clase III de la subfamilia de las PI3Ks que tiene como sustrato al fosfatidilinositol produciendo el fosfatidilinositol-3- fosfato (PI3P). El gen *AtPI3K* es esencial para la supervivencia de *Arabidopsis* ya que se ha encontrado que la pérdida en su expresión conduce a la muerte, incluso la sola reducción en su expresión da como resultado un retardo severo en el crecimiento y desarrollo de la planta (Lee et al., 2010). Estudios realizados sobre el crecimiento de los pelos radiculares de *A. thaliana* mostraron que la adición de LY294002 disminuyó su elongación (Lee et al., 2008).

Un homólogo de la proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1) se ha identificado en *Arabidopsis*, y posee un dominio cinasa en el amino terminal y otro dominio PH en el carboxilo terminal semejante a la cinasa PDK1 de mamíferos. Interesantemente, *AtPDK1* revirtió la letalidad en *Saccharomyces cerevisiae* causada por la interrupción del gen que codifica para el homólogo de PDK1 en levadura. PDK1 también interactúa con el ácido fosfatídico (PA), PI3P, PIP2 y PIP3 a través de su

---

dominio PH y es capaz de fosforilar y activar a la cinasa Akt/PKB de humano en presencia de PIP3 (Deak et al., 1999).

En mamíferos se ha descrito un sistema que regula la activación de la cinasa TOR basado en la activación e inactivación de la GTPasa Rheb. Dicho sistema es regulado por el factor de intercambio de nucleótidos guanina TCTP (proteína tumoral controlada traduccionalmente) que promueve la formación de Rheb-GTP, y por el complejo TSC1/TSC2 (proteínas activadoras de GTPasa que producen a Rheb-GDP) (Yang y Guan, 2007). En *A. thaliana* se observó que el silenciamiento de *TCTP* por RNAi retrasó el crecimiento vegetativo, redujo la expansión de las hojas debido a un menor tamaño celular y disminuyó la formación de raíces laterales. Lo anterior posiciona a TCTP como un regulador importante del crecimiento en las plantas controlando la actividad de TOR en forma similar a la descrita en mamíferos, aunque las proteínas homólogas correspondientes a la GTPasa Rheb y al complejo TSC1/2 no se han identificado en plantas (Berkowitz et al., 2008).

En los últimos años, la cinasa TOR de plantas ha sido objeto de una gran cantidad de investigaciones. *A. thaliana* posee un solo gen de esta cinasa que se expresa principalmente en zonas meristemáticas, en embriones y endospermo pero no en las células diferenciadas. La interrupción de *AtTOR* es letal para las plantas debido a que conduce a una detención prematura del desarrollo del endospermo y el embrión (Menand et al., 2002). *AtTOR* está directamente relacionada con el crecimiento de *Arabidopsis*. Se ha reportado que líneas de *AtTOR*-RNAi presentan un crecimiento menor que las plantas silvestres (wt) y de forma contraria un incremento en la expresión de *AtTOR* resultó en plantas de mayor tamaño (Deprost et al., 2007). Como se mencionó en mamíferos, TOR forma parte de dos complejos mTORC1 y mTORC2; en el complejo 1 se encuentra la proteína RAPTOR que actúa como un andamio para facilitar la unión de S6K a TOR (Yang y Guan, 2007; Jastrzebski et al., 2007). Se ha identificado en *A. thaliana* un homólogo de RAPTOR que interactúa con TOR y S6K1, el cual fue capaz de regular la actividad de la S6K1 en respuesta a estrés osmótico. Lo anterior sugiere que RAPTOR podría funcionar como andamio para reclutar sustratos a la cinasa TOR como lo hace en mamíferos (Mahfouz et al., 2006). La cascada de señalización de TOR regula el crecimiento en plantas, sin embargo, la planta modelo *A. thaliana* es insensible al macrólido utilizado ampliamente para inhibir a TOR: la rapamicina. Se encontró que dicha insensibilidad se debía a una secuencia de

---

aminoácidos diferentes en la inmunofilina FKBP12 de *Arabidopsis* en comparación con la de humano y levadura, que impedía la formación del complejo ternario (rapamicina-FKBP12-TOR). La sensibilidad a la rapamicina se restableció en plantas transgénicas de *Arabidopsis* a las cuales se les adicionó el gen *FKBP12* de la levadura (Sormani et al., 2007).

Respecto a la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) localizada río abajo de TOR, se han identificado dos homólogos en *Arabidopsis*, inicialmente llamados ATPK6 y ATPK19, refiriéndose a ellos en investigaciones posteriores como S6K1 y S6K2, con una identidad a la cinasa S6K1 de humano de 52.1 y 51.7 % respectivamente (Mizoguchi et al., 1995; Turck et al., 1998). Se ha sugerido que de estas dos cinasas, S6K2 podría ser el homólogo funcional de la proteína S6K1 de humano debido a su capacidad de fosforilar a la proteína S6 (Turck et al., 1998). Años más tarde, el mismo grupo de trabajo demostró que las fitohormonas auxinas y citocininas, inducían la fosforilación de la proteína ribosomal S6 al incrementar la actividad de S6K y que dicha señal era transmitida a través de la cinasa PI3K (Turck et al., 2004). Más tarde en el 2006, Mahfouz y colaboradores reportaron que la proteína S6K2 se localizaba en el núcleo, mientras que S6K1 se encontraba principalmente en el citoplasma. Lo anterior, sugirió que los dos homólogos de S6K de *Arabidopsis* tienen funciones distintas en las diferentes localizaciones subcelulares, siendo S6K1 el blanco probable de TOR por su localización citoplasmática (Mahfouz et al., 2006). En maíz también se aisló una cinasa de S6 (ZmS6K) que fue capaz de fosforilar a la proteína ribosomal S6 (Reyes de la Cruz et al., 2004). Existen reportes que muestran que en los ejes embrionarios de maíz las auxinas, la insulina y un péptido relacionado a la insulina de *Zea mays* (ZmIGF), promueven la síntesis de proteínas ribosomales, incrementan la fosforilación de la proteína S6 y el reclutamiento de dos mRNAs a los polisomas, que codifican para el factor de inicio de la traducción eIF-iso4E y la proteína S6 (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Beltrán-Peña et al., 2002; Dinkova et al., 2007). Los estudios antes mencionados sugieren la existencia de una ruta de señalización funcional en plantas, involucrada en la regulación de la traducción y el crecimiento, similar a la reportada en mamíferos. Recientemente a la cinasa S6K se le atribuyó un nuevo papel al regular la división y la expansión celular de pétalos y estambres, por medio de la regulación traduccional de los transcritos que codifican para las proteínas PISTILLATA (PI), APETALA3 (AP3) y SUPERMAN (SUP), lo que sugiere que S6K podría participar en una comunicación con

---

los genes involucrados en el diseño floral (Tzeng et al., 2009). Por último, otro blanco de la cinasa TOR en mamíferos es la proteína 4EBP1, de la cual no han sido identificados homólogos en plantas (Browning, 2004).

También en el estudio de la ruta PI3K/TOR en plantas ha sido de gran utilidad el uso de inhibidores para las cinasas PI3K y TOR. En cultivos celulares de *A. thaliana* se observó que la adición de LY294002 revirtió la fosforilación de S6 estimulada por auxinas y citocininas, confirmando así que la señal de las fitohormonas se transmitía a través de PI3K. En forma contraria, se encontró que la rapamicina no inhibió la activación de S6 lo que se atribuyó a su insensibilidad al macrólido (Turck et al., 2004). Sormani y colaboradores en 2007, obtuvieron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que portaban el gen *FKBP12* de levadura que fueron sensibles a rapamicina, consiguiendo con ello obtener una herramienta útil para investigaciones posteriores que involucren la actividad de TOR.

Por otro lado, varios investigadores han elucidado la participación de la insulina, el factor de crecimiento tipo insulina de *Zea mays* (ZmIGF) y las auxinas, a través de la vía de señalización PI3K/TOR en maíz con el uso de la wortmanina y la rapamicina. Encontraron que ambos inhibidores revierten la activación de la proteína S6, inducida por los factores de crecimiento antes mencionados, lo que muestra que el maíz es sensible a rapamicina a diferencia de *Arabidopsis* (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Beltrán-Peña et al., 2002; Reyes de la Cruz et al., 2004; Dinkova et al., 2007; Sotelo et al., 2010).

## **1.7 Crecimiento celular**

El crecimiento es el proceso por el que una célula incrementa su tamaño sintetizando proteínas, membranas, orgánulos y otros componentes que aumentan la masa celular. Los factores clave que regulan el crecimiento son los nutrientes y los factores de crecimiento extracelulares. En una población de células proliferando, el mantenimiento de tamaño celular requiere que una célula duplique su masa durante cada ciclo celular. Para coordinar el aumento de tamaño y la división, las rutas de señalización que controlan independientemente cada proceso deben estar comunicadas

---

para que se lleve a cabo el crecimiento celular y posteriormente la división celular (Morgan, 2007).

El crecimiento y la división están coordinados en las poblaciones de células donde el tamaño celular debe estar inalterado. En contraste, los dos procesos son frecuentemente deslindados en los tejidos donde el tamaño celular cambia. Para producir células largas en algunos tejidos el crecimiento ocurre en ausencia de división celular, mientras que en los embriones las divisiones tempranas se presentan en ausencia del crecimiento, produciendo células más pequeñas en cada división (Morgan, 2007).

En las plantas la proliferación celular se efectúa en los meristemos, estructuras dinámicas que continuamente se dividen y crecen a velocidades diferentes, las cuales se definen durante la embriogénesis. Aunque las plantas son autotróficas, los meristemos podrían ser considerados como heterótrofos debido a que dependen del resto de la planta para el suministro de nutrientes y así sostener el crecimiento. El desarrollo y la morfogénesis de la planta son altamente adaptativos, por lo que la proliferación en los meristemos debe estar integrada completamente a lo largo de la vida de la planta, a pesar de los variados estímulos ambientales y suministro de nutrientes (Robaglia et al., 2004).

El crecimiento y el desarrollo de las plantas son sustentados por la coordinación entre la división, la expansión y la diferenciación celular. El crecimiento vegetal corresponde al incremento en tamaño de los órganos existentes o recién formados y resulta en gran parte del alargamiento celular. En cambio, el desarrollo de la planta es un proceso continuo que comienza durante la embriogénesis con la formación del diseño primario del cuerpo de la planta (raíz y ápice embrionarios) y continúa post-embriónariamente con la producción regular de órganos nuevos (raíces, hojas, ramas y flores) (Perrot-Rechenmann, 2010). La organogénesis requiere la producción controlada de células nuevas dentro de zonas especializadas llamadas meristemos (Gutierrez, 2009). El desarrollo de la planta integra así, la regulación de la proliferación celular y el crecimiento con la expansión y diferenciación celular. La distinción se hace en base a que el crecimiento y la expansión celular corresponden a procesos distintos. Por una parte el crecimiento se refiere al incremento en el tamaño de las células proliferando, el cual forma parte del ciclo celular y coincide con el aumento de ácidos nucleicos totales

---

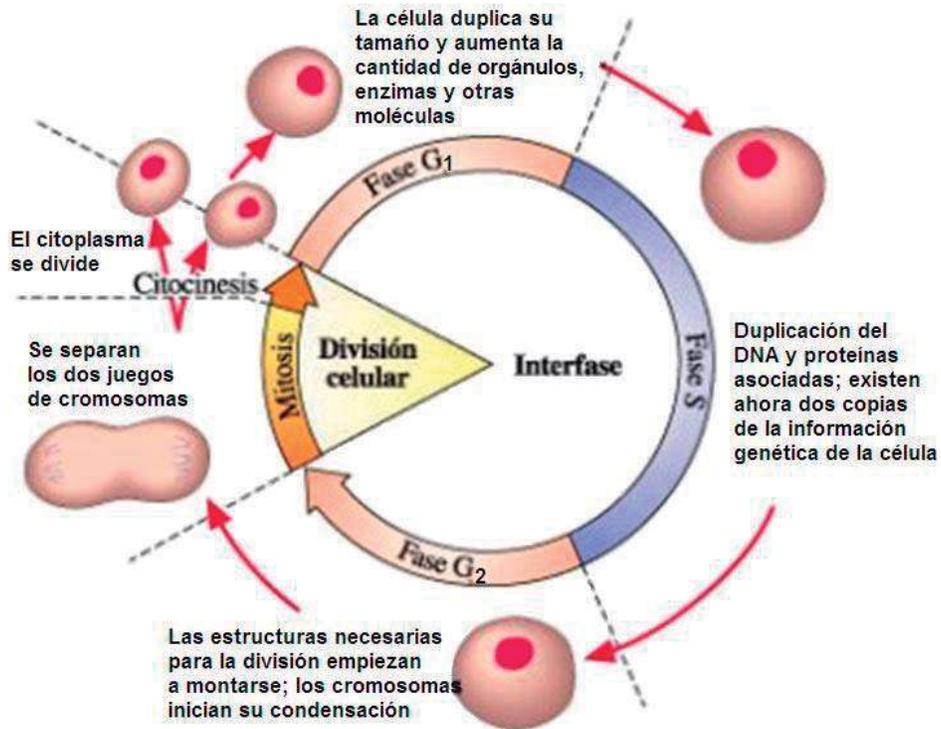
y de proteínas (Perrot-Rechenmann, 2010). En contraste, la expansión es frecuentemente asociada con endoreduplicación, programa bajo el que las células realizan varias rondas de síntesis del DNA sin transcurrir por la mitosis y citocinesis, lo que resulta en un incremento del DNA nuclear. Cabe mencionar que la entrada en un programa endoreduplicativo es señal de una diferenciación celular. En otras ocasiones la expansión está relacionada con un aumento en la vacuolización (Perrot-Rechenmann, 2010; Breuer et al., 2010). La diferenciación celular depende de la progresión a través de un ciclo de división celular diferente; un ejemplo es la formación de raíces laterales a partir de células del periciclo, que se refiere a la promoción de divisiones formativas y a la represión de estas divisiones en células adyacentes a las del primordio de raíz lateral (Harashima y Schnittger, 2010).

### **1.8 El ciclo celular**

El ciclo celular es el periodo que transcurre de una división a la siguiente. Cada célula es el producto de un ciclo celular, el cual comprende la secuencia ordenada de los eventos G1/S/G2/M (Fig. 4) (Lewin, 2001). La interfase se divide en diferentes periodos que son G1/S/G2 y se definen según el tiempo de síntesis del DNA:

- En la fase G1 se sintetizan RNA y proteínas.
- La fase S se define como el tiempo que tarda en replicarse el DNA. Durante esta fase el contenido total de DNA aumenta desde un estado diploide  $2n$  hasta el valor de replicación  $4n$ .
- El periodo desde el final de la fase S hasta el comienzo de la mitosis se llama fase G2 durante el cual la célula presenta dos juegos diploides de cromosomas.

La fase S se denomina así por ser el periodo de síntesis del DNA. G1 y G2 se refieren a los dos “gaps” (espacios) del ciclo celular en los que no existe síntesis de DNA. Durante la interfase se puede observar un aumento del tamaño celular debido al incremento continuo de RNA y proteínas, que contrasta con la discreta duplicación del DNA. El núcleo aumenta su tamaño durante la fase S y la cromatina continua siendo una masa compacta en la cual no se aprecia ningún cambio de estado (Fig. 4) (Lewin, 2001; Farias Escalera et al., 2005).



**Figura 4. El ciclo celular.** La interfase consta de G<sub>1</sub>, S, y G<sub>2</sub> donde la célula invierte más tiempo. En esta parte del ciclo se duplica el DNA de la célula y se sintetizan los componentes necesarios para llevar a cabo la mitosis. En la mitosis, tanto el DNA como los componentes de la célula madre se dividen en partes iguales entre las dos células hijas, para concluir en la citocinesis que es la división del citoplasma ([http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion\\_genetica/ap02\\_ciclo\\_celular.php](http://www.fisicanet.com.ar/biologia/informacion_genetica/ap02_ciclo_celular.php)).

La mitosis segrega un juego diploide de cromosomas para cada célula hija. Los cromosomas individuales se hacen visibles solamente durante este periodo cuando la envoltura nuclear se desintegra y la célula se organiza en torno al huso mitótico. Aparentemente todas las actividades de síntesis se interrumpen durante la mitosis (Lewin, 2001). La mitosis consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. En la profase hay una condensación de la cromatina, aparece el huso mitótico y no se observan los nucléolos, la envoltura nuclear comienza a desintegrarse y los cromosomas migran hacia el plano ecuatorial de la célula (Morgan, 2007). En la metafase los cromosomas se encuentran alineados en el plano ecuatorial de forma independiente unos con otros. En la anafase los cromosomas se dividen por sus centrómeros, separándose las dos cromátidas hermanas que son desplazadas hacia los polos opuestos

---

de la célula. En la telofase, se condensan los cromosomas en cada polo, formándose las envolturas nucleares (Morgan, 2007).

## **1.9 El ciclo celular en plantas**

El ciclo celular en plantas sigue una estrategia básica similar a otros eucariontes, sin embargo varios procesos son únicos de las células vegetales. Cuando las células animales encuentran problemas en el progreso a través de una etapa del ciclo celular se detienen transitoria o permanentemente o mueren. Lo anterior no parece suceder en las plantas, donde las células vegetales eligen salir del ciclo celular e iniciar un programa de diferenciación o entrar a un ciclo celular alternativo como la endoreduplicación (Gutierrez, 2009). Los mecanismos regulatorios desarrollados varían entre las células vegetales y animales, debido a algunas características únicas del ciclo de división celular en plantas, por ejemplo: 1) la citocinesis en plantas es completamente diferente a la de los animales por la necesidad de formar una nueva pared celular entre las dos células vegetales hijas; 2) la organogénesis es un proceso post-embionario, que ocurre en una manera continua a lo largo de la vida de la planta; 3) algunas células en la planta adulta retienen la habilidad para desdiferenciarse y adquirir un estado pluripotencial confiriéndole así una gran plasticidad a la planta (Gutierrez, 2009; Jager et al., 2005).

