

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Efecto de la insulina en la activación de las
cascadas PI3K-TOR y MAPK en cultivos de células
de tabaco NT-1**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

PRESENTA

.: Q. F. B. GRISEL FIERROS ROMERO :.

ASESORA

D.C. ELDA MARÍA BELTRÁN PEÑA

COMITÉ TUTORAL

D.C. Ernesto García Pineda

D.C. José López Bucio

D.C. Homero Reyes de la Cruz

D. C. Rafael Salgado Garciclia

Morelia, Michoacán, Febrero de 2012

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio del proyecto No. 48712.

A mi hija Natalia Noemí

AGRADECIMIENTOS

A la D.C. Elda María Beltrán Peña

Con un profundo respeto y admiración, agradezco el tiempo dedicado a la formación que tuve en esta maestría. Además de ser una motivación para continuar con estudios posteriores.

A la D.C. María Elena Mellado Rojas

Un gran agradecimiento por todas las experiencias buenas que me llevo y por todo lo aprendido. Agradezco también el conocimiento transmitido de diferentes técnicas moleculares, en especial de los ensayos de Western blot que realicé a su lado.

Al D. C. Víctor Manuel Baizabal Aguirre

Agradezco su disposición para permitirnos el manejo de radiactividad en las instalaciones del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como invitarnos al curso de manejo de radiactividad como personal ocupacionalmente expuesto (POE).

A mi comité tutorial:

D.C. Homero Reyes de la Cruz

D. C. José López Bucio

D.C. Ernesto García Pineda

D. C. Rafael Salgado Garciglia

Gracias por su tiempo y conocimientos transmitidos.

A mis compañeros de laboratorio

Rocío, Ricardo, Edgar, Ernesto y Chucho por compartir diversas experiencias que llevaré siempre conmigo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Capítulo I Antecedentes.....	2
1.1. Insulina	2
1.2. Efecto de la insulina en plantas	2
1.3. Cascada de señalización PI3K-TOR	3
1.3.1. TOR en plantas	5
1.3.2. PI3K en el desarrollo	5
1.4. Cascada de señalización de las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	5
1.5. Activación simultánea de las rutas PI3K-TOR y MAPD	7
1.6. Línea celular NT-1	8
1.7. Crecimiento en plantas	9
1.7.1. Proliferación celular	9
1.7.1.1.Reguladores del ciclo vegetal	11
1.7.2. Elongación celular.....	12
1.7.2.1.Expansinas	13
1.7.2.2.Expansión celular medada por auxinas.....	14
1.7.3. Endorreduplicación	14
1.7.4. Genes reguladores del crecimiento vegetal	14
1.8. Auxinas	15
1.8.1. Efecto de las auxinas en cultivos vegetales en suspensión	17
1.8.2. Genes de respuesta temprana a auxinas	17
1.8.2.1.Glutatión-S-Transferasa (PAR B).....	18
1.8.2.2.Genes inducibles por auxinas	18
1.8.2.2.1. Subunidad β de la proteína G (ARC A).....	18
1.8.2.2.2. Fosfolipasa A2 (PLA2)	
Justificación.....	20
Hipótesis	21
Objetivo General.....	22

Objetivos específicos.....	22
Capítulo II Materiales y métodos.....	23
2.1.Estrategia Experimental General	23
2.2. Mantenimiento de la línea celular NT-1	23
2.2.1. Preparación del inóculo para las cinéticas de crecimiento	24
2.3.Cinéticas de crecimiento.....	24
2.3.1. Determinación de Volumen de Paquete Celular.....	24
2.3.2. Determinación de peso seco	24
2.3.3. Determinación del Índice Mitótico (IM)	24
2.3.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento.....	25
2.3.5. Determinación del tamaño celular	25
2.4.Preparación de los diferentes tratamientos	25
2.5.Determinación de viabilidad celular	25
2.6.Extracción de proteínas de las células NT-1	26
2.6.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	26
2.7.Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE	26
2.8.Análisis tipo Western blot	27
2.8.1. Transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.....	27
2.8.2. Detección	27
2.9.Marcado de proteínas ribosomales	27
2.10.Extracción de RNA.....	28
2.11.RT-PCR	28
2.11.1Condiciones de amplificación	29
2.12. Análisis de datos	30
Capítulo III Resultados	
3.1.Crecimiento de los cultivos celulares NT-1	31
3.2.Efecto de la insulina sobre los cultivos NT-1.....	32
3.3.Evaluación del crecimiento de los cultivos NT-1 a través las rutas PI3K-TOR encendidas por insulina	34
3.3.1. Expresión de genes reguladores del ciclo celular en los cultivos NT-1 tratados con Torin.....	41

3.3.2. Expresión de genes reguladores del ciclo celular en los cultivos NT-1 suplementados con insulina e inhibidores de componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK.....	42
3.3.3. Activación por insulina de las cascadas de señalización PI3K-TOR y MAPK.....	43
3.4.Efecto de la insulina y la auxina 2,4-D en los cultivos NT-1	45
3.4.1. Efecto de la insulina dependiente de 2,4-D sobre la proliferación de los cultivos NT-1	47
3.4.2. Efecto de la insulina sobre la proliferación de los cultivos con baja concentración de auxina	49
3.4.3. Expresión de genes reguladores de la proliferación y la expansión en los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina suplementados con insulina	51
3.5.Activación de las rutas PI3K-TOR y MAPK en cultivos NT-1 parcialmente sincronizados por privación de auxinas.....	55
3.5.1. Expresión de genes reguladores de la proliferación celular en cultivos NT-1 semi sincronizados	58
Capítulo IV Discusión	61
4.1.La insulina estimula la proliferación en los cultivos NT-1	61
4.2.Activación por insulina de las vías PI3K-TOR y MAPK en los cultivos NT-1	61
4.3.La insulina estimula la proliferación de los cultivos NT-1 de forma dependiente de la concentración de 2,4-D	64
4.4.Activación diferencial de las vías PI3K-TOR y MAPK en los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados.....	64
Conclusiones.....	66
Perspectivas	67
Bibliografía.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Activación de la cascada PI3K-TOR por insulina.....	4
2. Activación de la cascada MAPK por insulina	7
3. Ciclo celular en plantas.....	11
4. Expansión dependiente de auxinas	13
5. Representación esquemática de la distribución intracelular y los mecanismos de acción de las auxinas endógenas	16
6. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1	32
7. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre crecimiento de los cultivos NT-1	33
8. Efecto de la insulina sobre la proliferación y el tamaño celular.....	34
9. Velocidad específica de crecimiento de cultivos NT-1 a diferentes concentraciones de insulina	35
10. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK.....	35
11. Efecto de la insulina y algunos inhibidores de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre el crecimiento de los cultivos NT-1	36
12. Efecto de la insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K y MAPK sobre la proliferación celular en los cultivos NT-1.....	37
13. Efecto de los inhibidores de algunos componentes de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre la viabilidad de los cultivos NT-1	37
14. Efecto de torin sobre la viabilidad celular de los cultivos NT-1	38

15. Efecto de diferentes concentraciones de Torin sobre el crecimiento de los cultivos NT-1	39
16. Efecto de torin en la proliferación y el tamaño de las células de los cultivos NT-1	40
17. Efecto de torin sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina	41
18. Efecto de torin sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular	42
19. Efecto de la insulina y los inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular	43
20. Efecto de la insulina e inhibidores de la cinasa TOR sobre la fosforilación de la proteína ribosomal S6 por insulina.....	44
21. Efecto de la insulina y UO126 sobre la activación de las cinasas MAPK 3/6 en los cultivos NT-1.....	45
22. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 en medio sin auxina ...	46
23. Efecto de la insulina en la proliferación y tamaño de los cultivos NT-1 sin auxina	47
24. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D sobre el crecimiento de los cultivos NT-1	48
25. Efecto de diferentes concentraciones de auxina en la proliferación y el tamaño celular de los cultivos NT-1.....	49
26. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina	50
27. Efecto de la insulina en la proliferación y el tamaño de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina	51
28. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular en los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina.....	52
29. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes reguladores de la expansión en los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina.....	53

30. Efecto de la insulina sobre la viabilidad de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina.....	54
31. Efecto de la insulina sobre la activación de MAPK 3/6 en cultivos NT-1 con baja concentración de auxina	55
32. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados	56
33. Cinéticas de crecimiento de cultivos NT-1 parcialmente sincronizados suplementadas con insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK.....	57
34. Efecto de la insulina y algunos inhibidores de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados	58
35. Efecto de la insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular en cultivos NT-1 parcialmente sincronizados.....	59

ABREVIATURAS

2,4-D Ácido 2,4 diclorofenoxiacético	PBS Buffer de Fosfato Salino
ABP1 AUXIN BINDING PROTEIN1	PDK 1 Cinasa Dependiente de Fosfoinosítido 1
Abs Absorbencia	PGP .fosfoglicoproteínas resistentes a multidrogas
AIA Acido Indol-Acético	PI3K Fosfatidil-inositol 3–cinasa
BSA Albúmina Sérica Bovina	PIN PIN FORMED 1
BY-2 Bright Yellow 2	PIP2 Fosfatidil-inositol 4,5 difosfato
CDKB Cinastas Dependientes de Ciclinas	PIP3 Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato
DAPI 4',6-diamino-2 fenilindol	PKB Proteína Cinasa B
DFA Diacetato de Fluoresceína	RAM Root Apical Meristem
DNA Ácido desoxirribonucleico	RNA Ácido ribonucleico
eIF4E Factor de inicio de la traducción	RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
ERO Especie Reactivas de Oxígeno	SAM Shoot Apical Meristem
GFP Proteína Verde Fluorescente	SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
GST Glutación-S- Transferasa	TAP42 Subunidad reguladora de la proteína fosfatasa A2
IGF Factores de crecimiento parecidos a insulina	TBS Buffer de Tris Salino
IM Índice Mitótico	TIR1 Proteína resistente a inhibidores de transporte
IRS Sustrato Receptor de Insulina	TOR Target of Rapamicyn
MAPK Proteína Cinastas Activadas por Mitógenos	TSC1/TSC2 Complejo de las proteínas de esclerosis tuberosa
mi-RNA micro RNA	VPC Volumen de Paquete Celular
MS Murashige and Skoog	
NPA Ácido N-1-naftitalámico	
NT-1 <i>Nicotiana tabacum</i> 1	
PAT Transporte Polar célula a célula	

Resumen

En metazoarios la insulina regula tanto los niveles de glucosa en sangre como el crecimiento, esto último a través de la activación de las rutas de señalización PI3K-TOR y MAPK. No obstante, aunque la insulina es una de las hormonas clásicas de animales, plantas como frijol, maíz, tabaco y *Arabidopsis* también responden a esta hormona, estimulando el desarrollo. En el presente estudio en cultivos celulares de tabaco (línea celular NT-1), dicha hormona incrementó la proliferación de forma dependiente de la concentración de la auxina 2,4-D a través de las vías PI3K-TOR y MAPK, cuya participación se comprobó con los inhibidores LY294002, rapamicina, UO126 y torin. Los cultivos suplementados con las concentraciones habituales de 2,4-D más insulina presentaron un incremento en la expresión de *CDKB* y de la fosforilación de la proteína ribosomal S6, la cual se inhibió con rapamicina y torin, implicando así la participación de la vía PI3K-TOR. Por otra parte, se propone que la insulina también activa la vía MAPK, debido al efecto inhibitorio de UO126 sobre el crecimiento previamente estimulado por insulina. En cultivos carentes de 2,4-D, la adición de nuevo de auxina más insulina promovió la proliferación y el incremento de la expresión de *E2F*, mientras que en bajas concentraciones de 2,4-D, la hormona estimuló la expresión de los genes *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F* y *GST*. Torin promovió la proliferación transitoria y la expresión genética de *CICLINA B* y *E2F* y cambió la forma de las células alargadas a redondas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Insulina

La insulina es una hormona proteica con un peso molecular de 6 kDa, que en mamíferos es segregada por el páncreas. Las células capaces de responder a la insulina poseen un receptor en su superficie, el cual es una proteína transmembranal compuesta de dos cadenas polipeptídicas α y dos β (Karp, 2005). La insulina incrementa la absorción de glucosa en las células por la estimulación de la translocación de transportadores de glucosa desde sitios intracelulares hasta la superficie y activa dos cascadas de transducción de señales: la vía del fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) y la de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La activación de la cascada de señalización por insulina o factores de crecimiento parecidos a la insulina, inicia cuando éstos se enlazan al receptor tirosina-cinasa de la insulina que se autofosforila y cataliza la fosforilación de proteínas celulares como algunos miembros de la familia del sustrato receptor de insulina (IRS), Shc y Cbl. Cuando se fosforilan estas últimas proteínas, interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, resultando en un encendido de diversas rutas de señalización como la de la PI3K y MAPK. Estas rutas actúan coordinadamente para regular el tráfico vesicular, la síntesis de proteínas, la activación de enzimas y la expresión genética, lo cual resulta en una regulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas (Saltiel y Kahn, 2001).

1.2. Efecto de la insulina en plantas

Existen evidencias de que la insulina puede estar involucrada en el crecimiento de las plantas, los primeros reportes de la presencia de sustancias parecidas a la insulina inicialmente denominadas “glucocininas” (Best, 1923; Collip, 1923) se encontraron en cebollas, hojas de lechuga, raíces de cebada, remolacha, germinados de papa y arroz. En maíz se observó que concentraciones altas de insulina y glucocinina retardaban la germinación del maíz, mientras que bajas concentraciones la aceleraban (Ellis and Eyster, 1923). Otros estudios han reportado que aislados proteicos de centeno etiolado, hojas de espinacas y *Lemna gibba* presentaban propiedades fisicoquímicas similares a la insulina de animales (Collier *et al.*, 1987). En cultivos de pepino, sandía y semillas de girasol se observó una emergencia más rápida de la radícula, sugiriendo con ello que dicha hormona presentaba un papel regulador tanto en plantas como en animales (Goodman and Davis, 1993). En estudios más detallados se reportó que la insulina aceleraba la germinación del maíz promoviendo el reclutamiento a polisomas del transcrito de la proteína ribosomal S6 y el incremento en el nivel de fosforilación de dicha proteína (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1997). La presencia de dos péptidos reconocidos por anticuerpos contra insulina bovina de aproximadamente 8 y 24 kDa en

extractos de maíz germinado por 46 horas (Beltrán-Peña, 1997). Dichos péptidos fueron purificados, caracterizados y reportados como factores de crecimiento como insulina de maíz (ZmIGF) de 20 kDa y 5.7 kDa respectivamente, este último con actividad y estructura similar a la insulina bovina (García Flores *et al.*, 2001; Rodríguez-López *et al.*, 2011). Dicha proteína regula el crecimiento y la división celular en maíz, promoviendo la síntesis de proteínas ribosomales y DNA (Rodríguez-López *et al.*, 2011). En *Phaseolus vulgaris*, concentraciones crecientes de insulina bovina estimularon un incremento de masa y tamaño de los epicotilos y raíces, así como del número de raíces laterales (Santos, 2003). Estudios *in silico* han servido para construir árboles filogenéticos y comprobar la similitud de algunas secuencias de moléculas parecidas a la insulina en plantas y animales, lo cual apoya la participación de proteínas parecidas a la insulina en el desarrollo de las plantas (Koonen, 2010). En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la insulina promueve el crecimiento de la raíz y de pelos radiculares en *Arabidopsis* a través de la vía MAPK (Juárez -Domínguez, 2010; Pascual-Morales, 2011). En cinéticas de crecimiento de cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* (NT-1) se determinó que la adición de 1.23 y 12.3 nM de insulina estimularon el crecimiento de las células en fase log, así como un incremento en masa y volumen (Fierros -Romero, 2010).

1.3. Cascada de señalización PI3K-TOR

La insulina en metazoarios se une a su receptor induciendo la activación de la fosfatidil-inositol 3-cinasa [PI3K] a través de la activación del sustrato receptor de la insulina (SRI: Fig. 1) (Saltiel y Kahn, 2001). La cinasa PI3K cataliza la fosforilación de un lípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP₂) en la posición 3'OH produciendo fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Este último permite el reclutamiento a la membrana plasmática de la cinasa dependiente del fosfoinosítido 1 (PDK 1) y la proteína cinasa B (PKB) también conocida como Akt. Esta última separa el complejo de las proteínas de escleroticismo tuberosa TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina). Al ser separado el complejo TSC1/TSC2 se inhibe la actividad de la proteína RHEB (proteína de enlace a GTP homóloga de TOR. Esta última cinasa fosforila a sus blancos: la proteína de enlace al factor de inicio de la traducción eIF4E (4EBP) y la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) (Manning y Cantley, 2003). Al fosforilar TOR a 4EBP se libera al factor de inicio de la traducción eIF4E del complejo inactivo eIF4E/4EBP, permitiendo con ello que la proteína eIF4E forme el complejo de iniciación de la traducción eIF4F (formado por eIF4A, eIF4E y eIF4G). eIF4E es el factor limitante en el inicio de la traducción que se une a la estructura Cap (m⁷GpppN) en el extremo 5' de los mRNAs (Gingras *et al.*, 2001). S6K a su vez fosforila a la proteína ribosomal S6 y los ribosomas fosforilados en S6 traducen preferencialmente a los mRNAs que presentan tramos de oligopirimidinas en el extremo 5' UTR (TOP). Los transcritos con estas características codifican para componentes del aparato traduccional, principalmente las proteínas ribosomales (Meyuhas, 2000).

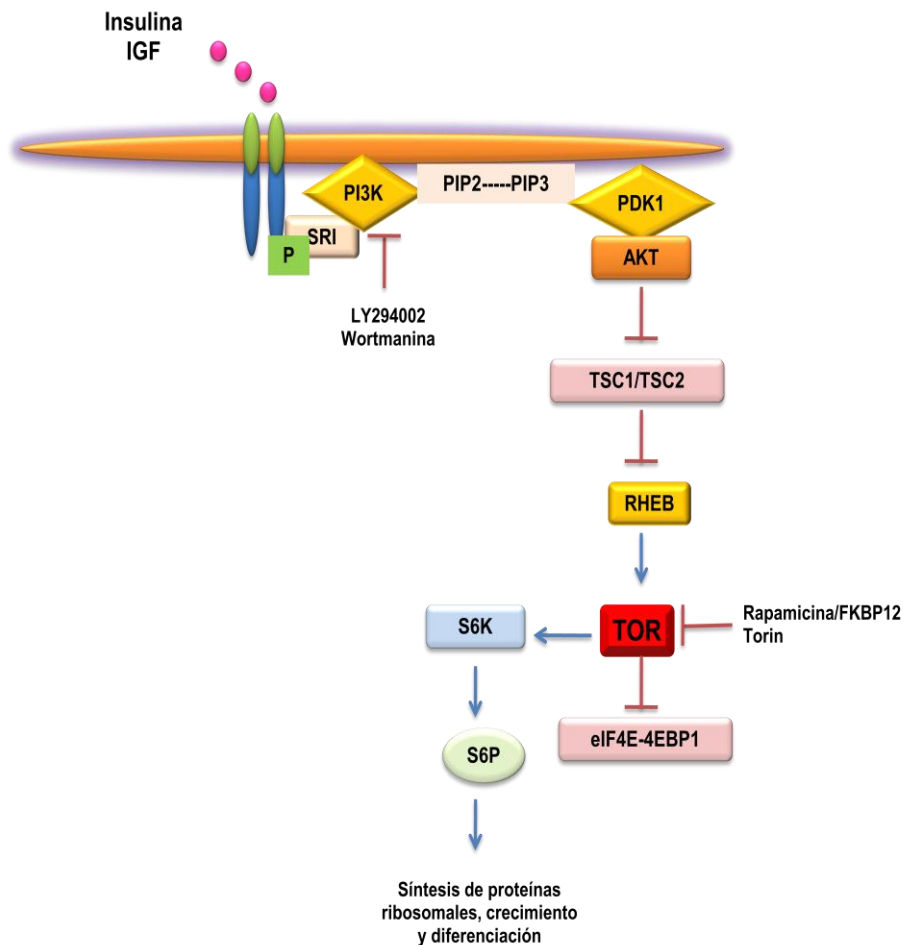


Figura 1. Activación de la cascada PI3K-TOR por insulina. El receptor de la insulina al unirse a su agonista se autofosforila y a través de la activación de PI3K, se promueve la fosforilación de TOR, esta última cinasa activa a sus blancos: la proteína 4EBP1 que libera al factor de inicio de la traducción eIF4E y S6K que fosforila a la proteína ribosomal S6 promoviendo así la síntesis de proteínas ribosomales, el crecimiento y la diferenciación (Saltiel y Kahn, 2001). Para estudiar esta cascada se han utilizado los inhibidores LY294002 y wortmanina que bloquean la actividad de PI3K, rapamicina que al formar un complejo con la proteína FKBP12 inhibe a TOR y torin que actúa directamente sobre TOR (Vezina *et al.*, 1975; Thoreen *et al.*, 2009).

Las plantas, al igual que otros eucariontes poseen un gen que codifica para TOR, siendo ésta una proteína que regula la actividad de S6K1 (Menand *et al.*, 2002; Turck *et al.*, 2004). Sin embargo, las plantas carecen de genes ortólogos de la proteína de unión a eIF4E. Para el estudio de la cascada PI3K-TOR se utilizan compuestos químicos sobre algunos de sus componentes, como el LY294002 que es un inhibidor altamente selectivo de la cinasa PI3K (Vlahos *et al.*, 1994). Dicho inhibidor se enlaza directamente con PI3K e inhibe su actividad, bloqueando la fosforilación de PKB, S6K y 4EBP. Turck y colaboradores (2004) utilizaron un sistema de cultivos en suspensión de *Arabidopsis*, observando que 50µM de LY294002 abolía completamente la actividad de S6K. La rapamicina o sirolimus es un antimicótico producido por *Streptomyces hygroscopicus* (Vezina *et al.*, 1975), que se une con alta afinidad a la inmunofilina FKBP12, formando un complejo que se enlaza a TOR, bloqueando así la fosforilación de S6K y 4EBP en mamíferos (Brunn *et al.*, 1996). Existen reportes de una resistencia de las plantas superiores a la acción de la rapamicina, aunque el maíz y las algas verdes

como *Chlamydomonas reinhardtii* son susceptibles (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 2005). En mamíferos se ha descrito un inhibidor competitivo con el sitio de unión a ATP de TOR conocido como torin (Thoreen *et al.*, 2009) y en plantas se ha observado que también bloquea la actividad de la cinasa S6K (Schepetilnikov *et al.*, 2011).

1.3.1. TOR en plantas

La cinasa TOR forma parte de dos complejos proteicos conocidos como TORC1 y TORC2 que controlan diferentes procesos como la autofagia, la traducción o síntesis de proteínas, la biogénesis del ribosoma, la dinámica de actina y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). En mamíferos la actividad de TOR es regulada por insulina, factores de crecimiento parecidos a insulina (IGF), nutrientes y ATP. TOR regula positivamente el crecimiento en *Arabidopsis* y su nivel de expresión se relaciona con el tamaño de las plantas, indicando su papel central en el desarrollo vegetal (Deprost *et al.*, 2007). Recientemente, se encontró que una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa A2 (TAP42) es un efector corriente abajo de la señalización de TOR (Ahn *et al.*, 2011). También, TOR regula procesos relacionados a la expansión en *Arabidopsis*, modulando la expresión del represor de una extensina (LRX1), *ROL5*, dicha extensina se ha visto involucrada en la formación de la pared celular (John *et al.*, 2011)

1.3.2. PI3K en el desarrollo

PI3K es una proteína cinasa codificada en plantas por un solo gen *VPS34* que fosforila al lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2) produciendo fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) (Welters *et al.*, 1994). Se ha reportado que la cinasa PI3K regula diferentes procesos del desarrollo como la formación de nódulos radiculares (Hong y Verma, 1994), producción de especies reactivas de oxígeno y el gravitropismo de la raíz (Joo *et al.*, 2005), cierre de los estomas (Jung *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003), en procesos de endocitosis y producción de especies reactivas de oxígeno en estrés salino (Leshem *et al.*, 2007). Además PI3K modula el tráfico vesicular durante la elongación de pelos radiculares de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2008).

1.4. Cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

La cascada de las MAPK promueve la expresión de genes del metabolismo, muerte, proliferación, diferenciación celular, estrés físico y químico en mamíferos y levaduras (Widmann *et al.*, 1999; Chen and Resh, 2001). La ruta MAPK está conservada evolutivamente entre los organismos eucariontes y consiste de tres tipos de proteínas cinasas: cinasa de MAP (MAPK), cinasa de MAPK (MAPKK) y cinasa de MAPKK (MAPKKK) (Chen y Resh, 2001). La vía de las MAPK en mamíferos (Fig. 2) es encendida por insulina y/o IGF, activando a través del receptor tirosina-cinasa a las

proteínas GRB2 y SHC vía su dominio SH2. En plantas, la cascada MAPK está involucrada en diferentes respuestas a estrés biótico y abiótico (Nakagami *et al.*, 2005). Análisis de la secuencia de *Arabidopsis* han revelado que la familia de las MAPKs consiste de 80 genes que codifican para las MAPKKK, 10 para las MAPKK y 20 para las MAPK (Rodríguez *et al.*, 2010a). Aunque esta vía se ha estudiado principalmente en respuestas de defensa, existen reportes de su implicación en procesos de división celular y desarrollo celular (Chiri *et al.*, 1998; Soyano *et al.*, 2003). En células de tabaco encontraron que la cinasa NPK1 (MAPKKK) fue activada principalmente en ápices de brotes y raíz. Estos estudios demostraron una disminución de la proteína NPK1 al final de la citocinesis, sugiriendo así, que NPK1 juega un papel importante en la formación de la pared celular. Estos mismos autores observaron que homólogos de NPK1 en *Arabidopsis* (ANP1, ANP2 y ANP3) al mutarse dos de ellos (ANP2 y ANP3), presentaban un fenotipo enano en las plantas y un defecto débil en la citocinesis, siendo letal la triple mutante. Los mismos autores, elucidaron que la cascada MAPK en tabaco está constituida por NPK1/NQK1/NRK1 y en *Arabidopsis* por ANP3/AtMKK6/AtMAPK4. La cascada MAPK en tabaco (NPK1/NQK1/NRK1) fue denominada NACK-PQR (Takahashi *et al.*, 2004). Samaj y colaboradores (2002) observaron en alfalfa que una pérdida de la función de SIMK daba lugar a la formación a pelos radiculares deformes, mientras que una sobreexpresión inducía el crecimiento acelerado de dichos órganos. Se ha reportado, que el bloqueo de la vía MAPK con mutantes o con inhibidores, impide y previene la estimulación del crecimiento y diferenciación celular en mamíferos y plantas (Favata *et al.*, 1998; Samaj *et al.*, 2002). Ma y Yu (2010) ensayaron el inhibidor específico de MAPK en células de tabaco BY-2, el U0126, observando una disminución de los niveles de fosforilación de MAPK y de la progresión de la telofase a la citocinesis temprana durante el ciclo celular.

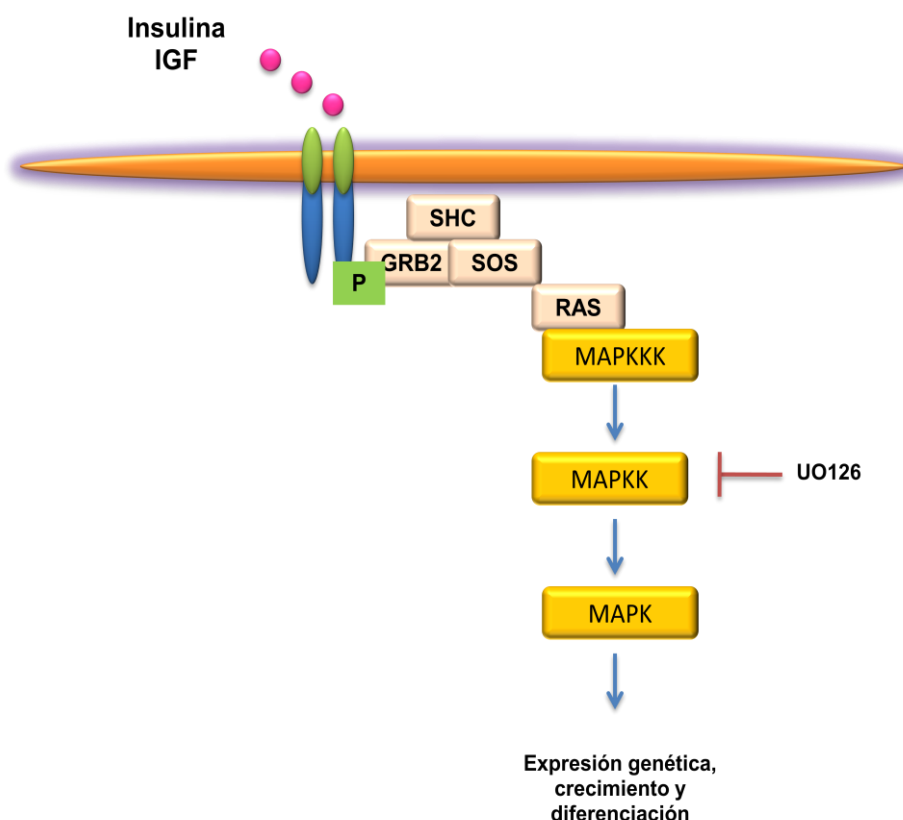


Figura 2. Activación de la cascada MAPK por insulina. La insulina se une a su receptor con actividad tirosina-cinasa que fosforila a las proteínas SHC y SOS, promoviendo a su vez, la activación de la proteína de unión a GTP RAS. Lo anterior, activa consecutivamente a las cinasas MAPKKK, MAPKK y MAPK, regulando finalmente la expresión genética, el crecimiento y la diferenciación (Saltiel and Kahn, 2001). Para el estudio de esta ruta se ha utilizado ampliamente el inhibidor UO126 que bloquea la actividad de MAPKK (Favata *et al.*, 1998).

