



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

IIQB

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Inducción de la autofagia por insulina en cultivos de células de tabaco NT-1

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

PRESENTA

•BIOL. RICARDO SANTILLÁN MENDOZA•

ASESORA

D.C. ELDA MARÍA BELTRÁN PEÑA

COMITÉ TUTORAL

D.C. José López Bucio

D.C. Víctor Meza Carmen

D.C. Homero Reyes de la Cruz

D.C. Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán. Noviembre de 2013

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) beca No. 258550 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Dedicatoria

A Dios:

Por darme fuerza y esperanza en los momentos difíciles

A mi esposa y a mi hijo (remolinito):

Montserrat Torres Olaya gracias por estar a mi lado en los momentos difíciles, por entenderme y apoyarme en todas las decisiones

A mis padres:

Cipriano Santillán Herrera y Silvia Mendoza Rincón, por haberme dado la vida, por los consejos, valores y enseñanzas, por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado correctas e incorrectas, por creer en mí, ya que sin ustedes esto no habría sido posible, no existen palabras para agradecerles, ni forma de recompensarles todo lo que han hecho por mí, y aunque a veces no he sido el mejor de los hijos saben que los quiero mucho

A mi hermano:

Fernando Javier Santillán Mendoza, por todos los momentos que hemos compartido, las alegrías, tristezas, por su apoyo y especialmente por ser el mejor hermano

A toda mi familia:

Por siempre apoyarme incondicionalmente y proporcionarme grandes enseñanzas para la vida

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la D.C. Elda María Beltrán Peña, por el apoyo y la confianza que deposito en mí, por los consejos y el conocimiento que me ha proporcionado, así como la paciencia que me ha brindado durante todos estos años en su laboratorio.

A la D. C. María Elena Mellado Rojas, por su ayuda, consejos, comentarios y paciencia que me brindo para realizar este trabajo.

A mis sinodales:

D. C. José López Bucio

D. C. Víctor Meza Carmen

D. C. Homero Reyes de la Cruz

D. C. Rafael Salgado Garciglia.

Por las correcciones, los valiosos consejos, el tiempo que dedicaron y los comentarios que aportaron durante la revisión del presente trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Edgar, Natan, Liz y Bety, por hacer más agradable la estancia en el laboratorio, así por como por sus comentarios y ayuda.

A mis amigos y compañeros de la maestría por los momentos divertidos que hemos compartido, el apoyo, los consejos, la compañía, por permitirme ser su amigo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I) ANTECEDENTES.....	2
1) Autofagia.....	2
1.1) Autofagia en plantas.....	3
1.2) Factores que inducen la autofagia en las plantas.....	4
1.3) Mecanismos moleculares de la autofagia en plantas.....	5
1.4) Ejemplos de la autofagia en plantas.....	7
2) Insulina.....	9
2.1) Vías de transducción de señales activadas por la insulina.....	10
2.2) Cascada de señalización PI3K/TOR/S6K.....	11
2.3) Efecto de la insulina en plantas.....	14
3) Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	15
3.1) Especies reactivas de oxígeno (ERO) en plantas.....	16
3.2) Producción de intermediarios de las especies reactivas de oxígeno en plantas.....	16
3.3) NADPH oxidasas en plantas.....	18
3.4) Explosión oxidativa, ERO en interacción planta/microorganismo...	18
3.5) ERO y la transducción de señales.....	19
3.6) ERO y autofagia.....	20
3.7) Mecanismos reguladores de la autofagia activada por ERO en mamíferos.....	21
3.8) Regulación de la autofagia por ERO en plantas.....	23
3.9) Vía TOR-ATG1 en plantas.....	25
4) Línea celular NT-1 como modelo de estudio.....	27
II) JUSTIFICACIÓN.....	30