### **1.9.1 Maquinaria del ciclo celular de las plantas**

#### Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

*A. thaliana* contiene una familia de 12 CDKs clasificadas en grupos de la A a la F. Todos los miembros de esta familia con excepción de C y E participan directamente en las actividades del ciclo celular. La CDKA presenta el motivo típico PSTAIRE y juega un papel fundamental en las progresiones del ciclo celular G1/S y G2/M (Gutierrez, 2009). Por otro lado, CDKB que es considerada una cinasa específica de plantas, es esencial para la transición G2/M y actúa de una manera cooperativa con CDKA para regular dicha transición del ciclo celular (Jager et al., 2005). CDKD y CDKF funcionan como CAKs (cinastas activadoras de CDKs), debido a que fosforilan a

---

las CDKs produciendo un cambio conformacional que les permite reconocer a sus sustratos (Perrot-Rechenmann, 2010).

### Ciclinas

*Arabidopsis* contiene ~30 genes que codifican para diferentes ciclinas clasificadas en cuatro grupos: A, B, D y H. Las ciclinas tipo D (CYCD) funcionan como sensores de las condiciones externas, las cuales están sujetas a una regulación transcripcional por factores promotores del crecimiento como las auxinas, las citocininas y la sacarosa (Gutierrez, 2009). Las CYCD se asocian con CDKA para regular la transición G1/S. Las ciclinas tipo A (CYCA) son importantes desde la fase S hasta la mitosis, mientras que las ciclinas B (CYCB) son críticas para el control de la transición G2/M. Después de la replicación del DNA las ciclinas A y B se asocian con las proteínas CDKA y CDKB (Jager et al., 2005; Perrot-Rechenmann, 2010).

### Inhibidores de CDKs

La actividad de los complejos ciclina/CDK es regulada negativamente por los inhibidores de CDK o proteínas represoras de cinasa dependiente de ciclina (ICK/KRP). De los cuales se conocen a ICK1/KRP1, ICK2/KRP2 y 5 miembros de KRP (del 3 al 7), contienen una caja con alta homología al inhibidor de CDK de humano, la proteína p27. Todos los inhibidores de CDK mencionados anteriormente interactúan con las ciclinas D (Gutierrez, 2009; Harashima y Schnittger, 2010).

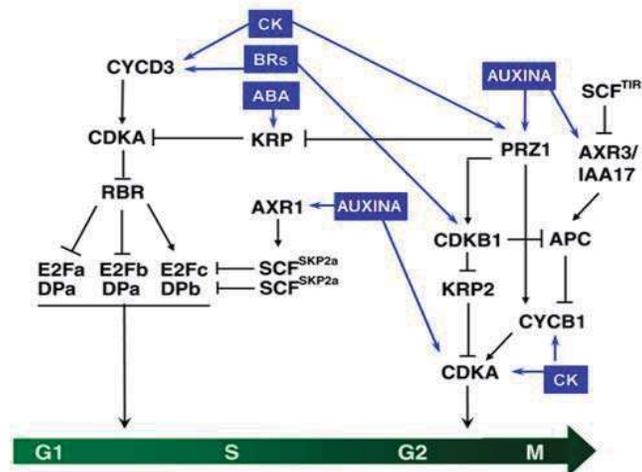
### Factores de transcripción E2Fs

En varias especies de plantas se ha identificado a la proteína RBR (relacionada a retinoblastoma) homóloga a la proteína RB de humano y también a miembros de la familia de los factores de transcripción E2F. *Arabidopsis* contiene seis clases de E2F, clasificados de la “a” a la “f”, y dos compañeros de dimerización DPa y DPb (Gutierrez, 2009). E2Fa, E2Fb y E2Fc forman heterodímeros con DPa y DPb; E2Fd, E2Fe y E2Ff pueden actuar independientemente de las proteínas DP debido a que contienen dos dominios de unión al DNA, de forma diferente a E2Fa-c que solo presentan un dominio (Mariconti et al., 2002). El resto de la maquinaria del ciclo celular es semejante entre plantas y animales.

## 1.9.2 Regulación de la transición G1/S en plantas

Varias hormonas como las citocininas y las auxinas son reguladores importantes en la progresión de la fase G1 y de la transición G1/S ya que regulan positivamente la expresión y/o actividad de CYCD y CDKA (Fig. 5). La cinasa CDKA es la única requerida para esta transición del ciclo celular y forma un complejo con la CYCD; para que dicho complejo se active requiere una fosforilación por parte de CAK. Además, la actividad de CDK está sujeta a una regulación negativa por KRPs cuya expresión es regulada positivamente por el ácido abscísico (ABA) (Fig. 5) (Perrot-Rechenmann, 2010).

El principal blanco del complejo CDKA/CYCD en la fase G1 es la proteína RBR cuya fosforilación conduce a la disociación de los factores de transcripción E2F/DP del complejo RBR/E2F (Fig. 5) (Jager et al., 2005). La proteína E2F y su compañera DP dirigen la transcripción de genes blanco necesarios para la progresión de la fase S. Las rutas reguladas por E2F juegan un papel importante en varios aspectos del desarrollo de la planta. En particular, la transición de células proliferando al ciclo de endoreduplicación así como el reclutamiento hacia diferentes etapas de diferenciación es en gran parte dependiente de la actividad de E2F (Perrot-Rechenmann, 2010; Gutierrez, 2009).



**Figura 5. Reguladores del ciclo celular vegetal.** Las fitohormonas controlan varios componentes reguladores del ciclo celular en diferentes puntos. CK (citocininas), BRs (brasinoesteroides), ABA (ácido abscísico), KRPs (inhibidores de CDKs), PRZ1 (proteína adaptadora transcripcional), AXR1 e AXR3/IAA17 (proteínas de la maquinaria de percepción de las auxinas), SCF<sup>SKP2/TIR1</sup> (ligasa de ubiquitina E3), APC (complejo promotor de la anafase) (Gutierrez, 2009).

---

### 1.9.3 Transición G2/M en vegetales

La CDKA es el principal conductor de esta transición, después de su asociación con las ciclinas tipo A, D y particularmente B. Además de la CDKA esta transición requiere CDKB la cual para su expresión depende de E2F. Ambos complejos CDKA y CDKB/ciclina son activados por una CAK (Fig. 5) y fosforilan varios factores de transcripción específicos de la fase G2 como las proteínas MYB. Estas últimas, interactúan con las cajas activadoras específicas de la fase M (MSA) presentes en los promotores de los genes requeridos para la progresión de la fase M, como los *KNOLLE* que codifican para las sintaxinas de los complejos SNARE (proteína receptora soluble en N-etilmaleimida sensible al factor adaptador) tipo (1) v-SNARE anclados a vesículas y (2) t-SNARE anclados a la membrana blanco, los cuales participan en la formación de la placa celular en la citocinesis (Gutierrez, 2009). Además, la progresión y salida de la mitosis requiere de la degradación de las ciclinas involucradas en esta última transición, a través de la proteólisis dependiente de ubiquitina por medio del complejo promotor de la anafase (APC), este es un paso crítico que conduce a la progresión unidireccional del ciclo celular (Perrot-Rechenmann, 2010). En la transición G2/M también juega un papel importante la señalización de hormonas como las auxinas que promueven la acumulación de CDKA, mientras que en conjunto las citocininas y auxinas regulan negativamente la expresión de los genes *KRP* y positivamente de las *CDKB*, a través de la participación de PRZ1 (proteína adaptadora transcripcional) que probablemente regula la expresión de genes para la división celular (Fig. 5) (Gutierrez, 2009).

### 1.9.4 Citocinesis

La citocinesis en los organismos no fotosintéticos inicia en la parte externa del plano de división, en un proceso en el cual la membrana plasmática se mueva hacia el centro de la célula por medio de un anillo contráctil de filamentos de actina-miosina (Farias Escalera et al., 2005). En cambio, en las células vegetales la citocinesis comienza en el centro del plano de división, un proceso que es ayudado por el fragmoplasto (un arreglo del citoesqueleto que libera y concentra vesículas). La fusión de vesículas en el centro de la célula origina la placa celular que se extiende hacia la periferia de la célula en división, donde finalmente se fusiona con la pared celular preexistente para separar a las dos células hijas (Gutierrez, 2009). Los eventos de fusión

---

---

de vesículas son coordinados por dos arreglos dinámicos del citoesqueleto conformado tanto de microtúbulos como de microfilamentos de actina. El primero forma la banda pre-profase que aparece transitoriamente desde el final de la fase G2 hasta la prometafase y marca la posición del plano de división. El segundo es el fragmoplasto que se forma después de la anafase y está involucrado en el tráfico y la liberación de vesículas en la placa celular (Nagata et al., 1992). Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina participan guiando la expansión de la placa celular hacia la periferia. Por otro lado, el proceso de fusión de las vesículas requiere la presencia de complejos tipo SNARE para la liberación de los materiales transportados (Gutierrez, 2009).

### **1.10 Factores de transcripción E2F en plantas**

La mayoría de los elementos clave en la vía RB/E2F se encuentran conservados a través de la evolución de los organismos multicelulares incluyendo las plantas (Farias Escalera et al., 2005). En *A. thaliana* se han identificado seis factores de transcripción E2F que de acuerdo a sus características se dividen en dos grupos. El primero está formado por: E2Fa, E2Fb y E2Fc que se asocian con proteínas DP, los heterodímeros E2Fa-c/DP pueden reconocer específicamente secuencias TTTCGCGC en el DNA localizadas en los promotores de los genes que participan en la fase S del ciclo celular como: la subunidad PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) de la DNA polimerasa, la polimerasa  $\alpha$  del DNA, algunas ciclinas, etc. Los miembros del segundo grupo E2Fd, E2Fe y E2Ff pueden unirse específicamente a la secuencia TTTCGCGC sin interactuar con DP, inhibiendo la expresión de genes de la fase S dependientes de E2F en *Arabidopsis* por lo que se les considera como reguladores negativos de la transcripción (Mariconti et al., 2002). También se han identificado secuencias E2F funcionales en *Nicotiana tabacum* cuya transcripción fue inducida en células que pasan de la fase G1 a S (Sekine et al., 1999). Además, *AtDPa* y *AtDPb* compañeros de dimerización de estos factores de transcripción han sido identificados en *A. thaliana* predominantemente en las células en división (Magyar et al., 2000).

Dentro del primer grupo de E2F que corresponde a los activadores de la transcripción, se han reportado diferentes funciones en dos de ellos. La sobreexpresión de *AtE2Fb* pero no de *AtE2Fa* estimula la proliferación celular en ausencia de auxina en

---

cultivos de tabaco BY-2, observándose que niveles elevados de E2Fb conducen al acortamiento en la duración del ciclo celular, incremento en el número de células y tamaños celulares extremadamente pequeños. Debido a que en los cultivos carentes de auxina, las células se elongan e incrementan su nivel de ploidía, AtE2Fb inhibe fuertemente las características de un cultivo sin auxina (Magyar et al., 2005).

Por otra parte, recientemente se ha relacionado a la proteína S6K con el complejo RB/E2F al observar que S6K se asocia con RBR1 y E2Fb, regula la localización nuclear de RBR1 y la expresión de genes del ciclo celular dependientes de E2F. En líneas de silenciamiento de S6K se encontró un incremento en la ploidía, lo que se relacionó con un aumento en los niveles del factor de transcripción E2Fb, de su compañero de dimerización DPa y de la cinasa CDKB1 (Henriques et al., 2010).

### **1.11 La insulina en plantas**

A la fecha, numerosos reportes sugieren la presencia de sustancias similares a la insulina presentes en plantas, uno de los primeros fue el de Collip y colaboradores quienes reportaron en cebollas, hojas de lechuga, raíces de cebada y remolacha, sustancias con actividad metabólica a las cuales denominaron “glucocininas” (Collip, 1923). En el mismo año Ellis y Eyster probaron la insulina y glucocinina obtenidas de páncreas fresco y de cebollas respectivamente en la germinación del maíz, encontrando que altas concentraciones de los extractos retardaron el crecimiento mientras que bajas lo incrementaron (Ellis y Eyster, 1923). Posteriormente en 1993 Goodman y Davies adicionaron insulina a semillas de girasol, sandía y pepino, observando una aceleración en la emergencia de la radícula sugiriendo con ello que la insulina juega un papel en la regulación del crecimiento en plantas como en animales. En 1999 Sánchez de Jiménez y colaboradores, reportaron que la adición de insulina a semillas de maíz aceleró la germinación y promovió el crecimiento de las plántulas. Además a nivel molecular se encontró que la insulina promovió la fosforilación de la proteína ribosomal S6; dicha fosforilación fue revertida al adicionar los inhibidores wortmanina y rapamicina. Venancio y colaboradores reportaron el aislamiento de una proteína de frutos de *Vigna unguiculata* (Cowpea), con masa y secuencia de aminoácidos similar a la insulina bovina la cual fue reconocida por el anticuerpo contra la insulina humana (Venancio et al., 2003).

---

Recientemente, se reportó el aislamiento del péptido ZmIGF en *Zea mays* con un peso molecular de 5.7 kDa que fue capaz de regular el crecimiento y la división celular en tejidos de maíz. Los autores encontraron que el ZmIGF posee una estructura bien definida de hélice  $\alpha$  similar a la reportada para la insulina y el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), lo que sugiere que las plantas contienen hormonas peptídicas altamente conservadas a través del proceso evolutivo (Rodríguez-López et al., 2011). En el 2010 Sotelo y colaboradores mostraron que tanto la insulina como el ZmIGF regulan el crecimiento celular y la división, observando un incremento en la síntesis de DNA, el índice mitótico, la biomasa y la síntesis de proteínas ribosomales en cultivos *in vitro* de callos de maíz. El análisis de los transcritos de ciclinas tipo D y del antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA) mostró que fueron movilizados a polisomas por la adición de insulina y ZmIGF. Interesantemente, todos los eventos anteriores fueron inhibidos por la rapamicina sugiriendo que dichos efectos podrían estar mediados por la activación de la cinasa TOR.

## II.- MODELO DE ESTUDIO

### 2.1 Origen de la línea TBY-2

La línea TBY-2 fue establecida a partir de callos inducidos de plántulas de *Nicotiana tabacum* L. cv, Bright Yellow 2 y propagada en el medio de cultivo Linsmaier and Skoog (1965) suplementado con sacarosa y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). La línea TBY-2 fue la más proliferativa entre los materiales examinados de 40 especies de *Nicotiana* (Nagata et al. 1992).

A partir de la línea celular TBY-2, An en 1985 estableció la línea NT-1 la cual ha sido mantenida en diversos laboratorios principalmente en el Norte de América. Las células de tabaco NT-1 han sido utilizadas en estudios de transformación con vectores binarios por *Agrobacterium tumefaciens*, localización subcelular de proteínas y producción de proteínas recombinantes (An, 1985; Nagata et al., 1992; Geelen e Inzé, 2001; Nagata et al., 2004).

---

## 2.2 Características principales de los cultivos TBY-2

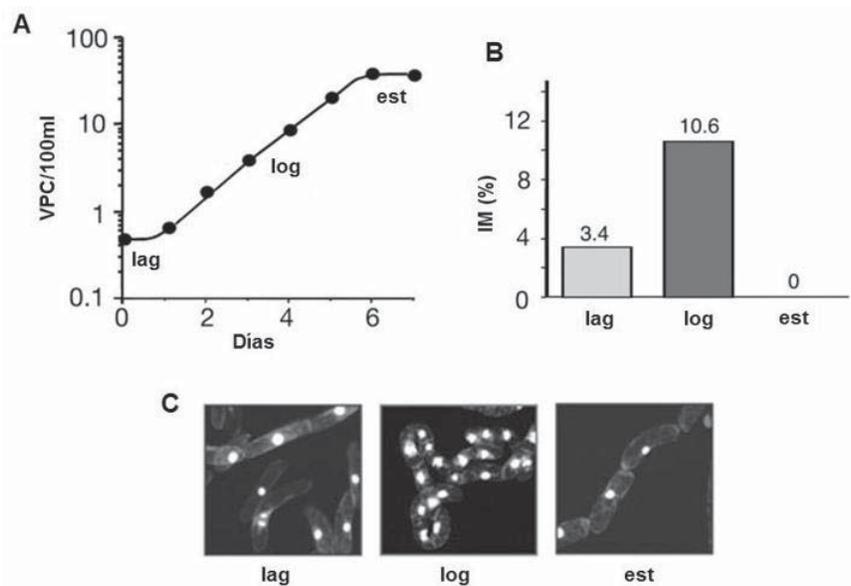
El crecimiento de los cultivos de células vegetales muestra ventajas únicas como: velocidad de crecimiento excepcionalmente alta, homogeneidad en el tipo celular dentro de una población, el control de parámetros extracelulares y la continua disponibilidad de biomasa. Además, la observación y manipulación de los cultivos celulares es más fácil que la de células que forman parte de un órgano (Nagata et al., 1992). No obstante que las células vegetales cultivadas *in vitro* sufrieron un proceso de desdiferenciación no son idénticas a las células indiferenciadas del tejido meristemático. Las primeras muestran algunos signos de diferenciación como vacuola grande y pared celular gruesa, además las células cultivadas *in vitro* son más grandes que las meristemáticas (Renaudin, 2004).

El crecimiento rápido que presentan los cultivos celulares de plantas proporciona una elevada cantidad de biomasa, sin embargo, debe tenerse en mente que en el curso de la multiplicación celular cambia la composición del medio en los siguientes componentes: azúcares, minerales, vitaminas, hormonas, densidad celular, factores apoptóticos y contenido de los gases solubilizados (carbonato, etileno, etc) (Renaudin, 2004). Además, los protocolos usados por diferentes grupos de investigación muestran cambios en condiciones como la temperatura, la luz, la velocidad de agitación, el volumen de la suspensión vs. el volumen del matraz, la permeabilidad del gas por la tapa del matraz, el pH externo, el protocolo de esterilización que pueden alterar el crecimiento celular y fisiología en una forma impredecible (Renaudin, 2004).