1.5. Activación simultánea de las rutas PI3K y MAPK

La activación encendida por la insulina en mamíferos controla diversos procesos metabólicos (Saltiel y Kahn, 2001). En mamíferos se ha reportado que ambas vías PI3K y MAPK, pueden activarse en forma diferencial, para regular los niveles de glucosa en sangre en algunas patologías como la resistencia a la insulina (diabetes tipo II). Yu y colaboradores (2011), observaron que el factor de transcripción de respuesta temprana a estrés (EGR-1) durante la hiperinsulinemia bloquea la vía PI3K a través de la activación de la fosfatasa PTEN (desfosforila a PI3K) y promueve la activación de la ruta MAPK promoviendo la resistencia a la insulina al bloquear la fosforilación de SRI en la serina 612. En otros estudios, se reportó que el encendido de las rutas PI3K y MAPK regula la activación de proteínas Myc involucradas en el crecimiento y proliferación celular. Dichas proteínas, participan en la degradación de la proteína Mad1 que controla el ensamble del huso mitótico (Zhu *et al.*, 2008). Respecto a las plantas, Mizoguchi y colaboradores (1996) en *Arabidopsis* reportaron la activación de las dos rutas por un mismo estímulo, encontrando que los niveles de transcritos de las proteínas cinasas

AMEKK1 (MAPKKK), ATMAPK3 (MAPK) y ATPK19 (proteína relacionada a p70 y p90 de la cinasa S6) se incrementaban simultáneamente cuando las plantas se sometieron a estreses salino y frío, sugiriendo con ello que las vías de transducción de señales pueden ser reguladas en plantas tanto a nivel transcripcional como traduccional (Mizoguchi *et al.*, 1996).

1.6. Línea celular NT-1

An, en 1982 estableció la línea celular NT-1 a partir de la línea BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), la cual se ha utilizado en diferentes laboratorios alrededor del mundo (An, 1985; Alvarez *et al.*, 1994; Robledo-Paz, 2006). La línea celular NT-1 es genéticamente igual a las células BY-2 (*Nicotiana tabacum*) es decir, es un híbrido interespecífico de dos especies de tabaco -*Nicotiana sylvestris* x *Nicotiana tomentosiformis*. Las células de tabaco BY-2, así como las NT-1 presentan características únicas: crecimiento rápido y alta homogeneidad (Nagata *et al.*, 2004). Los cultivos NT-1 son heterogéneos con una población de mayor número de agregados celulares que los BY-2, ambos están formados por células redondas y alargadas (Alvarez *et al.*, 1994; Nagata y Kumagai, 1999). El medio adecuado para el crecimiento de las células NT-1, es el Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.2 g/l KH_2PO_4 y una mezcla de vitaminas (5 mg/l de tiamina y 0.5g/l de mioinositol), además de 3% sacarosa y 0.2 mg/l de 2,4-D (Nagata, 1992). Los cultivos crecen a temperatura constante (25°C) y agitación continua (120 rpm), alcanzando la fase estacionaria a los 7-8 días, con una densidad de 15×10^6 células/ml o un volumen de paquete celular (VPC) del 40% (Alvarez *et al.*, 1994). El VPC es un parámetro variable debido a que su evaluación se obtiene a partir de la interpolación en la graduación del tubo y del volumen de las células que a su vez depende de su contenido de agua y de los cambios en el tamaño celular durante el desarrollo del cultivo. Mientras que el peso seco es una variable que determina la biomasa total de un cultivo en suspensión, la cual está relacionada con la tasa de producción y consumo de nutrientes. (Alvarez *et al.*, 1994). Los cultivos NT-1 son sistemas parecidos a los BY-2, por lo que es factible el estudio de diversos procesos celulares en ambas líneas (Alvarez *et al.*, 1994; Nagata y Kumagai, 1999; Ruiz *et al.*, 2010).

El crecimiento de células vegetales en suspensión de las líneas celulares BY-2 y NT-1 presentan una cinética que consta de tres fases: lag o de adaptación al medio, log o de crecimiento exponencial y estacionaria en la que se presenta un agotamiento de nutrientes. En cada uno de los diferentes estadios de la cinética de crecimiento se observaron varios tamaños de células, además de una gran variedad de genes que se expresan en cada una de las fases (Nagata *et al.*, 2004). Para clasificar dichos genes se realizaron microarreglos a partir de cDNAs de las fases lag, log y estacionaria, encontrando que proteínas cinasas transmembranales y factores de transcripción se expresaron durante la fase estacionaria. Esto último sugiere que en dicha fase, las células BY-2 presentan la capacidad de responder a señales extracelulares como la adición de fitohormonas y mitógenos como la insulina. Otros genes que se expresaron

en fase estacionaria, además de los antes mencionados fueron receptores de tipo no cinasa, canales iónicos y transportadores, lo que también podría indicar que durante esta fase se activa el transporte de nutrientes (Matsuoka *et al.*, 2004). Los cultivos en suspensión se han utilizado en una gran cantidad de disciplinas por su disponibilidad celular, la facilidad de manipulación y el bajo costo de mantenimiento. El cultivo de células vegetales es un sistema simple para el aislamiento y purificación de proteínas libres. Además la transformación mediada con *A. tumefaciens* se realiza rutinariamente en una gran cantidad de laboratorios, a partir de callos que darán origen a cultivos en suspensión transgénicos (van der Fits *et al.*, 2000). Por otra parte, debido a la facilidad de los análisis microscópicos de las células de tabaco, estas se han convertido en sistemas útiles para la localización subcelular de proteínas a través del marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP). Usando marcadores específicos de organelos, compartimientos de membrana y citoesqueleto unidos a GFP, dichas estructuras se han visualizado en las células de tabaco, así como otros componentes celulares (Kost *et al.*, 1998; Granger, 2000; Boruc *et al.*, 2010).

Una gran cantidad de investigaciones sobre el ciclo celular se realizan en cultivos en suspensión de tabaco debido a que su comportamiento es comparable a la división continua de los meristemos en plantas (Nagata y Kumagai, 1999; Geelen e Inze, 2001). A pesar de la gran cantidad de investigaciones que se llevan a cabo en cultivos vegetales en suspensión, se ha cuestionado si los estudios relacionados con el metabolismo, pueden ser válidos en procesos que no impliquen división celular y que pudieran ser paralelos a lo que ocurre en plantas (Nagata and Kumagai, 1999). En los últimos años se han empleado los cultivos de células en suspensión como modelo de investigación para elucidar procesos específicos de plantas completas. Por ejemplo, se observaron alteraciones similares en la organización y elongación en células BY 2 y en embriones de *Arabidopsis* en líneas transgénicas con el antisentido del receptor de auxina ABP1 (Chen *et al.*, 2001). Además se ha reportado que una mutación de *tap 46* (subunidad reguladora de una fosfatasa A2) afecta el crecimiento en *Arabidopsis* y la formación de puentes de cromatina durante la anafase, al igual que en las células BY-2 (Ahn *et al.*, 2011). Por otra parte se ha reportado una localización similar del transportador de eflujo PIN8 en la membrana plasmática en células BY-2 y en raíces de *Arabidopsis* (Ganguly *et al.*, 2010). Lo antes mencionado muestra que los cultivos de células en suspensión representan una herramienta útil en la investigación del desarrollo vegetal.

1.7. Crecimiento en plantas

Análisis moleculares en células de metazoarios han enfatizado la diferencia entre el crecimiento (incremento de la masa celular) y proliferación celular (aumento en el número de células). Las plantas presentan patrones de desarrollo y morfogénesis que son determinados por la división, la expansión y la diferenciación celular de forma similar a otros eucariontes. El proceso de desarrollo vegetal comienza con la embriogénesis donde se forman los meristemos apicales: a partir del RAM (del inglés Root Apical Meristem) se desarrolla la raíz y del SAM (del inglés Shoot Apical

Meristem) las hojas, ramas y flores (Conlon y Raff, 1999). El crecimiento por expansión se puede definir como un aumento irreversible y permanente de volumen de una célula, tejido, órgano o individuo, generalmente acompañado de un incremento de masa que ocurre después de la mitosis (Tais, 2006). Las plantas tienen la capacidad de regenerarse en respuesta a daño y frecuentemente realizan endoreduplicaciones, un proceso de crecimiento que consiste en la replicación del ADN (en inglés DNA) sin llevar a cabo la citocinesis (Perrot-Rechenmann, 2010).

1.7.1. Proliferación celular

El ciclo de división celular (Fig. 3) es un evento altamente regulado que genera dos células hijas a partir de una progenitora y consta de cuatro fases consecutivas: G1, S, G2 y M (Morgan, 2007). Durante la división, la célula pasa por dos etapas: la mitosis y la interfase (G1, S y G2). En la fase G1 se sintetizan materiales, como RNA (en inglés ARN) y proteínas; en la fase de síntesis (S) se replica el DNA y se sintetizan histonas. Cuando la replicación finaliza, la célula transcurre a través de G2 donde se sintetizan los componentes necesarios para la división celular (fase M) y comienza la condensación gradual de la cromatina completándose durante las primeras etapas de la mitosis dando lugar a cromosomas visibles al microscopio (Buchanan, 2000; Morgan, 2007). A través de análisis citológicos, se han distinguido varios estadios de la mitosis: en la profase la cromatina se condensa, aparece el huso mitótico y no se observan los nucléolos; la membrana nuclear comienza a disgregarse y las cromátidas de cada cromosoma se hacen visibles. Los cromosomas migran hacia el plano ecuatorial de la célula; en la metafase, los cromosomas condensados se encuentran alineados en el plano ecuatorial de forma independiente unos de otros; en la anafase se dividen por sus centrómeros, separándose en dos cromátidas que son desplazadas hacia polos opuestos de la célula, cuya cromátida es ya un cromosoma hijo independiente y finalmente en la telofase comienzan a condensarse formándose membranas nucleares que delimitan dos núcleos. Durante la citocinesis la membrana nuclear separa el citoplasma en dos partes, cada una con un núcleo y la mitad de los orgánulos, formando dos células hijas (Morgan, 2007).

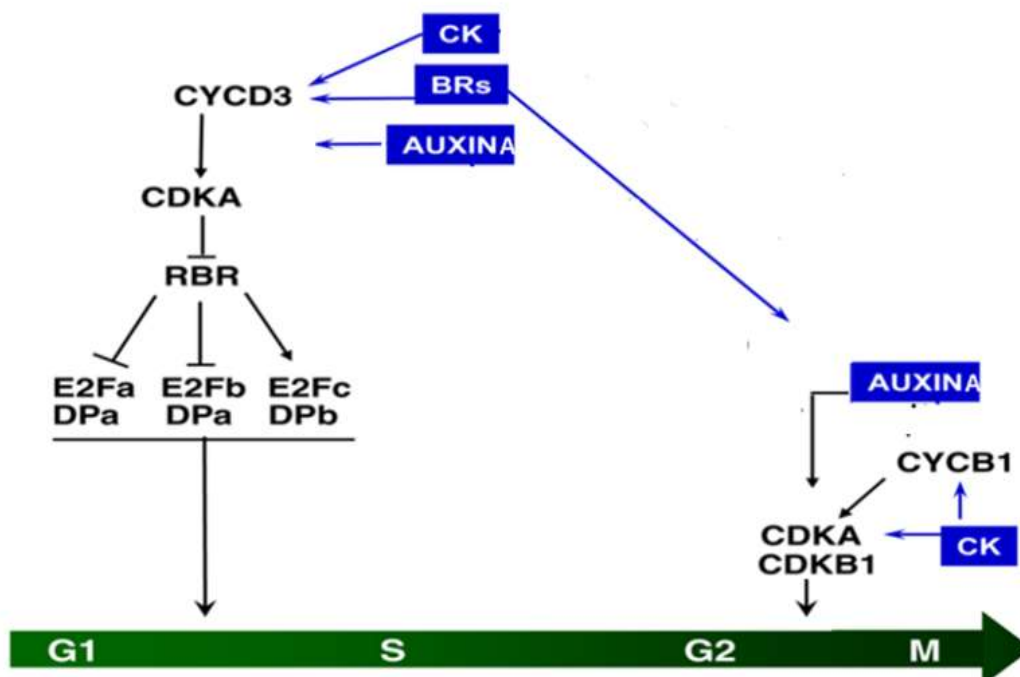


Figura 3. Ciclo celular en plantas. La progresión a través del ciclo es regulada por complejos de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKB), cuya actividad a su vez es modulada por fitoreguladores como citocininas, brasinoesteroides y auxinas. Durante la transición G1/S el complejo ciclina D/CDKA fosforila a la proteína RBR, liberando entonces al factor de transcripción E2F que se encuentra formando parte del complejo inactivo RBR/E2F y promueve la transcripción de genes necesarios para la síntesis de DNA. Específicamente durante la interfase G2/M interviene el complejo ciclina B/CDKA/CDKB que fosforila principalmente a factores de transcripción MYB que promueven la expresión de genes que intervienen en la mitosis (Gutierrez, 2009).

1.7.1.1. Reguladores del ciclo celular vegetal

La remarcable conservación genética del ciclo celular en eucariontes se ha confirmado con estudios en el genoma de *Arabidopsis* (Vandepoele *et al.*, 2002). Al igual que en otros eucariontes, la progresión a través del ciclo celular en plantas es conducida por cinasas heterodiméricas constituidas por las subunidades regulatorias llamadas ciclinas y las subunidades catalíticas denominadas como cinasas dependientes de ciclinas (CDK). *Arabidopsis* contiene una familia compleja de doce CDKs clasificadas en grupos del A- F (Menges *et al.*, 2005). La CDK tipo A contiene un motivo PSTAIRE de unión a ciclina, el cual está conservado en levadura y mamíferos. Las CDKB (CDKB1;1, CDKB1;2, CDKB 2;1 y CDKB 2;2) son específicas de plantas y se expresan activamente en la fase G2 del ciclo celular, estas cinasas presentan el motivo de unión a ciclina PP/STA/TLRE y su expresión máxima en la transición G2/M (Porceddu *et al.*, 2001; Boudolf *et al.*, 2004). Las CDKA y CDKB cooperan en la regulación de la transición G2/M. Las CDKD (CDKD1, CDKD2 y CDKD3) se relacionan a la cinasa CAK de mamíferos y la CDKF es específica de plantas (Kitsios *et al.*, 2008). Por otra parte, las ciclinas comprenden una familia numerosa agrupada en: diez del tipo A, once B, diez D y una H. Las ciclinas D participan en la transición G1/S, las A están involucradas desde la fase S hasta la mitosis y las ciclinas B en la progresión

G2/M. La expresión de las ciclinas B y D depende principalmente de las auxinas y citocininas, las condiciones de crecimiento y el desarrollo (De Veylder *et al.*, 2007). Además, en plantas se ha identificado una proteína relacionada al retinoblastoma (RBR) homóloga a la de mamíferos (Grafí *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1996; Dewitte and Murray, 2003; Shimizu-Sato *et al.*, 2008) y una familia de factores de transcripción E2F (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). El genoma de *Arabidopsis* contiene la secuencia para los factores E2Fa, E2Fb y E2Fc que requieren dimerizarse con las proteínas DPa o DPb. Estos E2F/DP regulan la expresión de una colección de genes necesarios para la progresión del ciclo. En todos los casos, los promotores de respuesta a E2F presentan al menos una secuencia consenso TTTSSCGS (Ramírez-Parra *et al.*, 2003). Otros factores de transcripción que contribuyen a la transición del ciclo celular son los MYB, que actúan en la etapa tardía de G2. En tabaco se ha identificado que dichos factores interactúan con las cajas MSA presentes en los promotores de sus genes blanco que son requeridos para la progresión de la fase M (Ito *et al.*, 2001; Araki *et al.*, 2004). Los fitorreguladores (citocinina, auxina y brasinoesteroides) y factores de crecimiento como la sacarosa son reguladores positivos de las ciclinas D y A que permiten la progresión de la transición G1/S (Gutierrez *et al.*, 2002; Inze and De Veylder, 2006). El blanco principal de los complejos CDKA/CycD en la fase G1 es la proteína RBR (Ach *et al.*, 1997), cuya fosforilación conduce a una disociación del complejo de los factores de transcripción E2F/DP unidos a RBR (Rossignol *et al.*, 2002). Los factores E2Fa y E2Fb son considerados activadores, mientras que E2Fc actúa como represor del ciclo (Gutierrez, 2005; Inze and De Veylder, 2006). E2F regula diferentes aspectos del desarrollo vegetal como la transición de células proliferantes al ciclo de endorreduplicación (Gutierrez, 2005). Durante la transición G2/M interviene la cinasa CDKA asociada con las ciclinas A y principalmente las ciclinas B (Inze and De Veylder, 2006). En la transición G2/M se requiere la expresión de CDKB dependiente de E2F (Boudolf *et al.*, 2004). Los complejos CDKA/CDKB– Ciclinas son activados por CAK. Dichos complejos fosforilan varios factores de transcripción específicos de G2. Finalmente la citocinesis en plantas comienza en el centro del plano de división con la formación del fragmoplasto y el arreglo del citoesqueleto. La dinámica de microtúbulos en el fragmoplasto requiere de las proteínas conocidas como NACK1 en células de tabaco BY-2 y de su blanco NPK1 que es una cinasa triple (MAPKKK) de la cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Nishihama *et al.*, 2002; Strompen *et al.*, 2002).

1.7.2. Elongación celular

En plantas, el tamaño y la forma celular están estrictamente regulados por la naturaleza física de la pared celular de las células en expansión, dicho proceso es además modulado por fitorreguladores como la auxina (Fig. 4). La planta está compuesta por órganos, tejidos y células que requieren patrones específicos de elongación en respuesta a señales ambientales diferentes y hormonales. La expansión celular o elongación es un incremento en tamaño celular durante el desarrollo de la planta. La elongación ocurre fuera de la zona de división al incrementar la presión de

turgencia mediante el alargamiento de la vacuola por el ingreso de agua, la síntesis *de novo* de la pared celular y de los componentes de la pared (Perrot-Rechenmann, 2010). Las células vegetales están delimitadas por una compleja y dinámica pared que tiene un papel crítico en el tamaño y forma de las células. La estructura de la pared primaria está formada por una red de microfibrillas de celulosa y hemicelulosa embebida en una matriz de pectina. La elongación requiere el relajamiento de la pared involucrando modificaciones de las interacciones moleculares de los polímeros (Alberts, 2007).

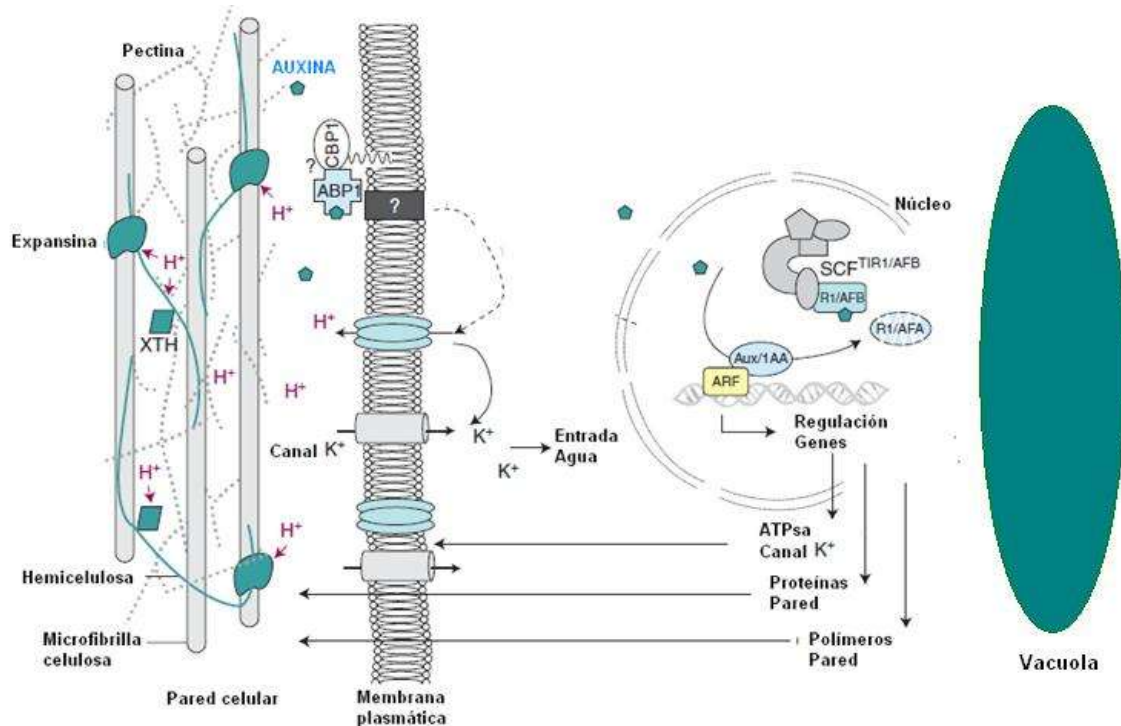


Figura 4. Expansión dependiente de auxinas. Las auxinas son percibidas por el receptor transmembranar ABP1 que promueve la activación de la bomba ATPasa provocando la entrada de agua a la célula con el consecuente incremento de tamaño de la vacuola. Además la activación de la bomba ATPasa induce la acidificación del medio que activa proteínas como expansinas, cuya acción consiste en relajar la red de polisacáridos de la pared celular. Las auxinas a través de un receptor nuclear TIR1 inducen la expresión de diferentes genes que codifican para ATPasas, canales de K, expansinas y enzimas que remodelan la pared celular (Perrot-Rechenmann, 2010).

1.7.2.1. Expansinas

La expansión celular puede ser estimulada en pocos segundos, participando proteínas como las expansinas que se unen débilmente entre la matriz y microfibrillas de celulosa. Las expansinas pertenecen a una familia multigénica en plantas y se clasifican α y β -expansinas, con un 20% de similitud en su región amino terminal y presentan funciones similares. De estos dos grupos las más estudiadas son las α -expansinas. En *Arabidopsis* se han identificado 31 expansinas, observándose que la expresión y localización de los transcritos está relacionada directamente con el desarrollo vegetal (Wu *et al.*, 2001). El mecanismo de acción de las expansinas consiste en desplazar tramos pequeños de hemicelulosa unidos a la superficie de las microfibrillas. Si la pared está tensionada los polímeros de hemicelulosa son arrastrados

a lo largo de la estructura, mientras que al estar relajada no ocurre movimiento. Las expansinas son activadas por acidificación en un rango de pH de 4.6 a 6 alterando la unión no covalente entre celulosa y hemicelulosa (Cosgrove, 1996).

1.7.2.2. Expansión celular mediada por auxinas

La expansión celular requiere la entrada de agua a la célula, la cual es almacenada en vacuolas ocasionando con ello la extensión celular a través del relajamiento de la pared celular y la síntesis de nuevo material y las auxinas intervienen activamente en dicho proceso (Perrot-Rechenmann, 2010). La polaridad de las microfibrillas de celulosa está regulada por rearrreglos de los micro túbulos que forman parte del citoesqueleto y son afectados por fitorreguladores como las auxinas (Shibaoka, 1994). Las auxinas regulan activamente los procesos de crecimiento como la expansión involucrando diversos componentes celulares de señalización: el receptor membranal de auxina ABP1 que se une a una proteína de andamiaje desconocida y activa a una bomba ATPasa, así como canales de K^+ . El incremento de iones K^+ promueve la entrada de agua lo que da como resultado la expansión celular (Tomas *et al.*, 2010; Simon y Petrasek, 2011). Se ha descrito que la sobreexpresión de *ABP1* en hojas de tabaco, incrementa la expansión en respuesta a las auxinas, mientras que la supresión antisentido de dicho gen afecta tanto la elongación, como la organización celular durante la embriogénesis (Chen *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado que ABP1 puede regular la expresión de algunos genes de respuesta temprana como los *AUX/IAA* siendo éste otro mecanismo de regulación independiente de los canales de K^+ (Mockaitis y Estelle, 2008).

1.7.3. Endorreduplicación

La endorreduplicación ocurre cuando el DNA es replicado y la progresión del ciclo celular es interrumpida, evitando que la célula llegue a la mitosis o citocinesis. Lo anterior, da como resultado un incremento en la ploidia que ocurre principalmente durante la transición de zonas meristemáticas a la diferenciación. Los factores ambientales y hormonales como las auxinas presentan un papel importante en la regulación de la endorreduplicación (Perrot-Rechenmann, 2010). En los tejidos donde se presenta endorreduplicación la expresión de CDKB y CDKA disminuye, siendo dichas proteínas cinasas reguladores importantes del proceso. Otros moduladores de la endorreduplicación son los inhibidores ICK1 y ICK2 que afectan la actividad de las cinasas CDKA (Lui *et al.*, 2000).

1.7.4. Genes reguladores del crecimiento vegetal

En plantas existen diferentes proteínas reguladoras del tamaño celular: la proteína blanco de la rapamicina TOR (del inglés Target of Rapamycin), AINTEGUMENTA (ANT), JAGGED (JAG), factores reguladores del crecimiento (AtGRFs), factores que interactúan con GFR (AtGIFs), ARGOS-LIKE (ARL) y el citocromo P450 (KLUH) (Mizukami y Fischer, 2000; Dinneny *et al.*, 2004; Kim y Kende, 2004; Ohno *et al.*,

2004; Horiguchi *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Anastasiou *et al.*, 2007). Por el contrario, algunos reguladores negativos del tamaño celular son: CINCINNATA (CIN), el factor de respuesta a auxina 2 (ARF2), BIG BROTHER (BB) y DA1 (Nath *et al.*, 2003; Okushima *et al.*, 2005; Disch *et al.*, 2006; Schruff *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). La expansión también puede ser regulada por la AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1), EXPANSIN-10 (AtEXP10), ROTUNDIFOLIA 3 (ROT3), ANGUSTIFOLIA (AN) y MEDIATOR COMPLEX SUBUNIT 25 (MED 25) (Tsuge *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999; Cho y Cosgrove, 2000; Kim *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006). De los reguladores antes mencionados, la cinasa TOR ha mostrado ser un regulador central del crecimiento vegetal, debido a que líneas transgénicas de plantas de *Arabidopsis* de baja y sobre expresión de TOR presentaron tamaños pequeños y grandes respectivamente (Deprost *et al.*, 2007).

1.8. Auxinas

El crecimiento y desarrollo vegetal involucra la integración de diversas señales ambientales y endógenas que determinan el desarrollo de la planta (Gray, 2004). Los reguladores del crecimiento vegetal incluyen a las auxinas, las citocininas, el etileno, las giberelinas, el ácido abscísico y algunos lípidos. Dichas moléculas controlan el desarrollo modulando la división, expansión, diferenciación y muerte celular (Bishopp *et al.*, 2006). Uno de los fitorreguladores más estudiados son las auxinas, cuyo nombre significa en griego "*crecer*". Dichas sustancias participan en procesos como el gravitropismo, fototropismo, la arquitectura de la raíz y follaje, la organogénesis, el desarrollo vascular y el crecimiento de explantes en cultivo de tejidos (Teale *et al.*, 2006). La auxina natural es el ácido indol-acético (AIA) y se ha encontrado desde bacterias hasta plantas (Mockaitis y Estelle, 2008). Las auxinas juegan un papel central en el crecimiento y desarrollo de la planta, siendo considerada como hormonas morfogénicas dosis-dependiente. Debido a lo anterior, las plantas han desarrollado mecanismos de regulación para controlar la homeostasis y la dinámica de la redistribución de auxinas (Fig. 5). La primera involucra la biosíntesis de auxina, conjugación, catabolismo, compartimentalización y transporte (Tromas *et al.*, 2010). El AIA es sintetizado a través de rutas dependiente e independiente de triptófano en hojas jóvenes y después es transportado hacia el resto de la planta (Ljung *et al.*, 2005). Por otra parte, el transporte de auxinas es el responsable del establecimiento de los gradientes dentro de los tejidos de las plantas (Tromas *et al.*, 2010). En la planta existen dos tipos de transporte de auxinas, de larga distancia a través del haz vascular y el transporte polar célula a célula (PAT). En este último son necesarios transportadores de influjo denominados AUX1 y de eflujo PIN FORMED 1 (PIN) y las fosfoglicoproteínas resistentes a multidrogas (PGP). Se ha reportado que el transporte polar de auxinas es el mecanismo de formación de órganos y tejidos (Friml *et al.*, 2002). Los inhibidores de eflujo como el ácido N-1-naftiltalámico (NPA) alteran los niveles locales de auxinas y, como consecuencia, un gran número de fenómenos relacionados con la función de dichas hormonas (Imhoff *et al.*, 2000). En cultivos en suspensión de tabaco BY-2 y NT-1 se requiere la aplicación de auxinas exógenas para mantener la división celular.