III) HIPÓTESIS.....	30
IV) OBJETIVOS.....	30
4.1) Objetivo general.....	30
4.2) Objetivos específicos.....	30
V) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
VI) MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1) Mantenimiento del cultivo celular NT-1.....	32
6.2) Determinación del volumen de paquete celular (VPC).....	32
6.2.1) Determinación del peso seco.....	32
6.3) Determinación de la muerte celular.....	33
6.4) Tratamientos de cultivos NT-1 en carencia de sacarosa y de auxinas.....	33
6.5) Tinción con MDC.....	33
6.5.1) Determinación del porcentaje de células en autofagia.....	34
6.5.2) Determinación de la actividad autofágica relativa.....	34
6.6) Cuantificación del peróxido de hidrógeno.....	34
6.7) Extracción del RNA.....	35
6.7.1) Reacciones de RT-PCR.....	35
6.8) Condiciones de amplificación.....	36
6.9) Análisis de datos.....	36
VII) RESULTADOS.....	37
7.1) Crecimiento de los cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa.....	37
7.1.1) Autofagia en cultivos de células NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa.....	38
7.1.2) Muerte celular de los cultivos de células NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa.....	40

7.2) Crecimiento de los cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	40
7.2.1) Autofagia en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	41
7.2.2) Producción de H ₂ O ₂ en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	44
7.2.3) Muerte celular en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	45
7.2.4) Expresión de los genes de autofagia <i>PI3K</i> y <i>ATG6</i> en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	46
7.2.5) Expresión de los genes de autofagia <i>ATG2</i> y <i>ATG9</i> en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	48
7.2.6) Expresión del gen de autofagia <i>ATG5</i> en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	50
7.2.7) Expresión de los genes de autofagia <i>ATG3</i> y <i>ATG8f</i> en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas.....	51
7.3) Autofagia en cultivos de células NT-1 suplementadas con insulina y en presencia de los inhibidores de las cinasas PI3K y TOR.....	53
7.3.1) Crecimiento de cultivos NT-1 suplementados con insulina y con los inhibidores de PI3K y TOR.....	55
7.3.2) Producción de H ₂ O ₂ en cultivos NT-1 suplementados con insulina y con los inhibidores de PI3K y TOR.....	56
7.3.3) Muerte celular de los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores de PI3K y TOR.....	57
VIII) DISCUSIÓN.....	58
IX) CONCLUSIONES.....	69
X) PERSPECTIVAS.....	70
XI) LITERATURA CITADA.....	71
ANEXO I Autofagia vegetal: mecanismo de reciclaje en eucariontes.....	86
ANEXO II Proteínas reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de autofagia en células vegetales.....	7
Figura 2. Cascadas de transducción de señales encendidas en respuesta a la insulina.....	11
Figura 3. Activación de la cascada PI3K-TOR por insulina.....	13
Figura 4. Regulación de la autofagia por ERO.....	22
Figura 5. Diferentes fuentes de ERO controlan la autofagia en plantas y algas.....	23
Figura 6. Modelo propuesto de la regulación de la autofagia por ERO en plantas y algas.....	26
Figura 7. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en carencia de sacarosa.....	37
Figura 8. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de sacarosa.....	39
Figura 9. Muerte celular de los cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de sacarosa.....	40
Figura 10. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en carencia de auxinas.....	41
Figura 11. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas.....	43
Figura 12. Producción de H ₂ O ₂ en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas.....	45
Figura 13. Muerte celular en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas.....	46
Figura 14. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de <i>PI3K</i> y <i>ATG6</i>	47
Figura 15. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de <i>ATG3</i> y <i>ATG9</i>	49
Figura 16. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de <i>ATG5</i>	51

Figura 17. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de <i>ATG3</i> y <i>ATG8f</i>	52
Figura 18. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR.....	54
Figura 19. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR.....	55
Figura 20. Producción de H ₂ O ₂ en cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR.....	56
Figura 21. Muerte celular de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR.....	57