## 2.3 Crecimiento de los cultivos TBY-2 y NT-1

El crecimiento de los cultivos celulares vegetales presenta tres fases: una inicial denominada lag o de adaptación que ha sido pobremente documentada. Se piensa que dicha fase se presenta por el estrés del subcultivo y por una baja velocidad inicial de actividad mitótica, debido a la gran dilución de células que se realiza durante los subcultivos a un medio no acondicionado. En el inicio de la fase lag las células presentan una morfología alargada y se agrupan en cadenas (Renaudin, 2004; Matsuoka et al., 2004). La fase lag es seguida por una fase de crecimiento exponencial o logarítmica donde la mayoría de las células transcurren a través del ciclo celular varias veces. En el final de este periodo, la actividad mitótica se detiene progresivamente

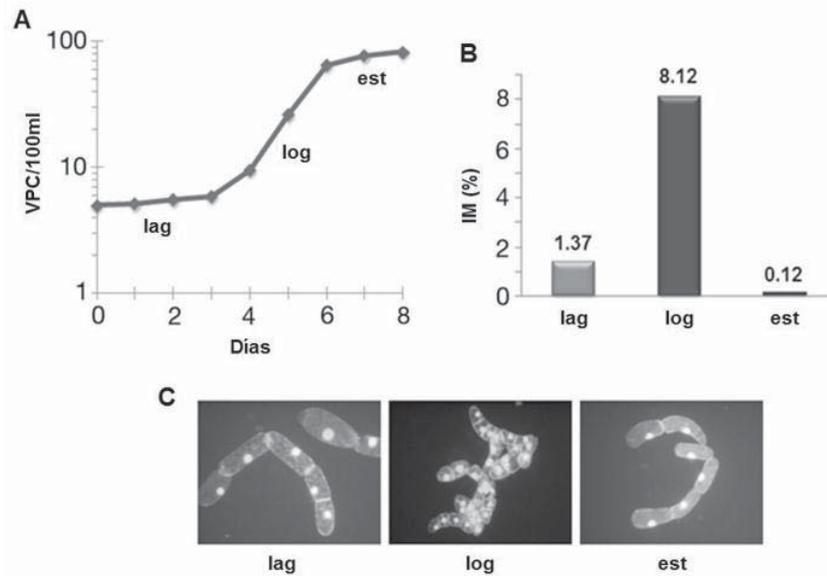
debido a factores limitantes en el medio como azúcar, nitrógeno, fosfato y hormona (Renaudin, 2004). Durante la fase log las células son redondas con tamaños celulares más pequeños comparadas a las de la fase lag y se agrupan en forma de racimos o zarcillos. Las células en fase estacionaria son alargadas, 3 a 5 veces más largas en uno de sus ejes y se agrupan en cadenas o están solas en el medio, en esta fase entran en un programa fenotípico (alargamiento) y fisiológico (síntesis de nuevos compuestos) diferente. Además, pueden permanecer vivas por periodos largos de tiempo dependiendo de la naturaleza del factor limitante, de la densidad celular y de otras condiciones del cultivo (Fig. 6) (Renaudin, 2004; Matsuoka et al., 2004).



**Figura 6. Crecimiento de células TBY-2, morfología y frecuencia de la división celular.** A) Curva típica de crecimiento de las células de tabaco BY-2, evaluada por volumen de paquete celular (VPC) de 100 ml. B) Índice mitótico (IM) en las diferentes fases de crecimiento. Se observa un IM mayor en la fase logarítmica (log). C) Imágenes de células teñidas con DAPI en diferentes fases de crecimiento. Se observa que las células en la fase log son pequeñas y redondas, a diferencia de las fases lag y estacionaria (est) que son más largas (Matsuoka et al., 2004).

La línea celular NT-1 es genéticamente igual a las células TBY-2 (Nagata et al., 1992). Los cultivos de células en suspensión de tabaco NT-1 son heterogéneos y menos friables que las células TBY-2. La morfología celular es similar a los TBY-2 observándose dos tipos celulares: células redondas formando racimos en la fase log y

células alargadas de 3 a 5 veces más grandes en uno de sus ejes formando cadenas en las fases lag y estacionaria (Fig. 7).



**Figura 7. Crecimiento, índice mitótico y morfología de las células NT-1.** Para el crecimiento de los cultivos se inocularon 100 ml de medio MS 1X con 7 ml de células en fase estacionaria, se retiraron alícuotas de 3 ml diariamente durante 8 días para registrar la cinética de crecimiento, el volumen celular obtenido para cada día se representa en forma equivalente a 100 ml. A) Curva de crecimiento por volumen de paquete celular (VPC). B) Índice mitótico (IM) en diferentes fases de crecimiento. Se observa un IM mayor en la fase logarítmica (log). C) Células teñidas con DAPI en diferentes fases de crecimiento. Se observa que las células en la fase log son más pequeñas y redondas, mientras que en las fases lag y estacionaria (est) son largas (datos obtenidos durante la realización del presente trabajo).

Conforme las células utilizan el medio de cultivo, este cambia su composición y presenta compuestos como polipéptidos, polisacáridos, hormonas, y metabolitos secundarios que son secretados por las células del cultivo durante su crecimiento. Por lo tanto, el medio de cultivo de las células vegetales es un material conveniente para buscar péptidos y otras moléculas de señalización endógena que contribuyan a la señalización extracelular en las células de las plantas (Renaudin, 2004). En una investigación sobre el secretoma de los cultivos en suspensión de células de tabaco se identificaron proteínas principalmente involucradas en la defensa por estrés y en procesos de regeneración celular como quitinasas, peroxidasas y  $\beta$ -1,4-xilosidas. Lo anterior indica que estos cultivos secretan proteínas asociadas al estrés durante su

---

---

crecimiento aún en ausencia de elicitores o tratamientos que induzcan estrés (Lippmann et al., 2009).

Matsuoka y colaboradores en el 2004, reportaron que la expresión de los genes varía de acuerdo a la fase de crecimiento. En las fases lag y log se transcriben genes relacionados principalmente al ciclo celular, a la reorganización del citoesqueleto, a la regulación de la transcripción, entre otros. Mientras que en la fase estacionaria se expresan genes relacionados con la recepción de señales extracelulares, sistemas de endomembranas, canales transportadores y proteínas cinasas transmembranales.

## **2.4 Evaluación del crecimiento de los cultivos celulares**

El crecimiento de los cultivos celulares vegetales es evaluado midiendo el número de células o la biomasa celular. En el último caso los parámetros determinados son: el volumen del paquete celular, el peso fresco y el peso seco (Dixon, 1985). Cualquiera de estos métodos puede ser apropiado pero debe recordarse que las células vegetales pueden alcanzar un rango amplio en tamaño y peso seco de acuerdo a su ambiente. Como consecuencia las curvas de crecimiento son diferentes de acuerdo al parámetro medido (Renaudin, 2004). De esta manera, se pueden encontrar inconsistencias entre el crecimiento celular estimado por el número de células y el peso fresco, debido al hecho de que primero hay un aumento en el número de células y posteriormente un incremento en el volumen y el peso seco (Hiraga et al., 2010). En el 2008, Mravec y colaboradores mostraron que los cambios fenotípicos de los cultivos celulares de tabaco se pueden evaluar midiendo la longitud y el ancho celular, el análisis de la distribución del tamaño celular por población permitió determinar los cambios en la morfología celular.

## **2.5 Requerimientos hormonales generales de los cultivos celulares vegetales**

Las hormonas auxinas y citocininas han sido adicionadas a los cultivos celulares vegetales para sostener la actividad mitótica (Nagata et al., 2004). Sin embargo, la síntesis de pequeñas cantidades de estas hormonas puede ocurrir endógenamente. En los cultivos TBY-2 la concentración de AIA (ácido indol-3-acético) fue del orden de 50

---

nmol/kg de peso en las células y de 0.5 nmol/L en el medio. Dichas cantidades no permitieron la actividad mitótica lo cual explica porque se requiere adicionar auxina a los cultivos (Renaudin, 2004; Nagata et al., 1992). Las auxinas sintéticas son usadas en los cultivos celulares de plantas en lugar de la auxina natural AIA debido a que esta última es menos estable y más propensa a metabolizarse. Entre las auxinas sintéticas más utilizadas están el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 1-naftalenacético (ANA). Por otro lado la producción de citocininas alcanza valores de 100 a 150 nmol/kg de peso en las células por lo cual esta línea celular de tabaco no requiere la adición exógena de citocininas para crecer (Renaudin, 2004).

## **2.6 Primeros estudios realizados con los cultivos TBY-2**

Debido a su gran sensibilidad para el análisis microscópico, las células TBY-2 han sido usadas para estudiar y visualizar el citoesqueleto (Geelen y Inzé, 2001). Imágenes fluorescentes de estas células expresando GFP-tubulina y GFP-actina, han confirmado la organización estructural de la red del citoesqueleto y sus transiciones entre conformaciones diferentes en las células en proceso de división. Se ha observado que diferentes arreglos de microtúbulos ocurren durante el ciclo celular: una red cortical en las células en interfase, una banda pre-profase durante la fase G2 hasta el comienzo de la fase M, y un fragmoplasto en las células transcurriendo a través de la mitosis (Nagata et al., 2004). Otra característica propia de estos cultivos es su potencial para sincronizarlos, por esta ventaja las células TBY-2 han sido usadas también para determinar las características ultra-estructurales de las distintas fases de la citocinesis. Esta última característica también ha sido útil para realizar estudios sobre las diferentes fases del ciclo celular, y para evaluar el nivel de expresión de los genes reguladores del ciclo en sus diferentes fases, tal es el caso de las ciclinas (Nagata et al., 1992; Nagata et al., 2004).

---

### **III.- JUSTIFICACIÓN**

Los cultivos NT-1 son un sistema homogéneo que nos permitirá evaluar los cambios y el tipo de crecimiento inducido por la insulina a través de la ruta PI3K/TOR. Además, no hay estudios sobre la cascada de señalización mencionada anteriormente o el efecto de la insulina en este sistema

### **IV.- HIPÓTESIS**

La insulina promueve la proliferación celular en los cultivos NT-1, a través de la cascada PI3K/TOR

---

## V.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la insulina sobre el crecimiento y la activación de la ruta de señalización PI3K/TOR de los cultivos celulares NT-1

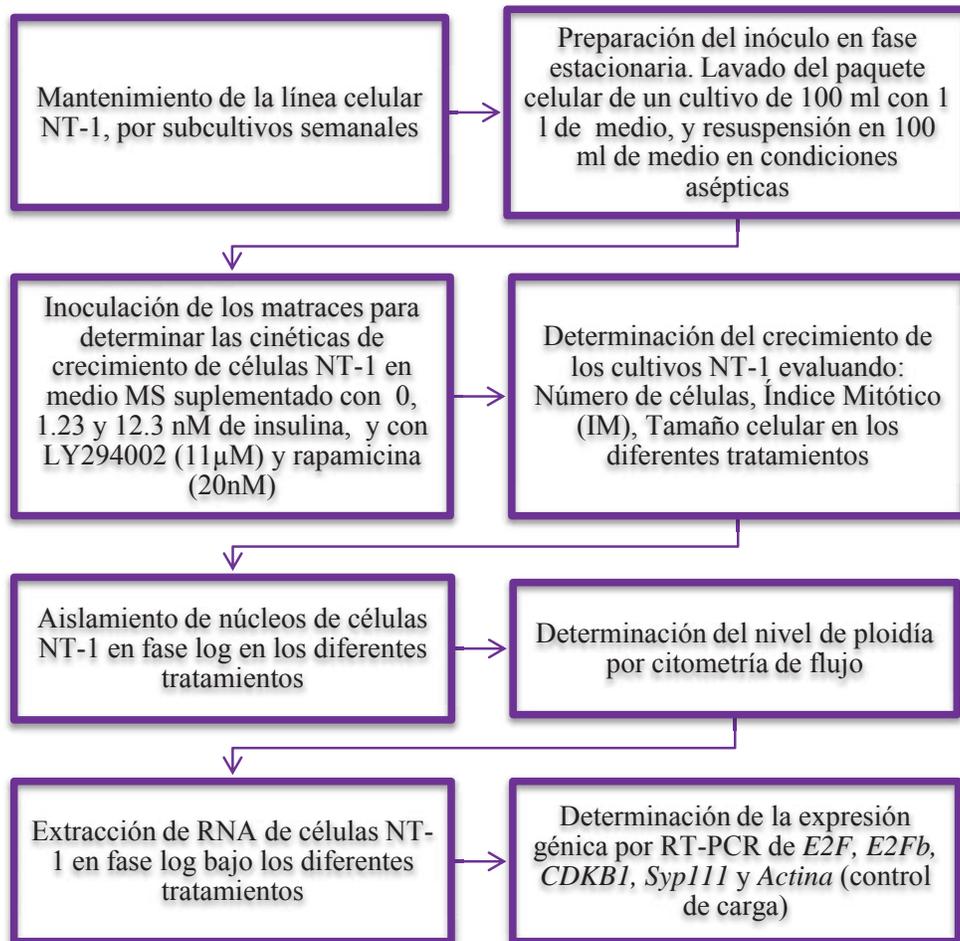
## VI.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizando los parámetros de número de células e índice mitótico analizar el crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina
- Con el uso de los inhibidores LY294002 y rapamicina para la cinasas PI3K y TOR respectivamente, determinar la participación de la ruta PI3K/TOR en el crecimiento de la células de tabaco por la insulina
- Por medio de citometría de flujo evaluar el crecimiento endoreduplicativo en los cultivos de tabaco adicionados con insulina
- Analizar la expresión por RT-PCR de los reguladores del ciclo celular *E2F*, *E2Fb*, *SYP111* y *CDKB* en los cultivos NT-1 con insulina

---

## VII.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Estrategia experimental general



### 7.2 Mantenimiento de la línea celular de *Nicotiana tabacum* NT-1

Las células de tabaco NT-1 se mantuvieron realizando subcultivos semanales para lo cual se inocularon 50 ml de medio con 3.5 ml de células en fase estacionaria. Los cultivos fueron incubados a 25° C en obscuridad con agitación a 150 rpm. El medio Murashige y Skoog (MS 1X) fue suplementado con 30 g/l de sacarosa y 0.2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El pH se ajustó a 5.8 con KOH 1M y se esterilizó en autoclave por 20 min. Una vez que los medios alcanzaron la temperatura ambiente se adicionó 0.2 mg/l de 2,4-D (0.9 μM), 100 mg/l de myo-inositol y 1 mg/l de tiamina.

- 
- Stock de 2,4-D: 4 mg de 2,4-D fueron disueltos en 10 ml de KOH 0.1M y esterilizados por filtración. Se agregaron 50  $\mu$ l por cada 100 ml de medio de cultivo.
  - Stock de Vitamina: 500 mg de myo-inositol y 5 mg de tiamina se diluyeron en 10 ml de agua tridestilada, la solución se esterilizó por filtración y se adicionaron 200  $\mu$ l por 100 ml de medio.

### 7.3 Preparación del inóculo

Bajo condiciones estrictamente asépticas en una campana de flujo laminar se filtraron y lavaron 100 ml de cultivo NT-1 de 7 días de edad con 1 l de medio MS 1X sin vitaminas ni 2,4-D. El paquete celular se agitó suavemente con una espátula. Al terminar el lavado las células se suspendieron en 100 ml de medio MS 1X (con vitaminas y hormona) el cual sirvió como inóculo para los cultivos donde se determinaron las cinéticas de crecimiento.

### 7.4 Cinéticas de crecimiento

Se inocularon 100 ml de Medio MS 1X con 3.5 ml de células del inóculo antes mencionado y se incubaron. Se tomaron alícuotas de 3 ml del cultivo diariamente. Para evaluar el crecimiento en la fase logarítmica, los cultivos se retiraron de la incubación en el día 7 sin muestreo previo.

- Stock de insulina: En el liofilizado de la insulina porcina de Sigma (Cat. No. 15523) un mg equivale a 28.1 U. Un mg de insulina se disolvió en 20 ml de agua tridestilada y se esterilizó por filtración. La concentración del stock fue de 1405  $\mu$ U/ $\mu$ l.
- Stock de LY294002 (PM= 307.35): 5 mg de LY294002 se disolvieron en 600  $\mu$ l de etanol absoluto (8.33  $\mu$ g/ $\mu$ l).
- Stock de rapamicina (PM= 919.19): se preparó disolviendo 2.28 mg de rapamicina en 5 ml de etanol absoluto (0.457  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Preparación de los grupos de tratamiento:

	14.23 $\mu$ l del stock de insulina (1.23 nM)	142.3 $\mu$ l del stock de insulina (12.3 nM)	4 $\mu$ l del stock de rapamicina (20 nM)	40.56 $\mu$ l del stock de LY294002 (11 $\mu$ M)
<b>Control</b>	—	—	—	—
<b>I 1.23</b>	+	—	—	—
<b>I 12.3</b>	—	+	—	—
<b>Rap</b>	—	—	+	—
<b>LY</b>	—	—	—	+
<b>I 1.23/Rap</b>	+	—	+	—
<b>I 1.23/LY</b>	+	—	—	+
<b>I 12.3/Rap</b>	—	+	+	—
<b>I 12.3/LY</b>	—	+	—	+

### 7.5 Determinación del peso seco

La alícuota del cultivo se filtró al vacío a través de un papel filtro a peso constante, se secó en una estufa a 80° C por 24 h y se registró el peso. El peso seco se obtiene por la diferencia de pesos entre el papel y la muestra filtrada y dividida entre la cantidad de mililitros filtrados, se expresó en mg/ml (Dixon, 1985).

### 7.6 Número de células

Se tomaron alícuotas de 0.2 ml del cultivo a las cuales se les agregó un volumen igual de Buffer (0.6 M manitol, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 % de celulasa, 0.25 % de pectinasa pH= 5.7). La mezcla se incubó a 37° C por 2 h con agitación suave cada 30 min. Se tomó una alícuota de 2  $\mu$ l y con ayuda de un microscopio se contaron las células expresándose como el número de células/  $\mu$ l (modificado de Turck et al., 2004).