Debido a lo anterior se usan compuestos con actividad auxínica como el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Raghavan, 2004). Cabe mencionar que la difusión de la auxina sintética 2,4-D en las células no necesita del transportador AUX1, a diferencia del AIA (Pickett *et al.*, 1990). La percepción de las auxinas en las células ha estado sujeta a numerosas investigaciones, donde se ha sugerido la existencia de un receptor membranal ABP1 y otro nuclear. Como mencionamos antes, uno de los receptores auxínicos es la proteína de unión a auxina (ABP1) que media la elongación de la célula por la entrada de agua. El segundo receptor nuclear, es la proteína resistente a inhibidores de transporte (TIR1) (Dharmasiri *et al.*, 2005). La unión de las auxinas a este último receptor conduce a una rápida activación de la transcripción de genes de respuesta temprana a auxina dependiente de la degradación de represores Aux/AIA por el sistema de ubiquitinación (Mockaitis and Estelle, 2008).

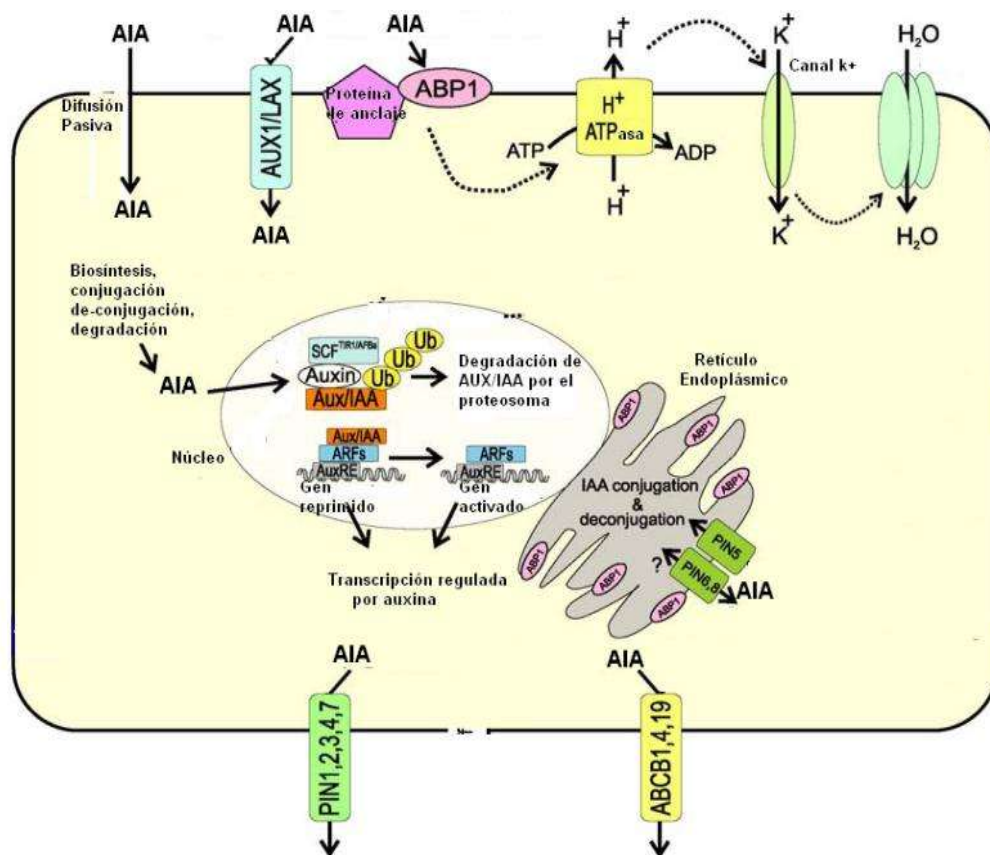


Figura 5. Representación esquemática de la distribución intracelular y los mecanismos de acción de las auxinas endógenas. El AIA es la principal auxina vegetal, donde una pequeña cantidad difunde pasivamente por la membrana y requiere también transportadores de influjo AUX1/LAX y de eflujo PIN/ABCB. El receptor nuclear TIR1 interactúa con las auxinas e inicia la degradación mediada por ubiquitina de los represores Aux/IAA promoviendo a su vez la expresión de genes de respuesta temprana a auxinas. El receptor membranal ABP1 asociado a una proteína transmembranal desconocida activa bombas ATPasa e induce la elongación de la célula y también se ha localizado en el retículo endoplásmico con una función aún no determinada, al igual que los transportadores de eflujo PIN5, PIN6 y PIN8 (Simon y Petrasek, 2011).

1.8.1. Efecto de las auxinas en cultivos vegetales en suspensión

Cuando las células vegetales de tabaco carecen de auxina se presenta un proceso de elongación muy marcado: los cultivos BY-2 sin auxinas presentan poblaciones heterogéneas de células elongadas (Winicur *et al.*, 1998). En estas células se ha reportado que las auxinas son responsables de promover la expansión celular en concentraciones bajas en el medio (menos de 1 μ M), mientras que mayores a 1 μ M estimulan la división celular (Chen *et al.*, 2001; Nagata *et al.*, 2004). Cuando las células vegetales crecen en condiciones de baja concentración de auxinas se presenta un incremento de cisternas en el trans-Golgi (Winicur *et al.*, 1998), acumulación de almidón (Miyazawa *et al.*, 1999), cambios en la presión osmótica y en la expansión celular (Chen *et al.*, 2001). Numerosos reportes indican que bajas concentraciones de auxinas promueven el incremento en los niveles de citocininas (Petrasek *et al.*, 2002) y que la adición de citocininas puede amplificar el fenotipo de las células privadas de auxinas. Cuando las células vegetales se subcultivan en ausencia de auxinas, se observa una disminución en su viabilidad y en la capacidad de entrar al ciclo celular. Condiciones restrictivas de auxinas detienen la progresión del ciclo celular y conducen a la acumulación de células en la fase G1. Es posible obtener una sincronización parcial cuando se privan las células vegetales de esta hormona por un determinado periodo de tiempo (Ito *et al.*, 1998). Además es conocido que los cultivos BY-2 que son carentes totalmente de auxinas, la muerte celular se presenta después del cuarto día (Mlejnek and Prochazka, 2002). Se propone que cuando las células carecen de auxinas, la muerte celular puede ser consecuencia de un incremento de citocininas endógenas o de relación auxinas/citocininas anormal (Balague *et al.*, 1982).

1.8.2. Genes de respuesta temprana a auxina

Las auxinas intervienen en procesos celulares de los vegetales como la turgencia, la elongación, división y diferenciación y en la modulación de la expresión de genes en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. La inducción de los genes de respuesta temprana es independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, lo que implica que los componentes requeridos para la activación transcripcional ya están presentes y que los estímulos extracelulares son transducidos al núcleo por procesos post traduccionales en pocos minutos u horas (Abel y Theologis, 1996). Los genes de respuesta temprana a auxina se han clasificado en tres familias; *AUX/IAA*, *SAUR* y *GH3*. Se han descrito veintinueve genes de la familia *AUX/IAA* que codifican para los represores transcripcionales del mismo nombre y cuya función consiste en mantener apagada la expresión a bajas concentraciones de auxinas y promoverla cuando se incrementa la concentración de dicho fitorregulador (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010). Los genes de la familia *SAUR* codifican para polipéptidos de entre 9 y 10 kDa con funciones escasamente conocidas. Sin embargo, se ha reportado que dichos genes modulan los niveles de auxina en *Arabidopsis* y arroz (Kant and Rothstein, 2009). Por último, los genes *GH3* codifican para enzimas como la glutatión s-transferasa (PAR B) actuando

como reguladores de los niveles de auxina libre. Se han identificado regiones promotoras de los genes *AUX/IAA* y *GH3* con elementos consenso TGTCTC que son denominadas elementos de respuesta a auxina (en inglés ARE) (Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010).

1.8.2.1. Glutación-S-transferasa (PAR B)

Los miembros de la familia *GH3* codifican para enzimas con actividad enzimática como la glutación-S transferasa (GST) que cataliza la adición nucleofílica de un grupo tiol de glutación reducido a la fracción electrofílica de una amplia variedad de productos químicos hidrofóbicos. Los genes *GST* son inducidos en respuesta a las auxinas, a compuestos químicos electrofílicos, a estrés y a metales pesados para prevenir el daño oxidativo (Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010). En protoplastos de tabaco se ha reportado que *PAR B* se expresa durante la transición G1/S del ciclo celular en respuesta a las auxinas (Iantcheva *et al.*, 2005). El producto de *PAR B* está distribuido en el citoplasma rodeando a los plástidos y se relaciona con la proliferación celular y la detoxificación de xenobióticos en plantas y animales. En relación al papel de GST en la proliferación celular, se ha mostrado que este gen regula la síntesis de DNA dependiente de la activación del glutación en mamíferos y plantas (Takahashi y Nagata, 1992).

1.8.2.2. Genes inducibles por auxinas

Existe otro tipo de genes que su nivel de expresión cambia en respuesta a auxinas y otros agentes promoviendo cambios fisiológicos. Algunos de ellos codifican para proteínas de unión a calcio, del ciclo celular, involucradas en la modificación de la pared celular, en respuesta a daño y patógenos y en el metabolismo secundario, entre otras (Hagen y Guilfoyle, 2002). Los genes que a continuación se mencionan pertenecen también a este grupo.

1.8.2.2.1. Subunidad β de la proteína G (ARC A)

Las proteínas G heterotriméricas de unión a GTP son interruptores moleculares que regulan diferentes rutas de señalización en eucariontes y funcionan como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina de GDP a GTP. El genoma de *Arabidopsis* codifica para una subunidad α , una β y dos γ . La subunidad α (GPA1) en *Arabidopsis* regula positivamente la proliferación celular, mientras que la β (AGB1) la regula de forma negativa atenuando la señalización de auxina río arriba de la transcripción de genes (Ullah *et al.*, 2003). *ARC A* es un gen homólogo a *AGB1* de *Arabidopsis* que codifica para la subunidad β de una proteína G heterotrimérica; en células BY-2 se ha encontrado que se expresa principalmente después de que los cultivos son privados de auxina (Lu *et al.*, 2011). La subunidad β de la proteína G pertenece a la familia de proteínas WD40 cuyos miembros están involucrados principalmente en transducción de señales. La subunidad β de las proteínas heterotriméricas consiste en una α -hélice N-

terminal seguida de siete repeticiones de WD que forman un anillo de siete láminas β anti paralelas. Además se ha descrito que *ARC A* es homólogo al receptor que se activa por la proteína C en mamíferos (Ishida *et al.*, 1996). Ulla y colaboradores (2003), reportaron que las subunidades de la proteína G modulan la división celular inducida por auxinas durante la formación de las raíces laterales en *Arabidopsis* y que dicha división fue arrestada cuando la subunidad β fue liberada del complejo por la activación de la α . En este sentido, los autores proponen una retroalimentación negativa cuando los niveles de auxinas disminuyen, la transcripción de la subunidad β se estabiliza, mientras que aumenta la α (Ullah *et al.*, 2003).

1.8.2.2.2. Fosfolipasa A2 (PLA2)

La fosfolipasa A2 (PLA2) es una enzima que hidroliza glicerofosfolípidos en la posición 2 liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos. PLA2 está implicada en diversas respuestas celulares en plantas como el metabolismo de lípidos, señalización de defensa, gravitropismo y crecimiento celular estimulado por auxina. *PLA2* citosólica se expresa a bajas concentraciones de auxina en células BY-2, microsomas *in vitro* y órganos de plantas. Mientras que la activación de PLA2 se lleva a cabo en minutos, siendo sus productos moléculas que regulan proteínas cinasas como algunas de la vía MAPK y ATPasa H^+ (Scherer, 2002).

JUSTIFICACIÓN

La insulina estimula el crecimiento en diferentes especies vegetales y la proliferación en maíz a través de la vía PI3K-TOR. En mamíferos la insulina activa las vías de señalización PI3K-TOR y MAPK y debido a que diferentes componentes de ambas rutas están presentes en plantas, es posible que las cascadas se activen por insulina en los cultivos de tabaco NT-1 estimulando la proliferación. Dicho proceso, en este sistema es regulado por las auxinas, por lo que es posible que estos fitoreguladores junto con la insulina estimulen la proliferación celular.

HIPÓTESIS

La insulina estimula la proliferación celular dependiente de auxinas en las células de tabaco NT-1 en suspensión a través de las rutas de señalización PI3K-TOR y/o MAPK.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la insulina sobre la proliferación de los cultivos celulares de tabaco NT-1 y su dependencia de auxina a través de las rutas de señalización PI3K-TOR y/o MAPK.

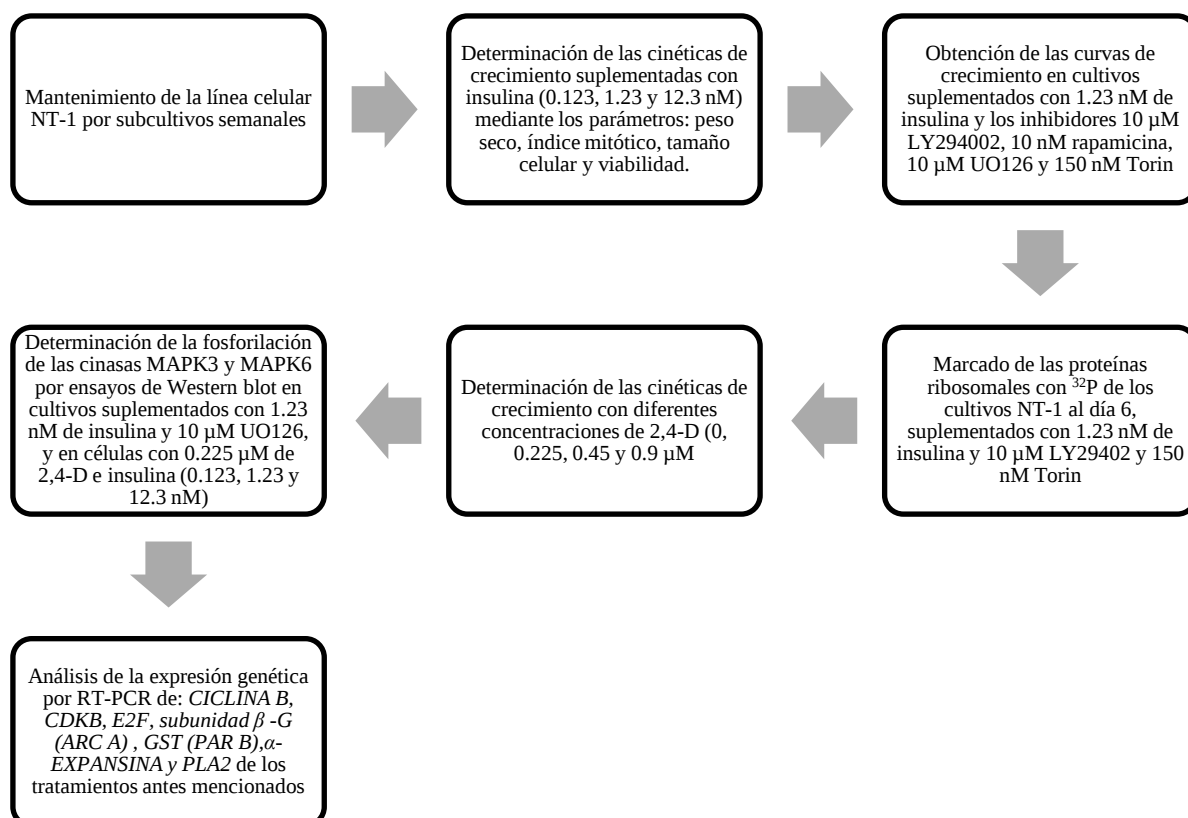
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la insulina sobre la proliferación celular en células de suspensión de tabaco (NT-1).
2. Determinar el efecto de la insulina sobre la proliferación celular a través de las vías de señalización PI3K-TOR y MAPK.
3. Analizar el efecto de la insulina y la dependencia de auxina sobre la proliferación celular.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.Estrategia Experimental General



2.2.Mantenimiento de la línea celular NT-1

Las células de tabaco en suspensión NT-1 se mantuvieron por subcultivos semanales, inoculando 3.5 ml de células de un cultivo previo en fase estacionaria (día 7) a 50 ml del medio MS 1X (4.3g/l de una mezcla de sales MS, 30 g/l de sacarosa, 0.2 g/l de KH₂PO₄, 0.2 mg/l de 2,4-D, 100 mg/l de mio-inositol y 1mg/l de tiamina)

2.2.1. Preparación del inóculo para las cinéticas de crecimiento

En la campana de flujo laminar bajo condiciones estrictas de asepsia, se filtró el total del cultivo de células en suspensión en fase estacionaria de 7 días de edad y se lavó con 1 litro de medio MS 1X (sin vitaminas ni hormona). Las células se resuspendieron en 100 ml de medio MS 1X y de dicho cultivo se tomaron alícuotas para inocular los diferentes tratamientos.

2.3. Cinéticas de Crecimiento

Se inocularon 100 ml de medio MS 1X con 7 ml del inóculo antes mencionado, se incubaron con diferentes concentraciones de insulina y de 2,4-D, así como algunos inhibidores. Diariamente se tomaron alícuotas de 3 ml del cultivo para evaluar el crecimiento como se describe a continuación.

2.3.1. Determinación de Volumen de Paquete Celular (VPC)

Las muestras de 3 ml se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. El volumen del paquete celular se determinó de acuerdo a la graduación del tubo (VPC/3 ml).

2.3.2. Determinación de peso seco

Las células se filtraron sobre papel filtro a peso constante, los papeles con las células se secaron en estufa a 80°C durante 24 h. Las muestras se pesaron nuevamente para calcular el peso seco por diferencia.

2.3.3. Determinación del Índice Mitótico (IM)

Se colectaron 0.5 ml de células con puntas de 1 ml recortadas de la punta para no destruir las estructuras celulares y se adicionó 0.5 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 50 %). Las células se almacenaron en solución fijadora al menos 12 h a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó 0.5 ml de una solución de DAPI (10 mg de 4',6-diamino-2 fenilindol /ml PBS). El índice mitótico se determinó por microscopía de epifluorescencia usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ IM} = \text{Total de células en mitosis} / 500 \text{ células contadas} \times 100$$

2.3.4. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento se refiere al crecimiento comprendido en la fase log y se calcula mediante la ecuación: $\mu = \ln X - \ln X_0 / t$, donde μ es la velocidad específica de crecimiento, X_0 es la biomasa inicial, X es la final y t el tiempo comprendido entre el inicio y el final de la fase log (Loyola Vargas, 2006).

2.3.5. Determinación del tamaño celular

Se capturaron imágenes de las células NT-1 teñidas con DAPI con una cámara Nikon Coolpixs10 acoplada al microscopio de epifluorescencia Nikon. Se midió la longitud y el ancho de las células con ayuda del programa Image J. (Mravec *et al.*, 2008).

2.4. Preparación de los diferentes tratamientos

- 2.4.1. Cinéticas de crecimiento suplementadas con insulina: Matraces con 100 ml de medio MS 1X suplementado con 0, 0.123, 1.23, 12.3 y 61.5 nM de insulina, se adicionaron con 7 ml de inóculo.
- 2.4.2. Cinéticas de crecimiento suplementadas con insulina e inhibidores: Matraces con 100 ml de medio MS 1X suplementado con 1.23 nM de insulina y 10 μ M de LY294002, 10 nM de rapamicina, 10 μ M de UO126 y 150 nM de torin se adicionaron con 7 ml de inóculo.
- 2.4.3. Cinéticas de crecimiento suplementadas con insulina y diferentes concentraciones de 2,4-D: Matraces con 100 ml de medio MS 1X suplementado con 0.123, 1.23, 12.3 nM de insulina y 0, 0.225 y 0.45 μ M de 2,4-D se adicionaron con 7 ml de inóculo
- 2.4.4. Cinéticas de crecimiento de cultivos semi sincronizados y suplementados con insulina e inhibidores: Se inocularon en diferentes matraces con 100 ml medio MS sin 2,4-D, 7 ml de células NT-1 y se incubaron durante 4 días. Posteriormente se transfirieron 7 ml de células a 100 ml de medio MS con 0.9 μ M de 2,4-D suplementado con 1.23 nM de insulina y 10 μ M de LY294002, 10 nM de rapamicina y 10 μ M de UO126.

2.5. Determinación de viabilidad celular

La viabilidad de las células fue determinada con una solución al 0.5% de DFA (Diacetato de fluoresceína). Se agregó 5 μ l de la solución durante 1 min en una relación 1:10. Las células viables se tiñeron de color verde por la reacción de las esterasas con los grupos acetato del DFA (Smith *et al.*, 1982). El porcentaje de viabilidad celular se determinó como el número de células viables entre el total de las células por 100.

2.6.Extracción de proteínas de las células NT-1

Se congelaron 200 mg de células NT-1 con nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero, al polvo obtenido se adicionó 300 µl de buffer de extracción E (Tris HCl 125 mM pH 8.8, SDS 1%, glicerol 10 % y Na₂S₂O₅ 50 mM) y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf, donde se adicionó 50 µl de buffer Z (Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS 12 %, glicerol 10 % y 2-mercaptoetanol 22 %). La mezcla se hirvió durante 10 min y al final se adicionó inhibidor de fosfatasas (Martinez-Garcia *et al.*, 1999).

2.6.1. Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para determinar la concentración de proteínas, se realizó una curva estándar de albúmina sérica de bovino (BSA). Se tomaron alícuotas de una solución de BSA (1 mg/ml) de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µl, las cuales se completaron a un volumen a 800 µl con agua tridestilada. A esta solución se le adicionó 200 µl de reactivo de Bradford Bio-Rad®, y se determinó la Abs a 595 nm. Para cuantificar la proteína total de las células de tabaco NT-1, se tomaron 10 µl de la solución de muestra, se completó el volumen a 800µl con agua tridestilada, se adicionó 200 µl de reactivo Bradford y se leyó la Abs a 595 nm. Las concentraciones problema, se determinaron multiplicando el valor de Abs por el inverso de la pendiente de la curva estándar previamente determinada y dividiendo entre el volumen de la alícuota.

2.7.Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

La composición de los geles de acrilamida fue la siguiente: Solución I: 30% acrilamida y 0.8% bis-acrilamida. Solución II: 0.75 M Tris base pH 8.8 y 0.2% SDS. Solución III: 0.25 M Tris base pH 6.8 y 0.2% de SDS.

Preparación de geles de acrilamida al 12%: Para un gel de 8 x 8 cm se mezclaron 2.2 ml de sol. I; 2.75 ml de sol. II; 0.55 ml de agua tridestilada; 5 µl de TEMED y 50 µl de persulfato de amonio (APS 20%). Gel concentrador: Para el mismo gel, se agregaron 0.415 ml de sol. I; 1.25 ml de sol. III; 0.825 ml de agua tridestilada ; 5 µl de TEMED y 25 µl APS 20%. Alícuotas de 10-25 µl de proteínas más 5 µl de buffer de carga 30g Tris, 40 ml SDS 20%, 20 ml de 2-mercaptoetanol, 40 ml glicerol y 40 mg azul de bromofenol), se corrieron a 90 volts en un equipo Bio-Rad® con buffer de corrida (25 mM de Tris, 0,192 M de Glicina y 0.1 % de SDS) después de la corrida, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomasie.

2.8. Análisis tipo Western blot

2.8.1. Tranferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa

Soluciones para la transferencia: Solución anódica I: 0.3 M Tris pH 10.4 y 20% v/v MeOH. Solución anódica II: 25 mM de Tris pH 10.4 y 20% de MeOH. Solución catódica III: 10 mM de 6-amino-n-hexano caproico y 20% MeOH pH 7.2.

Una vez realizada la electroforesis, se procedió a hacer la transferencia de las proteínas del gel a la membrana Immobilon-P en el equipo Semi-dry Transfer (Unit Amersham TE77 ECL) a un voltaje de 0.8 mA/cm^2 de gel. Después de transferir el gel, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau (0.1% en 1% de ácido acético) para comprobar la transferencia de proteínas.

2.8.2. Detección

La membrana se incubó en una solución de saturación de albúmina bovina al 3% (albúmina de Merck disuelta en TBS + NaCl 0.15M) durante 1 hora a temperatura ambiente, agitación suave y constante. Posteriormente se realizaron dos lavados con TBS (NaCl 0.15M) durante 15 min, se incubó toda la noche con el primer anticuerpo en solución de saturación con agitación muy suave y constante a 4°C. Enseguida, la membrana se lavó a temperatura ambiente con soluciones de TBS (NaCl 0.15M) durante 15 min; TBS (NaCl 1M) por 15 min y TBS (NaCl 0.15M) por 15 min más. Después, la membrana se incubó con el segundo anticuerpo 1:5000 Jackson ImmunoResearch® en solución de saturación a temperatura ambiente y agitación constante durante 2 hrs. Posteriormente la membrana se lavó dos veces con una solución de TBS (NaCl 0.15M) por 15 min y se revelaron con el kit Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents GE®.

Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron: Anti fosfo ERK 1/2 p44/p42 (Thr 202/Tyr 204) 1:1000 y anti ERK 1/2 p44/p42 (Thr 202/Tyr 204) 1:500 Cell Signalling Technology®

2.9. Marcado de proteínas ribosomales

Se incubó 1ml de células NT-1 con 100 µCi de ortofosfato ^{32}P ACR® durante 1 hora y agitación constante. Enseguida las células se molieron con nitrógeno líquido, el polvo obtenido se resuspendió en buffer de extracción A2 (20 mM Tris HCl pH 7.8, 5mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 1 mM PMSF, 5 mM NaF y 0.5% 2-mercaptoetanol) con agitación vigorosa y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min. El sobrenadante (4 ml) se depositó sobre 5 ml de una solución que contenía 0.5 M de sacarosa y 800 mM de KCl y se centrifugó a 50000 rpm a 4 °C por 3 h (Ultracentrifuga Beckman). El sobrenadante se desechó y la pastilla de las proteínas ribosomales se resuspendió en 500

µl de buffer A3 (20 mM HEPES, 20 mM KOH, 5 mM de acetato de magnesio, 125 mM de acetato de potasio y 6 mM de 2-mercapto etanol), se agregaron lentamente 50 µl de acetato de magnesio 1M y 1ml de ácido acético glacial; la mezcla se incubó 1 h en hielo con agitación ocasional. Después se centrifugó a 10000 rpm durante 1min y se transfirió el sobrenadante a tubos de centrífuga para precipitar las proteínas con 5 volúmenes de acetona fría a -20°C toda la noche. Después la muestra se centrifugó a 8000 rpm por 15 min, se decantó la acetona y se dejó evaporar el resto del solvente. La pastilla se resuspendió en 350µl de buffer de carga para proteína y se midió su concentración por el método de Bradford. Se cargaron 30 µg de proteínas en un gel de electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE (12% acrilamida) y se corrió a 90 volts. Después de correr el gel se tiñó con azul de Coomassie y se secó. Sobre el gel seco se colocó en un cassette con una placa de rayos X (Fuji medical X ray film 100 NIF 20X 25 (8X10)), el cual se guardó a -70°C y se reveló después de 30 días (Beltrán-Peña *et al.*, 2002).

2.10. Extracción de RNA

Se molieron 500 mg de células NT-1 con nitrógeno líquido, el polvo se transfirió a un tubo estéril y se agregó 1ml 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 agregó 0.5 ml de isopropanol, 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, se lavó 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 en campana de flujo laminar por 15 min, la cual se resuspendió en 50 µl de agua grado biología molecular (°BM) a 60 °C por 10 min. Se agregaron 0.5 µl de inhibidor de RNAasa y se almacenó a -20 °C. La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa al 1%, tomando 3µl de la muestra la cual se mezcló con 3µl de buffer de carga. La electroforesis se realizó con TAE 1X (2.42 g Tris base, 0.571 ml ácido acético glacial en 300 ml de agua tridestilada a pH 8.5, 0.372 g de EDTA 2 H₂O aforado a 500 ml) a 90 volts. Después de la corrida, el gel se observó en un transiluminador con luz UV. La cuantificación de RNA se realizó mezclando 1µl de muestra con 999 µl de agua tridestilada, y la Absorbencia (Abs) de la muestra se leyó a una longitud de onda de 260 nm, usando como blanco agua tridestilada. Para determinar la concentración se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g RNA/ml} = (\text{Abs } 260 \text{ nm})(40)(1/1000)$$

2.11. RT-PCR

Se utilizó el Kit SuperScript III TM One-Step RT-PCR System with Platinum [®] *taq* DNA polymerase, en base a las especificaciones establecidas por la casa comercial Invitrogen TM. Las reacciones fueron llevadas a un volumen total de 12.5 µl adicionando los siguientes componentes en un tubo Eppendorf estéril de 0.2ml para PCR: 6.25 µl de mezcla de reacción 2X, 0.5 µl de RNA (0.64 µg/ µl), 0.5 µl de oligonucleótidos sentido, 0.5 µl de oligonucleótidos antisentido, 0.25 µl de SuperScript III TM RT/Platinum [®] *taq*

Mix, 4.5 µl de Agua °BM estéril, con un volumen total de 12.5 µl. Los tubos se colocaron en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 con las condiciones de amplificación optimizadas para cada gen.