RESUMEN

Como proceso catabólico durante el desarrollo o limitación nutricional, la autofagia permite a las células reciclar componentes intracelulares, incluyendo orgánulos. La maquinaria necesaria para la autofagia se encuentra conservada entre organismos eucariontes y permite el reciclamiento de nutrientes mediante el transporte de materiales del citoplasma hacia los lisosomas (animales) o vacuolas (levaduras y vegetales), manteniendo una homeostasis celular adecuada. Por otra parte, la insulina en metazoarios regula los niveles de glucosa en sangre y el crecimiento a través de la activación de dos vías de señalización: la PI3K/TOR/S6K y la MAPK. A pesar de que la insulina es una hormona ubicua en animales, las plantas como el frijol, maíz, tabaco y *Arabidopsis* también responden a dicha hormona, estimulando el desarrollo. En la vía PI3K/TOR/S6K, TOR activada, regula negativamente la autofagia, tanto en animales como en vegetales. Trabajos previos de nuestro laboratorio, mostraron que en cultivos de células de tabaco NT-1, la insulina estimula la proliferación celular en presencia de auxinas, y que la carencia de esta fitohormona promueve la formación de estructuras similares a autofagosomas. Con base en lo antes mencionado y debido a que no existen reportes específicos sobre el efecto de las auxinas o de la insulina sobre la autofagia, en el presente estudio se determinó si la disponibilidad de auxinas y/o la adición de insulina inducen la autofagia, así como establecer el posible mecanismo de la activación de la autofagia bajo dichas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron que la insulina y la carencia de auxinas en los cultivos NT-1 estimularon la autofagia por un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno y que la inducción de la autofagia por efecto de la insulina a través del H₂O₂ es independiente de la activación de TOR.

I) ANTECEDENTES

1) Autofagia

Los organismos eucariontes poseen la capacidad de adaptarse a los cambios ambientales a través de un ajuste en su metabolismo. Por ejemplo, en condiciones de baja disponibilidad de nutrimentos las macromoléculas son degradadas para producir los sustratos requeridos en la producción de energía. La autofagia es el mecanismo principal por el cual las células degradan las biomoléculas, sin embargo, la autofagia también puede eliminar orgánulos redundantes o dañados (Meijer, 2008).

El término “autofagia” deriva de las palabras griegas “phagy” que significa comer, y “auto”, uno mismo. La autofagia es un proceso evolutivamente conservado en eucariontes mediante el cual, la carga (moléculas u orgánulos) citoplasmática secuestrada dentro de vesículas de doble membrana se fusiona a los lisosomas para su degradación. Cuando la autofagia fue descubierta hace más de 40 años, era incierto el por qué la célula auto-digería sus propios componentes. La hipótesis más simple fue que era un mecanismo de eliminación de basura celular. Sin embargo, desde entonces hemos aprendido que este proceso de “auto-alimentación” no sólo elimina proteínas intracelulares mal plegadas o de larga vida, orgánulos dañados y microorganismos invasores, sino que también es una respuesta adaptativa para proporcionar nutrientes y energía durante la exposición a varios tipos de estreses. La autofagia se ha involucrado en la fisiopatología de humanos, como el cáncer, la neurodegeneración, la respuesta inmune, el desarrollo y el envejecimiento (Yang y Klionsky, 2010). Durante la autofagia, parte del citoplasma es secuestrado por estructuras de doble membrana llamados autofagosomas, cuyo origen aún no ha sido establecido por completo pero se piensa que derivan de regiones especializadas del retículo endoplasmático (Reggiori y Klionsky, 2005).

El proceso básico de autofagia está conservado entre eucariontes desde levaduras hasta animales y plantas. Varios tipos de autofagia que han sido descritos en una gran variedad de especies, incluyen la microautofagia (Mijaljica *et al.*, 2011), la macroautofagia (Yang y Klionsky, 2009), la autofagia mediada por chaperonas (Orenstein y Cuervo, 2010) y la

autofagia órgano específica (Reumann *et al.*, 2010). En plantas, ocurre tanto la microautofagia y la macroautofagia; la primera involucra la formación de una pequeña vesícula intravacuolar por invaginación del tonoplasto, llamada cuerpo autofágico, que engulle componentes citoplasmáticos; mientras que en la macroautofagia, los autofagosomas citoplasmáticos envuelven componentes citosólicos para su degradación (Bassham, 2007).