---

---

### 7.7 Índice mitótico (IM)

Se tomaron alícuotas de 0.2 ml del cultivo se dejaron reposar en hielo por 15 min y se retiró el sobrenadante. Se agregó 0.2 ml de solución fijadora y se dejó reposar a 4° C por 12 h. Se retiró el sobrenadante y se agregó 0.2 ml de la solución de DAPI (1 ml PBS 1X: 1 µl stock de DAPI) para obtener una concentración final de 28.55 µM, se incubó por 6 h a 4° C. El índice mitótico se determinó por observación de las células en mitosis con ayuda de un microscopio de epifluorescencia Nikon de la siguiente manera:

$$\text{IM (\%)} = \text{no. células en mitosis} / \text{no. células totales} (100)$$

- Buffer de Fosfatos Salinos (PBS) 10X: se diluyó 1.37 M de NaCl, 26.83 mM de KCl, 17.64 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó en autoclave por 20 min, se almacenó a 4° C.
- Solución Fijadora: se calentaron 25 ml de PBS 1X entre 60-70° C y se agregó lentamente 2g de paraformaldehído (4%). Se agitó constantemente hasta que se disolvió, se dejó enfriar y se agregaron 3 ml de glutaraldehído acuoso al 50%. La solución se aforó a 50 ml con PBS 1X y se almacenó a 4° C.
- Stock de DAPI (4,6- diamino- 2- fenilindol): se disolvieron 10 mg de DAPI en 1 ml de agua tridestilada, se almacenó a 4° C y protegido de la luz.

### 7.8 Tamaño celular

Se capturaron imágenes de las células NT-1 teñidas con DAPI con ayuda de una cámara Nikon CoolpixS10 acoplada a un microscopio de epifluorescencia Nikon. Se midió la longitud y ancho de las células con ayuda del programa ImageJ. Los datos se registraron en gráficos tipo XY (longitud vs. ancho) (Mravec et al., 2008).

### 7.9 Ensayo de viabilidad

La viabilidad de las células NT-1 fue estimada por tinción con una solución al 0.5% de diacetato de fluoresceína en acetona, la cual se conserva a - 20° C. Se agregó a las células durante 1 min en una relación 1:5 (5 µl de solución: 20 µl de células). Las

---

---

células viables se tiñeron de un color verde fluorescente (modificado de Lippmann et al., 2009). El porcentaje de viabilidad celular se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \text{no. de células viables} / \text{no. de células totales} (100)$$

### **7.10 Obtención de núcleos y determinación del contenido de DNA**

Se molieron dos gramos de células NT-1 en fase logarítmica con nitrógeno líquido y se adicionó 3 ml de buffer de homogenización (0.44 M de sacarosa, 2.5 % de Ficoll 400, 5 % de Dextran 40, 25 mM de Tris pH= 8.5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de β-mercaptoetanol, 0.5 % de Tritón X-100, 2 mM de espermina). El homogenizado obtenido se filtró sobre Miracloth y centrifugó a 5000 rpm por 5 min. La pastilla se resuspendió en 5 ml de buffer de homogenización sin espermina, y se adicionó sobre un colchón formado por 5 ml de sacarosa 2 M, 5 ml de Percoll en concentraciones de 80 %, 60 % y 40 %, se centrifugó a 3500 rpm por 20 min. Los núcleos se aislaron de la interfase entre la sacarosa y el Percoll. Esta fracción se lavó dos veces con buffer de homogenización sin espermina a 3500 rpm por 5 min, la pastilla se resuspendió en 200 μl de buffer (50 % de glicerol, 50 mM de Tris pH= 8.5, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.074 % de β-mercaptoetanol) y las muestras se almacenaron a -20° C (Luthe y Quatrano, 1980).

Para determinar el contenido de DNA los núcleos (200 μl) se trataron con RNasa (50 μg/ml) y se tiñeron con yoduro de propidio (50 μg/ml) y posteriormente fueron analizados a través del citómetro de flujo FACSCalibur Beckton Dickinson.

### **7.11 Extracción de RNA**

Se molieron 200 mg de células NT-1 con nitrógeno líquido, el polvo congelado se transfirió a un tubo estéril y se agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen). Se homogenizó e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4° C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 0.5 ml de isopropanol, posteriormente se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante para lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a 7500

---

rpm por 5 min. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se dejó secar al aire por 10 min, la cual se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua grado biología molecular ( $^{\circ}$ BM) y se calentó a 60 $^{\circ}$  C por 10 min. Se agregaron 0.5  $\mu$ l de inhibidor de RNasa y se almacenó a -20 $^{\circ}$  C (Portillo et al. 2006).

Para analizar la integridad del RNA, se tomaron 3  $\mu$ l de la muestra y se mezclaron con 2  $\mu$ l de buffer de carga, se colocaron en un gel de agarosa al 1 % suplementado con bromuro de etidio y se realizó la electroforesis con TAE 1X a 90 volts; el gel se observó en un transluminador con luz UV.

- Gel de agarosa al 1 %: se mezcló 1 g de agarosa en 100 ml de TAE 1X y se calentó en un horno de microondas hasta disolver completamente la agarosa. La solución se deja enfriar y se adicionó con 1  $\mu$ l de bromuro de etidio, posteriormente se vació en el equipo de electroforesis con el peine previamente colocado hasta que solidifique.
- TAE 50X: se disolvieron 121 g de Tris base y 28.55 ml de ácido acético glacial en 300 ml de agua tridestilada y se ajustó el pH a 8.5; se agregaron 18.6 g de EDTA $\cdot$ 2H $_2$ O y se aforó a 500 ml, esta solución se almacenó a temperatura ambiente.

La cuantificación se realizó mezclando 5  $\mu$ l de muestra con 995  $\mu$ l de agua tridestilada, y la Absorbencia (Abs) de la muestra se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, usando como blanco agua tridestilada. Para determinar la concentración de RNA se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g RNA}/\mu\text{l} = (\text{Abs } 260 \text{ nm}) (1000/5) (40) / 1000$$

## 7.12 RT-PCR

Se utilizó el Kit SuperScript<sup>TM</sup> III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase, en base a las especificaciones establecidas por la casa comercial Invitrogen<sup>TM</sup>. Las reacciones fueron llevadas a un volumen total de 25  $\mu$ l adicionando los siguientes componentes en un tubo Eppendorf de 0.2 ml para PCR:

Componentes	volumen
Mezcla de reacción 2X	12.5 µl
1 µg de RNA (0.22 µg/ µl)	4.5 µl
Oligonucleótidos sentido (10 µM)	1 µl
Oligonucleótidos antisentido (10 µM)	1 µl
SuperScript™ III RT/ Platinum® Taq Mix	1 µl
Agua °BM estéril	5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>25 µl</b>

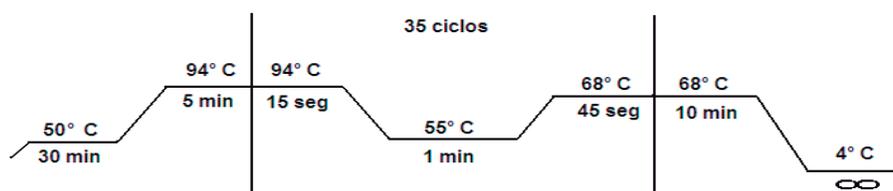
Los tubos se colocaron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400, programado con las condiciones para la amplificación de cada gen.

#### Condiciones de amplificación:

- *E2F*: los oligonucleótidos fueron diseñados de la secuencia reportada para *Nicotiana tabacum* en NCBI con número de acceso AB025347:

Sentido 5'-CAAATTACAAACAGGGAGTTGGTGC-3'

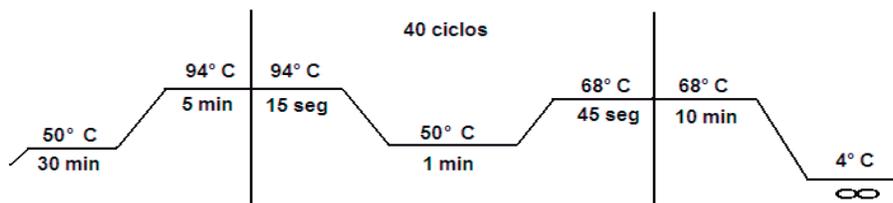
Antisentido 5'-CTCCTTTGTGGATAATCAACAGCCT-3'



- *E2Fb*: los oligonucleótidos fueron diseñados de la secuencia reportada para *A. thaliana* en NCBI con el número de acceso AJ294533:

Sentido 5'-GACGCGATTGTGATCAAATCTACTC-3'

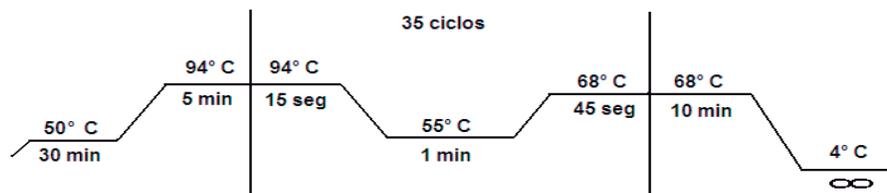
Antisentido 5'-ATGTTTCTTTCGGTGCTTTCCTCTT-3'



- *SYP111*: los oligonucleótidos fueron diseñados de la secuencia reportada para *A. thaliana* en NCBI con el número de acceso AT1G08560.1:

Sentido 5'-TGAAGGATATGGAAGCAGGACCTGA-3'

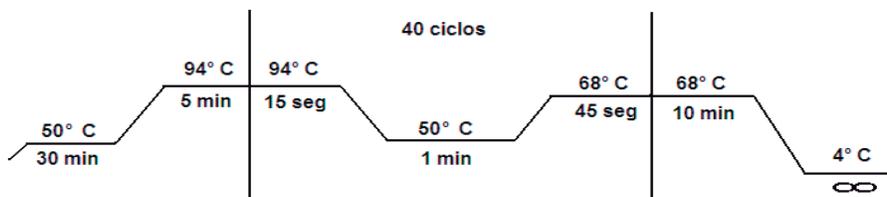
Antisentido 5'-ATGATGCTCGATCTCGTCCATCTGT-3'



- *CDKB*: los oligonucleótidos fueron diseñados de la secuencia reportada para *A. thaliana* en NCBI con el número de acceso X57840:

Sentido 5'-GGGTCTTGGTCGTGCTTTTACTGTT-3'

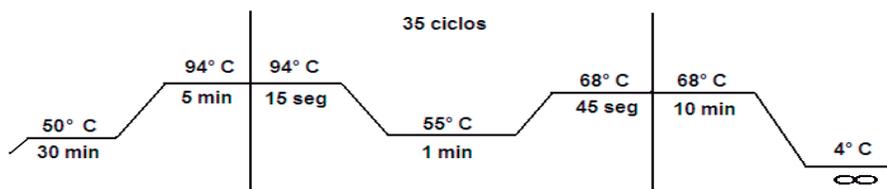
Antisentido 5'-CCAAGACGATGACAACAGATACAGC-3'



- *Actina*: los oligonucleótidos fueron diseñados de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con el número de acceso X63603:

Sentido 5'-CCTCTTAACCCGAAGGCTAA-3'

Antisentido 5'-GAAGGTTGAAAAGGACTTC-3'



### 7.13 Análisis de datos

Los análisis estadísticos de los experimentos presentados, se realizaron con el programa STATISTICA ver 8.0. Los resultados de los experimentos fueron evaluados con la prueba de Fisher. Las diferentes letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ( $P \leq 0.05$ ).

---

## VIII.- RESULTADOS

### 8.1 Cinética de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina

Previamente se reportó que la adición de insulina a los ejes embrionarios de maíz aceleraba la germinación, aumentaba el tamaño de la plántula, y en cultivos *in vitro* de células de maíz incrementaba la proliferación celular (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Sotelo et al., 2010). Para evaluar el efecto de esta hormona sobre el crecimiento de los cultivos de tabaco NT-1 se inocularon 100 ml de medio adicionado con 0, 1.23 y 12.3 nM de insulina (Control, I 1.23 e I 12.3) con 3.5 ml de células en fase estacionaria y se retiraron alícuotas de 3 ml diariamente durante 14 días (Fig. 8). En estas cinéticas se observaron tres fases de crecimiento: la fase lag del día 0 al 4, la logarítmica del día 5 al 8 y la estacionaria del día 9 al 14, la cuales son características de los cultivos de tabaco BY-2 (Matsuoka et al. 2004). El crecimiento se evaluó diariamente usando los parámetros: número de células e índice mitótico (IM). En la Fig. 8A se obtuvo un incremento en el número de células para el tratamiento con I 1.23 en los días 6 y 7 que corresponden a la fase logarítmica. El tratamiento con I 1.23 incrementó significativamente el IM en los días 2 y 4 de la fase lag y en el día 7 de la fase log (Fig. 8B). Como se observa las cinéticas de crecimiento presentaron IMs altos en la fase lag donde no hay un aumento considerable en el número de células, e índices mitóticos bajos en la fase logarítmica donde se presenta un mayor crecimiento. Esto es lógico si se considera que el efecto sobre el crecimiento dependerá de la densidad celular. En la fase lag el número de células es pequeño y aunque presenten índices mitóticos elevados este crecimiento no será detectado en la cinética evaluada por el número de células. Mientras que en la fase log el número de células ha aumentado considerablemente y aunque el IM sea menor el crecimiento será más notorio en la cinética, debido a que se partió de un mayor número de células. Como en el día 7 de crecimiento se presentó un aumento tanto en el número de células como en el IM, se eligió este día para posteriores análisis donde en dicho tiempo se retira el matraz completo para su evaluación.

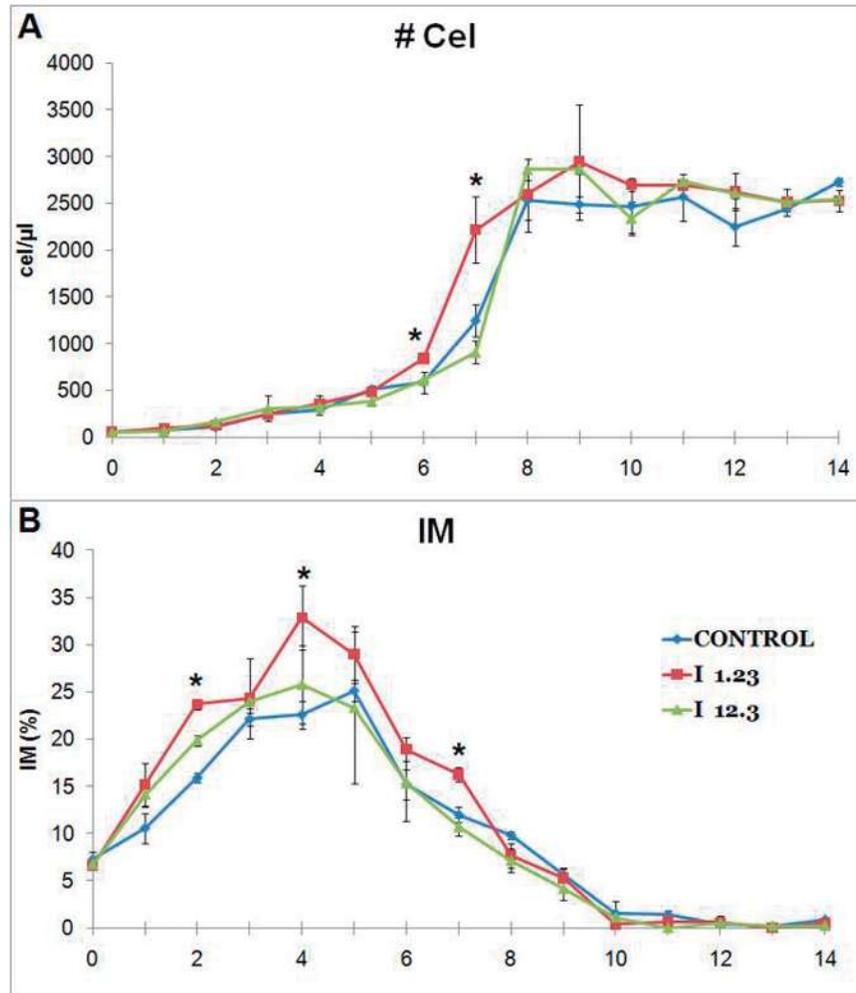
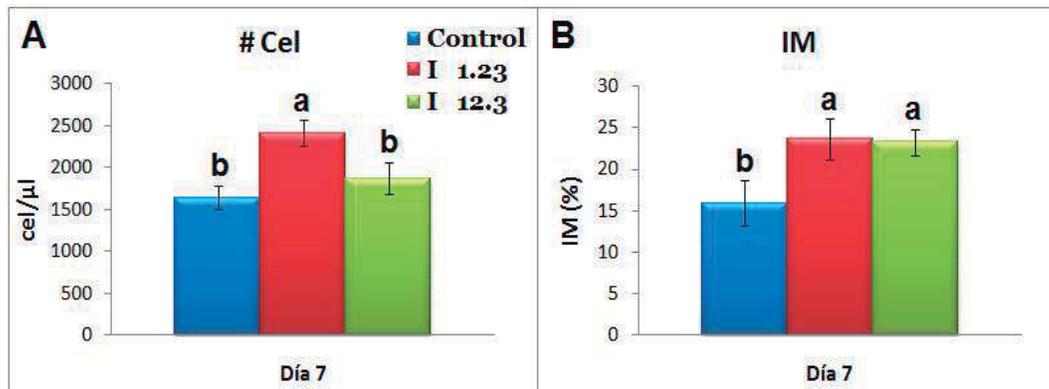


Figura 8. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de las células de tabaco en cultivos en suspensión. Los cultivos NT-1 fueron crecidos en medio MS 1X suplementado con 0, 1.23 y 12.3 nM de insulina. Se evaluó el crecimiento de los cultivos diariamente mediante: A) número de células y B) índice mitótico (IM). n= 2. \* Diferencia significativa ANOVA/Prueba de Fisher.  $P \leq 0.05$ . STATISTICA ver. 8.0.