2.11.1. Condiciones de amplificación

E2F: Los oligonucleótidos sentido 5'CAAATTACAAACAGGGAGTTGGTGC 3' y antisentido 5'CTCCTTTGTGGATAATCAACAGCCT 3', fueron diseñados de la secuencia reportada para *Nicotiana tabacum* en NCBI con número de acceso AB025347 por Peña-Correa (2010). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 94°C por 5min y 35 ciclos de 15 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C y 45 seg a 68°C.

CDKB: Los oligonucleótidos sentido 5'GGGTCTTGGTCGT GCTTTTACTGTTT 3' y antisentido 5'CCAAGACGATGACA ACAGATACAGC 3', fueron diseñados de la secuencia reportada para *A. thaliana* en NCBI con número de acceso X57840 por Peña-Correa (2010). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 40 ciclos de 15 seg a 94°C, 1 min a 50°C y 45 seg a 68°C.

CICLINA B: Los oligonucleótidos sentido 5'ATAACGAGGGGCTTTTGTGC 3' y antisentido 5'CTTTTCTCCATTCCCAACACCT 3' para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso D89635.1 (Kwon *et al.*, 2011). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C.

GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA: Oligonucleótidos sentido 5'TGCA ACCATGAGAGTTGCTGCTTG 3' y antisentido 5'ATTGCGCTTCGC TTTCTTCACAG 3' se diseñaron en la página web Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso D10524.1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C.

SUBUNIDAD B-G ARC A: Oligonucleótidos Sentido 5'TGAGCTCCGTT TGTGGGATCTTCA 3' y antisentido 5'ACTCCAGCTCAAAGTGGTGCAGTA 3' se diseñaron en la página web Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso D17526.1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C.

FOSFOLIPASA A2: Oligonucleótidos sentido 5' AGTAGAATGCAGGGAGGCGACAAT 3' y antisentido 5' AGCCAT GTCCATACCCTGTACCAT 3' se diseñaron en la página web Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso AB190177.1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C.

α-EXPANSINA: Oligonucleótidos sentido 5' TGTCCCTGTTGTTT ATCGTCGGGT 3' y antisentido 5' AGCCGCTTCAGCTCTTCTACACAA 3' se diseñaron en la página web Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso AF049355.1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 65°C y 30 seg a 72°C.

ACTINA: Los oligonucleótidos sentido 5'CCTCTTAACCCGAAGGCTAA 3' y antisentido 5'GAAGGTTGGAAAAGGACTTC 3' fueron diseñados de la secuencia reportada para *N. tabacum* en NCBI con número de acceso X63603 por Peña-Correa (2010). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 30 min a 50°C, 5min a 94°C y 25 ciclos de 15 seg a 94°C, 1 min a 55°C y 45 seg a 68°C.

2.12. Análisis de datos

Se utilizó el programa STATISTICA ver 8.0 para analizar los resultados de los experimentos presentados a través de una prueba de Tukey. Las diferentes letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Crecimiento de los cultivos celulares NT-1

La cinética de crecimiento de los cultivos BY-2 consta de las fases: lag (de adaptación), log (exponencial) y estacionaria. La primera se encuentra durante las primeras horas del cultivo mostrando un incremento nulo en el volumen del paquete celular y escasa actividad mitótica. La fase log se presenta un día después del subcultivo, y con un mayor volumen celular que la lag, en esta fase una gran cantidad de células están en mitosis. Después de seis días (fase estacionaria) el volumen celular se incrementa más que en las anteriores y la mayoría de las células no presentan actividad mitótica (Matsuoka *et al.*, 2004). Las cinéticas de crecimiento de las células NT-1 evaluadas por peso seco y volumen de paquete celular (VPC) se muestran en las Figs. 6A y 6B. La cinética de los cultivos NT-1 evaluada por peso seco presenta una fase lag hasta el cuarto día, una log del día cuatro al seis y finalmente la estacionaria a partir del día seis (Fig. 6A). En la evaluación con el VPC, la fase log se aprecia a partir del día 4 y la fase estacionaria hasta el 8 (Fig.6B). En las diferentes fases de las cinéticas (lag, log y estacionaria), las células presentan variaciones morfológicas (Fig. 6C), observándose alargadas en la fase lag y estacionaria y pequeñas en la fase log.

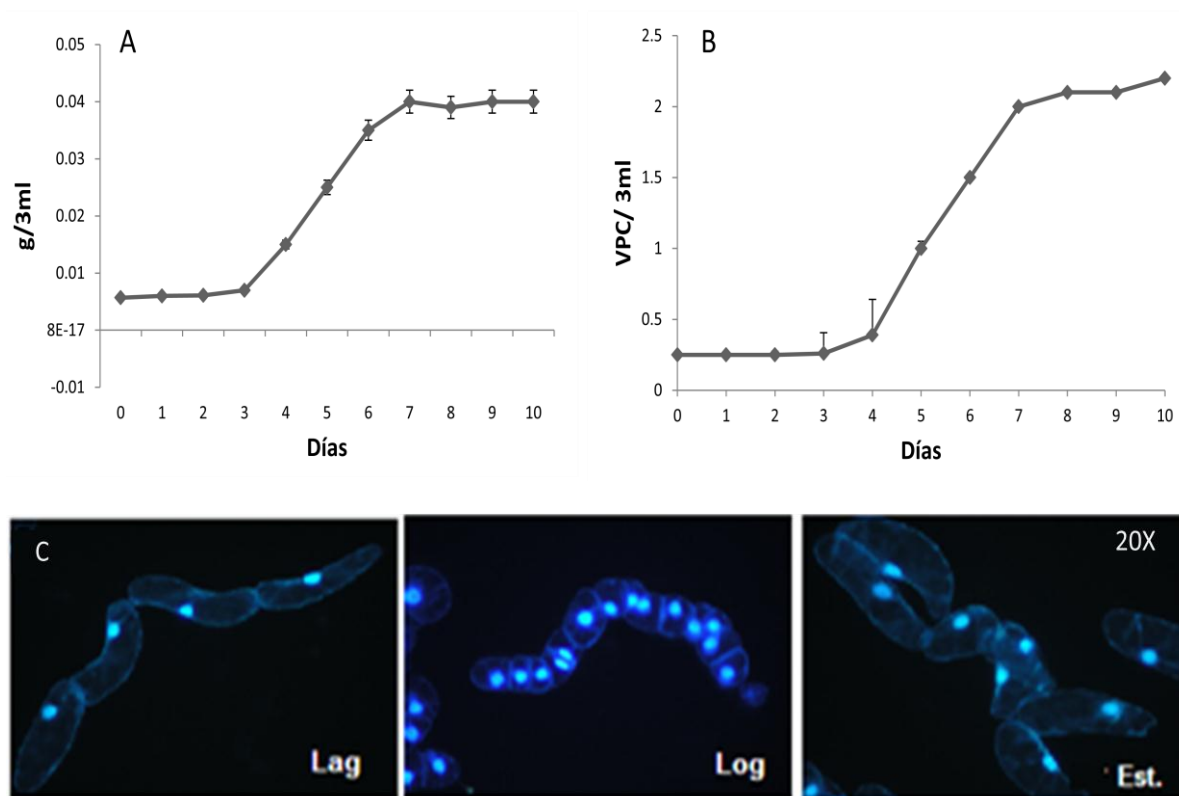


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1. Las cinéticas de crecimiento semi-log se determinaron analizando el crecimiento diariamente por A) peso seco y B) Volumen de Paquete Celular (VPC). C) Imágenes representativas de las células NT-1 teñidas con DAPI en las diferentes fases de crecimiento. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

3.2.Efecto de la insulina sobre los cultivos NT-1

En la Fig. 7A se presenta la cinética evaluada por peso seco, donde se aprecia que solamente el cultivo suplementado con 1.23 nM mostró un crecimiento superior a los otros tratamientos. Sin embargo, en las curvas de crecimiento evaluadas por VPC (Fig. 7B) se observó que las células tratadas con las diferentes concentraciones de insulina presentan solamente una tendencia a incrementar dicho parámetro a partir del día 5; con diferencias significativas en los días 5, 6 y 7 en las concentraciones de 1.23 y 12.3 nM respecto al control.

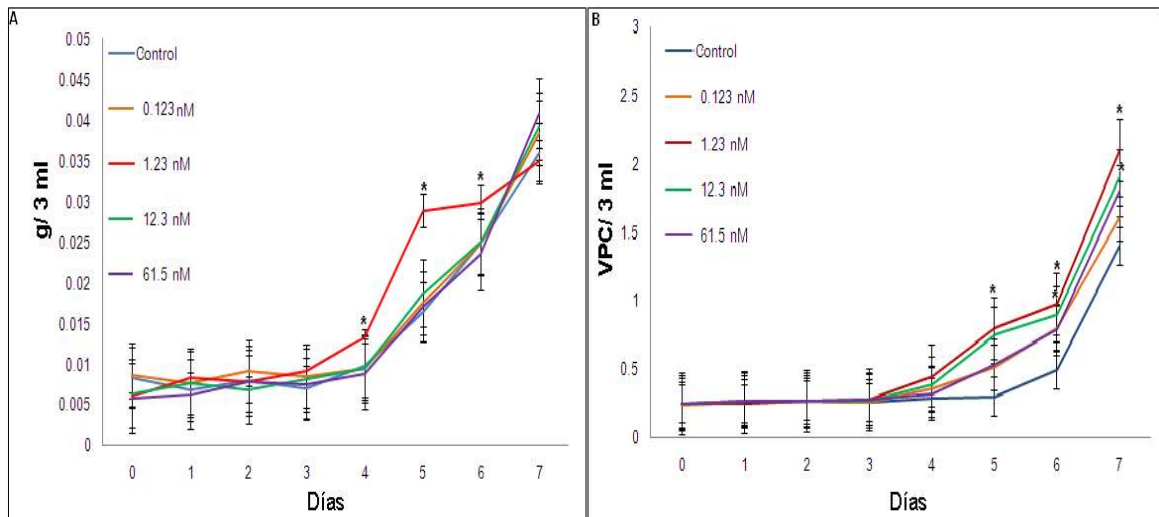


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1. Se realizaron cinéticas de crecimiento analizando diariamente el crecimiento de cultivos suplementados con 0.123, 1.23, 12.3 y 61.5 nM de insulina por A) Peso seco y B) VPC. Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

Para evaluar el efecto de la insulina directamente sobre la proliferación celular, se calculó el porcentaje de índice mitótico (IM). En la Fig. 8A se puede observar que solamente 1.23 nM de insulina aumentó en un 36 % el IM respecto al control. En cuanto a la relación celular de largo/ancho como una medida de la elongación, encontramos que cerca del 50 % de la población de las células NT-1 tratadas con 1.23 nM de insulina son de tamaño pequeño, es decir, de escasa longitud celular comparadas con el control (Fig. 8B y 8C).

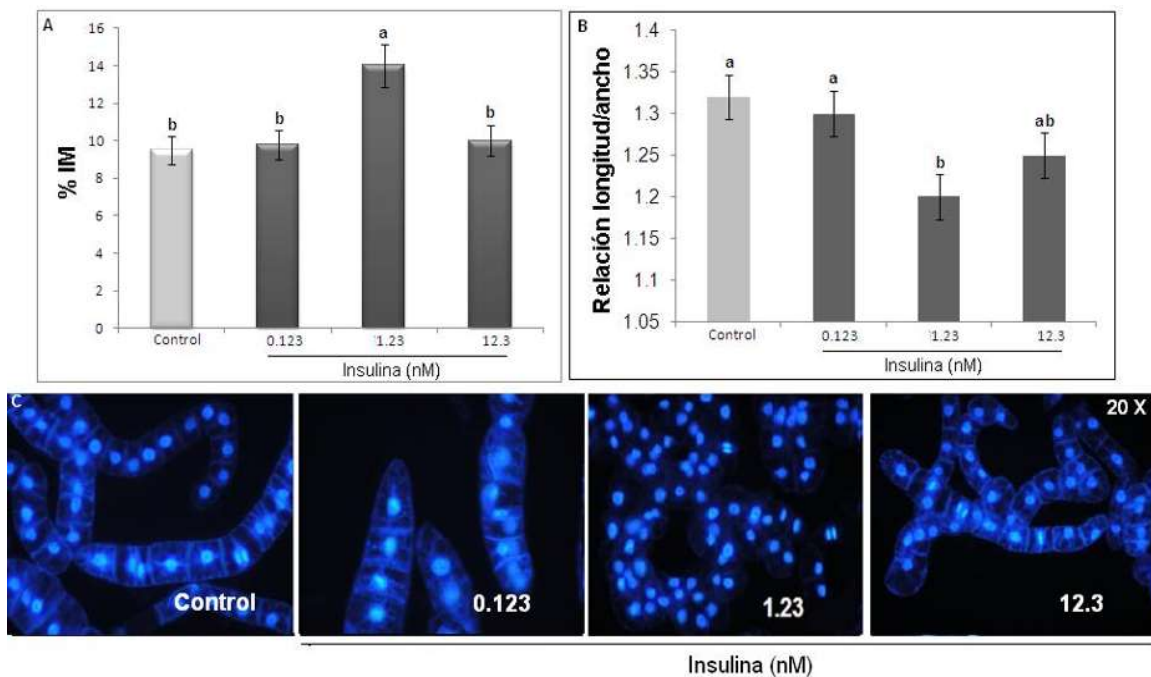


Figura 8. Efecto de la insulina sobre la proliferación y el tamaño celular. A) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis correspondiente a la fase log de las cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1. B) Tamaño celular. Las células teñidas con DAPI se midieron para calcular la relación

largo/ancho. C) Fotografías de células NT-1 en fase log teñidas con DAPI. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

Debido a que se observó que 1.23 nM de insulina estimulaba el crecimiento de los cultivos NT-1, se decidió evaluar la velocidad específica de crecimiento de la fase log. Como se observa en la Fig. 9, la velocidad específica (μ) fue mayor en los cultivos suplementados con 1.23 nM de insulina respecto al control, lo que sugiere que las células NT-1 a esta concentración proliferan con mayor velocidad.

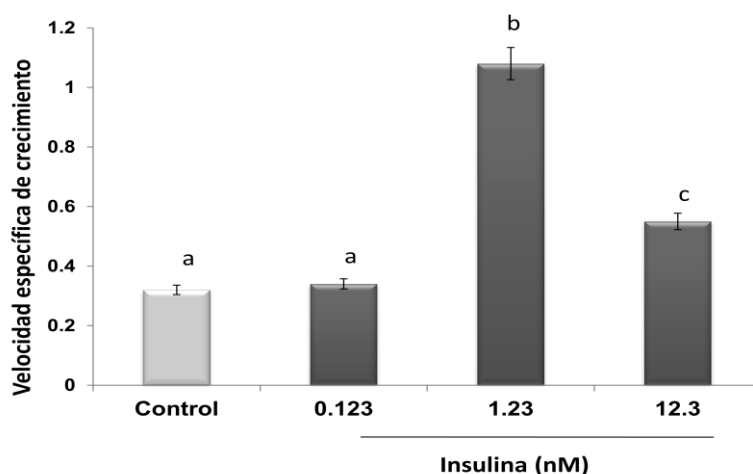


Figura 9. Velocidad específica de crecimiento de los cultivos NT-1 a diferentes concentraciones de insulina. La velocidad específica de crecimiento se calculó durante el tiempo que comprende la fase log de las cinéticas de crecimiento de cultivos suplementados con 0.123, 1.23 y 12,3 nM de insulina. Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

3.3. Evaluación del crecimiento de los cultivos NT-1 a través de las rutas PI3K-TOR y MAPK activadas por insulina

Una vez que se determinó que 1.23 nM de insulina estimulaba la proliferación celular, se decidió investigar si en tal efecto participan las rutas de señalización PI3K-TOR y/o MAPK al igual que en mamíferos (Saltiel and Kahn, 2001). Se utilizó LY294002 para inhibir la actividad de la cinasa PI3K, rapamicina para TOR y UO126 como inhibidor de la cinasa MAPKK. Dichos compuestos fueron aplicados en presencia de 1.23 nM de insulina y el crecimiento se evaluó por peso seco y VPC (Fig.10). Se observó que el LY294002 inhibió el crecimiento evaluado por peso seco y VPC previamente inducido por la insulina (10A y 10B). Los cultivos suplementados con insulina y rapamicina, presentaron una menor disminución en el crecimiento, comparado con el efecto de LY294002 (Fig. 10C y 10D). Debido a que LY294002 y rapamicina actúan sobre dos de los componentes de la ruta PI3K-TOR y no se observó un efecto similar en la inhibición del crecimiento, tal comportamiento indicaría una sensibilidad diferente de los cultivos a ambas sustancias. Sin embargo, es claro el efecto inhibidor de la rapamicina sobre el crecimiento de los cultivos suplementados con insulina. En las Figs. 10E y 10F se observa que el UO126 también inhibió el crecimiento estimulado por insulina en los dos parámetros evaluados. Los resultados

aquí presentados, muestran que los cultivos NT-1 suplementados con insulina incrementaron su crecimiento, el cual fue inhibido con LY294002 y UO126 en forma similar y con rapamicina en menor proporción. Lo anterior sugiere que la insulina podría activar las rutas de señalización PI3K-TOR y MAPK durante el crecimiento de los cultivos NT-1.

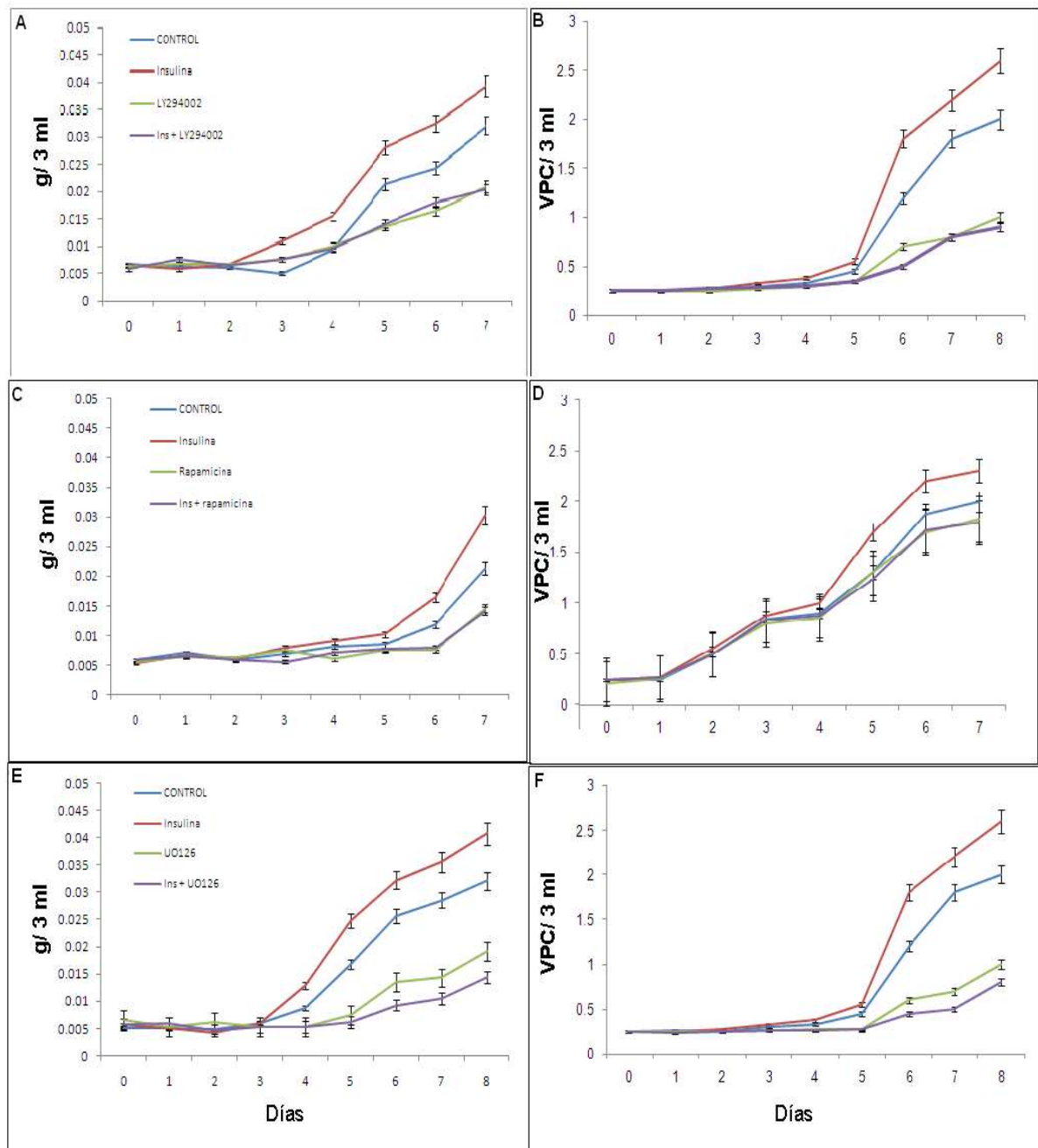


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK. A) C) y E) Crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina y 10 μ M de LY294002, 10 nM de rapamicina y 10 μ M de UO126, evaluado diariamente por peso seco. B), D) y F) Los cultivos NT-1 suplementados con insulina y LY294002, rapamicina y UO126 a las concentraciones antes mencionadas se evaluaron diariamente por Volumen de Paquete Celular (VPC). Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0

Para comparar el efecto de los diferentes inhibidores sobre los cultivos suplementados con 1.23 nM de insulina, se calculó el porcentaje de crecimiento al día seis, el cual está dentro de la fase log (Fig. 11). Considerando como 100% el crecimiento alcanzado por el cultivo suplementado con insulina, el inhibidor LY294002 lo redujo tanto en peso seco como en VPC en aproximadamente un 60%. Los cultivos adicionados con rapamicina inhibieron su crecimiento en 25%. Esto último indica que los cultivos NT-1 no responden de igual forma con rapamicina que a LY294002, es decir, que presentan una sensibilidad reducida a dicho inhibidor. Por otra parte, UO126 disminuyó el crecimiento de los cultivos en aproximadamente 65%. Tomando juntos los resultados anteriores, parece ser que la insulina estimuló la proliferación de los cultivos NT-1, a través de las vías PI3K-TOR y MAPK.

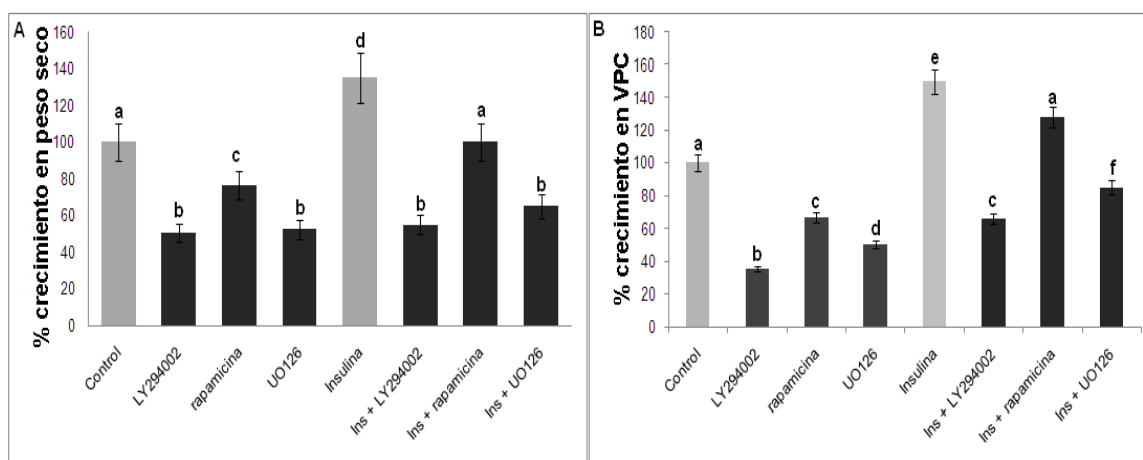


Figura 11. Efecto de la insulina y algunos inhibidores de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre el crecimiento de los cultivos NT-1. A) Se determinó el porcentaje de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina y 10 μ M UO126 al día seis de la fase log de la cinética de crecimiento por peso seco y B) VPC. Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

Puesto que se observó que la insulina estimuló el crecimiento en los cultivos suplementados con insulina (Figs. 10 y 11) y fue inhibido en forma diferencial con LY29402, rapamicina y UO126, se decidió evaluar el efecto de los inhibidores sobre la proliferación. Se determinó el porcentaje de IM en los cultivos NT-1, el cual se observa en la figura 12A con un incremento del IM en los cultivos suplementados con insulina de aproximadamente un 20 %, mientras que con los inhibidores LY294002 y UO126 disminuyó en un 65 % y la adición de rapamicina lo redujo en solo un 35%. Al evaluar el tamaño de las células, se observó que la población con células más pequeñas correspondió a los cultivos tratados con insulina (Fig. 12B), mientras que los cultivos suplementados con insulina y LY294002, rapamicina y UO126 mostraron células más grandes. Los datos anteriores sugieren que la insulina estimula la proliferación celular al incrementar el IM y presentar células pequeñas (Fig. 12).

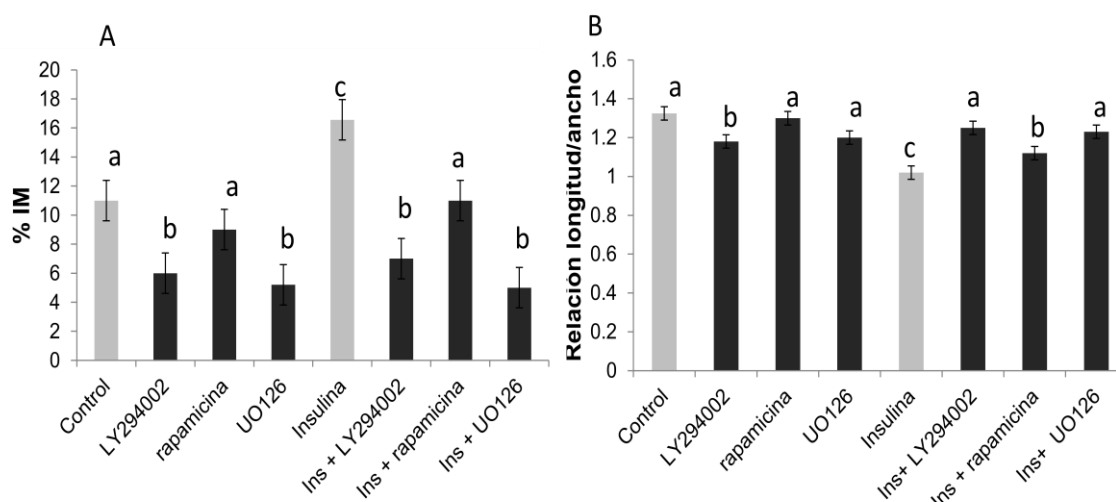


Figura 12. Efecto de la insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K y MAPK sobre la proliferación celular en los cultivos NT-1. Los cultivos NT-1 suplementados con 1.23 nM de insulina y los inhibidores 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina y 10 μ M UO126. A) Se determinó el porcentaje de IM de células tomadas al día seis de la fase log. B) Tamaño celular evaluado por la relación longitud/ancho. Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

Para determinar si el efecto de los compuestos ensayados sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 no era causado por una toxicidad de dichos compuestos, se evaluó la viabilidad celular con DFA. En la figura 13 se aprecia que los cultivos donde se aplicaron los inhibidores UO126, LY294002 y rapamicina, mantenían una viabilidad superior a 90%, lo que indica que dichas sustancias no fueron tóxicas.

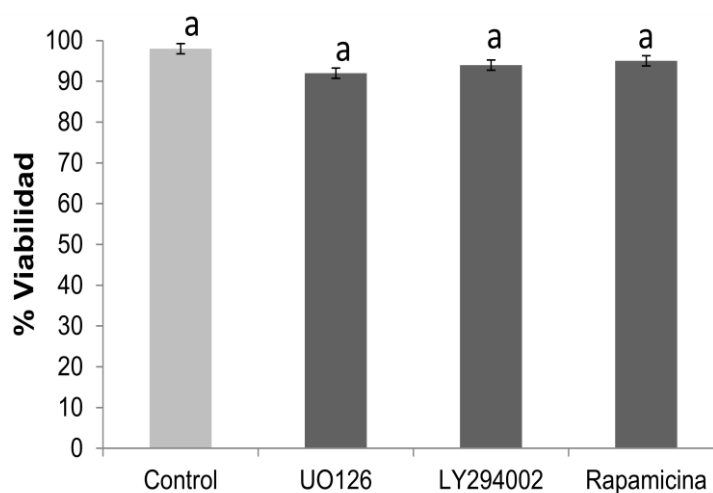


Figura 13. Efecto de los inhibidores de algunos componentes de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre la viabilidad de los cultivos NT-1. Las células de los cultivos suplementados con 10 μ M de UO126, 10

μM de LY294002 y 10 nM de rapamicina se tiñeron con DFA y se evaluaron al día seis. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0

Debido a que la inhibición del crecimiento con rapamicina no fue la misma que con LY294002 (Fig. 11), no obstante que ambos compuestos son inhibidores de componentes de la ruta PI3K-TOR, sugiere una sensibilidad diferente para cada sustancia. Se decidió evaluar el efecto de torin, ensayando varias concentraciones previamente reportadas en mamíferos: 5, 50, 150 y 250 nM. Se evaluó la viabilidad celular en cultivos tratados con dicho inhibidor (Fig. 14) y se obtuvieron porcentajes superiores a 90%, lo que indica que dichas concentraciones no fueron tóxicas para las células.