El conocimiento de la autofagia a nivel molecular, comenzó a finales de 1990, revolucionando con esto la capacidad de detectar y manipular genéticamente dicho proceso, lo que permitió el crecimiento en las investigaciones de este campo destacando la importancia de la autofagia en la salud. Aunque la autofagia fue inicialmente identificada en mamíferos, un progreso importante en el conocimiento de su regulación proviene del análisis genético de levaduras, en donde se han identificado más de 30 genes relacionados con autofagia (*ATG*). Dichos genes se dividen en cuatro grupos funcionales: a) el complejo de cinasas ATG1-ATG13, b) ATG9 y proteínas asociadas, c) el complejo formado por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y otras proteínas y d) dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Los estudios en levadura facilitaron la identificación de genes homólogos en plantas, requeridos para llevar a cabo la autofagia y proporcionaron una guía para la investigación de sus funciones moleculares (Yang y Klionsky, 2010).

1.1) Autofagia en plantas

Las plantas por su forma de vida sésil, se enfrentan a condiciones ambientales desfavorables tanto climáticas como a la carencia de nutrientes, de ahí que hayan desarrollado procesos sofisticados para su sobrevivencia. Siendo uno de ellos, la autofagia, que es un mecanismo de degradación de macromoléculas que recicla materiales celulares dañados o no requeridos, y permite a las plantas enfrentar condiciones de estrés o adecuarse a procesos de desarrollo como la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo. La mayor parte de la maquinaria requerida para la autofagia se encuentra conservada entre organismos eucariontes, y cuando se induce, los nutrientes son reciclados por los autofagosomas, lo que resulta en el mantenimiento de la homeostasis celular (Inoue *et al.*, 2006; Liu y Bassham, 2012).

Después de la inducción de la autofagia, el autofagosoma se forma alrededor del material que está destinado para degradación, y libera esta carga a la vacuola. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana de la vacuola y posteriormente, las hidrolasas vacuolares degradan la carga y la membrana interna del autofagosoma (Mitou *et al.*, 2009; ver Fig. 5.1 Capt 5. Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de Plantas, 2013). Hasta hace poco, el conocimiento sobre los aspectos moleculares de la autofagia vegetal era escaso, comparado con el de levaduras y mamíferos. No obstante, ahora se sabe que los cuatro grupos de genes involucrados en la autofagia antes mencionados se encuentran conservados en plantas. Además, la búsqueda en plantas de los genes participantes en la vía autofágica ha sido enfocada en *Arabidopsis thaliana*, donde se han aislado mutantes afectadas en homólogos de los genes de autofagia de levaduras. Las mutantes de estos genes en *Arabidopsis*, mostraron fenotipos defectuosos en el reciclamiento de nutrientes como: hipersensibilidad a privación de macronutrientes y senescencia prematura. Lo anterior sugiere que la autofagia en plantas es un componente importante en la vía de reciclamiento (Mitou *et al.*, 2009; ver Tabla 5.1 Capt 5. Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de Plantas, 2013).

Para el estudio de la autofagia en plantas se emplean varios marcadores, siendo los más comunes las construcciones genéticas que incluyen a los promotores de genes relacionados con la autofagia (*ATG*), fusionados a la secuencia de la proteína verde fluorescente (*GFP*); el colorante específico para autofagosomas, la monodansilcadaverina (*MDC*) y el inhibidor de proteasas de cisteína (*E-64c*), que impide la fusión de los autofagosomas con la vacuola, reteniéndolos en el citosol. En conjunto, el uso de tales marcadores, ha permitido la detección rápida de la autofagia en células vegetales por su especificidad en el marcaje y retención de los autofagosomas en el citoplasma (Takatsuka *et al.*, 2011; Liu y Bassham, 2012).

1.2) Factores que inducen la autofagia en plantas

El estrés abiótico más común que induce la autofagia es la deficiencia de nutrientes, debido a que dicho proceso es requerido para la movilización de moléculas, aunque también se ha involucrado al estrés oxidativo (Xiong *et al.*, 2007). Además, se ha determinado la participación de la autofagia en la tolerancia de las plantas a sequía y estrés salino, lo que la

implica en la remoción de proteínas y orgánulos dañados durante tales condiciones. Por otro lado, se ha reportado que la proteína inducida por ácido abscísico (AtTSPO), es degradada vía autofágica, lo que sugiere su participación en las respuestas al ácido abscísico (Liu *et al.*, 2009; Vanhee *et al.*, 2011).