## 8.2 Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 en la fase logarítmica

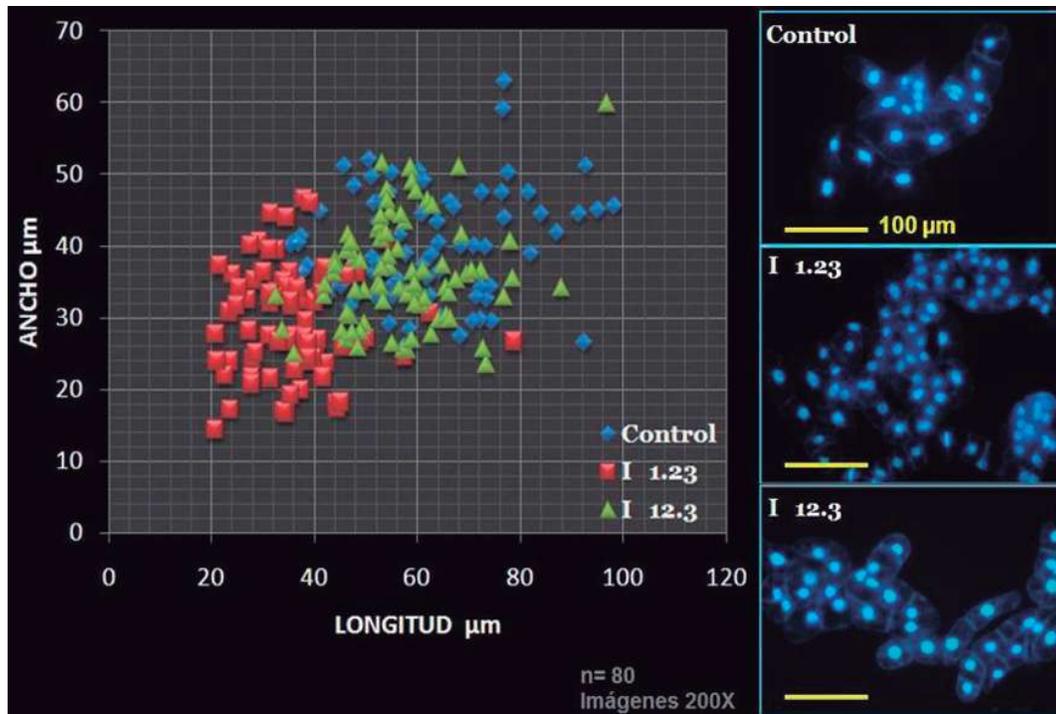
Se inocularon 100 ml de medio adicionado con 0, 1.23 y 12.3 nM de insulina (Control, I 1.23 e I 12.3) con 3.5 ml de células en fase estacionaria. En el día 7 correspondiente a la fase log se retiraron los cultivos de la incubación y se evaluó el crecimiento determinando el número de células y el IM. El tratamiento de I 1.23 incrementó en un 46.84% el número de células y un 48.61% el IM comparado con el

control. Mientras que el tratamiento con I 12.3 aumentó un 45.88% el IM pero no el número de células (Fig. 9A y B).



**Figura 9. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos de tabaco en la fase logarítmica.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina. Se evaluó el crecimiento de los cultivos en el día 7 de la fase logarítmica a través de: A) número de células, B) índice mitótico (IM). n= 3. ANOVA/ Prueba de Fisher.  $P \leq 0.05$ . STATISTICA ver. 8.0.

En estos mismos cultivos se evaluó la longitud y el ancho de 80 células de los grupos control, I 1.23 e I 12.3 para analizar los cambios en la morfología celular. Se observó que las células tratadas con I 1.23 presentaron tamaños celulares más pequeños que las células control, y las crecidas en presencia de I 12.3 tuvieron una dispersión de tamaños similar que el tratamiento control (Fig. 10). Cuando las células se encuentran en proliferación celular constante, el tiempo entre una división y otra es menor, por lo cual tienden a ser más pequeñas que aquellas que no han disminuido el tiempo de división celular o que no se encuentran en constantes divisiones, ya que cuentan con más tiempo para recuperar su tamaño entre una división y otra (Morgan, 2007). Lo anterior, sugiere que las células con el tratamiento de I 1.23 presentan un tamaño menor como consecuencia del aumento en la actividad proliferativa y probablemente una reducción en el tiempo entre una división y otra lo cual concuerda también con el incremento en el IM y número de células observado en la Fig. 9. Mientras que para I 12.3 no hubo aumento en el número de células ni disminución en el tamaño celular, por lo cual se considera que este tratamiento no fue capaz de inducir la proliferación.

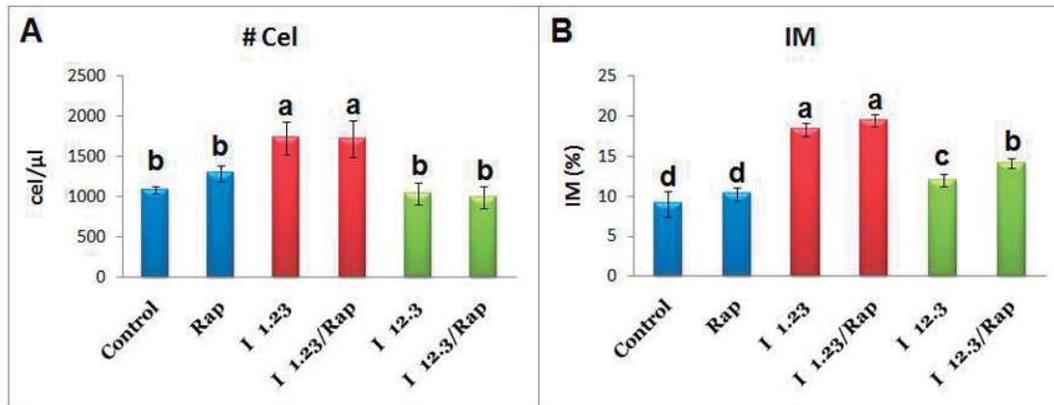


**Figura 10. Efecto de la insulina sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 en la fase logarítmica.** Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina. En el día 7 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares. A la izquierda se muestra el gráfico de longitud (eje x) vs. ancho (eje y) n= 80 y a la derecha las imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

### 8.3 Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de los cultivos suplementados con insulina

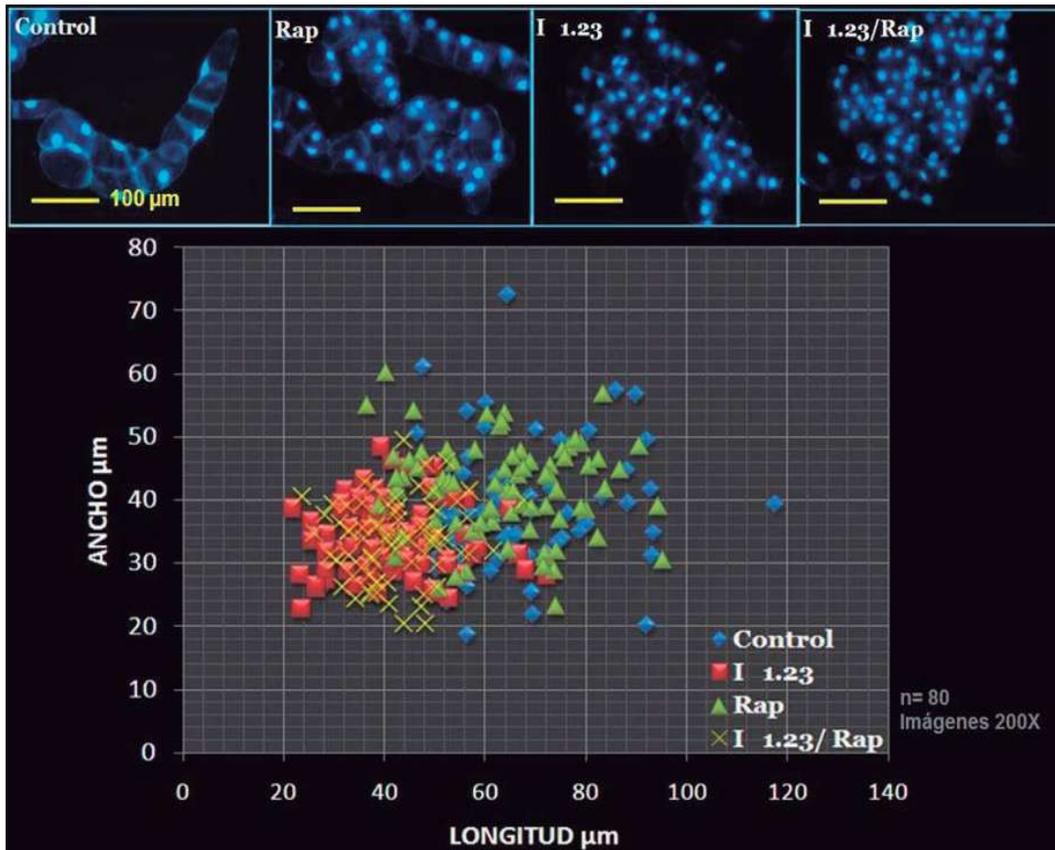
Para determinar si la inducción del crecimiento por insulina en los cultivos NT-1 en fase log se debía a la activación de la cinasa TOR, se aplicó 20 nM de rapamicina sola o en combinación con cada una de las concentraciones de insulina antes mencionadas. Se utilizó 20 nM de rapamicina porque dicha concentración había sido previamente reportada en los cultivos de células de *Arabidopsis* (Turck et al., 2004). En la Fig. 11 se muestra el efecto inductor del crecimiento de la insulina 1.23 que incrementó un 59.08% en el número de células y un 100% el IM, respecto al control. Sin embargo, al adicionar la rapamicina al grupo tratado con I 1.23 no inhibió el crecimiento inducido por la insulina en ningún parámetro, ya que siguió presentando un incremento de 58.57% en el número de células y de 114% en el IM (Fig. 11A y B).

Como se mencionó anteriormente, los cultivos tratados con I 12.3 no presentaron incremento en el crecimiento respecto al control. Sin embargo, se observó un aumento del 32.60% en el IM y ambos parámetros no fueron afectados por la rapamicina (Fig. 11B).



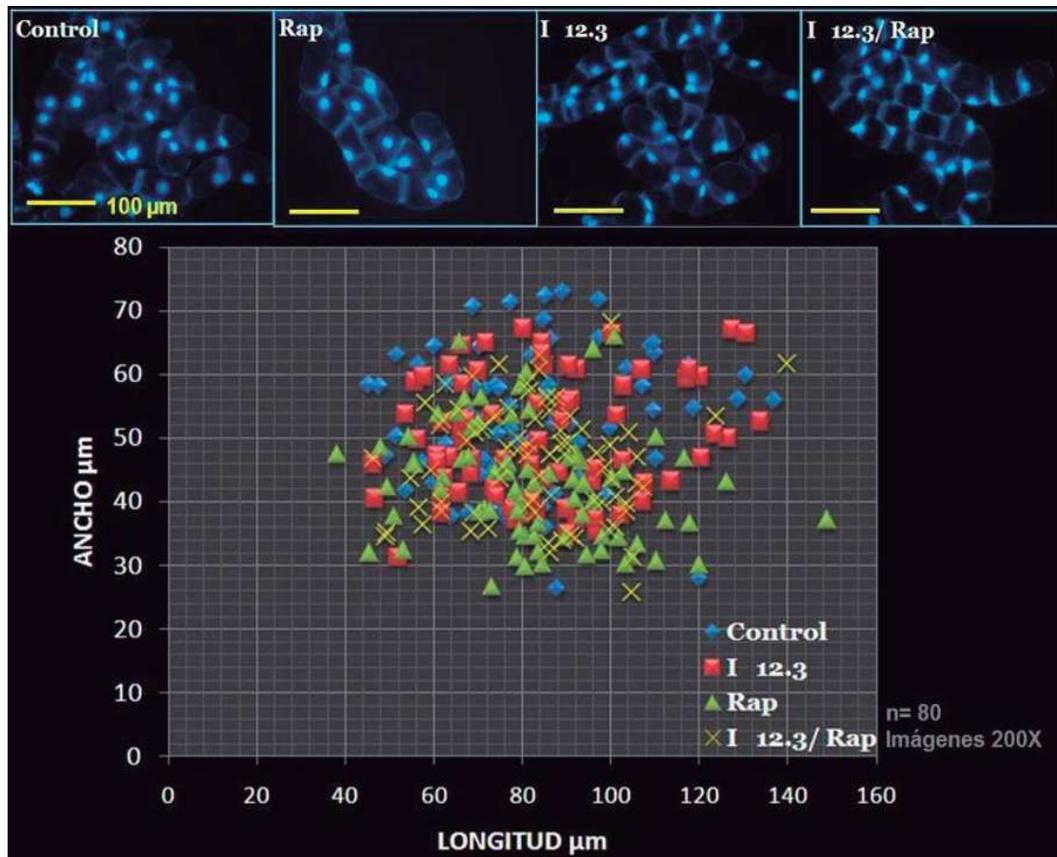
**Figura 11. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento inducido por la insulina en los cultivos NT-1.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina o 20 nM de rapamicina, sola o en combinación con las dos concentraciones de insulina ensayadas. Se evaluó el crecimiento de los cultivos en el día 7 de la fase logarítmica determinado por: A) número de células, B) índice mitótico (IM). n= 4. ANOVA/Prueba de Fisher.  $P \leq 0.05$ . STATISTICA ver. 8.0.

También se analizaron los tamaños de las células tratadas con rapamicina y en combinación con I 1.23. Las células del grupo I 1.23/Rap presentaron una distribución de tamaños celulares pequeños de forma similar a las de I 1.23, por lo tanto la rapamicina no inhibió la proliferación celular inducida por I 1.23 (Fig. 12). Es importante mencionar que no hay reportes de la acción de rapamicina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* sin embargo, los resultados aquí obtenidos sugieren que los cultivos NT-1 en las condiciones probadas son insensibles a la rapamicina.



**Figura 12. Efecto de la rapamicina sobre el tamaño celular de los cultivos de tabaco suplementados con I 1.23 en la fase logarítmica.** Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 nM de insulina o 20 nM de rapamicina, sola o en combinación con la insulina. En el día 7 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares. En la parte inferior se muestra el gráfico de longitud (eje x) vs. ancho (eje y) n= 80, y en la superior imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

Respecto a la distribución de los tamaños celulares para el grupo I 1.23/Rap esta fue parecida a los tratamientos control, Rap e I 1.23 (Fig. 13) confirmando lo mencionado anteriormente que los cultivos NT-1 son insensibles a la rapamicina.

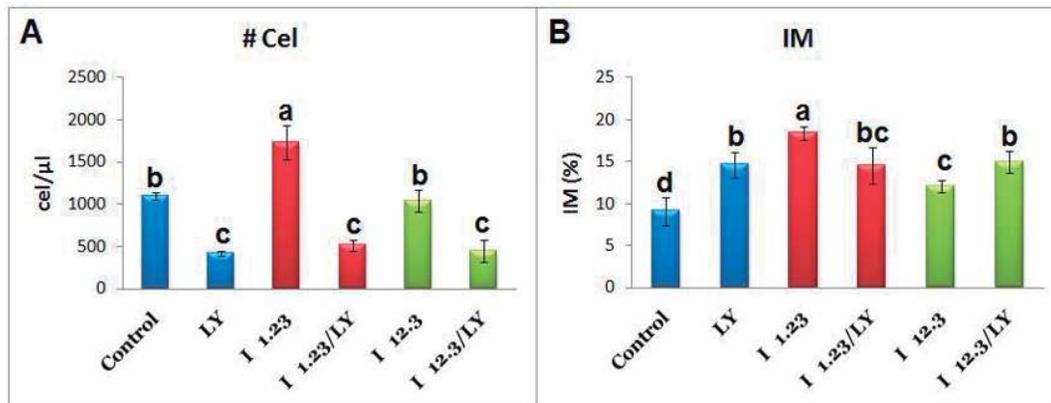


**Figura 13. Efecto de la rapamicina sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 12.3 en la fase logarítmica.** Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 12.3 nM de insulina o 20 nM de rapamicina, sola o en combinación con la insulina. En el día 7 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares. En la parte inferior se muestra el gráfico de longitud (eje x) vs. ancho (eje y) n= 80, y en la superior se muestran imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

#### **8.4 Efecto del LY294002 sobre el crecimiento de los cultivos suplementados con insulina**

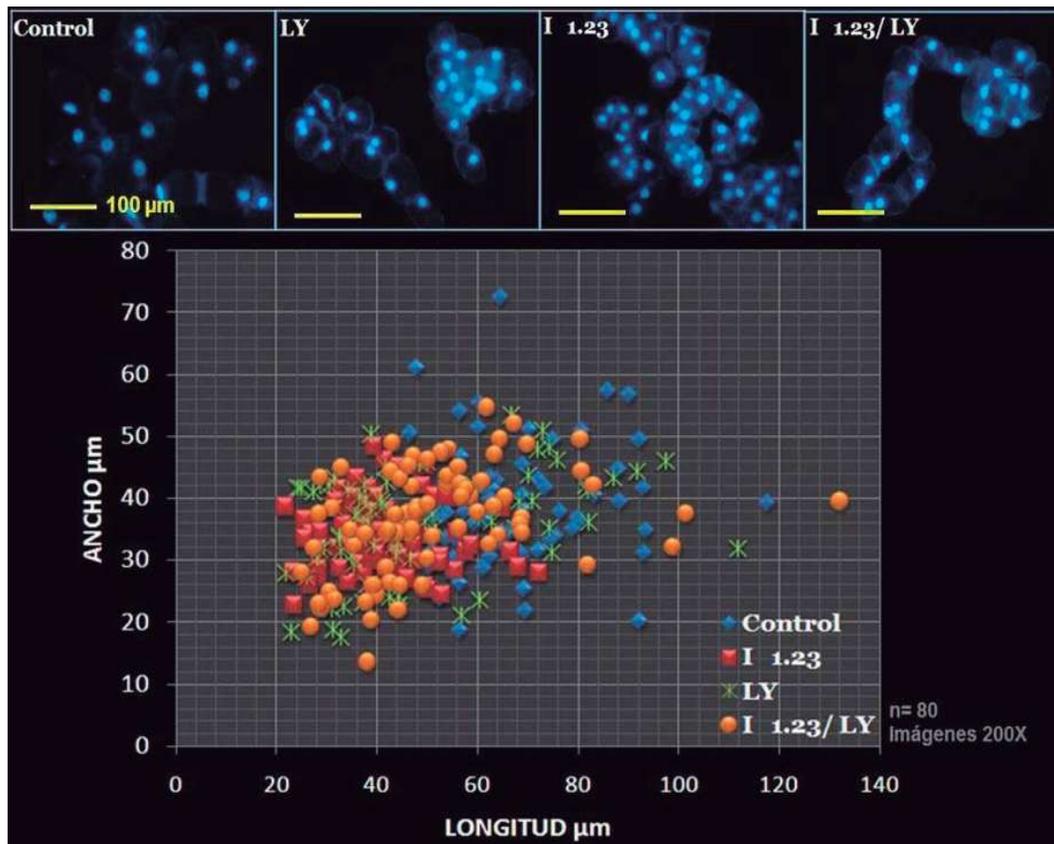
Para establecer si el crecimiento inducido por la insulina involucraba también la activación de la cinasa PI3K se utilizó 11  $\mu$ M de LY294002 solo o en combinación con cada concentración de insulina (1.23 o 12.3 nM). La concentración de LY fue elegida a partir de un barrido de concentraciones ensayadas en los cultivos NT-1. En la Fig. 14 se puede observar que la adición de dicha sustancia inhibió el crecimiento de los cultivos NT-1 y el efecto promotor sobre la proliferación celular estimulado por 1.23 nM de insulina, obteniéndose una disminución en el número de células entre 52-62% en los

tratamientos que contenían LY294002 comparados con el control. Mientras que el IM del tratamiento de I 1.23/LY disminuyó en un 20% con respecto a I 1.23. Por otro lado, para los cultivos del grupo I 12.3 se observó un aumento de 32.60% en el IM y la combinación de I 12.3 y LY incrementó el IM un 64.44% respecto al control (Fig. 14A y B). Los resultados anteriores muestran que en la señalización de la insulina en los cultivos NT-1 parece estar involucrada la activación de la cinasa PI3K.