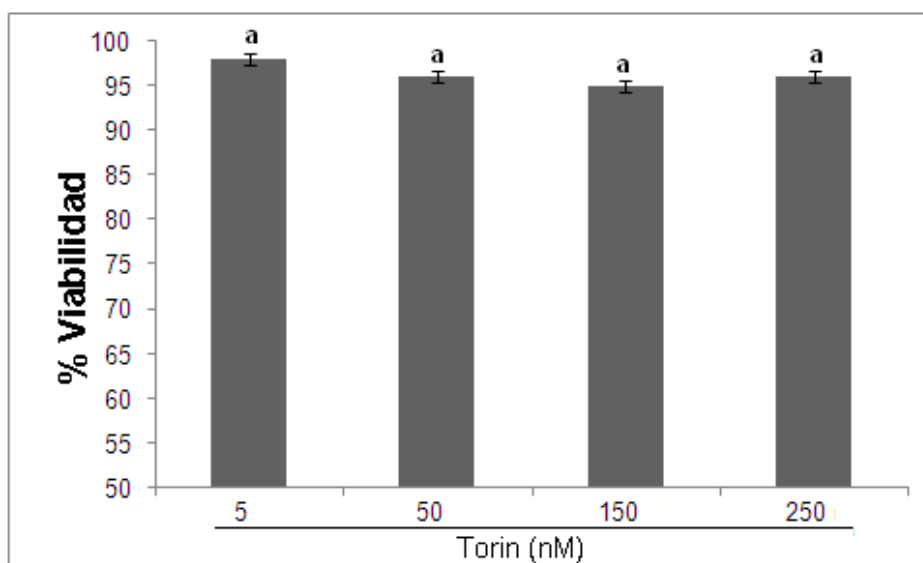


Figura 14. Efecto de torin sobre la viabilidad celular de los cultivos NT-1. El porcentaje de viabilidad de células NT-1 suplementadas con 5, 50, 150 y 250 nM de Torin se determinó con DFA que tiñe solamente a las células viables. Tukey $P \leq 0.05$; $n=2$ STATISTICA ver. 8.0.

Una vez que se comprobó que torin no era tóxico, se realizaron las cinéticas de crecimiento suplementadas con diferentes concentraciones de torin. En la figura 15A puede observarse que 150 y 250 nM de torin indujeron solamente una inhibición hasta el día 4 (inicio de la fase log) y a partir de ese día el crecimiento se incrementó en peso seco, superando incluso al control. Mientras que las concentraciones de 5 y 50 nM mantuvieron una tendencia a incrementar el peso seco desde el día dos. Por otra parte, en las cinéticas suplementadas con 150 y 250 nM y evaluadas por VPC, disminuyó notablemente el crecimiento durante toda la cinética, excepto en la parte final donde alcanza al control (Fig. 15B). En el presente estudio en los cultivos NT-1 suplementados con 150 y 250 nM de torin, se encontró una inhibición en el crecimiento hasta el cuarto día, sin embargo a partir de ese día torin ya no presentó un efecto inhibitorio, sino que promovió el crecimiento que fue evaluado por peso seco. Por otra parte, a diferencia del peso seco el VPC si disminuyó en los cultivos tratados con las diferentes concentraciones de Torin durante casi toda la cinética. Los datos anteriores sugieren que la disminución de VPC puede deberse a una disminución del tamaño ocasionado por un

estado de proliferación activo, para comprobar esto se evaluó el tamaño celular en experimentos posteriores (Fig. 16).

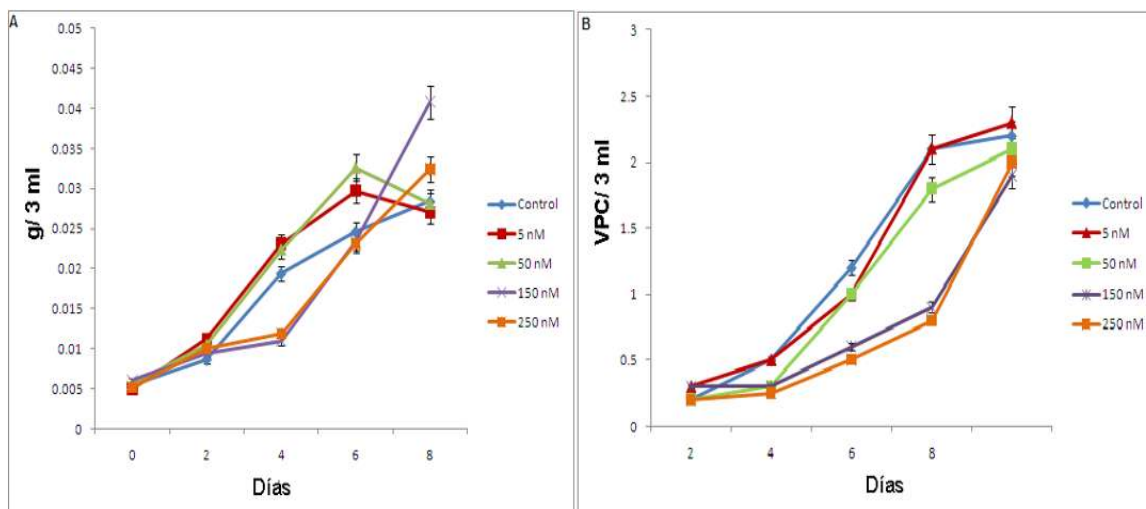


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de torin sobre el crecimiento de los cultivos NT-1. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos tratados con 0, 5, 50, 150 y 250 nM de Torin evaluadas por A) peso seco y B) VPC. Tukey $P=0.05$; $n=2$. STATISTICA ver. 8.0.

Los resultados anteriores (Fig. 15) mostraron que torin no se está comportando como un inhibidor en los cultivos NT-1, debido a que concentraciones bajas (5 y 50 nM) incrementaron el peso seco durante toda la cinética, mientras que las altas (150 y 250 nM) lo inhibieron solamente hasta el cuarto día. Dicho comportamiento fue inesperado, debido a que torin, presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diferentes sistemas biológicos (Thoreen *et al.*, 2009; Schepetilnikov *et al.*, 2011). Por lo anterior, se decidió observar su comportamiento sobre la proliferación celular, evaluando el IM en el día seis. Como se muestra en la figura 16A, se obtuvo una disminución de casi un 30% con 50 nM de torin respecto al control, lo que no se relaciona con el incremento de peso seco, pero si con el VPC (Fig. 15). Mientras que las células suplementadas con 150 y 250 nM, presentaron un 25% de incremento en el IM respecto al control, que concuerda con el crecimiento observado después del día cuatro originado por el aumento en la proliferación (Fig. 16A). Como se observó que el VPC disminuyó en todos los tratamientos de torin (15 B) y el incremento de IM solamente se presentó en los cultivos suplementados con 150 y 250 nM (16A), se decidió evaluar el tamaño de las células. Los cultivos suplementados con 150 y 250 nM de torin presentaron células pequeñas, lo que explica la disminución de VPC (Fig. 16 B). En la figura 16C, también se observa que las células NT-1 al ser tratadas con torin cambian de forma alargada a redonda.

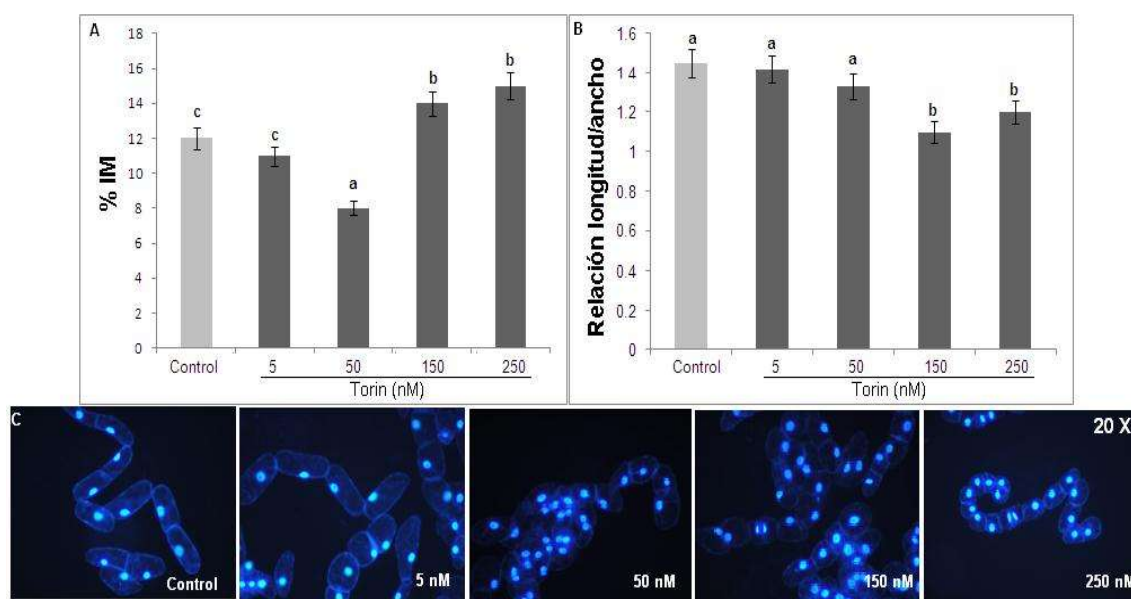


Figura 16. Efecto de torin en la proliferación y el tamaño de las células de los cultivos NT-1. A) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis de fase log de los cultivos suplementados con 0, 5, 50, 150 y 250 nM de Torin. B) Tamaño celular. Las células teñidas con DAPI se midieron para calcular la relación largo/ancho con el programa ImageJ. C) Fotografías de células NT-1 en fase log teñidas con DAPI. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

A pesar de los efectos contrastantes de torin sobre el crecimiento de los cultivos NT-1, seleccionamos la concentración de 150 nM de dicho inhibidor para determinar su efecto sobre los cultivos tratados con insulina. En la Fig. 17 se observa que la insulina estimula el crecimiento en ambos parámetros (peso seco y VPC), mientras que en los cultivos tratados con 150 nM de Torin, este último inhibe dicho crecimiento en peso seco hasta el quinto día y durante toda la cinética evaluada por VPC. Los resultados anteriores, se asemejan a los de la Fig. 15, lo que sugiere que el efecto sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 en presencia de torin, es independiente de la insulina. Existen pocos antecedentes acerca del uso de torin en sistemas vegetales, en plántulas de *Arabidopsis* se ha reportado que 200 nM de torin inhibió la señalización de TOR al bloquear la fosforilación de S6K, sin embargo no se reporta el fenotipo de las plantas (Schepetilnikov *et al.*, 2011). Mientras que en mamíferos se observó que 250 nM de Torin suprimió dramáticamente la proliferación al disminuir la abundancia de la ciclina D (Thoreen *et al.*, 2009). Con relación al incremento en la proliferación de los cultivos NT-1 después del día cuatro, suponemos que ocurrió por un efecto compensatorio a la inhibición de TOR con el incremento de la transcripción de genes reguladores del ciclo celular.

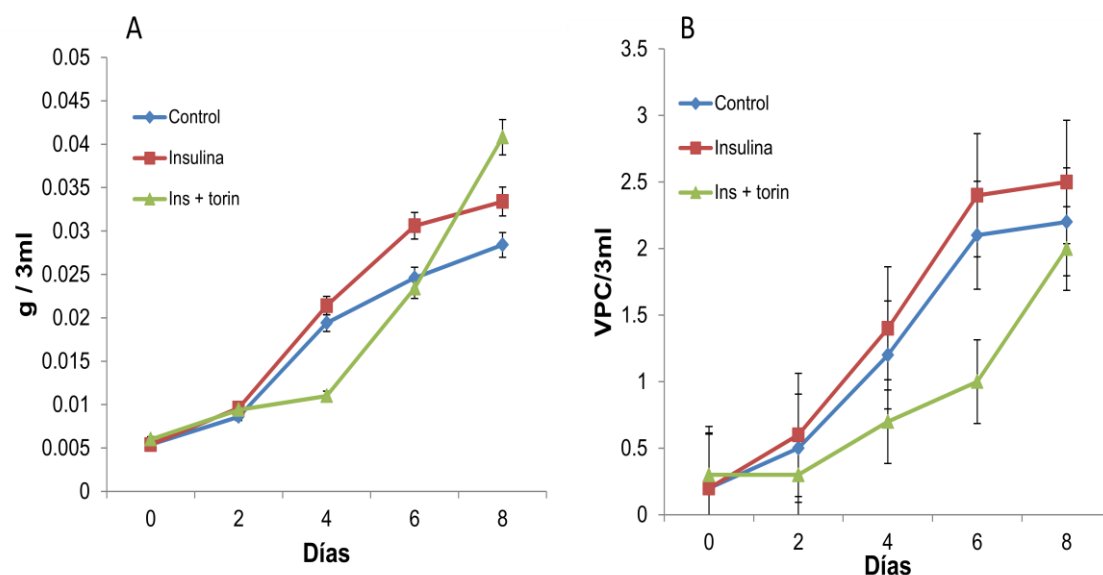


Figura 17. Efecto de torin sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con 1.23 nM de insulina más 150 nM de Torin evaluadas por A) peso seco y B) VPC. Tukey $P=0.05$; $n=2$. STATISTICA ver. 8.0

3.3.1. Expresión de genes reguladores del ciclo celular en cultivos NT-1 tratados con torin

Como se observó un incremento en la proliferación en los cultivos NT-1 suplementados con Torin (Fig. 16), se decidió evaluar los niveles de algunos transcritos de genes reguladores del ciclo celular. Se muestra en la Fig. 13 que 150 nM de Torin incrementó la expresión de ciclina B y E2F, lo que podría explicar porque Torin estimuló en lugar de inhibir la proliferación de los cultivos NT-1 (Fig. 15A).

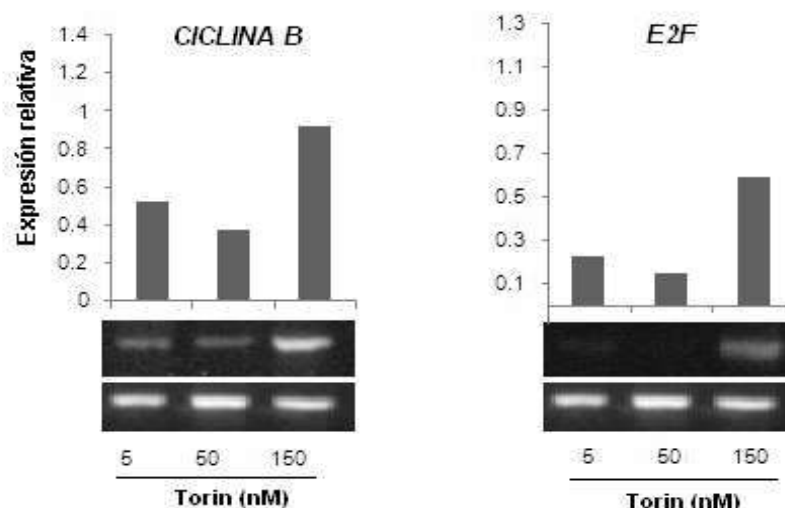


Fig. 18. Efecto de Torin sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular. Los cultivos NT-1 fueron suplementados con 5, 50 y 150 nM de Torin y se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes *CICLINA B*, *E2F* y *ACTINA* como control de carga. Las fotografías mostradas representan los productos de amplificación de cada gen en gel de agarosa 1%.

3.3.2. Expresión de diferentes genes reguladores del ciclo celular en cultivos NT-1 suplementados con insulina e inhibidores de componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK

Una vez que se observó que la insulina estimula la proliferación en los cultivos NT-1 probablemente a través de las vías PI3K-TOR y MAPK (Fig. 11), se decidió evaluar si dicha hormona podría regular la expresión de genes reguladores del ciclo celular. En la Fig. 19 se aprecia que 1.23 nM de insulina estimuló la expresión de *CDKB* y que dicho efecto disminuyó con los inhibidores LY294002, rapamicina y UO126, lo que sugiere que *CDKB* podría ser un regulador importante en la proliferación de los cultivos NT-1 estimulados por insulina. La expresión de *E2F* disminuyó con insulina, mientras que con LY294002 y Torin aumentó en más del 100% y permaneció inalterada con rapamicina y UO126. Además LY294002 y Torin incrementaron también la expresión de *CICLINA B*. En cuanto a *ARC A*, regulador negativo de la proliferación (Ullah *et al.*, 2003), se observó que en los cultivos tratados con insulina y rapamicina la expresión disminuyó con respecto al control. En cambio, dicha expresión fue estimulada por UO126 y LY294002 principalmente.

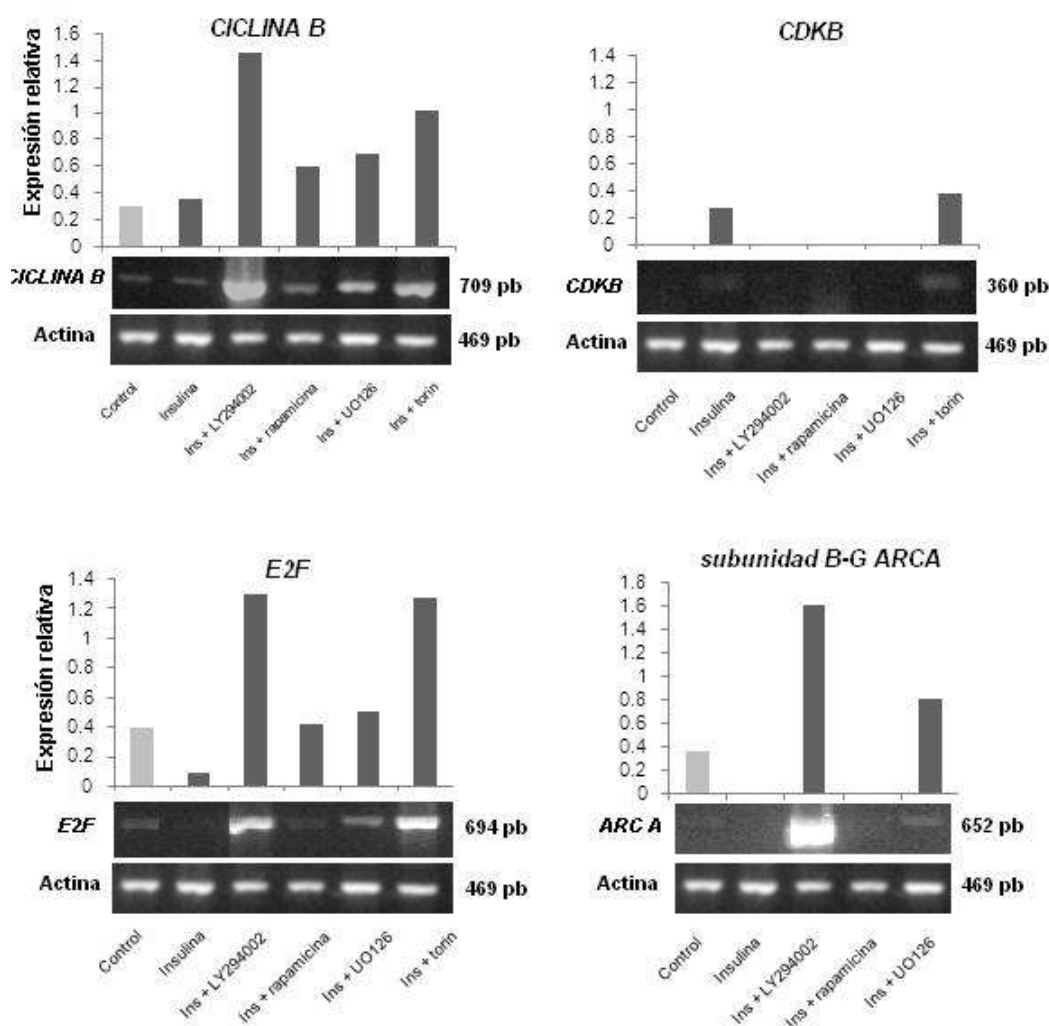


Figura 19. Efecto de la insulina y los inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular. Los cultivos NT-1 fueron suplementados con 1.23 nM de insulina y 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina, 10 μ M UO126 y 150 nM de Torin. Se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F*, *E2F*, *subunidad β -G ARC A* y *ACTINA* como control de carga. Las fotografías mostradas representan el análisis de los productos de amplificación de cada gen en gel de agarosa 1%.

3.3.3. Activación por insulina de las cascadas de señalización PI3K-TOR y MAPK

Hasta aquí, se ha determinado que la insulina estimula la proliferación celular incrementando la expresión de CDKB y se sugiere que lo hace a través de la activación de las vías PI3K-TOR y MAPK. Para determinar directamente la posible participación la vía PI3K-TOR se evaluó la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Como se ha mencionado, en mamíferos la insulina enciende la vía PI3K-TOR activando a través de su receptor a la cinasa PI3K, la cual promueve corriente abajo la fosforilación de TOR. Esta última cinasa fosforila a sus blancos 4EPBP1 y S6K y al ser activada S6K, ésta fosforila a la proteína ribosomal S6 (Saltiel y Kahn, 2001). Para determinar directamente la posible activación de la vía PI3K-TOR, se marcaron las proteínas ribosomales con 32 P y en la Fig. 20 podemos observar que la insulina incrementó la fosforilación de la proteína S6, mientras que los inhibidores rapamicina y Torin

disminuyeron dicha fosforilación. Lo anterior sugiere que durante la proliferación estimulada por insulina, participa la cinasa TOR, probablemente a través de la cascada PI3K-TOR. Para determinar esto último sería necesario analizar el efecto de un inhibidor de PI3K sobre la fosforilación de S6. Sin embargo, los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento en cultivos tratados con LY294002 muestran un efecto inhibitorio del crecimiento previamente estimulado con insulina (Fig. 10), lo que sugiere la activación de la ruta PI3K-TOR por insulina. Los resultados de la fosforilación de S6 en el presente estudio son similares al efecto de la insulina reportado durante la germinación en maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Buentello Volante *et al.*, 2010).

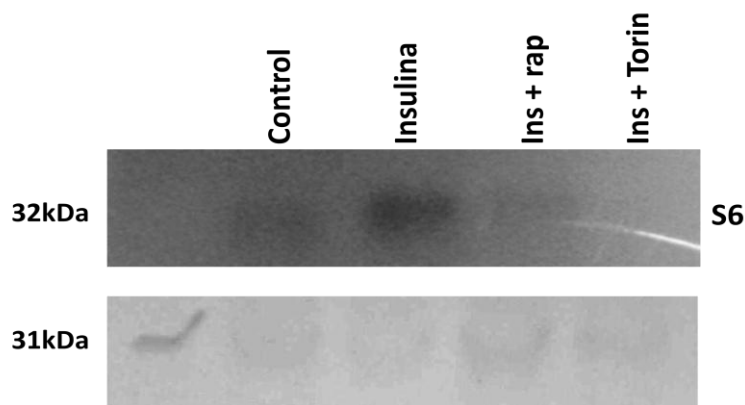


Figura 20. Efecto de la insulina e inhibidores de la cinasa TOR sobre la fosforilación de la proteína ribosomal S6 por insulina. Los cultivos NT-1 fueron suplementados con 1.23 nM de insulina y los inhibidores 10 nM rapamicina y 150 nM Torin. Las células al día seis de la fase log se marcaron con 32 P. Se muestra la autoradiografía y gel de Coomassie representativos de la fosforilación de S6 de cultivos NT-1. n=2.

Por otra parte, sabemos que en mamíferos la insulina enciende las vías PI3K-TOR y MAPK (Figs. 1 y 2), por lo que se decidió determinar si la ruta MAPK también estaría participando en la proliferación estimulada por insulina. Se evaluó la fosforilación de las cinasas MAPK3 y 6 que han sido involucradas en diferentes procesos del desarrollo vegetal (Bush y Krysan, 2007; Wang *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, se ha observado que ambas cinasas son reconocidas por anticuerpos de mamíferos anti ERK1/2 (Heese *et al.*, 2007; Beckers *et al.*, 2009). En la Fig. 21 se muestra un Western blot de proteínas obtenidas de cultivos NT-1 suplementados con insulina y el inhibidor UO126. Se observa que la fosforilación de ambas MAPK disminuyó en los cultivos tratados con insulina más UO126, lo que sugiere una posible activación de la vía MAPK. Sin embargo, debido a que la insulina no incrementó la fosforilación de ninguna de las cinasas, se podría atribuir únicamente el efecto de la disminución de la fosforilación de ambas cinasas a la inhibición de MAPKK por UO126. La vía MAPK es reconocida por la convergencia que existe entre las distintas MAPK durante la regulación de diferentes procesos como la progresión del ciclo celular y la dinámica del citoesqueleto durante la mitosis. Con relación a esto último, en tabaco se ha propuesto la activación de la ruta NPK1 (MAPKKK), NQK1 (MAPKK) y NRK1

(MAPK), siendo esta última homóloga a la MAPK4 de *Arabidopsis* (Komis *et al.*, 2011). Por lo anterior, se sugiere que MAPK4 podría ser el blanco de la fosforilación de una MAPKK, previamente estimulada por una MAPKKK activada por insulina.

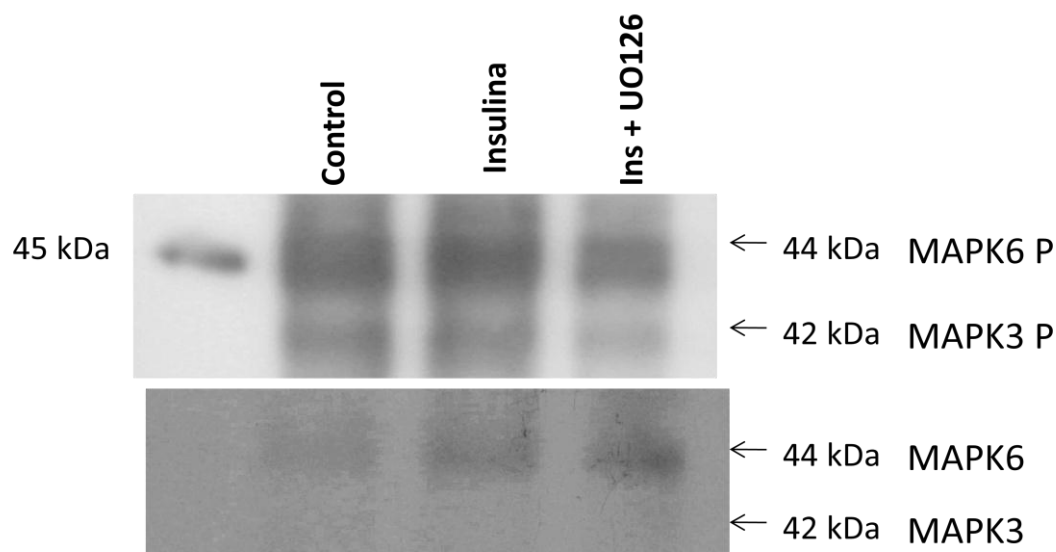


Figura 21. Efecto de la insulina y UO126 sobre la activación de las cinasas MAPK 3/6 en los cultivos NT-1. Los cultivos NT-1 se suplementaron con 1.23 nM de insulina y 10 μ M de UO126. A partir de muestras del día seis de la fase log se realizó el ensayo de Western blot con los anticuerpos anti fosfo-MAPK3/6 y anti MAPK3/6 como control de carga. n=2

En conjunto, los datos presentados anteriormente indican que la insulina estimula la proliferación celular y sugieren la posible activación de las vías PI3K-TOR y MAPK y el incremento en la expresión de CDKB.

3.4.Efecto de la insulina y la auxina 2,4-D en los cultivos NT-1

Una vez que observamos que 1.23 nM de insulina fue capaz de estimular la proliferación en los cultivos, se decidió determinar si la insulina sería capaz de reemplazar a las auxinas durante la proliferación, debido a que se ha descrito en cultivos de tabaco en suspensión que las auxinas promueven la proliferación a concentraciones de mayores a 1 μ M y la expansión a menores de 1 μ M (Nagata *et al.*, 2004). Para lograr este propósito se suplementaron los medios con 0.123, 1.23, 12.3 y 61.5 nM de insulina sin la presencia de auxina. Como observamos en las Fig. 22, ninguna de las concentraciones de insulina promovió un aumento en peso seco y VPC, lo que indica que la insulina para estimular la proliferación de los cultivos NT-1 requiere la presencia de las auxinas.

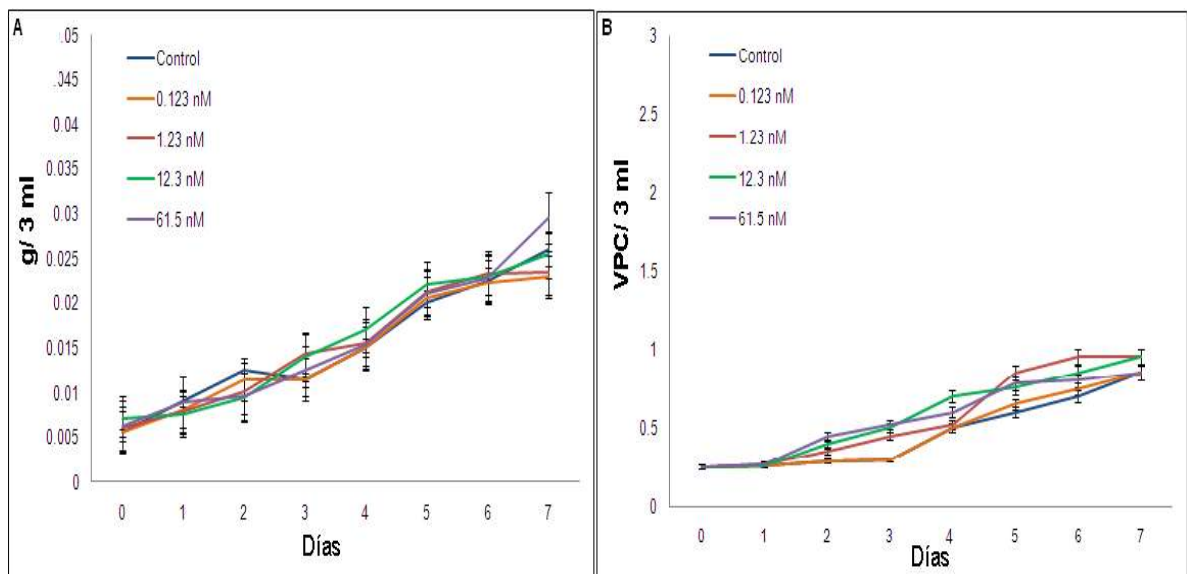


Figura 22. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 en medio sin auxina. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con 0.123, 1.23, 12.3 y 61.5 nM de insulina en medio que carece de 2,4-D valuadas por A) peso seco y B) VPC. Tukey $P=0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0

En relación al efecto de las auxinas en los cultivos de tabaco, se ha descrito ampliamente que ésta coordina tanto la proliferación como la elongación de forma dependiente de la concentración. Los cultivos sin auxina presentaron una disminución de aproximadamente un 80% del IM respecto a los que se suplementaron con auxina (ver Figs. 8 y 23). Se observó un incremento del 1% en el IM en células sin auxina suplementadas con 1.23 nM de insulina que no fue suficiente para aumentar la población celular (Fig. 23A). Esto último mostró que las auxinas son necesarias para mantener la división en cultivos NT-1. Respecto al tamaño, observamos que en todos los cultivos ensayados las poblaciones de los cultivos presentaron células alargadas, fenómeno ampliamente descrito en cultivos BY-2 carentes de auxinas (Fig. 23 B y C) (Chen *et al.*, 2001).

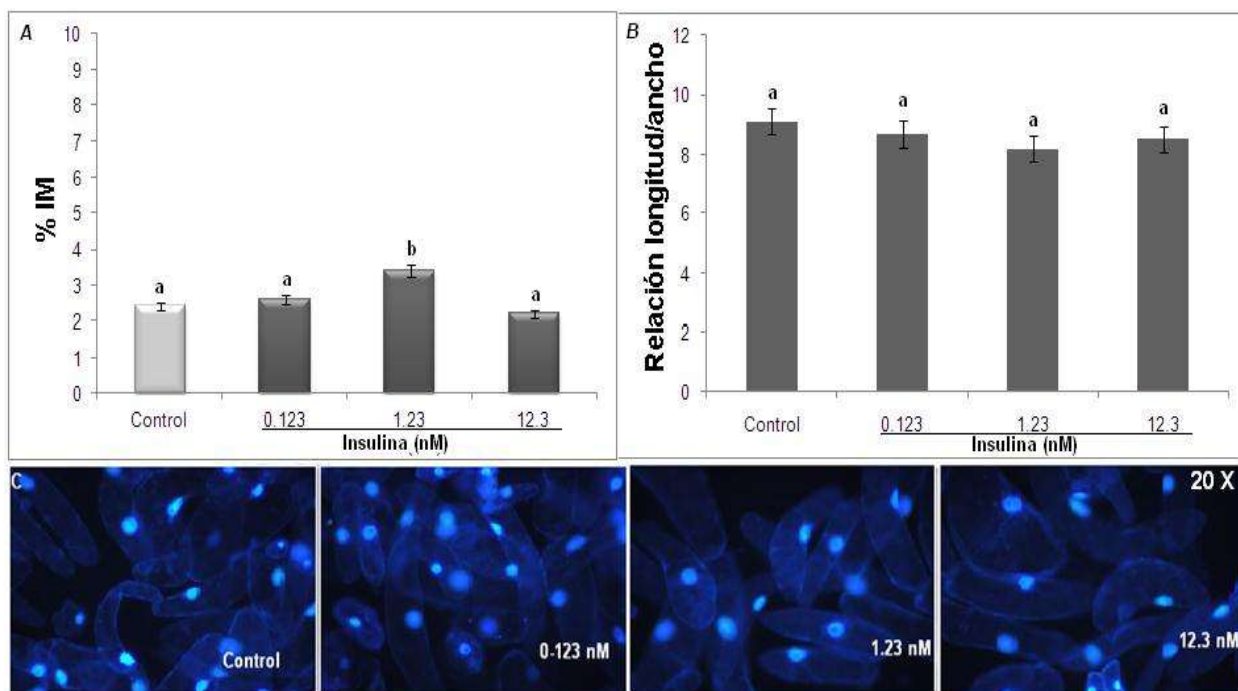


Figura 23. Efecto de la insulina en la proliferación y tamaño de los cultivos NT-1 sin auxina. Las células NT-1 se crecieron en medio MS sin 2,4-D y suplementado con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina. A) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis de fase log. B) Tamaño celular. Las células teñidas con DAPI se midieron para calcular la relación largo/anchura con el programa ImageJ. C) Fotografías de células NT-1 en fase log teñidas con DAPI. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

3.4.1. Efecto de la insulina dependiente de 2,4-D sobre la proliferación de los cultivos NT-1

Una vez que se determinó que la insulina requiere de la auxina 2,4-D para estimular la proliferación en los cultivos NT-1, se decidió probar un sistema con actividad mitótica restringida por efecto de una baja concentración de auxina y estimulado con insulina. La concentración requerida de 2,4-D para que los cultivos NT-1 proliferen adecuadamente es de 0.9 μM , por lo que se ensayaron concentraciones más bajas de 0.45 y 0.225 μM de 2,4-D. Se puede apreciar en la Fig. 24 las cinéticas de crecimiento en peso seco y VPC, donde en la primera no se observaron diferencias significativas en ninguna concentración (Fig. 24A). Sin embargo, el VPC incrementó significativamente en los cultivos adicionados con 0.225 μM de auxina (Fig. 24B). Se ha reportado en células BY-2 un incremento del VPC debido a la expansión celular ocasionada por concentraciones menores a 1 μM de auxina (Nagata *et al.*, 2004).

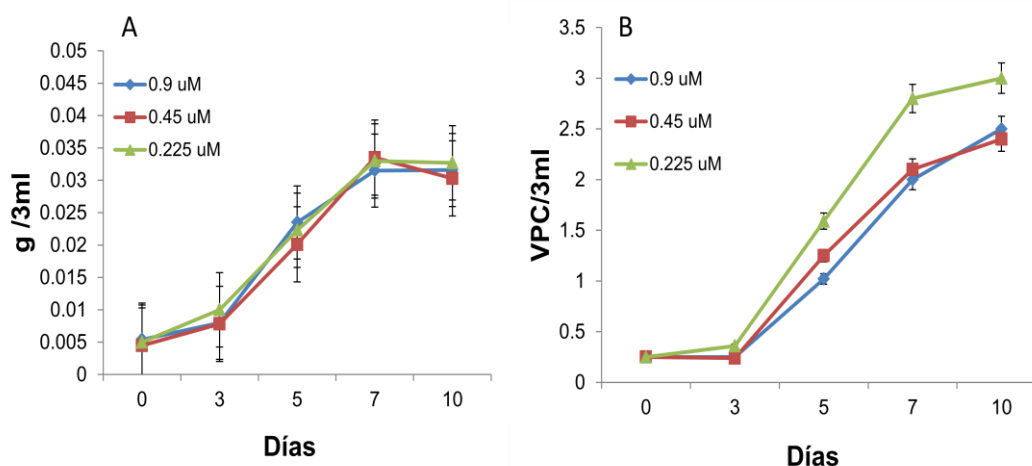


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D sobre el crecimiento de los cultivos NT-1. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos suplementados con 0.9, 0.45 y 0.225 μ M de 2,4-D evaluados por A) peso seco y B) VPC. Tukey $P=0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0.

Por los antecedentes que indican que las auxinas regulan la proliferación celular en cultivos BY-2 dependiente de su concentración (Nagata *et al.*, 2004) se determinó el IM en los cultivos suplementados con 0.225, 0.45 y 0.9 μ M de 2,4-D, para seleccionar la concentración que limitara la proliferación y determinar en ellos, si dicho parámetro se restablecía con la insulina. Podemos observar en la Fig. 20 que el IM disminuyó alrededor de 40% en los cultivos con 0.45 y 0.225 μ M de auxina respecto al control y esto concuerda con los reportes en cultivos BY-2, donde concentraciones bajas de auxina impiden la progresión del ciclo celular en la transición G1/S (Ito *et al.*, 1998). En relación al tamaño, se muestra la Fig. 25B que las células con 0.225 μ M de 2,4-D incrementaron marcadamente el tamaño y esto se aprecia en las fotografías representativas (Fig. 25C). El aumento de tamaño se relaciona con el incremento de VPC (Fig. 25B) y ha sido extensamente reportado en cultivos de tabaco en suspensión, que bajas concentraciones de auxina ocasionan una expansión por la escasa actividad mitótica (Nagata, 1992; Chen *et al.*, 2001). Por los resultados anteriores seleccionamos 0.225 μ M como la concentración de 2,4-D limitante para la proliferación celular en cultivos NT-1.

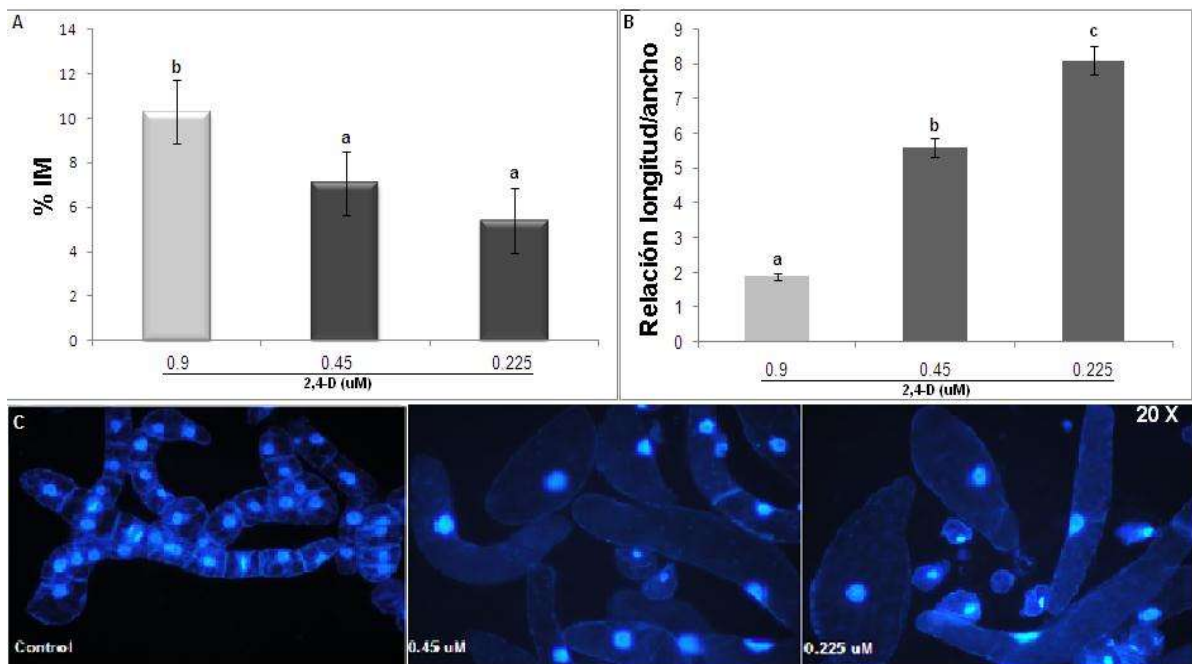


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de auxina en la proliferación y el tamaño celular de los cultivos NT-1. Las células NT-1 se crecieron en medio MS suplementado con 0.9, 0.45 y 0.225 μM de 2,4-D. A) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis de fase log. B) Tamaño celular. Las células teñidas con DAPI se midieron para calcular la relación largo/ancho con el programa ImageJ. C) Fotografías de células NT-1 en fase log teñidas con DAPI. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

3.4.2. Efecto de la insulina sobre la proliferación de los cultivos con baja concentración de auxina

En los cultivos suplementados con 0.225 μM de 2,4-D, donde la actividad mitótica es limitada, se ensayaron 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina. Se puede observar en la Fig. 26 que la concentración de 1.23 nM incrementó el peso seco a partir del cuarto día que corresponde a la fase log. En cuanto al VPC, no se encontraron variaciones significativas en los tratamientos, aunque existe una tendencia a disminuir en las concentraciones de 1.23 nM y 12.3 nM de insulina (Fig. 26B).

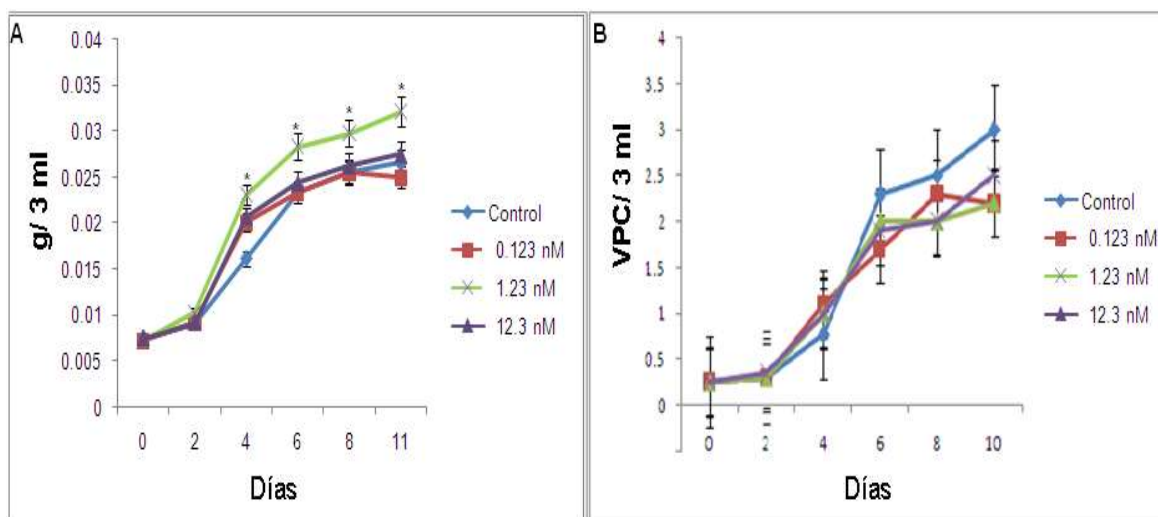


Figura 26. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Se realizaron cinéticas de crecimiento de los cultivos con 0.225 μ M de 2,4-D y suplementados con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina evaluadas por A) peso seco y B) VPC. Tukey $P=0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0.

Para comprobar directamente si la insulina estimula la proliferación en cultivos con limitada actividad mitótica, se calculó el porcentaje de IM de los cultivos NT-1 suplementados con 0.225 μ M de auxina e insulina (Fig. 27A). Los cultivos NT-1 con 1.23 nM de insulina mostraron el IM más alto (3.5 %). En células BY-2 se ha reportado que bajas concentraciones de auxina provocan que las células permanezcan en la fase G1 y que la re adición de ésta promueve la entrada al ciclo (Nagata, 1992). Es posible que la insulina ocasione que algunas células del cultivo con 0.225 μ M de auxina reingresen al ciclo celular. Aún así el porcentaje de 3.5 alcanzado no se asemejó al obtenido con auxina que fue del 11 % (Fig. 8), lo que comprueba que la proliferación de los cultivos N-1 es dependiente de la concentración de auxina. El tamaño celular es menor en los cultivos suplementados con 1.23 nM de insulina respecto al control, lo que indica que las células se encuentran proliferando (Fig. 27B). El aumento del IM y el tamaño celular pequeño que presentan los cultivos con limitada capacidad proliferativa en presencia de insulina sugieren que la hormona fue capaz de inducir la proliferación.

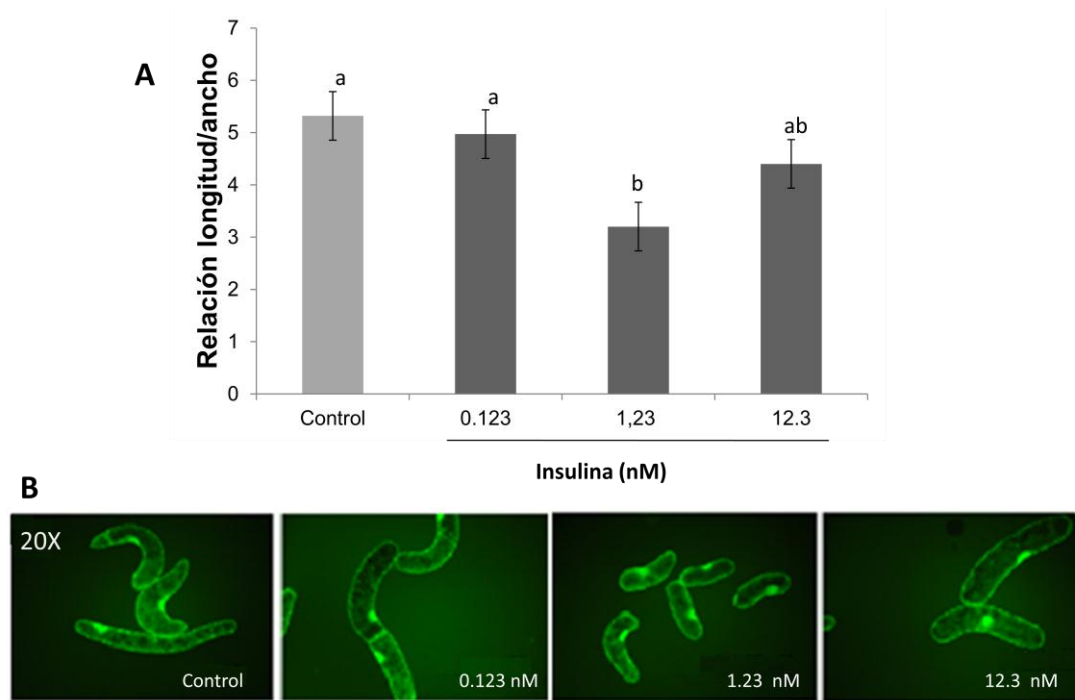


Figura 27. Efecto de la insulina en la proliferación y el tamaño de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Las células NT-1 crecieron en medio MS IX con 0.225 μ M de 2,4-D suplementado con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina. A) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis de fase log. B) Tamaño celular. Las células teñidas con DAPI se midieron para calcular la relación largo/anchura con el programa ImageJ. C) Fotografías de células NT-1 en fase log teñidas con DFA. Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0

3.4.3. Expresión de algunos genes reguladores de la proliferación en cultivos NT-1 suplementados con concentraciones bajas de auxina e insulina

Debido a lo que se mostró en los experimentos anteriores, la insulina estimuló la proliferación en cultivos con baja actividad mitótica, se evaluó la expresión por RT-PCR de *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F* que regulan directamente el ciclo celular y los que lo regulan indirectamente: *subunidad β -G ARC A* y *GST*. En la Fig. 28 se observa que 1.23 nM de insulina incrementó los niveles de los transcritos de *ciclina B*, *CDKB*, *E2F* y *GST*. Se ha reportado que la expresión de *CICLINA B* es regulada en el ciclo celular, con un máximo durante G2/M (Ito, 2000) y que la cantidad de la proteína CDKB sigue el mismo patrón y que las auxinas son importante para la expresión de dicho gen en cultivos BY-2 incrementando la proliferación (Sorrell *et al.*, 2001), lo que coincide con el efecto la insulina en el presente trabajo. En cuanto al factor de transcripción *E2F*, se ha descrito que su expresión estimula la proliferación celular en ausencia de auxina en células BY-2 (Magyar *et al.*, 2005) y que se expresa principalmente en la transición G1/S. El efecto estimulador de la insulina sobre la expresión de este último gen, nos permite sugerir que el incremento en la proliferación estaría regulado en este punto del ciclo. *GST* es un gen de respuesta temprana a auxinas que codifica para la glutatión S-transferasa que se expresa principalmente en la fase S del ciclo celular de manera dependiente de auxina (Takahashi and Nagata, 1992), por lo que probablemente los cultivos NT-1 aumenten su sensibilidad a auxina al ser tratados con insulina y se

promueva la expresión del gen GST durante la proliferación. Por otra parte, observamos que la insulina disminuyó la expresión de la *subunidad β -G ARC A*, que regula negativamente la proliferación celular en *Arabidopsis* (Ullah *et al.*, 2003), es decir que la insulina afectó la expresión de dicho transcrito para promover la proliferación. Los resultados anteriores mostraron que 1.23 nM de insulina promovió la proliferación celular en cultivos con 0.225 μ M de 2,4-D (Fig. 28) a través de la expresión de los genes reguladores del ciclo celular.

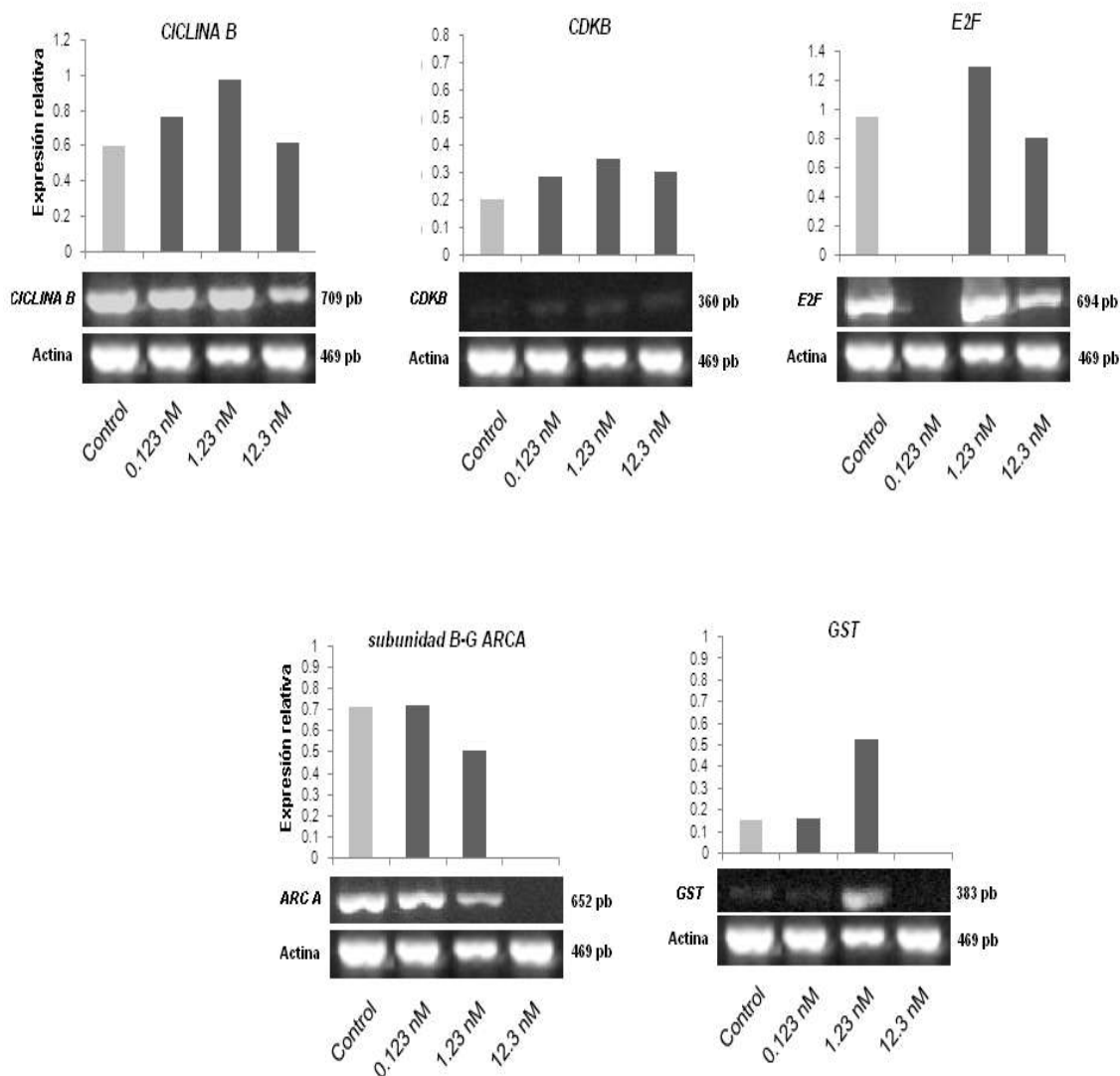


Figura 28. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular en los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Los cultivos con 0.225 μ M fueron suplementados con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de Se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F*, *subunidad β -G ARC A*, *GST* y *ACTINA* como control de carga. Las fotografías mostradas representan el análisis de los productos de amplificación de cada gen en gel de agarosa 1%.

Además se evaluó la expresión de genes relacionados con expansión celular como *A-EXPANSINA* y *LA FOSFOLIPASA A2 (PLA2)* en los cultivos con concentración baja de auxina (Fig. 29). Las expansinas son proteínas que participan

activamente en la elongación celular y cuya actividad se relaciona con su expresión. (Link and Cosgrove, 1998). Mientras que PLA2 interviene en procesos como elongación, gravitropismo y sus productos pueden actuar como segundos mensajeros en cascadas de transducción de señales (Scherer, 2002; Scherer *et al.*, 2007). La concentración de 1.23 nM de insulina no disminuyó la expresión de los genes antes mencionados como se esperaba, ya que su expresión se relaciona con la elongación lo que indica que el tamaño pequeño observado en las células tratadas con esta concentración no se regula por dichos genes. En relación a lo anterior, podemos suponer que otro tipo de expansinas pueden participar como las β - expansinas, ya que éstas pertenecen a una familia multigénica (Link y Cosgrove, 1998) o por el transcrito *ABP1* que regula la elongación en cultivos BY-2 (Chen *et al.*, 2001).

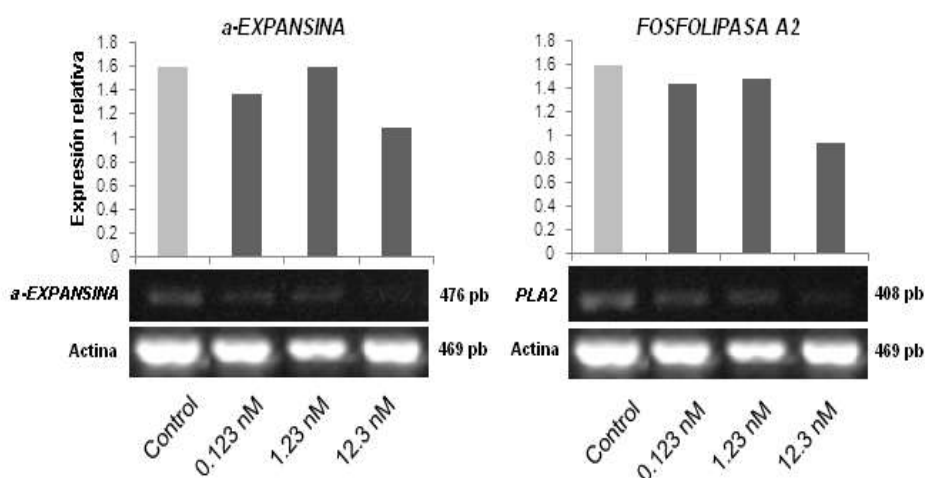


Figura 29. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes reguladores de la expansión en los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Los cultivos con 0.225 10 μ M fueron suplementados con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de Se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes α -EXPANSINA, PLA2 y ACTINA como control de carga. Las fotografías mostradas representan el análisis de los productos de amplificación de cada gen en gel de agarosa 1%.

Para comprobar que las células con baja concentración de auxina permanecían viables en el transcurso de los experimentos, se evaluó la viabilidad celular con DFA (Fig. 30). El control y los tratamientos con insulina alcanzaron un porcentaje de viabilidad de aproximadamente 66%, una disminución similar de viabilidad ha sido documentado en células BY-2 (Nagata *et al.*, 2004). La auxina es necesaria para el mantenimiento de las células de tabaco BY-2 en suspensión, estimulando el ciclo celular, elongación, diferenciación, etc. (Nagata, 1992). En relación a los resultados obtenidos en los cultivos NT-1, donde la insulina necesita la presencia de 2,4-D para promover la proliferación se propone un efecto aditivo, siendo la auxina indispensable para el mantenimiento de los cultivos.