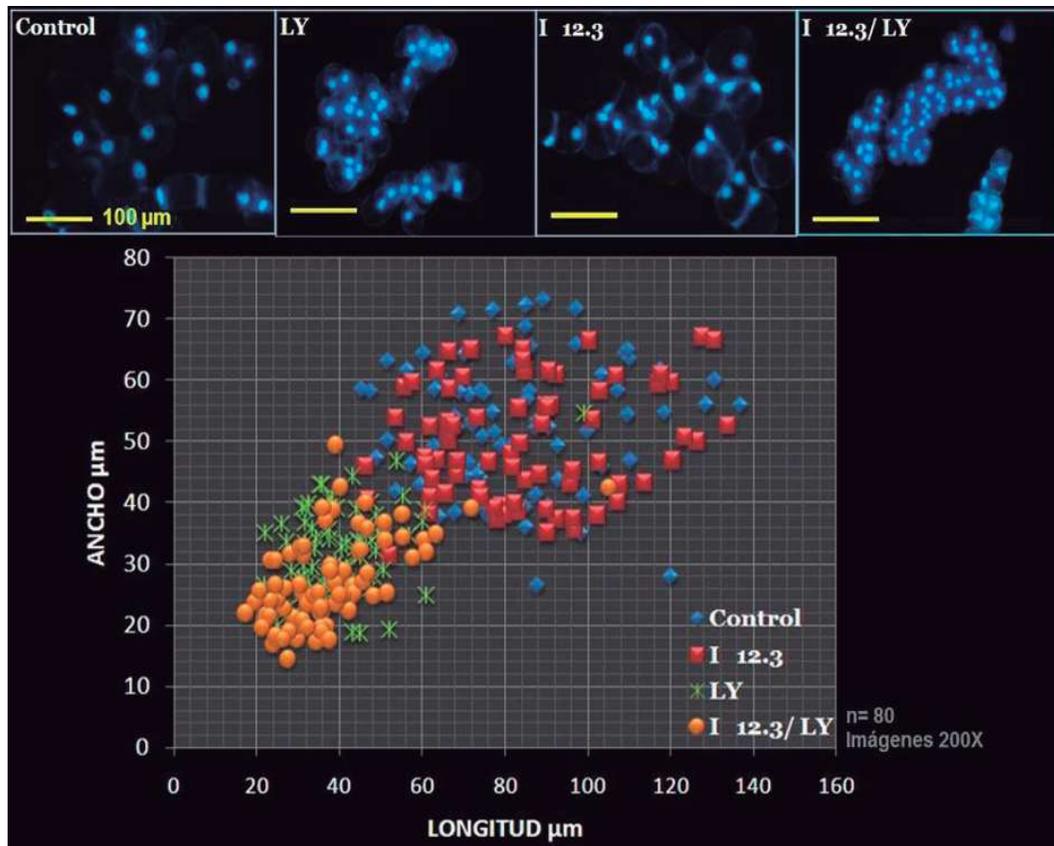
**Figura 14. Efecto del LY294002 sobre el crecimiento inducido por la insulina en las células de tabaco NT-1.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina o 11 μM de LY294002, solos o en combinación. Se evaluó el crecimiento de los cultivos en el día 7 de la fase logarítmica mediante: A) número de células, B) índice mitótico (IM). n= 4. ANOVA/Prueba de Fisher.  $P \leq 0.05$ . STATISTICA ver. 8.0.

Respecto al tamaño, las células bajo el tratamiento de I 1.23 son más pequeñas respecto al control, en cambio las células con la adición de I 1.23/LY presentaron un tamaño mayor comparadas con las del grupo de I 1.23 lo cual confirmó que el LY294002 inhibió la proliferación celular estimulada por la insulina (Fig. 15). Por otro lado, el tamaño celular en los cultivos suplementados con 11 μM de LY294002 fue pequeño, lo cual no puede atribuirse a una alta proliferación celular, debido a que los cultivos no presentaban ningún incremento en el número de células (Fig. 14 y 15).



**Figura 15.** Efecto del LY294002 sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 1.23 en la fase logarítmica. Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 nM de insulina o 11 µM de LY294002, solos o en combinación. En el día 7 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares. En la parte inferior se muestra el gráfico de longitud (eje x) vs. ancho (eje y) n= 80, y en la superior imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

Los tamaños celulares en los cultivos con el tratamiento I 1.23/LY fueron más pequeños comparados con los tratamientos control e I 1.23 (Fig. 16). Esto sugiere que la combinación del LY con una concentración alta de insulina tiene un efecto aditivo inhibiendo tanto la proliferación celular como la elongación celular. Lo primero debido a que el número de células en este tratamiento disminuyó con respecto a los tratamientos control e I 1.23 (Fig. 14A).

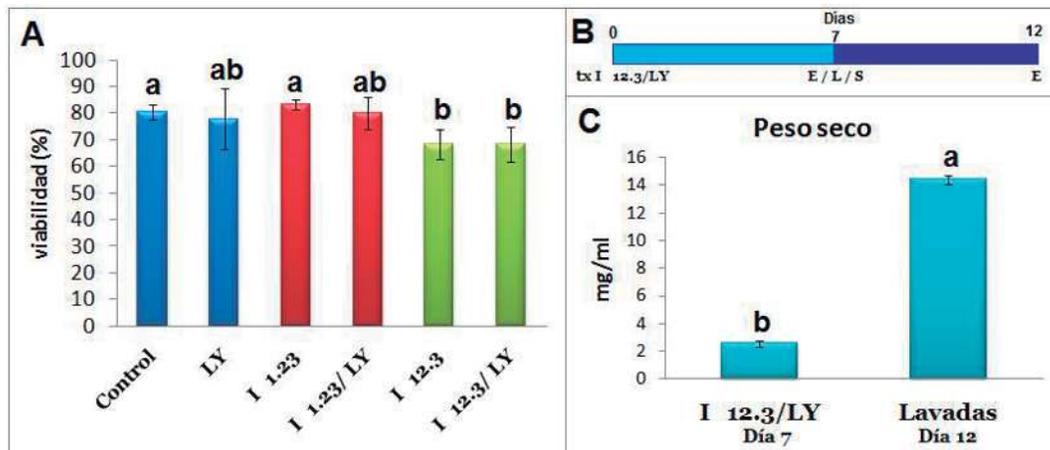


**Figura 16.** Efecto del LY294002 sobre el tamaño celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 12.3 en la fase logarítmica. Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 12.3 nM de insulina o 11  $\mu$ M de LY294002, solos o en combinación. En el día 7 de la fase logarítmica se hicieron las mediciones celulares. En la parte inferior se muestra el gráfico de longitud (eje x) vs. ancho (eje y)  $n=80$ , y en la superior imágenes representativas de las células con los diferentes tratamientos.

### 8.5 Efecto del inhibidor LY294002 y de la insulina sobre la viabilidad celular

Como en los experimentos anteriores el LY294002 disminuyó drásticamente el crecimiento celular evaluado por el número de células (Fig. 14) se decidió analizar la viabilidad celular de los grupos de tratamiento con ambas concentraciones de insulina o LY o en combinación. Para esta prueba se utilizó diacetato de fluoresceína como marcador de células viables, observándose al microscopio de epifluorescencia con una tonalidad verde fluorescente. La viabilidad celular disminuyó aproximadamente en un 15 % para los tratamientos de I 12.3 e I 12.3/LY con respecto al control. Sin embargo, esta disminución podría ser producida por la concentración alta de insulina ya que la

adición de LY no produjo un efecto aditivo sobre la disminución en la viabilidad (Fig. 17A). Además, se probó si los cultivos tratados con I 12.3/LY (grupo que presentó menor crecimiento y viabilidad celular) eran capaces de restablecer su crecimiento después de retirarles el inhibidor y la insulina. Este grupo de tratamiento al ser lavado y resuspendido en medio nuevo logró restablecer su crecimiento (Fig. 17C), lo que sugiere que el LY294002 inhibe el crecimiento sin producir la muerte de los cultivos NT-1.

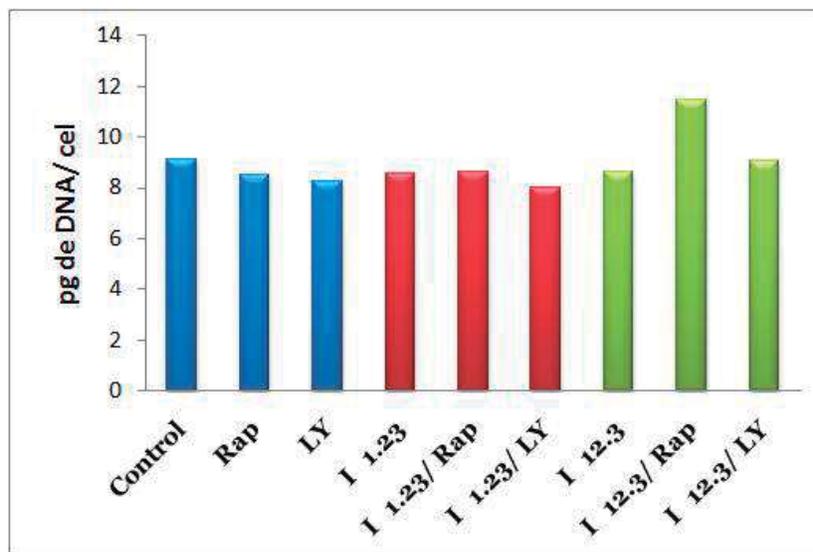


**Figura 17. Efecto de la insulina y el LY294002 sobre la viabilidad de las células NT-1.** Las células de *Nicotiana tabacum* fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina o 11  $\mu$ M de LY294002 solo o en combinación. A) Viabilidad celular evaluada en el día 7. B) Diagrama representativo del manejo de las células tratadas con I 12.3/LY. En el día cero se aplicó el tratamiento antes mencionado a los cultivos y se incubaron durante 7 días. En este día se tomaron 3 ml del cultivo y se evaluó el crecimiento por peso seco, el resto del cultivo se lavó con medio fresco y el paquete celular se resuspendió en 50 ml de medio nuevo, se colocó nuevamente en incubación por 5 días más. En el día 12 se evaluó el crecimiento por peso seco en los tiempos indicados en C. n= 2. ANOVA/Prueba de Fisher.  $P \leq 0.05$ . STATISTICA ver. 8.0.

## 8.6 Efecto de la insulina sobre el contenido de DNA y la expresión de genes del ciclo celular en los cultivos celulares NT-1

Hasta este momento los experimentos realizados muestran que los cultivos con los tratamientos LY, I 12.3, I 12.3/Rap, I 12.3/LY presentaron índices mitóticos elevados que no concuerdan con un incremento en el número de células. Lo anterior podría sugerir una regulación negativa en la ruta PI3K/TOR debido a que recientemente

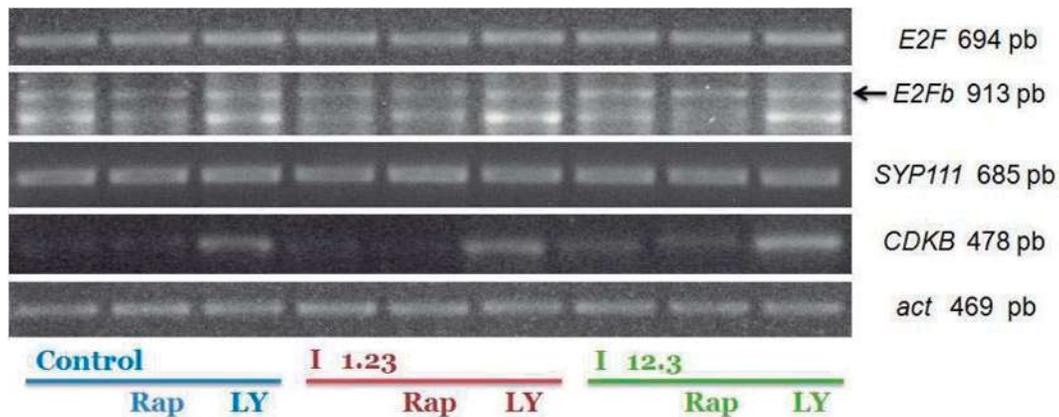
se ha relacionado a la cinasa S6K de *Arabidopsis* con componentes del ciclo celular como el factor de transcripción E2Fb y la cinasa mitótica CDKB. Líneas de baja expresión (RNAi-S6K1) y plantas mutantes *s6k1/s6k*, mostraron un incremento en los niveles de ploidía por una sobrerregulación de los componentes del ciclo celular E2Fb, DPa y CDKB (Henriques et al., 2010). Además, en cultivos celulares TBY-2 la sobreexpresión de los factores de transcripción E2F promovió un incremento en los niveles de ploidía y estas células presentaron índices mitóticos elevados (Magyar et al., 2005). Lo anterior indica que una regulación negativa sobre la cinasa S6K podría estar sobrerregulando a los factores E2F y promoviendo la endoreduplicación. Por las razones antes expuestas se decidió analizar el contenido de DNA en las células de los diferentes tratamientos, por citometría de flujo. Se ha reportado que *Nicotiana tabacum* contiene de 8.75 a 9.63 pg de DNA por célula diploide (Arumuganathan y Earle, 1991). Los resultados obtenidos de la citometría de flujo no mostraron ningún incremento en los niveles de ploidía bajo ningún tratamiento (Fig. 18).



**Figura 18. Efecto de la insulina y los inhibidores LY294002 y rapamicina sobre el contenido de DNA nuclear de las células NT-1 en suspensión.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina o 20 nM de rapamicina o 11  $\mu$ M de LY294002, solo o en combinación. En el día 7 de la fase logarítmica se aislaron los núcleos de las células sometidas a los diferentes tratamientos y se determinó el contenido de DNA por citometría de flujo. n= 2.

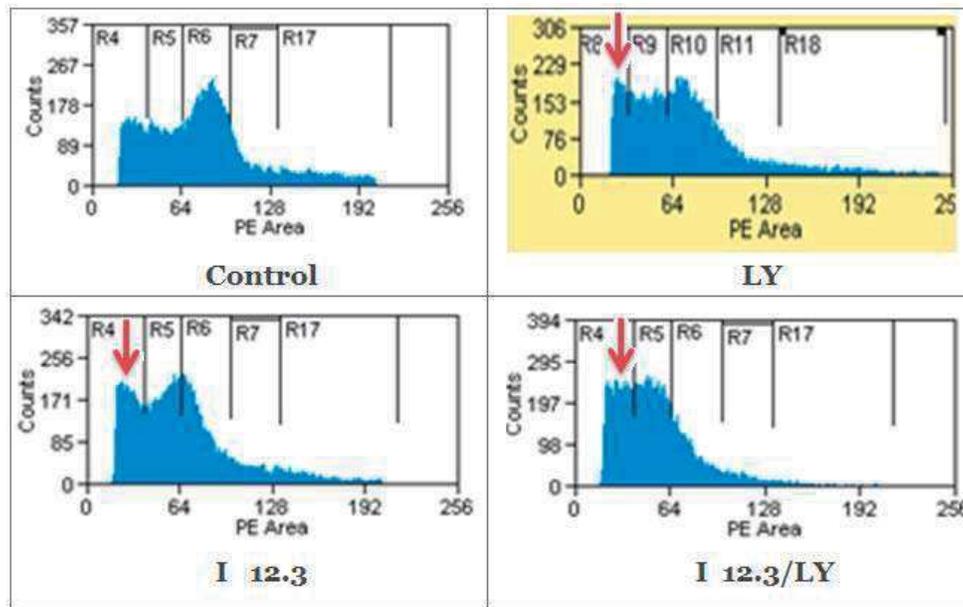
Además, se analizó la expresión de los genes del ciclo celular: *E2F*, *E2Fb*, *CDKB*, *SYP111* y *actina* (control de carga) en los distintos tratamientos. Para los genes *E2F* y *E2Fb* no se observaron diferencias en la expresión en ningún tratamiento (Fig. 19) esto concuerda con los resultados de citometría de flujo donde tampoco se obtuvo incrementos en el contenido de DNA; ya que de acuerdo con Henriques et al., un aumento en la ploidia debería coincidir con un aumento en la expresión de *E2F*. Como se observa en la Fig. 19, el único gen que mostró un incremento en la expresión fue *CDKB* en los tratamientos que contenían LY294002, lo que podría deberse a que una inhibición de la cinasa PI3K puede disminuir la activación de la cinasa S6K y el crecimiento. Por lo tanto, el incremento en la expresión de *CDKB* podría interpretarse como un efecto compensatorio para la inhibición de la proliferación observada en la Fig. 14.