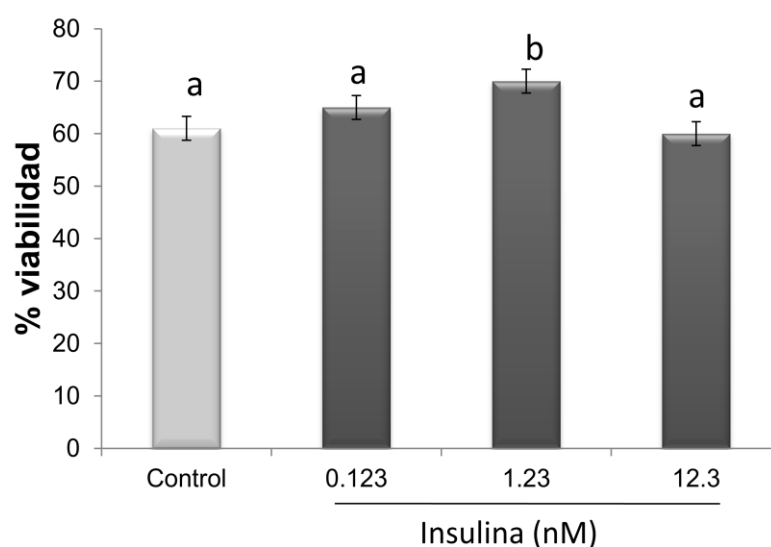


Figura 30. Efecto de la insulina sobre la viabilidad de los cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Los cultivos con 0.225 μ M suplementados con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina se evaluaron al día seis, siendo viables las células que se tiñeron con DFA. 6Tukey. $P \leq 0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0

Para evaluar si la vía MAPK estaría participando en el crecimiento estimulado por insulina en este tipo de cultivos, se realizó un ensayo de Western blot para observar el estado de fosforilación de las cinasas MAPK 3 y MAPK6 por efecto de insulina. En la Fig. 26 se observa que solamente la fosforilación de MAPK6 se incrementó con 1.23 nM de insulina, además se aprecia baja expresión de ambas cinasas en el control de carga. Se ha reportado en cultivos BY-2 que la activación de los componentes de vía MAPK es importante para la progresión del ciclo celular en células BY-2 durante la pre citocinesis (Ma and Yu, 2010), por lo que la activación de esta vía puede relacionarse con un incremento en la proliferación estimulada por insulina. Los resultados obtenidos sugieren que la vía MAPK podría ser activada por 1.23 nM de insulina, regulando la proliferación celular.

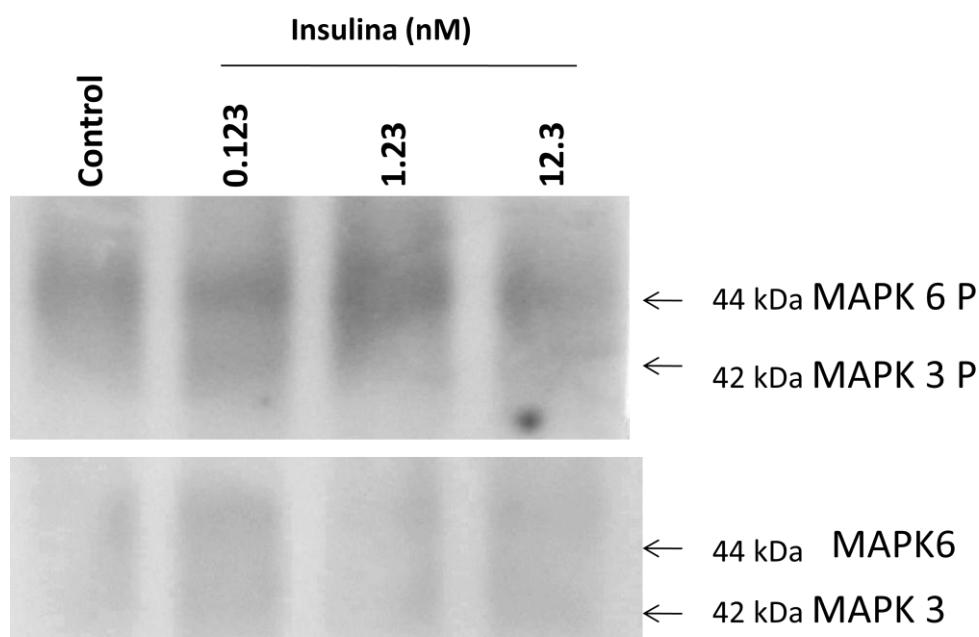


Figura 31. Efecto de la insulina sobre la activación de MAPK 3/6 en cultivos NT-1 con baja concentración de auxina. Los cultivos NT-1 con 0.225 μ M de 2,4-D se suplementaron con 0.123, 1.23 y 12.3 nM de insulina. A partir de muestras del día seis de la fase log se realizó el ensayo de western blot con los anticuerpos anti fosfo- MAPK3/6. y anti MAPK3/6 como control de carga. n=2

3.5.Activación de las rutas PI3K-TOR y MAPK en cultivos NT-1 parcialmente sincronizados por privación de auxina

Debido a que los resultados anteriores mostraron que las auxinas determinan el efecto de la insulina sobre la proliferación, se decidió evaluar dicho efecto en un sistema parcialmente sincronizado por ausencia de auxinas. Se ha descrito en cultivos BY-2 que la privación de auxinas induce que la mayoría de las células se arreten en G1, originando una sincronización parcial y células elongadas como consecuencia de la escasa división (Ishida *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2001). Además, se sabe que los cultivos de tabaco privados de auxinas poseen células alargadas como consecuencia de una expansión isodiamétrica provocada por una mayor entrada de agua a las células (Ulrich y Key, 1988; Nagata, 1992; Winicur *et al.*, 1998). Se privó a los cultivos de 2,4-D durante cuatro días, al cabo de los cuales se suplementaron con auxina. En la Fig. 26 se observa que las cinéticas de crecimiento evaluadas por peso seco, presentaron una fase de adaptación lag corta de dos días; una log del segundo al cuarto día. Las células alcanzaron la fase estacionaria desde el día cuatro en peso seco y sexto en VPC (Figs. 32A y 32B). El hecho de tener un crecimiento acelerado con una fase lag corta de los cultivos, se relaciona con la re-adición de auxinas al medio sin auxinas, debido a que en dichas condiciones se alcanza un IM máximo en las primeras horas después de adicionar auxinas. (Ishida *et al.*, 1993; Mizoguchi *et al.*, 1994).

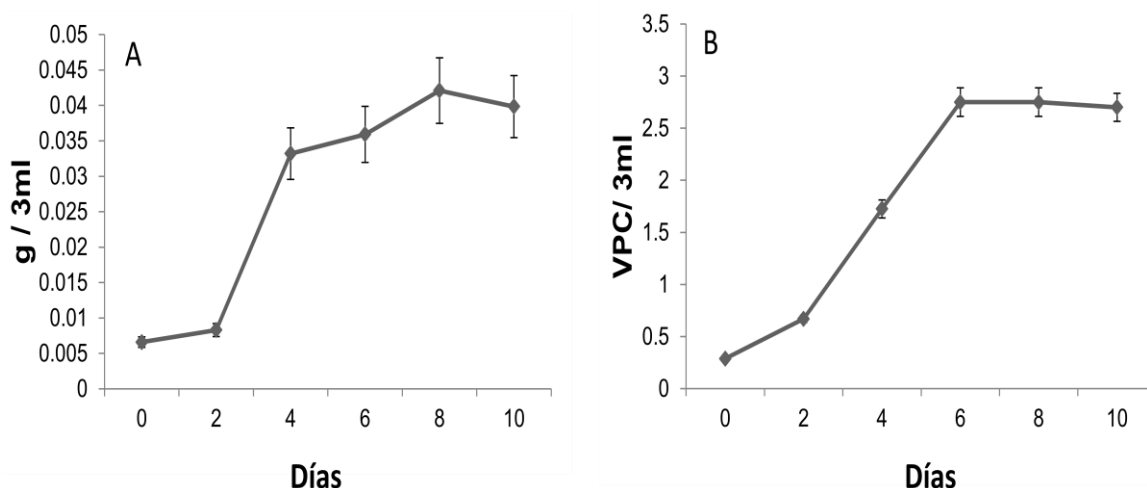


Figura 32. Cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados. Las cinéticas de crecimiento se determinaron analizando el crecimiento por A) peso seco y B) VPC a través de muestreo diario. C) Imágenes representativas de las células NT-1 en las diferentes fases de crecimiento teñidas con DAPI en. $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

Al tener un sistema parcialmente sincronizado cuyas condiciones son diferentes a los cultivos asincrónicos, se determinó el crecimiento estimulado por insulina y en presencia de inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK. El crecimiento evaluado por peso seco se incrementó con insulina (Fig. 33) de forma más pronunciada que en los cultivos asincrónicos (Fig. 10). El arresto del crecimiento promovido por la insulina provocado por LY294002 fue de aproximadamente 60% (Fig. 33A y 33B) y la adición de rapamicina indujo una inhibición del 30% (Fig. 33C y 33D). En la Fig. 33E y 33F se observa que los cultivos suplementados con UO126 no presentaron el mismo efecto inhibitorio que los cultivos asincrónicos.

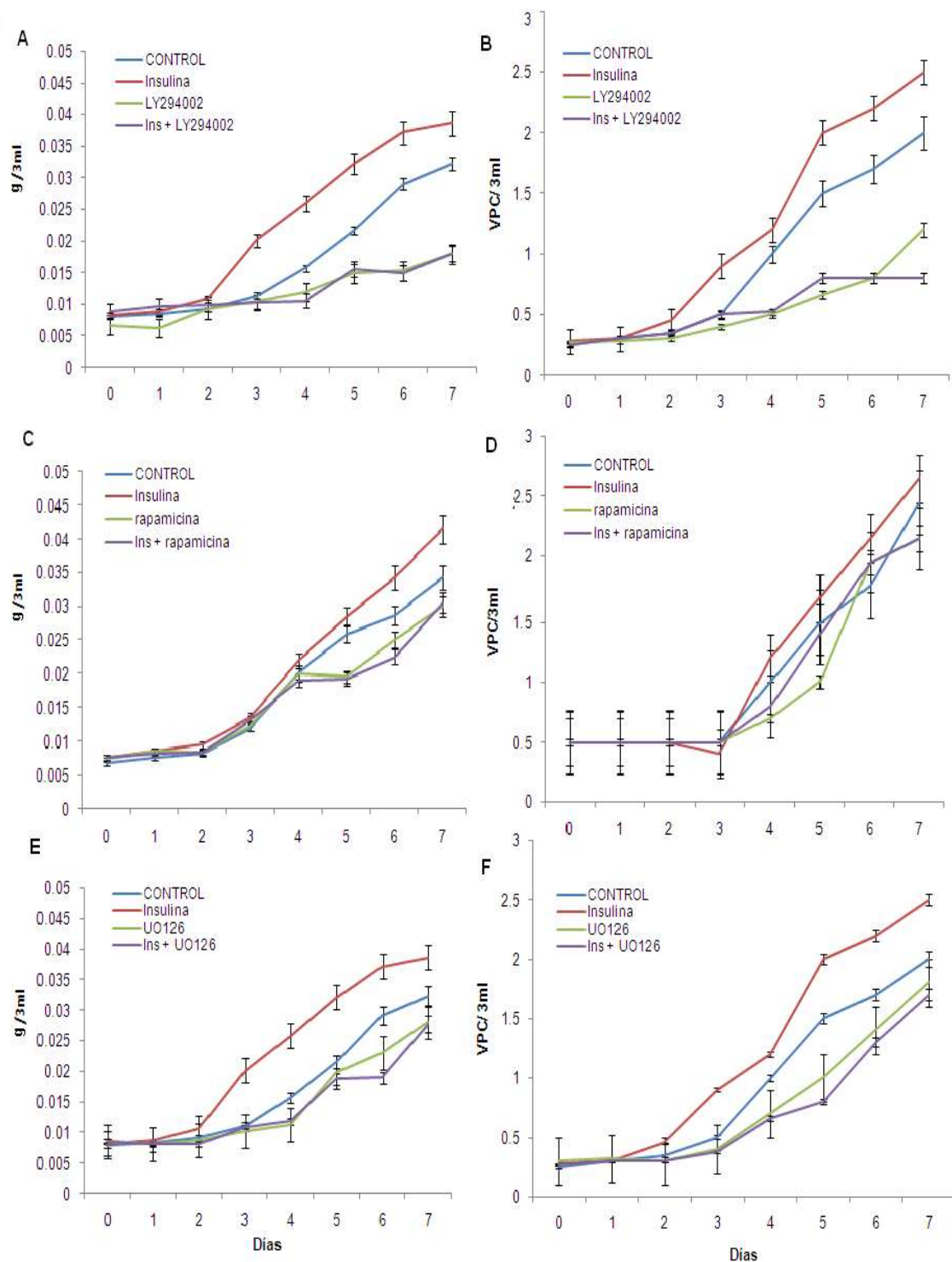


Figura 33. Cinéticas de crecimiento de cultivos NT-1 parcialmente sincronizados suplementadas con insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK. A) B) y C) Los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina y 10 μ M UO126 se evaluaron diariamente por peso seco. D), E) y F) Los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores LY294002, rapamicina y UO126 se evaluaron diariamente por Volumen de Paquete Celular (VPC). Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$. STATISTICA ver. 8.0

En la Fig. 34 se puede observar que el inhibidor UO126 no presentó el efecto obtenido en los cultivos asincrónicos, probablemente porque en estas condiciones,

participa parcialmente la vía MAPK durante el crecimiento estimulado por insulina. Estos resultados sugieren que en los cultivos semi-sincronizados el efecto estimulador de insulina se establece principalmente a través de la activación de la vía PI3K-TOR, a diferencia de los asincrónicos donde parece que participan ambas.

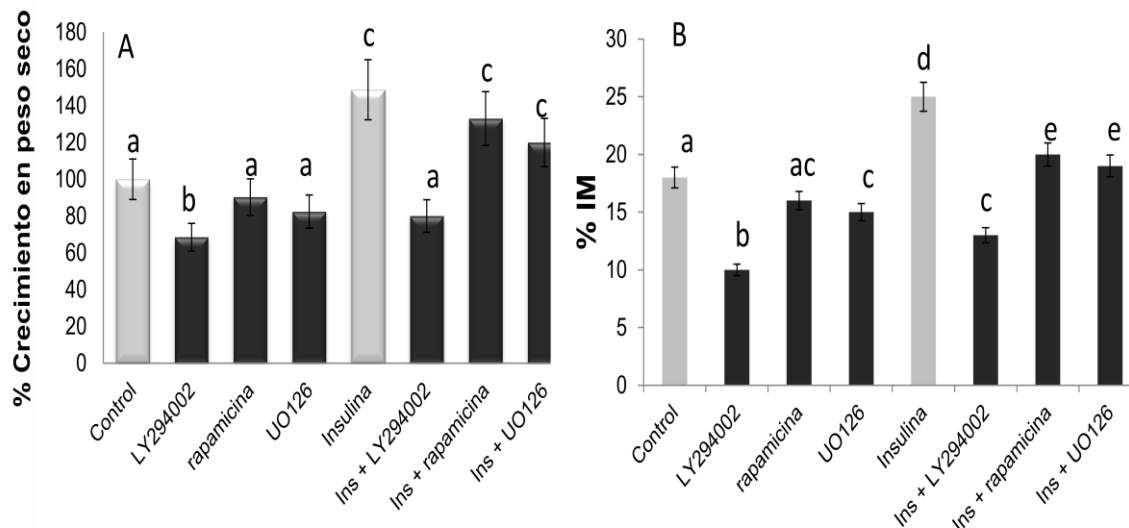


Figura 34. Efecto de la insulina y algunos inhibidores de las rutas PI3K-TOR y MAPK sobre el crecimiento de los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados. A) Se determinó el porcentaje de crecimiento de los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina y 10 μ M UO126 al día seis de la fase log de la cinética de crecimiento por peso seco. B) Porcentaje de Índice Mitótico (IM) determinado en el día seis de fase log. Tukey $P \leq 0.05$; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

3.5.1. Expresión de genes reguladores de la proliferación celular en cultivos NT-1 semi sincronizados

Como se observó que la insulina estimuló la proliferación en los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados, se evaluó la expresión de genes reguladores del ciclo celular. Se muestra en la Fig. 35 que la insulina estimuló la expresión de *E2F* con respecto al control y que dicha expresión se vio afectada solamente por rapamicina. Por el contrario, los cultivos suplementados con insulina más UO126 y LY294002 incrementaron la expresión de *E2F* aún más que sólo con insulina, principalmente con LY. En los cultivos asincrónicos no se observó incremento de *E2F* solo de *CDKB*. Se ha reportado que la auxina regula la expresión de *E2F*, y este a su vez a proliferación en células privadas de auxina en cultivos BY-2 (Magyar *et al.*, 2005), efecto que observamos en el presente estudio. La expresión de *CICLINA B*, *CDKB* y subunidad β -G ARC A en cultivos NT-1 aumentó en los cultivos suplementados con insulina más LY294002. Los resultados anteriores son similares a los cultivos asincrónicos, es decir, la insulina no regula la expresión de *CICLINA B* y *CDKB* durante la proliferación de los cultivos NT-1 semi- sincronizados, a diferencia de los asincrónicos donde se incrementó *CDKB*. La expresión de *CDKB* con LY294002 coincide con lo reportado por Peña Correa, 2010 en cultivos NT-1 con exceso de nutrientes y cuya expresión se relacionó

con un efecto compensatorio del sistema en presencia del inhibidor. La subunidad β -G regula negativamente la proliferación celular (Ullah *et al.*, 2003) y en este sistema se observó un incremento, al igual que en los asincrónicos bajo efecto de LY294002 y que coincide con la escasa proliferación observada en ambos sistemas. El gen *GST* se expresó únicamente en cultivos suplementados con insulina y UO126, a diferencia de los cultivos asincrónicos donde no se observó expresión.

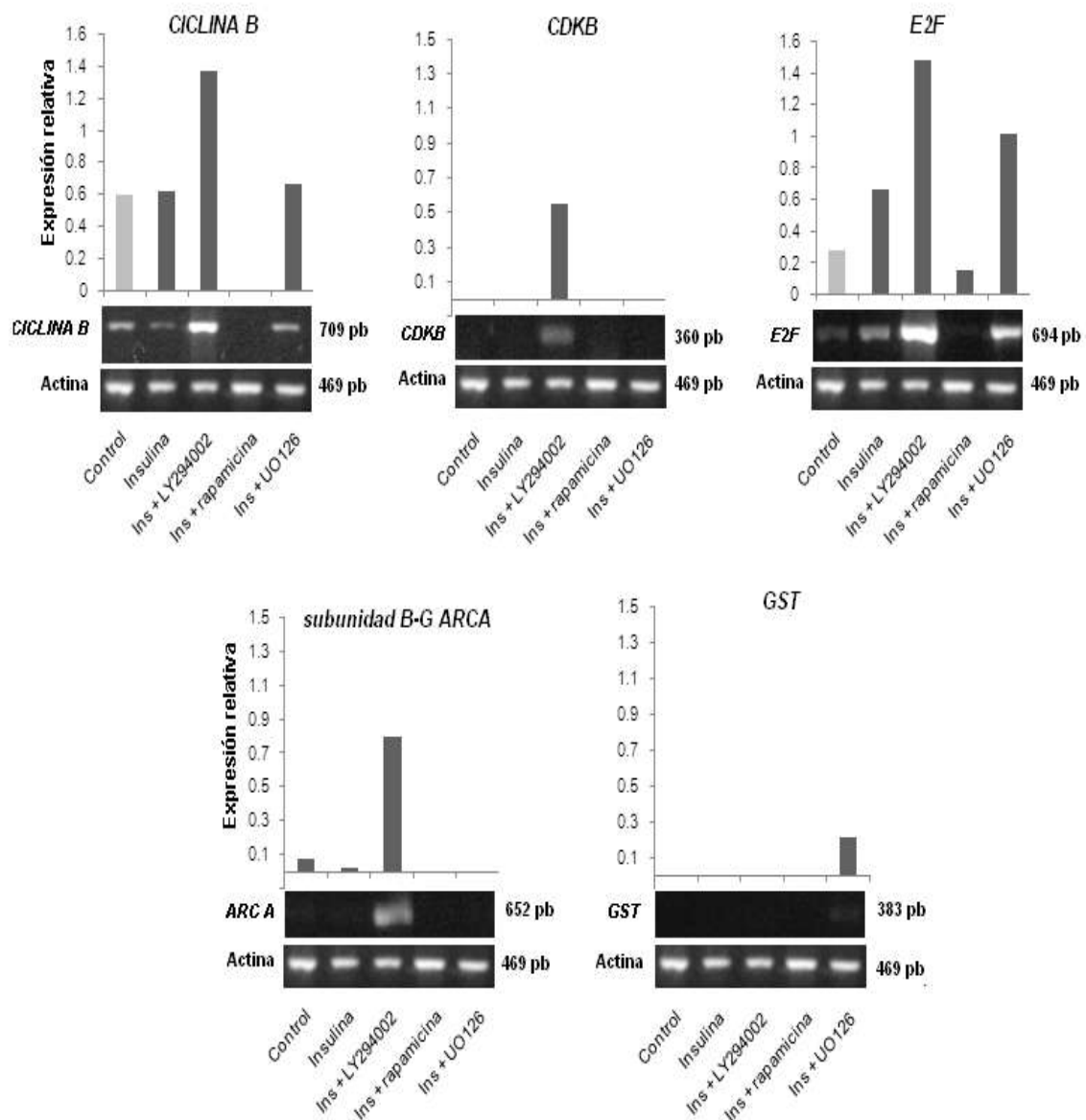


Figura 35. Efecto de la insulina e inhibidores de algunos componentes de las vías PI3K-TOR y MAPK sobre la expresión de genes reguladores del ciclo celular en cultivos NT-1 parcialmente sincronizados. Los cultivos se suplementaron con 1.23 nM de insulina y los inhibidores 10 μ M LY294002, 10 nM rapamicina y 10 μ M UO126. Se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F*, subunidad β -G *ARCA*, *GST* y *ACTINA* como control de carga. Las fotografías mostradas representan el análisis de los productos de amplificación de cada gen en gel de agarosa 1%.

Los resultados de los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados sugieren que las células permanecen en la fase G1 del ciclo celular y que la insulina induce la proliferación a través de la vía PI3K-TOR y la expresión de E2F.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1. La insulina estimula la proliferación celular en cultivos NT-1

Las cinéticas de crecimiento de los cultivos NT-1 evaluadas por peso seco y VPC (Fig. 6) se asemejan a las descritas en los cultivos BY-2 (Matsuoka *et al.*, 2004). Cada parámetro evaluado (peso seco y VPC) presentó una curva de crecimiento con patrones diferentes entre sí, lo cual se ha observado en los cultivos BY-2 y se ha atribuido a las variaciones entre la biomasa y el contenido de agua (Gould, 1984). Los resultados donde se observó que 1.23 nM de insulina estimulaba el crecimiento evaluado por peso seco (Fig. 7A) sugieren que la hormona participa en la proliferación celular. Después de un proceso de división las células tienden a elongarse (Conlon and Raff, 1999), hecho que correlaciona con un incremento en VPC (Fig. 7B) a 1.23 nM de insulina. En cuanto al VPC, el proceso de expansión celular es complejo y puede ocurrir de forma independiente a la división celular (Perrot-Rechenmann, 2010). Debido a que se ha reportado una correlación entre el aumento de biomasa con proliferación en cultivos BY-2 (Alvarez *et al.*, 1994) y que los cultivos NT-1 suplementados con 0.123, 12.3 y 61.5 nM solamente presentaron la tendencia a aumentar el VPC, se considera que estos últimos únicamente aumentan en volumen por una entrada de agua a las células. Por lo antes mencionado, 12.3 nM de insulina fue la concentración elegida para promover el crecimiento en los cultivos NT-1, debido a que incrementó tanto el peso seco como el VPC. De las diferentes concentraciones de insulina ensayadas, la óptima que estimuló el crecimiento proliferativo en cultivos NT-1 fue de 1.23 nM, donde se presentaron células pequeñas (Fig. 8). Como se mencionó, las células de tabaco BY-2 presentan poblaciones de células pequeñas en la fase log, que corresponde a la fase de división celular (Matsuoka *et al.*, 2004), por lo que los resultados antes mencionados sugieren que los cultivos NT-1 tratados con 1.23 nM se encuentran en división activa. En plantas superiores como el maíz, esta misma concentración aceleró la germinación y la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999) lo que indica que las plantas son capaces de responder a 1.23 nM de insulina.

4.2. Activación por insulina de las vías PI3K y MAPK en los cultivos NT-1

La insulina en mamíferos activa las rutas PI3K-TOR y MAPK en diferentes procesos metabólicos (Saltiel y Kahn, 2001), en los cultivos NT-1 dicha hormona promovió el crecimiento evaluado por peso seco y VPC (Fig. 11). La observación de que los inhibidores LY294002, rapamicina y UO126 disminuyeron el IM (Fig. 12) de forma similar que el peso seco y VPC (Fig. 11) sugiere la participación de las vías PI3K-TOR y MAPK durante la proliferación estimulada con insulina. En relación a la regulación de la vía MAPK sobre la proliferación de las células BY-2, se ha reportado que lo hace específicamente en la pre citocinesis (Ma and Yu, 2010), por lo que el efecto de la insulina sobre la proliferación a través de la vía MAPK podría llevarse a cabo durante la mitosis en cultivos NT-1. Además se incrementó la expresión de CDKB

y la disminución de la *subunidad* β -G ARCA que actúa como regulador negativo de la proliferación (Fig. 19) (Ullah *et al.*, 2003). En relación a *CDKB* su expresión correlaciona con su actividad regulando la transición G2/M del ciclo celular (Sorrell *et al.*, 2001) y esto podría estar ocurriendo en los cultivos NT-1 estimulados con insulina. No obstante que ambos inhibidores actúan sobre la ruta de señalización PI3K-TOR (Fig. 1); la sensibilidad de los cultivos NT-1 a LY294002 y a rapamicina fue diferente, siendo más susceptibles al primero. Lo anterior se asemeja al comportamiento de las células tumorales de mamíferos, donde se ha evidenciado una baja susceptibilidad a rapamicina (Thomson *et al.*, 2009; Peterson *et al.*, 2011). Existe una controversia del efecto de rapamicina en plantas, por un lado se ha reportado la resistencia de *Arabidopsis* a rapamicina debido a que no se forma el complejo rapamicina-FKBP12 (que inhibe a TOR) (Brunn *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha observado que las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (Crespo *et al.*, 2005) y plantas superiores como el maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999) son sensibles a rapamicina. Sin embargo, recientemente se ha reportado que *Arabidopsis* presenta sensibilidad a altas concentraciones de rapamicina (1000 nM) al inhibir la señalización de TOR-S6K. Con relación a esto, los autores sugieren que una cantidad variable de la proteína FKBP12 en las diferentes plantas, podría explicar la resistencia de alguna de ellas a la rapamicina (Xiong y Sheen, 2012). En mamíferos, se ha reportado que la inhibición de rapamicina es parcial sobre la actividad del complejo TORC1 ya que solamente altera la fosforilación de S6K pero no la de 4E-BP (ambos, blancos de la cinasa TOR) (Peterson *et al.*, 2011). Mientras que torin es un inhibidor competitivo por el sitio de unión del ATP a TOR y suprime la actividad de TOR en ambos complejos donde participa: TORC1 y TORC2 (Thoreen *et al.*, 2009). En el presente estudio dicho compuesto no se comportó como un inhibidor, sino como un inductor de la proliferación a partir del cuarto día de la cinética por peso seco (Figs. 15A y 16A) y también estimuló la expresión de genes reguladores del ciclo celular como: *CICLINA B*, *CDKB* y *E2F* (Fig. 18 y 19), lo cual correlacionó con el incremento del IM (Fig. 16). En mamíferos, se ha reportado que 250 nM de torin inhibe la síntesis de proteínas en un 50% y completamente la proliferación durante una cinética de crecimiento con células arrestadas en la transición G1/S del ciclo celular (Thoreen *et al.*, 2009). Por otra parte, líneas transgénicas de *Arabidopsis* de 14 días de edad que sobre expresan el factor viral TAV que promueve la traducción de RNAs virales, fueron incubadas con 200 nM de Torin durante 6 h, donde observaron una inhibición en la fosforilación de TOR y S6K1 (Schepetilnikov *et al.*, 2011). Interesantemente, torin provocó un cambio de la forma alargada de las células NT-1 a células redondas y pequeñas (Fig. 16C). Al tratar de explicar este comportamiento, se encontró que en células de mamíferos, los nutrientes a través del complejo TORC1 regulan la excentricidad del núcleo. Este último parámetro se refiere a la propiedad que presentan los objetos circulares de aumentar o disminuir la longitud de sus ejes. En células animales tratadas con 250 nM de torin cambiaron de forma redonda a alargada, mientras que en *Schizosaccharomyces pombe* el aumento de la excentricidad del núcleo fue regulado por el gen *NED1*, homólogo al gen *LIPINA-1* en mamíferos (Peterson *et al.*, 2011). Este último regula la adipogénesis, el metabolismo de lípidos y la sensibilidad a la insulina (Reue, 2007). Con los

antecedentes antes mencionados, podemos suponer que el cambio de las células NT-1 de alargadas a redondas (Fig. 11C) por efecto de Torin, podría deberse a un mecanismo regulado por un gen homólogo a *LIPINA-1* en plantas. Como hemos observado anteriormente, el efecto de 150 y 250 nM de Torin es ambiguo, debido a que inhibe el crecimiento a los cuatro días y posteriormente lo incrementa. Por otra parte, observamos que el LY294002 incrementó la expresión de diferentes genes como *CICLINA B*, *E2F* y, la subunidad β -G. Como se observó, el inhibidor LY294002 incrementó la expresión de *CICLINA B*, *E2F* y la subunidad β -G ARC A, en relación a este efecto, en los cultivos NT-1 con exceso de nutrientes se reportó un incremento de la expresión de *CDKB* en presencia de LY294002, debido tal vez a un efecto compensatorio por la inhibición de PI3K (Peña-Correa 2010), lo cual no fue observado en el presente estudio. Lo anterior sugiere que el estatus nutricional de las células es determinante para las respuestas celulares y se ha descrito en células BY-2 que nutrientes como el fósforo o sacarosa (fuentes de carbono) pueden afectar procesos celulares como proliferación (Nagata, 2004). Por otra parte, LY294002 se ha utilizado ampliamente como inhibidor específico de la cinasa PI3K, sin embargo, en mamíferos se ha reportado que este compuesto estimula la expresión génica del factor de transcripción EGR-1, promoviendo así la expresión de genes pro apoptóticos de forma independiente a su efecto inhibitorio sobre PI3K (Yamaguchi *et al.*, 2006). En otro estudio en mamíferos se reportó de forma similar que LY294002 estimuló la expresión del gen *CHOP*, que codifica para un factor de transcripción de respuesta a estrés con actividad apoptótica en forma dosis dependiente (Hyoda *et al.*, 2006). Lo anterior podría explicar un mecanismo por el cual LY294002 induce la expresión genética, sin embargo, en los cultivos NT-1 los genes estimulados fueron reguladores del ciclo celular y no de la apoptosis y además dicha expresión no correlacionó con el crecimiento (Fig. 16). Una explicación para tal comportamiento podría ser a través de una regulación post transcripcional de los mensajeros, lo cual se llevaría a cabo por micro RNAs (miRNAs) que regulan negativamente la expresión genética de RNA mensajeros (mRNAs). En *Arabidopsis* se ha descrito que los miRNAs pueden coordinar la proliferación al antagonizar la expresión de factores de transcripción como *GROWTH-REGULATING FACTOR (GRF)* y ciclina B1 (Rodríguez *et al.*, 2010b). Finalmente observamos que la insulina activó la ruta PI3K-TOR al presentar un incremento en la fosforilación de S6, mientras que con los inhibidores rapamicina y Torin disminuyó dicha fosforilación (Fig. 20), por lo que el efecto de la insulina es dependiente de la activación de la cinasa TOR. En maíz se ha descrito que la insulina acelera la germinación e incrementa la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Los datos anteriores y los ensayos con LY294002 y rapamicina sugieren la activación de la vía PI3K-TOR por insulina en los cultivos NT-1. En cuanto a la ruta MAPK se observó que la fosforilación las cinasas MAPK3 y MAPK6 se afectó únicamente con el inhibidor UO126 y no con insulina (Fig. 22), tomando en cuenta la amplia convergencia que existe entre las MAPK (Komis *et al.*, 2011) se sugiere la participación de otra MAPK, que podría ser la MAPK4. Esta última está involucrada en la dinámica del citoesqueleto, al igual que MAPK3/6.