En cuanto a *SYP111*, syntaxina que participa en la citocinesis la expresión de este gen tampoco varió en ningún tratamiento (Fig. 19). Resumiendo nuestros resultados muestran que la insulina no fue capaz de modificar la expresión de ninguno de los genes del ciclo celular ensayados.



**Figura 19. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes del ciclo celular.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 1.23 y 12.3 nM de insulina o 20 nM de rapamicina o 11  $\mu$ M de LY294002 solos o en combinación. Se extrajo el RNA total en el día 7 de crecimiento (fase log) y se realizó un análisis de RT-PCR semi-cuantitativo. Para cada muestra se realizó una amplificación con oligonucleotidos específicos para: *E2F*, *E2Fb*, *SYP111*, *CDKB* y *actina* como control de carga. Los productos de la amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1%. Las fotografías mostradas son representativas de dos repeticiones con resultados similares.

Inesperadamente en los resultados de citometría de flujo se encontró un incremento en la muerte celular para los tratamientos de I 12.3, LY e I 12.3/LY (Fig. 20). Esto fue observado por un aumento en el pico al cual se le ha denominado sub-G1 (Ahn et al. 2011), lo que sugiere que los tratamientos con I 12.3 nM y 11  $\mu$ M de LY294002 podrían estar regulando los procesos celulares que inducen la muerte celular en los cultivos NT-1, en forma contraria a I 1.23 nM que promueve la proliferación celular. Sin embargo, la viabilidad celular no disminuyó drásticamente en los tratamientos antes mencionados (Fig. 17A). Debido a las inconsistencias observadas es necesario utilizar ensayos específicos para la detección de muerte celular y posteriores investigaciones sobre las cascadas de señalización para estrés y muerte celular, para determinar si los programas de muerte son regulados a una concentración alta de insulina.



**Figura 20. Citometría de flujo de los núcleos de células tratadas con I 12.3 y LY294002.** Las células fueron crecidas en medio MS 1X (control) suplementado con 12.3 nM de insulina o 11  $\mu$ M de LY294002 solos o en combinación. Se aislaron los núcleos de las células sometidas a los diferentes tratamientos en el día 7 de la fase logarítmica y se determinó el contenido de DNA por citometría de flujo. Las flechas rojas muestran el area que corresponde a muerte celular.

---

---

## IX.- DISCUSIÓN

### 9.1 Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1

Las cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 de 8 y 14 días (Fig. 7 y 8) se obtuvieron cambiando la cantidad de inóculo en 100 ml de medio (7 y 3.5 ml de células en fase estacionaria respectivamente). Ambas cinéticas presentaron las fases de crecimiento características: lag, log y estacionaria como lo reportado por Matsuoka et al., 2004 y Nagata et al., 1992). Comparando las cinéticas de 8 y 14 días se observó que algunas fases variaron en su duración. La fase lag fue de 4 días en las dos cinéticas, esta fase ha sido descrita como la de adaptación de las células al medio (Matsuoka et al., 2004; Renaudin, 2004), por lo cual los dos cultivos tardaron el mismo tiempo en adaptarse a su entorno a pesar de que la cinética de 14 días inicia con una población celular menor. Por otro lado, la fase logarítmica fue de 3 días en la cinética de 8 días y de 4 en la de 14 días lo que indicaría que el crecimiento fue más rápido en esta última. Lo anterior podría deberse a que en la cinética de crecimiento de 14 días la densidad poblacional es menor y dispone de una mayor cantidad de nutrientes lo cual promueve un mayor crecimiento, comparado con la cinética de 8 días que empezó con el doble de células y por lo tanto una regulación más estricta. Al final del periodo exponencial la actividad mitótica se detiene progresivamente a causa de un agotamiento de nutrientes en el medio como: sacarosa, nitrógeno, fosfato y auxinas, por lo tanto las células entran en la etapa estacionaria de crecimiento (Renaudin, 2004; Matsuoka et al., 2004). La fase estacionaria presentó una duración de 2 días en la cinética de 8 días, y de 6 en la cinética de 14 días. En esta fase de crecimiento las células presentan una actividad mitótica nula (Matsuoka et al., 2004); y la rapidez de su aparición en la cinética dependerá del comportamiento observado en la fase log. De tal manera que en la cinética de 14 días el crecimiento exponencial fue más rápido por lo cual se agotan los nutrientes y alcanza la fase estacionaria antes, debido a esto la fase estacionaria fue más prolongada en la cinética de 14 días que en la de 8 (Fig. 7 y 8).

Por otro lado, al analizar el crecimiento de los cultivos celulares se determinó el IM para cada fase de crecimiento. Matsuoka en 2004 reporta que el IM más alto se encuentra en la fase log, siendo menor en la fase lag y nulo en la estacionaria (en fase lag a las 9 h tiene un IM de 3.4 %, en el día 4 de la fase log fue de 10.6 % y en la fase estacionaria al día 7 de 0 %) (Fig. 6). En este estudio se seleccionaron tiempos similares

---

a los reportados por Matsuoka, encontrándose que en la fase lag a las 6 h el IM fue de 1.37 %, en la fase log correspondiente al día 5 fue de 8.12 % y en la estacionaria del día 8 de 0.12 % (Fig. 7), de esta forma se presentó un comportamiento similar al descrito por Matsuoka. Posteriormente, se evaluó el IM diariamente durante la cinética de crecimiento donde se esperaba obtener el mismo comportamiento descrito anteriormente, es decir, valores bajos donde no se observaba crecimiento y porcentajes elevados en la fase exponencial. Sin embargo lo anterior no fue observado ya que se encontraron IMs elevados en la fase lag y al comienzo de la fase log, no obstante que en este periodo se presenta un menor crecimiento. Respecto a la fase logarítmica donde el crecimiento es mayor se observaron IMs que van disminuyendo progresivamente alcanzando un IM nulo en la fase estacionaria (Fig. 8). En la literatura existen reportes que muestran comportamientos similares en el IM al que se obtuvo en este trabajo, como el de Nagata et al., 1992 y Magyar et al., 2005. Ambos artículos presentan IMs altos en la fase lag y el comienzo de la log, posteriormente los valores del IM van disminuyendo paulatinamente en la fase log conforme el cultivo va creciendo y en la fase log terminal donde reportan el mayor crecimiento observan valores de IM bajos. Sin embargo, en estos reportes no se discute nada respecto a dicho comportamiento. Como se ha descrito que la tasa de incremento en el número de células en un cultivo es proporcional al número de células iniciales antes de cada división (Blanch y Clark, 1997), se piensa que dicho comportamiento del IM en las cinéticas de crecimiento podría deberse a que la cantidad inicial de células en la fase lag es escasa y aunque presente IM elevados, las primeras divisiones celulares no podrán ser notorias en la cinética evaluada por el número de células debido a la escala que se usó; mientras que en la fase log inicial el cultivo ya ha transcurrido por algunas divisiones y una duplicación celular en esta fase será fácilmente detectada debido a que fueron un número mayor de células las que se dividieron. Posteriormente, las células disminuyen su actividad mitótica conforme transcurren la fase log al ir agotando los nutrientes, hasta alcanzar la fase estacionaria donde no habrá actividad mitótica (Matsuoka et al. 2004).

---

## 9.2 Efecto de la insulina sobre el crecimiento

Para analizar el efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 se ensayaron dos concentraciones: 1.23 y 12.3 nM, las cuales en estudios previos mostraron que inducían el crecimiento de los cultivos NT-1 (Fierros Romero et al., 2010). Nuestros resultados indicaron que la I 1.23 nM incrementó el número de células y el IM en la fase logarítmica (Fig. 9), lo que concuerda con el reporte de Sotelo et al., (2010) donde se observa que la insulina a esta concentración promovió la proliferación celular y un incremento en el número de células pequeñas en los cultivos de callos embriogénicos de maíz. Además, también las células tratadas con I 1.23 presentaron tamaños celulares pequeños comparados con el control (Fig. 10) sugiriendo un incremento en la actividad proliferativa. En los cultivos de tabaco la proliferación celular está regulada principalmente por las auxinas, cuando la concentración de dicha hormona disminuye como en la fase estacionaria, las células comienzan a elongarse y detienen la división celular (Renaudin, 2004). Existen evidencias que sugieren que las auxinas presentan diferentes efectos en las células a través de dos rutas de señalización: a concentraciones bajas de auxinas las células se detienen en G1, mientras que las altas promueven la transición G2/M y la división seguida de una expansión mínima. En la primera de estas rutas se ha observado que se estimula la elongación celular a través de un receptor de alta afinidad para las auxinas donde se ha involucrado al receptor de auxina ABP1 (proteína de unión a auxina); mientras que en la vía que induce la división celular participa otro receptor de baja afinidad. Para esta última ruta los autores sugieren por evidencias farmacológicas la participación de una proteína G heterotrimérica la cual no ha sido identificada (Jones et al., 2004). También se ha determinado que las auxinas inducen la proliferación incidiendo en varios puntos del ciclo celular, como en la transición G1/S donde incrementan la actividad de los factores de transcripción E2F y en G2/M promoviendo la formación de los complejos CDKA-B/CYCB (Gutierrez, 2009). Por otro lado, en maíz se ha reportado que las auxinas al igual que la insulina estimulan la fosforilación de la proteína ribosomal S6 y el reclutamiento a polisomas de los transcritos para la S6 y el factor de iniciación de la traducción eIF-iso4E, sugiriendo que la insulina y las auxinas podrían presentar un cruce de señales (Beltrán-Peña et al., 2002). Por lo tanto, se creó que el efecto de I 1.23 nM podría ser a través de la regulación de la señalización de las auxinas en los cultivos NT-1. En nuestro equipo de

---

trabajo también se ha observado que la insulina no es capaz de estimular el crecimiento en los cultivos de tabaco en ausencia de las auxinas (datos no mostrados).

Respecto a la concentración de I 12.3 nM, esta promovió un aumento en el IM pero no en el número de células (Fig. 9) y tampoco modificó el tamaño celular (Fig. 10). Estudios en mamíferos han indicado que una sobreactivación de la ruta PI3K/mTOR por insulina causa una retroalimentación negativa sobre esta cascada (Yang y Guan, 2007). En otro reporte sobre cultivos celulares de alas de *Drosophila* la aplicación de 1  $\mu$ M de insulina retrasó el crecimiento y la progresión del ciclo celular en la transición G2/M por una regulación negativa de la ruta PI3K/TOR (Wu et al., 2007). En plantas Ellis y Eyster en 1923 reportaron que concentraciones elevadas de insulina retardaban el crecimiento de plántulas de maíz en forma dependiente de la concentración. Además en 1999 Sánchez de Jiménez y colaboradores analizaron el efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre la síntesis de proteínas ribosomales, encontrando que 200  $\mu$ U/ml incrementó la síntesis de dichas proteínas y 1000  $\mu$ U/ml la inhibió. Estos reportes sugieren que las concentraciones altas de insulina en las plantas podrían autoregular la ruta PI3K/TOR de manera similar a los organismos no fotosintéticos. Por lo anterior, se piensa que la concentración de I 12.3 nM podría tener un efecto negativo en los cultivos NT-1, debido a que obtuvo un incremento en el IM pero no en el número de células ya que podría estar retrasando la progresión de la mitosis en estos cultivos.

### **9.3 La insulina estimula el crecimiento de los cultivos celulares NT-1 a través de la cascada PI3K/TOR**

El crecimiento y la proliferación celular están fuertemente relacionados con la disponibilidad de nutrientes, niveles de energéticos, señales de desarrollo y factores de estrés a través de la ruta de señalización PI3K/TOR, además de que dicha cascada está conservada evolutivamente (Yang y Guan, 2007; Berkowitz et al., 2008; Krizek, 2009). Para estudiar la activación de las vías de señalización se hace uso de inhibidores de algunos componentes de la ruta como la rapamicina y el LY294002 para verificar la participación de la cascada PI3K/TOR (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Turck et al., 2004). Se ha demostrado que la insulina activa la ruta PI3K/TOR en maíz y dicha señalización fue confirmada con los inhibidores específicos para PI3K (wortmanina) y TOR (rapamicina) (Sánchez de Jiménez et al., 1999). En *Arabidopsis* la insulina

---

promovió el crecimiento a través de la activación de la cinasa TOR lo cual se demostró con el uso de rapamicina en líneas transgénicas sensibles (García Flores, 2010). En el presente estudio se usó la concentración de 20 nM de rapamicina previamente reportada para los cultivos de células de *Arabidopsis* en estudios sobre la activación de la cinasa TOR (Turck et al., 2004). Se observó que la adición de rapamicina a los cultivos celulares NT-1 no inhibió la proliferación celular estimulada por 1.23 nM de insulina (Fig. 11). Además, al medir el tamaño celular se confirmó que dicho macrólido no modificó este parámetro en ningún tratamiento (Fig. 12 y 13). También se probaron otras concentraciones de rapamicina como 50 y 100 nM, las cuales no inhibieron el crecimiento de los cultivos NT-1 (datos no mostrados), lo que sugiere que no tiene efecto alguno sobre el crecimiento de las células de tabaco. La rapamicina se ha usado en diferentes organismos vegetales como el maíz donde 100 nM inhibió la activación de la cinasa TOR por efecto de la insulina (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Reyes de la Cruz et al., 2004; Dinkova et al., 2007; Sotelo et al., 2010). En *Chlamydomonas reinhardtii* se han utilizado concentraciones entre 100 y 500 nM las cuales presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del alga unicelular (Crespo et al., 2005). Sin embargo, a diferencia de maíz que presenta sensibilidad a la rapamicina *Arabidopsis* es insensible aún a concentraciones de 10 mM (Sormani et al., 2007). En los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* 20 nM de rapamicina no indujo ningún efecto inhibitorio (Turck et al., 2004). Respecto a tabaco, no existen reportes del efecto de la rapamicina sobre su crecimiento. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los cultivos de tabaco NT-1 fueron insensibles a la rapamicina.

Por otro lado, para verificar la participación de la cinasa PI3K en los cultivos NT-1 suplementados con insulina, se adicionó 11  $\mu$ M de LY294002 (seleccionada a partir de un barrido de concentraciones de dicho inhibidor sobre el crecimiento de los cultivos de tabaco). De forma contraria a la rapamicina LY294002 inhibió la proliferación celular de los cultivos NT-1 suplementados con I 1.23 (Fig. 14). Además, cuando se evaluaron los tamaños celulares, LY promovió un mayor tamaño celular en el tratamiento de I 1.23/LY comparado con I 1.23 (Fig. 15) lo que confirma que LY294002 inhibió la proliferación celular inducida por I 1.23 nM. En 1999 Sánchez de Jiménez y colaboradores utilizando wortmanina reportaron que en maíz la señalización por insulina involucra la activación de la cinasa PI3K. Los resultados aquí obtenidos con el uso de LY294002 sugieren que la señal disparada por la insulina activa a la

---

---

cinasa de lípidos PI3K promoviendo el crecimiento. Lo anterior podría ocurrir a través de dos vías: 1) dependiente de la activación de la cinasa TOR o 2) independiente de la activación de TOR, debido a que en mamíferos se ha demostrado que PI3K puede inducir la síntesis de proteínas aún cuando la cinasa TOR se encuentre inhibida, lo que indicaría la participación de una ruta alterna promotora del crecimiento que depende solo de la activación de PI3K (Stolovich et al., 2002).

#### **9.4 Efectos de la inhibición de la cinasa PI3K**

En los cultivos tratados con LY, I 12.3, I 12.3/LY se encontró un aumento en el IM sin el incremento correspondiente en la proliferación celular (Fig. 14). Dangi y colaboradores reportaron que la inhibición de PI3K arresta a las células en las fases G2-M y una vez que entraron a mitosis bloquea a las células en la telofase y previene el progreso hacia la citocinesis (Dangi et al., 2003). Además, se ha reportado que la inhibición de dicha cinasa induce la apoptosis en la transición G2/M, retrasa la progresión mitótica paralelamente con una disminución en la activación del complejo ciclina B/cdk1 (Shtivelman et al., 2002). Por lo anterior, se creó que debido a la participación de PI3K en el ciclo celular, al adicionar LY294002 e inhibir esta cinasa en las células de tabaco ocurrió un bloqueo en la progresión mitótica, por lo cual se observó un aumento en la proporción de células en mitosis. Cabe mencionar que en las plantas se conoce menos de la participación de PI3K en el ciclo celular, sin embargo es posible que estos mecanismos regulatorios se conserven entre eucariontes.

También, la adición de LY294002 y I 12.3/LY inhibieron la elongación celular con respecto al tratamiento control (Fig. 15 y 16). Al igual que en otros eucariontes, en vegetales PI3K regula diferentes procesos celulares relacionados al crecimiento y es crucial para el desarrollo de los órganos vegetativos y reproductivos de la planta, ya que cuando se disminuye la expresión de PI3K afecta el desarrollo de hojas y tallos (Welters et al., 1994). Se ha comprobado la participación de PI3K en la ruta TOR regulando el crecimiento a través de la activación de la cinasa S6K y la síntesis de proteínas como en mamíferos (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Turck et al., 2004). Además a PI3K se le ha relacionado con sistemas de transporte de auxinas como las PIN (transportadores de eflujo de auxinas) a través de la activación de proteínas que regulan la localización de estos transportadores a la membrana plasmática, según los autores de forma similar a la

---

---

translocación que sufre Glut4 en mamíferos (Muday y Murphy, 2002). En las células de tabaco se ha demostrado que incrementando la proporción de PIN en la membrana disminuye la concentración intracelular de auxina y como consecuencia se produce una elongación celular (Mravec et al. 2008). Lo anterior sugiere que podrían ser varios procesos celulares afectados al agregar el inhibidor de PI3K, uno de ellos la síntesis de proteínas ya que este evento es de los primeros que se lleva a cabo durante el ciclo celular para incrementar el tamaño celular. Otra posibilidad es que se inhiba el transporte de PIN a la membrana lo cual afectaría el transporte de auxinas y cualquiera de estas dos posibilidades inhibiría la elongación celular.

Al medir la viabilidad de los cultivos NT-1 se observó una disminución en los tratamientos con I 12.3 y con I 12.3/LY (Fig. 17). Además, el análisis de citometría de flujo indicó que en estos tratamientos hubo un incremento en la muerte celular (Fig. 20). Algunos reportes en mamíferos sugieren que el tratamiento de LY294002 incrementa la proporción de células en apoptosis, lo anterior debido a que la inhibición de PI3K induce un arresto en la mitosis a causa de una disminución en la actividad del complejo ciclina B/cdk1 alcanzando hasta un 20 % de células que mueren intentando progresar a través de esta fase (Shtivelman et al., 2002). Otros autores sugieren mecanismos de señalización comunes que controlan la apoptosis y la mitosis, como la condensación de cromosomas, la pérdida del volumen celular y de la envoltura nuclear, así como el desensamblaje de orgánulos, por lo tanto la actividad de PI3K es fundamental para regular la progresión mitótica de forma correcta (Dangi et al., 2003). Nuestros resultados muestran que bajo el tratamiento con I 12.3, LY294002 y en combinación hay un incremento en la muerte celular y un gran porcentaje de estas células se encontraron en mitosis (Fig. 14), lo que sugiere que la actividad de PI3K es importante para la progresión de la mitosis y evitar la activación de procesos de muerte celular similar a lo reportado para mamíferos.

### **9.5 Participación de la insulina sobre la regulación de genes del ciclo celular y la endoreduplicación**

Nuestros resultados sugieren que en los tratamientos con I 12.3, LY y en combinación podría haber una regulación negativa sobre la cinasa PI3K lo cual podría tener un efecto negativo sobre la cinasa S6K. Recientemente se reportó que una

---

regulación negativa en la actividad de S6K en *Arabidopsis*, promueve un aumento del factor de transcripción E2Fb y como consecuencia un incremento de las proteínas necesarias en la fase S del ciclo celular lo que da lugar a incrementos en los niveles de ploidía (Henriques et al., 2010). Los resultados de la citometría de flujo del presente estudio indicaron que la insulina no fue capaz de promover crecimiento endoreduplicativo (Fig. 18), ni de regular la expresión de los factores de transcripción *E2F* (Fig. 19). Una sobrerregulación de estos factores ha sido relacionada con la activación de ciclos endoreduplicativos en plantas promoviendo que las células tengan núcleos grandes de hasta 8C (octaploides) o 16C (hexadecaploides) (Magyar et al., 2005; Henriques et al., 2010). Por lo tanto, al no tener un incremento en la expresión de estos genes era lógico esperar que las células NT-1 no presentaran diferentes niveles de ploidía. Con respecto a la expresión de *SYP111* no hubo cambios significativos bajo ningún tratamiento (Fig. 19). *SYP111* es una syntaxina que fue identificada en una mutante de *Arabidopsis* que presentaba defectos en la citocinesis, en dicho trabajo los autores no descartan la posibilidad de que esta proteína participe en otros procesos celulares como otros miembros de esta familia de proteínas, los cuales participan en el tráfico vesicular entre otros procesos (Lukowitz et al., 1996); esta podría ser la razón de que no se encontraran diferencias en su expresión. Además al analizar el nivel de expresión de *CDKB*, la insulina no fue capaz de promover la expresión de esta cinasa de la fase mitótica. Sin embargo, hubo un incremento en los tratamientos que contenían LY294002 (Fig. 19) que podría ser a causa de la inhibición de PI3K ya que como se mencionó anteriormente se disminuye la actividad del complejo ciclina B/Cdk1 en mamíferos cuando se inhibe a PI3K (Shtivelman et al., 2002). Siendo en plantas *CDKB* la cinasa que participa en la transición G2/M del ciclo celular, el aumento en la expresión podría ser un efecto compensatorio a una disminución de la actividad del complejo CYCB/*CDKB* en los tratamientos con LY. Sin embargo, se requieren análisis posteriores para descartar una posible regulación de la insulina sobre la actividad de las proteínas correspondientes a los genes analizados, ya que una gran cantidad de elementos del ciclo celular son regulados a nivel traduccional, postraduccional o por la formación de complejos proteicos.

---

## **X.- CONCLUSIÓN**

La insulina 1.23 nM estimuló la proliferación de los cultivos NT-1 a través de la activación de la cinasa PI3K y en la concentración de 12.3 nM no modificó el crecimiento de los cultivos de tabaco, pero puede tener un efecto negativo sobre la cinasa PI3K.

---

## XI.- PERSPECTIVAS

- Evaluar la participación de TOR en la cascada de señalización estimulada por insulina utilizando otras técnicas como: disminuir la expresión de la cinasa TOR creando líneas de RNAi o antisentido para el dominio cinasa de TOR; obtener líneas transgénicas sensibles a la rapamicina al clonar la secuencia del gen FKBP12 de levadura o humano en células NT-1; probar otro inhibidor directo sobre TOR que no dependa de FKBP12 como Torin.
- Evaluar la fosforilación de la proteína S6 ribosomal para comprobar la activación de la cascada de señalización PI3K/TOR.
- Sincronizar los cultivos NT-1 para determinar el efecto de la insulina en cada fase del ciclo celular, lo que nos permitirá conocer sobre que fase del ciclo actúa principalmente esta hormona.
- Utilizar otras técnicas para evaluar la posible existencia de muerte celular programada (PCD) en las células NT-1 como: TUNEL que es una prueba específica para ver la actividad por endonucleasas. En la PCD se afecta la permeabilidad de la membrana mitocondrial e incrementa la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así que determinando estos dos parámetros se confirmaría o descartaría si el programa de PCD se activa en las células NT-1 tratadas con I 12.3 y LY.

---

## XII.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahn C. S., Han J. A., Lee H. S., Lee S. and Pai H.S. 2011. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *Plant Cell*. 1-25.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2008. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group. USA. 879-904.
- An G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol*. 79: 568-570.
- Arumuganathan K. and Earle E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Beltrán-Peña E., Aguilar R., Ortíz-López A., Dinkova T. D. and Sánchez de Jiménez E. 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol. Plant*. 115: 291-297.
- Berkowitz O., Jost R., Pollman S. and Masie J. 2008. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 20: 3430-3447.
- Blanch H. W. and Clark D. S. 1997. *Biochemical Engineering*. Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York. 162-275.
- Breuer C., Ishida T. and Sugimoto K. 2010. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010. 13: 654-660.
- Browning K. S. 2004. Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 589-591.
- Byfield M. P., Murray J. T. and Backer J. M. 2005. hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* 280: 33076-33082.
- Chang L., Chiang S. H. and Saltiel A. R. 2004. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med.* 10: 7-12.
- Collip J. B. 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 56: 513-543.
- Crespo J.L., Diaz-Troya S. and Florencio F.J. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*. 139: 1736-1749.

- 
- 
- Dangi S., Cha H. and Shapiro P. 2003. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase activity during progression through S-phase and entry into mitosis. *Cell Sign.* 15: 667-675.
  - Deak M., Casamayor A., Currie R. A., Downes C. P. and Alessi D. R. 1999. Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett.* 451: 220-226.
  - Deprost D., Yao L., Sormani R., Moreau M., Leterreux G., Nicolai M., Bedu M., Robaglia C. and Meyer C. 2007. The Arabidopsis TOR Kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8: 864-870.
  - Dinkova T. D., Reyes de la Cruz H., García-Flores C., Aguilar R., Jiménez-García L. F. and Sánchez de Jiménez E. 2007. Dissecting the TOR-S6K signal transduction pathway in maize seedlings: relevance on cell growth regulation. *Physiol. Plant.* 130: 1-10.
  - Dixon R. A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. 1-20. In: *Plant cell culture a practical approach.* (R. A. Dixon, Ed.) IRL PRESS. Oxford-Washington DC.
  - Ellis M. M. and Eyster W. H. 1923. Some effects of insulin and glucokinin on maize seedlings. *Science.* 541-542.
  - Farias Escalera A., Beltrán Peña E. y Pardo Galván M. A. 2005. Control molecular del ciclo celular eucariótico. *Ciencia Nicolaita.* 42: 37-56.
  - Fierros Romero G., Peña Correa R., Mellado Rojas M. E. y Beltrán Peña E. M. 2010. Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Biológicas.* 12: 82-89.
  - García Flores M. 2010. Efecto de la rapamicina sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 60 pp.
  - Geelen D. N. V. and Inzé D. G. 2001. A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol.* 127: 1375-1379.
  - Goodman D. B. P. and Davies W. L. 1993. Insulin accelerates the postgerminative development of several fat-storing seed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 440-446.
  - Gutierrez C. 2009. The Arabidopsis cell division cycle. 1-19. In: *The Arabidopsis Book.* Plant Physiol.
- 
-

- 
- 
- Harashima H. and Schnittger A. 2010. The integration of cell division, growth and differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 66-74.
  - Haselbacher G. K., Humbel R. E. and Thomas G. 1979. Insulin-like growth factor: insulin o serum increase phosphorylation of ribosomal protein S6 during transition of stationary chick embryo fibroblasts into early G1 phase of the cell cycle. *FEBS. Lett.* 100: 185-190.
  - Henriques R., Magyar Z., Monardes A., Khan S., Zalejski C., Orellana J., Szabados L., de la Torre C., Koncz C. and Bögre L. 2010. Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J.* 29: 2979-2993.
  - Hiraga A., Kaneta T., Sato Y. and Sato S. 2010. Programmed cell death of tobacco BY-2 cells induced by still culture condition is affected by the age of culture under agitation. *Cell. Biol. International.* 34: 189-196.
  - Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J. and Guan K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat. Cell Biol.* 4: 648-657.
  - Inoki K., Zhu T. and Guan K. L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590.
  - Jager S. M., Maughan S., Dewitte W., Scofield S. and Murray J. A. H. 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 16: 385-396.
  - Jastrzebski K., Hannan K. M., Tchoubrieva E. B., Hannan R. D. and Pearson R. B. 2007. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors.* 25: 209-226.
  - Jefferies H. B. J., Fumagalli S., Dennis P. B., Reinhard C., Pearson R. B. and Thomas G. 1997. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16: 3693-3704.
  - Jones A. M., Ullah H. and Chen J. G. 2004. Dual pathways for auxin regulation of cell division and expansion. 181-191. In: *Biotechnology in agriculture forestry.* Vol. 53. Tobacco BY-2 cells. (T. Nagata, S. Hasezawa and D. Inzé, Eds.) Springer. Germany.
  - Krizek B. A. 2009. Making bigger plants: key regulators of final organ size. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 17-22.
- 
-

- 
- Lee Y., Munnik T. and Lee Y. 2010. Plant phosphatidylinositol 3-kinase. 95-106. In: Lipid Signaling in Plants, Plant Cell Monographs 16. (T. Munnik, Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
  - Lee. Y., Bak G., Choi Y., Chuang W. I., Cho H. T. and Lee Y. 2008. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol.* 147: 624-635.
  - Lewin B. 2001. Genes VII. MARBÁN, S. L. Edición en español. Oxford University Press. 835-874.
  - Lippmann R., Kaspar S., Rutten T., Melzer M., Kumlehn J., Matros A. and Mock H. P. 2009. Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 3012-3032.
  - Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P. and Hall M. N. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell Growth Control. *Mol. Cell.* 10: 457-468.
  - Lukowitz W., Mayer U. and Jürgens G. 1996. Cytokinesis in the Arabidopsis embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell.* 84: 61-71.
  - Luthe D. S. and Quatrano R. S. 1980. Transcription in isolated wheat nuclei. *Plant Physiol.* 65: 305-308.
  - Ma X. M. and Blenis J. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Mol. Cell Biol.* 10: 307-318.
  - Magyar Z., Atanassova A., Veylder L. D., Rombauts S. and Inzé D. 2000. Characterization of two distinct DP-related genes from Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* 486: 79-87.
  - Magyar Z., De Veylder L., Atanassova A., Bako L., Inze D. and Bögre L. 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell.* 17: 2527-2541.
  - Mahfouz M. M., Kim S., Delauney A. J. and Verma D. P. S. 2006. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell.* 18: 477-490.
  - Mariconti L., Pellegrini B., Cantoni R., Stevens R., Bergounioux C., Cella R. and Albani D. 2002. The E2F family of transcription factors from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 9911-9919.
-

- 
- Mathews C. K., Van Holde K. E. and Ahern K. G. 2002. Bioquímica. Pearson Addison Wesley. España. 931-982.
  - Matsuoka K., Demura T., Galis I., Horiguchi T., Sasaki M., Tashiro G. and Fukuda H. 2004. A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 45: 1280-1289.
  - Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 6422-6427.
  - Mizoguchi T., Hayashida N., Shinozaki Y. K., Kamada H. and Shinozaki K. 1995. Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 358: 199-204.
  - Morgan D. O. 2007. The cell cycle principles of control. New Science Press Ltd. Oxford University Press. 297pp.
  - Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrsek J., Skupa P., Chand S., Benkova E., Zazimalova E. and Friml J. 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development.* 135: 3345-3354.
  - Muday G. K. and Murphy A. S. 2002. An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell.* 14: 293-299.
  - Nagata T., Nemoto Y. and Hasezawa S. 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132: 1-30.
  - Nagata T., Sakamoto K. and Shimizu T. 2004. Tobacco BY-2 cells: the present and beyond. *In Vitro cell. Dev. Biol. Plant.* 40: 163-166.
  - Nobukuni T., Joaquin M., Roccio M., Dann S. G., Kim S. Y., Gulati P., Byfield M. P., Backer J. M., Natt F., Bos J. L., Zwartkuis F. J. T. and Thomas G. 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 14238-14243.
  - Olivares-Reyes J. A. y Arellano-Plancarte A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB.* 27: 9-18.
  - Perrot-Rechenmann C. 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 1-15.
  - Portillo M., Fenoll C. and Escobar C. 2006. Evaluation of different RNA extraction methods for small quantities of plant tissue: Combined effects of reagent type and
-

- 
- homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiol. Plant.* 128: 1-7.
- Potter C. J., Pedraza L. G. and Xu T. 2002. Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. *Nat. Cell Biol.* 4: 658-665.
  - Renaudin J. P. 2004. Growth and physiology of suspension-cultured plant cells: the contribution of Tobacco BY-2 cells to the study of auxin action. 160-180. In: *Biotechnology in agriculture forestry*. Vol.53. Tobacco BY-2 cells. (T. Nagata, S. Hasezawa and D. Inzé, Eds.) Springer. Germany.
  - Reyes de la Cruz H., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70S6K. *Biochem.* 43: 533-539.
  - Robaglia C., Menand B., Lei Y., Sormani R., Nicolai M., Gery C., Teoulé E., Deprost D. and Meyer C. 2004. Plant growth: the translational connection. *Biochem. Society Trans.* 32: 581-584.
  - Rodríguez-López C. D., Rodríguez-Romero A., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays L.*) peptide growth factor. *Prot. Pept. Lett.* 18: 1-8.
  - Saltiel A. R. and Kahn C. R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414: 799-806.
  - Sánchez de Jiménez E., Beltrán Peña E. and Ortiz López A. 1999. Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105: 148-154.
  - Schalm S. S., Fingar D. C., Sabatini D. M. and Blenis J. 2003. TOS Motif-mediated Raptor Binding regulates 4EBP1 multisite phosphorylation and function. *Curr. Biol.* 13: 797-806.
  - Sekine M., Ito M., Uemukai K., Maeda Y., Nakagami H. and Shinmyo A. 1999. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett.* 460: 117-122.
  - Shtivelman E., Sussman J. and Stokoe D. 2002. A role for PI3-kinase and PKB activity in the G2/M phase of the cell cycle. *Curr. Biol.* 12: 919-924.
  - Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C. and Robaglia C. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7: 26-33.
-

- 
- Sotelo R., Garrocho-Villegas V., Aguilar R., Calderón M. E. and Sánchez de Jiménez E. 2010. Coordination of cell growth and cell division in maize (*Zea mays L.*) relevance of the conserved TOR signal transduction pathway. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 46: 578-586.
  - STATISTICA ver 8.0 Stat Sof. Inc. Tulsa, OK, USA.
  - Stolovich M., Tang H., Hornstein E., Levy G., Cohen R., Bae S. S., Birnbaum M. J. and Meyuhas O. 2002. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 22: 8101-8113.
  - Tee A. R., Manning B. D., Roux P. P., Cantley L. C. and Blenis J. 2003. Tuberous Sclerosis Complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* 13: 1259-1268.
  - Turck F., Kozma S. C., Thomas G. and Nagy F. 1998. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18: 2038-2044.
  - Turck F., Zilbermann F., Kozama S. C., Thomas G. and Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal Transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1527-1535.
  - Tzeng T. Y., Kong L. R., Chen C. H., Shaw C. C. and Yang C. H. 2009. Overexpression of the lily p70s6k gene in Arabidopsis affects elongation of flower organs and indicates TOR-dependent regulation of AP3, PI and SUP translation. *Plant Cell Physiol.* 50: 1695-1709.
  - Venancio T. M., Oliveira A. E. A., Silva L. B., Machado O. L. T., Fernandes K. V. S. and Xavier-Filho J. 2003. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). *Brazilian J. Med. Biol. Research.* 36: 1167-1173.
  - Vezina C., Kudelski A. and Sehgal S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* 10: 721-726.
  - Virgilio C. D. and Loewith R. 2006. The TOR signaling network from yeast to man. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1476-1481.
-

- 
- Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y. and Brown R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.
  - Welters P., Takegawa K., Emr S. D. and Chrispeels M. J. 1994. AtVPS34, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 11398-11402.
  - Wu M. YW., Cully M., Andersen D. and Leever S. J. 2007. Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex. *EMBO J.* 26: 371-379.
  - Yang Q. and Guan K. L. 2007. Expanding mTOR signaling. *Cell Res.* 17: 666-681.

---

### XIII.- ANEXOS

1.- Peña-Correa R., Mellado-Rojas M. E. y Beltrán-Peña E. 2010. TOR: regulador central del crecimiento en organismos eucariontes. 85-99. En: Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas. (E. Beltrán-Peña y J. López-Bucio, Eds.) Ediciones Michoacanas. Morelia, Michoacán, México.

2.- Fierros Romero G., Peña Correa R., Mellado Rojas M. E. y Beltrán Peña E. M. 2010. Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Biológicas*. 12: 82-89.