4.3. La insulina estimula la proliferación de los cultivos NT-1 de forma dependiente de la concentración de 2,4-D

El efecto de la insulina sobre la proliferación de los cultivos NT-1 requirió de la presencia de 2,4-D (0.9 μ M) en el medio (Fig. 22). En cultivos BY-2 las auxinas regulan tanto la proliferación como la elongación celular de forma dependiente de la concentración. Estos cultivos son un excelente modelo para estudiar el crecimiento dependiente de auxina, ya que la auxina sintética 2,4-D estimula la división y a concentraciones limitantes induce la elongación (Nagata *et al.*, 2004). En los cultivos suplementados con 0.225 μ M de auxina con escasa actividad mitótica, la insulina incrementó la proliferación (Fig. 27) y la presencia de una mayor cantidad de células pequeñas (Fig. 27B) a través de la posible participación de la vía MAPK (Fig. 29). En la línea celular BY-2 se ha involucrado a la vía MAPK con la progresión del ciclo celular, específicamente en la formación del fragmoplasto durante la pre citocinesis (Ma and Yu, 2010). La insulina también estimuló la expresión de genes reguladores directos del ciclo celular como *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F* e indirectos como la subunidad β -G *ARC A* y *GST* (Fig. 31). La expresión de *CICLINA B* y *CDKB* se presenta en la transición G2/M (Ito *et al.*, 2001; Sorrell *et al.*, 2001), *E2F* se expresa en G1/S (Magyar *et al.*, 2005) y *PAR B* es un gen de respuesta temprana a auxina presente en la fase S del ciclo celular (Takahashi and Nagata, 1992). Los resultados anteriores sugieren que los cultivos con escasa actividad mitótica y en presencia de la insulina restablecen la proliferación estimulando la progresión del ciclo celular.

4.4. Activación diferencial de las vías PI3K-TOR y MAPK por efecto de la insulina en los cultivos NT-1 parcialmente sincronizados

Este tipo de cultivos parcialmente sincronizados presentaron diferencias importantes respecto a los cultivos asincrónicos como: el acortamiento de la fase lag (Fig. 26) y un mayor índice mitótico (Fig. 33). Se ha reportado que cultivos BY-2 bajo estas condiciones, se presenta una proliferación acelerada después de la re-adición de auxinas al medio (Nagata, 2003). A diferencia de los cultivos asincrónicos, donde UO126 inhibió en la misma proporción el crecimiento que el LY294002 (Figs. 32E y 32F), los cultivos semi sincronizados fueron parcialmente inhibidos. En cultivos BY-2 se ha descrito una activación de MAPK dependiente de auxina en cultivos privados de esta durante los primeros 15 minutos (Mizoguchi *et al.*, 1994), probablemente la escasa activación de la vía MAPK en los cultivos NT-1 se deba a que fue evaluada al día seis de la cinética de crecimiento. En mamíferos ambas rutas, PI3K-TOR y MAPK son reguladas por insulina de forma diferencial; durante la hiperinsulinemia la ruta PI3K está bloqueada por un factor de transcripción EGR-1 a través de la fosfatasa PTEN y se presenta una sobre activación de MAPK provocando con ello resistencia a la insulina, a diferencia de la activación preferente de PI3K por insulina sobre MAPK (Yu *et al.*, 2011). Lo anterior indica que ambas cascadas pueden ser encendidas en forma alterna bajo el estímulo de la insulina, tanto en animales como en plantas. Por otra parte, la insulina estimuló la expresión de *E2F* (Fig. 35). La sobre expresión del factor E2F en cultivos BY-2 privados de auxina promueve la proliferación celular (Magyar *et al.*,

2005) y un efecto similar se observó en este sistema con un incremento del transcrito por la insulina. De forma similar que el sistema asincrónico, LY294002 incrementó la expresión de *CICLINA B*, *E2F CDKB* y *ARC A*. La expresión de *CDKB* por LY294002 coincide con lo reportado en nuestro grupo de trabajo en cultivos NT-1 con exceso de nutrientes, y que se atribuyó a un efecto compensatorio a la inhibición de PI3K (Peña-Correa, 2010). En los cultivos parcialmente sincronizados la insulina estimuló la proliferación celular a través de la vía PI3K-TOR y la expresión de E2F, además estos datos sugieren respuestas diferenciales de los cultivos NT-1 dependientes de auxinas.

CONCLUSIONES

La insulina estimula la proliferación celular en cultivos NT-1 en suspensión a través de las cascadas de señalización PI3K-TOR y MAPK. Ambas cascadas son encendidas por insulina en los cultivos asincrónicos y principalmente la vía PI3K-TOR en los cultivos parcialmente sincronizados. Además la insulina regula la expresión de genes reguladores de la proliferación como *CICLINA B*, *CDKB*, *E2F*, *GST* y la subunidad β -G *ARC A* de forma dependiente de la concentración de 2,4-D.

PERSPECTIVAS

- a) Analizar la fosforilación de MAPK4 en cultivos NT-1 asincrónicos y semi-sincronizados suplementados con insulina.
- b) Evaluar la fosforilación de la proteína ribosomal S6 en cultivos suplementados con 0.225 μ M de 2,4-D e insulina, así como evaluar la expresión del gen ABP1.
- c) Evaluar el crecimiento de los cultivos con 0.225 μ M de 2,4-D con insulina y los inhibidores LY294002, rapamicina, UO126, Torin y wortmanina
- d) Evaluar el crecimiento de los cultivos NT-1 con insulina y el inhibidor wortmanina.
- e) Caracterizar el efecto de LY294002 y Torin durante la proliferación y la expresión de genes reguladores del ciclo celular

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., Theologis, A., 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol* 111, 9-17.
- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C., Grissem, W., 1997. RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* 17, 5077-5086.
- Ahn, C.S., Han, J.A., Lee, H.S., Lee, S., Pai, H.S., 2011. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *Plant Cell* 23, 185-209.
- Alberts, B.J., A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, Keith;Walter, Peter (Ed), 2007. *Molecular Biology of the Cell*.
- Alvarez, R.C., Nissen, S.J., Ernst, S.G., 1994. Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco. *Plant Science* 103, 73-79.
- An, G., 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 79, 568-570.
- Anastasiou, E., Kenz, S., Gerstung, M., MacLean, D., Timmer, J., Fleck, C., Lenhard, M., 2007. Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Dev Cell* 13, 843-856.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., Machida, Y., 2004. Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem* 279, 32979-32988.
- Balague, C., Latche, A., Fallot, J., Pech, J.C., 1982. Some Physiological Changes Occurring during the Senescence of Auxin-Deprived Pear Cells in Culture. *Plant Physiol* 69, 1339-1343.
- Beckers, G.J., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., Conrath, U., 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 944-953.
- Beltrán-Peña, E., 1997. Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, DF.
- Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortiz-López, A., Dinkova, T.D., De Jiménez, E.S., 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiologia Plantarum* 115, 291-297.
- Best, C.S., MA, 1923. Possible sources of insulin. . *Metabol. Res.* 3, 177-179
- Bishopp, A., Mahonen, A.P., Helariutta, Y., 2006. Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133, 1857-1869.
- Boruc, J., Mylle, E., Duda, M., De Clercq, R., Rombauts, S., Geelen, D., Hilson, P., Inze, D., Van Damme, D., Russinova, E., 2010. Systematic localization of the *Arabidopsis* core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiol* 152, 553-565.
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G.T., Magyar, Z., Torres Acosta, J.A., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inze, D., De Veylder, L., 2004. The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2683-2692.
- Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., Jr., Abraham, R.T., 1996. Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J* 15, 5256-5267.
- Buchanan, B.G., W; Jones, RL 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol, U.S.A. , pp. 528 -565.
- Buentello Volante, B., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., Aguilar Caballero, R., Ponce-Valadez, M., Sánchez de Jiménez, E., Pérez-Flores, L., 2010. Apparent cross-talk of two signaling pathways that regulate *Zea mays* coleoptile growth. *Phyton (Buenos Aires)* 79, 101-108.

Bush, S.M., Krysan, P.J., 2007. Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58, 2181-2191.

Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F., Roth, J., 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J Biol Chem* 262, 6238-6247.

Collip, J., 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. *J. Biol. Chem.* 56, 513-543.

Conlon, I., Raff, M., 1999. Size control in animal development. *Cell* 96, 235-244.

Cosgrove, D.J., 1996. Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bioessays* 18, 533-540.

Crespo, J.L., Diaz-Troya, S., Florencio, F.J., 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 139, 1736-1749.

Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., Jones, A.M., 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev* 15, 902-911.

Chen, X., Resh, M.D., 2001. Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem* 276, 34617-34623.

Chiri, S., De Nadai, C., Ciapa, B., 1998. Evidence for MAP kinase activation during mitotic division. *J Cell Sci* 111, 2519-2527.

Cho, H.T., Cosgrove, D.J., 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9783-9788.

De Veylder, L., Beeckman, T., Inze, D., 2007. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 655-665.

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C., 2007. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* 8, 864-870.

Dewitte, W., Murray, J.A., 2003. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54, 235-264.

Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jurgens, G., Estelle, M., 2005. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* 9, 109-119.

Dinneny, J.R., Yadegari, R., Fischer, R.L., Yanofsky, M.F., Weigel, D., 2004. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* 131, 1101-1110.

Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, V.K., Laux, T., Fletcher, J.C., Lenhard, M., 2006. The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. *Curr Biol* 16, 272-279.

Ellis, M.M., Eyster, W.H., 1923. Some Effects of Insulin and Glucokinin on Maize Seedlings. *Science* 58, 541-542.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M., 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273, 18623-18632.

Fierros -Romero, G.C.P., R; Mellado Rojas, M E; Beltrán Peña, EM, 2010. Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Biológicas* 12, 82 – 89.

Friml, J., Wisniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., Palme, K., 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415, 806-809.

Ganguly, A., Lee, S.H., Cho, M., Lee, O.R., Yoo, H., Cho, H.T., 2010. Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in Arabidopsis root hair cells. *Plant Physiol* 153, 1046-1061.

Garcia Flores, C., Aguilar, R., Reyes de la Cruz, H., Albores, M., Sanchez de Jimenez, E., 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem J* 358, 95-100.

Geelen, D.N., Inze, D.G., 2001. A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol* 127, 1375-1379.

- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15, 807-826.
- Goodman, D.B., Davis, W.L., 1993. Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 440-446.
- Gould, A., 1984. Control of the cell cycle in cultured plant cells. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1, 315-344.
- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., Kaelin, W.G., Jr., 1996. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8962-8967.
- Granger, C.L.C., R J 2000. Expression of GFP-MAP4 reporter gene in a stably transformed tobacco cell line reveals dynamics of microtubule reorganization. *Planta* 210, 502-509
- Gray, W.M., 2004. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biol* 2, e311.
- Gutierrez, C., 2005. Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat Cell Biol* 7, 535-541.
- Gutierrez, C., 2009. The Arabidopsis cell division cycle. *Arabidopsis Book* 7, 20.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., del Pozo, J.C., 2002. G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol* 5, 480-486.
- Hagen, G., Guilfoyle, T., 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49, 373-385.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., Rathjen, J.P., 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12217-12222.
- Hong, Z., Verma, D.P., 1994. A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9617-9621.
- Horiguchi, G., Kim, G.T., Tsukaya, H., 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 43, 68-78.
- Hu, Y., Poh, H.M., Chua, N.H., 2006. The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* 47, 1-9.
- Hyoda, K., Hosoi, T., Horie, N., Okuma, Y., Ozawa, K., Nomura, Y., 2006. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 286-290.
- Iantcheva, A., Slavov, S., Prinsen, E., Vlahova, M., van Iantcheva, H., Onckelen, H.v., Atanassov, A., 2005. Embryo induction and regeneration from root explants of *Medicago truncatula* after osmotic pre-treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81, 37-43.
- Imhoff, V., Muller, P., Guern, J., Delbarre, A., 2000. Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 210, 580-588.
- Inze, D., De Veylder, L., 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40, 77-105.
- Ishida, S., Takahashi, Y., Nagata, T., 1993. Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11152-11156.
- Ishida, S., Takahashi, Y., Nagata, T., 1996. The mode of expression and promoter analysis of the *arcA* gene, an auxin-regulated gene in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 37, 439-448.
- Ito, M., 2000. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol* 43, 677-690.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., Watanabe, A., 2001. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* 13, 1891-1905.

Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., Watanabe, A., 1998. A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* 10, 331-341.

John, F., Roffler, S., Wicker, T., Ringli, C., 2011. Plant TOR signaling components. *Plant Signal Behav* 6, 11.

Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., Fedoroff, N.V., 2005. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17, 957-970.

Juárez -Domínguez, A.S.-M., R; Mellado -Rojas, ME; Beltrán -Peña, EM, 2010. Insulina estimula el crecimiento de Arabidopsis thaliana a través de la cinasa MAPK3. *Biológicas* 12, 14-19.

Jung, J.Y., Kim, Y.W., Kwak, J.M., Hwang, J.U., Young, J., Schroeder, J.I., Hwang, I., Lee, Y., 2002. Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell* 14, 2399-2412.

Kant, S., Rothstein, S., 2009. Auxin-responsive SAUR39 gene modulates auxin level in rice. *Plant Signal Behav* 4, 1174-1175.

Karp, G. (Ed), 2005. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill – Interamericana, México, D. F. .

Kim, G.T., Shoda, K., Tsuge, T., Cho, K.H., Uchimiya, H., Yokoyama, R., Nishitani, K., Tsukaya, H., 2002. The ANGUSTIFOLIA gene of Arabidopsis, a plant CtBP gene, regulates leaf-cell expansion, the arrangement of cortical microtubules in leaf cells and expression of a gene involved in cell-wall formation. *EMBO J* 21, 1267-1279.

Kim, G.T., Tsukaya, H., Saito, Y., Uchimiya, H., 1999. Changes in the shapes of leaves and flowers upon overexpression of cytochrome P450 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9433-9437.

Kim, G.T., Tsukaya, H., Uchimiya, H., 1998. The ROTUNDIFOLIA3 gene of Arabidopsis thaliana encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Genes Dev* 12, 2381-2391.

Kim, J.H., Kende, H., 2004. A transcriptional coactivator, AtGIF1, is involved in regulating leaf growth and morphology in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13374-13379.

Kitsios, G., Alexiou, K.G., Bush, M., Shaw, P., Doonan, J.H., 2008. A cyclin-dependent protein kinase, CDKC2, colocalizes with and modulates the distribution of spliceosomal components in Arabidopsis. *Plant J* 54, 220-235.

Komis, G., Illes, P., Beck, M., Samaj, J., 2011. Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 14, 650-657.

Koona, S.K., S; Sridhar, GR; Rao, SB; Apparao, A 2010. Plant insulin: An in silico approach. *Intl J DiabetesDev Countries* 30, 192-193

Kost, B., Spielhofer, P., Chua, N.H., 1998. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J* 16, 393-401.

Kwon, H.-K., Choi, Y.-E., Wang, M.-H., 2011. Overexpression of NlgCycB Isolated from Interspecific Hybrid of N. langsdorffii N. glauca Alters Root Growth and Root Hair Development. *Journal of Plant Growth Regulation* 30, 367-377.

Lee, Y., Bak, G., Choi, Y., Chuang, W.I., Cho, H.T., 2008. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol* 147, 624-635.

Leshem, Y., Seri, L., Levine, A., 2007. Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* 51, 185-197.

Li, Y., Zheng, L., Corke, F., Smith, C., Bevan, M.W., 2008. Control of final seed and organ size by the DA1 gene family in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 22, 1331-1336.

Link, B.M., Cosgrove, D.J., 1998. Acid-growth response and alpha-expansins in suspension cultures of bright yellow 2 tobacco. *Plant Physiol* 118, 907-916.

Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G., 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 17, 1090-1104.

Loyola Vargas, V.V.F., F., 2006. *Plant Cell Culture Protocols*. In: Walker, J.M. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. Second edition. U.S.A. 393: 51 – 58.

, U.S.A., pp. 51 – 58.

Lu, H., Wan, Q., Wang, H., Na, X., Wang, X., Bi, Y., 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunctions are early events in narciclasine-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Physiol Plant* 14, 1399-3054.

Lui, H., Wang, H., Delong, C., Fowke, L.C., Crosby, W.L., Fobert, P.R., 2000. The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J* 21, 379-385.

Ma, Z., Yu, G., 2010. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) is required for cytokinesis and progression of cell cycle in tobacco BY-2 cells. *J Plant Physiol* 167, 216-221.

Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D., Bogre, L., 2005. The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17, 2527-2541.

Manning, B.D., Cantley, L.C., 2003. United at last: the tuberous sclerosis complex gene products connect the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway to mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling. *Biochem Soc Trans* 31, 573-578.

Martinez-Garcia, J.F., Monte, E., Quail, P.H., 1999. A simple, rapid and quantitative method for preparing Arabidopsis protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J* 20, 251-257.

Matsuoka, K., Demura, T., Galis, I., Horiguchi, T., Sasaki, M., Tashiro, G., 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., Robaglia, C., 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6422-6427.

Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W., Murray, J.A., 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546-566.

Meyuhas, O., 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267, 6321-6330.

Miyazawa, Y., Sakai, A., Miyagishima, S., Takano, H., Kawano, S., Kuroiwa, T., 1999. Auxin and cytokinin have opposite effects on amyloplast development and the expression of starch synthesis genes in cultured bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* 121, 461-469.

Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H., Shinozaki, K., 1994. Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in Arabidopsis thaliana and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J* 5, 111-122.

Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., Shinozaki, K., 1996. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 765-769.

Mizukami, Y., Fischer, R.L., 2000. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 942-947.

Mlejnek, P., Prochazka, S., 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215, 158-166.

Mockaitis, K., Estelle, M., 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 55-80.

Morgan, D. (Ed), 2007. The cell cycle: principles and control. New Science Press Ltd, Sinauer Associates, Inc. Publishers and Oxford University Press., U. K.

Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrasek, J., Skupa, P., Chand, S., Benkova, E., Zazimalova, E., Friml, J., 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135, 3345-3354.

Nagata, T. (Ed), 2003. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer.

Nagata, T., 2004. When I encountered tobacco BY-2 cells! . In: Nagata, T.H., S; Inzé, D (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Springer, New York, pp. 1-5.

Nagata, T., Kumagai, F., 1999. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Methods Cell Sci* 21, 123-127.

Nagata, T., Sakamoto, K., Shimizu, T., 2004. Tobacco by-2 cells: The present and beyond. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40, 163-166.

Nagata, T.N., Y; Hasezawa, S 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132, 1 – 30.

Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H., 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 10, 339-346.

Nath, U., Crawford, B.C., Carpenter, R., Coen, E., 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299, 1404-1407.

Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y., Machida, Y., 2002. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109, 87-99.

Ohno, C.K., Reddy, G.V., Heisler, M.G., Meyerowitz, E.M., 2004. The Arabidopsis JAGGED gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development. *Development* 131, 1111-1122.

Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., Theologis, A., 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* 43, 29-46.

Park, D.W., Kim, J.R., Kim, S.Y., Sonn, J.K., Bang, O.S., Kang, S.S., Kim, J.H., Baek, S.H., 2003. Akt as a mediator of secretory phospholipase A2 receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 170, 2093-2099.

Pascual-Morales, E., 2011. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los pelos radicales en *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán.

Peña-Correa, R., 2010. Crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 por insulina a través de la ruta de señalización PI3K/TOR. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH, Morelia.

Perrot-Rechenmann, C., 2010. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 7.

Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., Sabatini, D.M., 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408-420.

Petrasek, J., Elckner, M., Morris, D.A., Zazimalova, E., 2002. Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta* 216, 302-308.

Pickett, F.B., Wilson, A.K., Estelle, M., 1990. The aux1 Mutation of Arabidopsis Confers Both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol* 94, 1462-1466.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, D., Mironov, V., 2001. A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* 276, 36354-36360.

- Raghavan, V., 2004. Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Am J Bot* 91, 1743-1756.
- Ramirez-Parra, E., Frundt, C., Gutierrez, C., 2003. A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 33, 801-811.
- Reue, K., 2007. The role of lipin 1 in adipogenesis and lipid metabolism. *Novartis Found Symp* 286, 58-68.
- Robledo-Paz, A.V.-S., M N; Adame-Álvarez, R M; Jofre-Garfias, A E, 2006. Callus and suspension culture induction, maintenance and characterization. In: Loyola-Vargas, V.M.V.F., F (Ed.), *Plant Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc, USA, pp. 59–86.
- Rodriguez-Lopez, C.D., Rodriguez-Romero, A., Aguilar, R., de Jimenez, E.S., 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Pept Lett* 18, 84-91.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., Mundy, J., 2010a. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61, 621-649.
- Rodriguez, R.E., Mecchia, M.A., Debernardi, J.M., Schommer, C., Weigel, D., Palatnik, J.F., 2010b. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* 137, 103-112.
- Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D., Bergounioux, C., 2002. AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce *Arabidopsis* leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* 266, 995-1003.
- Ruiz, L.F., Higareda, A.E., Pardo, M.A., 2010. Sincronización de Células de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) NT-1. *Información tecnológica* 21, 3-11.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Samaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögge, L., Baluska, F., Hirt, H., 2002. Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* 21, 3296-3306.
- Sánchez de Jiménez, E., Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A., 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiologia Plantarum* 105, 148-154.
- Santos, V., 2003. Presença de insulina em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca. Monograph, Universidade Estadual Norte Fluminense Campos dos Goytacazes. R.J.
- .
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., Ryabova, L.A., 2011. Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* 30, 1343-1356.
- Scherer, G.F., 2002. Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction. *Plant Mol Biol* 49, 357-372.
- Scherer, G.F., Zahn, M., Callis, J., Jones, A.M., 2007. A role for phospholipase A in auxin-regulated gene expression. *FEBS Lett* 581, 4205-4211.
- Schruff, M.C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., Scott, R.J., 2006. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133, 251-261.
- Shibaoka, H., 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45, 527-544

Shimizu-Sato, S., Ike, Y., Mori, H., 2008. PsRBR1 encodes a pea retinoblastoma-related protein that is phosphorylated in axillary buds during dormancy-to-growth transition. *Plant Mol Biol* 66, 125-135.

Simon, S., Petrasek, J., 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci* 180, 454-460.

Smith, B.A., Reider, M.L., Fletcher, J.S., 1982. Relationship between Vital Staining and Subculture Growth during the Senescence of Plant Tissue Cultures. *Plant Physiol* 70, 1228-1230.

Sorrell, D.A., Menges, M., Healy, J.M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J.H., Sekine, M., Murray, J.A., 2001. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol* 126, 1214-1223.

Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., Machida, Y., 2003. NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev* 17, 1055-1067.

Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F.F., Jurgens, G., Mayer, U., 2002. The Arabidopsis HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr Biol* 12, 153-158.

Tais, L.Z., E (Ed), 2006. *Fisiología Vegetal*. Castello de la Plana.

Takahashi, Y., Nagata, T., 1992. parB: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 56-59.

Takahashi, Y., Soyano, T., Sasabe, M., Machida, Y., 2004. A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J Biochem* 136, 127-132.

Teale, W.D., Paponov, I.A., Palme, K., 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 847-859.

Thomson, A.W., Turnquist, H.R., Raimondi, G., 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 9, 324-337.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., Gray, N.S., 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284, 8023-8032.

Tomas, A., Paponov, I., Perrot-Rechenmann, C., 2010. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends Plant Sci* 15, 436-446.

Tomas, A., Perrot-Rechenmann, C., 2010. Recent progress in auxin biology. *C R Biol* 333, 297-306.

Tsuge, T., Tsukaya, H., Uchimiya, H., 1996. Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development* 122, 1589-1600.

Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., Nagy, F., 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 1527-1535.

Ulrich, T.H., Key, J.L., 1988. Comparative analysis of polyadenylated RNA complexity in soybean hypocotyl tissue and cultured suspension cells. *Plant Physiol* 86, 482-490.

Ullah, H., Chen, J.G., Temple, B., Boyes, D.C., Alonso, J.M., Davis, K.R., Ecker, J.R., Jones, A.M., 2003. The beta-subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* 15, 393-409.

van der Fits, L., Deakin, E.A., Hoge, J.H., Memelink, J., 2000. The ternary transformation system: constitutive virG on a compatible plasmid dramatically increases *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 43, 495-502.

Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., Inze, D., 2002. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 903-916.

Vezina, C., Kudelski, A., Sehgal, S.N., 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 28, 721-726.

Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., 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.

Wang, H., Liu, Y., Bruffett, K., Lee, J., Hause, G., Walker, J.C., Zhang, S., 2008. Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in Arabidopsis ovule development. *Plant Cell* 20, 602-613.

Welters, P., Takegawa, K., Emr, S.D., 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 U S A* 91, 11398-11402.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L., 1999. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.

Winicur, Z.M., Zhang, G.F., Staehelin, L.A., 1998. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* 117, 501-513.

Wu, Y., Meeley, R.B., Cosgrove, D.J., 2001. Analysis and expression of the alpha-expansin and beta-expansin gene families in maize. *Plant Physiol* 126, 222-232.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., Gutierrez, C., 1996. Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J* 15, 4900-4908.

Xiong, Y., Sheen, J., 2012. Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants. *J Biol Chem* 287, 2836-2842.

Yamaguchi, K., Lee, S.H., Kim, J.S., Wimalasena, J., Kitajima, S., Baek, S.J., 2006. Activating transcription factor 3 and early growth response 1 are the novel targets of LY294002 in a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. *Cancer Res* 66, 2376-2384.

Yu, X., Shen, N., Zhang, M.L., Pan, F.Y., Wang, C., Jia, W.P., Liu, C., Gao, Q., Gao, X., Xue, B., Li, C.J., 2011. Egr-1 decreases adipocyte insulin sensitivity by tilting PI3K/Akt and MAPK signal balance in mice. *EMBO J* 30, 3754-3765.

Zhu, J., Blenis, J., Yuan, J., 2008. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6584-6589.