Debido a que la privación de nutrientes (carbono y nitrógeno) puede activar la autofagia, esta condición ha sido usada para su estudio en plantas. Durante la privación de nutrientes, ocurre la formación de autofagosomas y la degradación de materiales citoplásmicos en los compartimientos líticos de cultivos de células vegetales. Mutaciones en genes de la familia *ATG* inducen la expresión de marcadores de senescencia, indicando que las condiciones limitantes de nutrientes aceleran la senescencia. En conjunto se sugiere que la autofagia sirve como un sistema regulador que facilita el suministro de nutrientes bajo condiciones de inanición (Rose *et al.*, 2006).

Puesto que la autofagia recicla materiales citoplásmicos, es comprensible que funcione durante la senescencia y la germinación, ejemplo de esto es el reciclamiento del nitrógeno, el cual se encuentra contenido en un 80% en los cloroplastos. Durante la senescencia las plantas reciclan el nitrógeno de las hojas viejas hacia los órganos en desarrollo (Guiboileau *et al.*, 2010). Otro ejemplo de la participación de la autofagia durante el desarrollo, es la germinación de las semillas, donde las plantas sintetizan grandes cantidades de proteínas y las conservan en vacuolas de almacenamiento. Después de la germinación, dichas proteínas son degradadas para aportar nutrientes durante el crecimiento de los nuevos órganos en formación (Ibl y Stoger, 2012).

1.3) Mecanismos moleculares de la autofagia en plantas

Estreses nutricionales, oxidativos y energéticos, inducen marcadamente la autofagia en la mayoría de los tipos celulares para mantener la sobrevivencia celular bajo dichas condiciones. El papel central de proteína TOR como regulador negativo de la autofagia en respuesta a los distintos estreses ha conducido al estudio del mecanismo mediante el cual la señalización por TOR suprime la autofagia de manera dependiente del estatus nutricional (Chang *et al.*, 2009). Dependiendo del estatus nutricional TOR regula la autofagia a través

del complejo ATG1-ATG13-ATG17. Bajo condiciones normales TOR se activa y fosforila a ATG13; esta proteína al ser hiperfosforilada presenta baja afinidad por ATG1 y ATG17. TOR es inactivada en condiciones de inanición o por tratamiento con su inhibidor (rapamicina), lo que induce la desfosforilación de ATG13, la cual, entonces adquiere una alta afinidad por ATG1 y ATG17. La actividad de cinasa de ATG1 es promovida después de su interacción con ATG13 y ATG17, lo que conduce a la inducción de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000).

Los componentes clave de esta vía reguladora de la autofagia se encuentran conservados en metazoarios y en plantas. Recientemente, se determinó en *Arabidopsis* la participación del complejo cinasa ATG1/ATG13 en la iniciación de la formación del autofagosoma en respuesta a la demanda de nutrientes (Suttangkakul *et al.*, 2011).

También, el complejo transmembranal ATG9/ATG2/ATG18 participa en la promoción de la expansión del fagóforo a partir del retículo endoplásmico (Xie y Klionsky, 2007). Mientras que el complejo PI3K (VPS34) es requerido durante la nucleación del autofagosoma y para la localización de la estructura pre-autofagosomal (PAS por sus siglas en inglés). Dicho complejo contiene además de PI3K a ATG6 (Beclina 1 en mamíferos) que regula la actividad de PI3K y por tanto, la producción de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), fosfolípido indispensable para la formación de los autofagosomas. El complejo de PI3K contiene a la proteína VPS15, cuya función permite la asociación de VPS34 a la membrana, aquí es donde ATG14 se conecta a PI3K. Finalmente, en el proceso de autofagia participan dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina: en el primero, ATG12, induce la expansión del fagoforo con ATG5, mientras que en el segundo, ATG8, decora la membrana del fagóforo con la proteína ATG8 unida al fosfolípido fosfatidil etanolamina (PE) (Yang y Klionsky, 2009; Suttangkakul *et al.*, 2011). En la figura 1 se ilustra el proceso de autofagia en células vegetales de forma detallada.

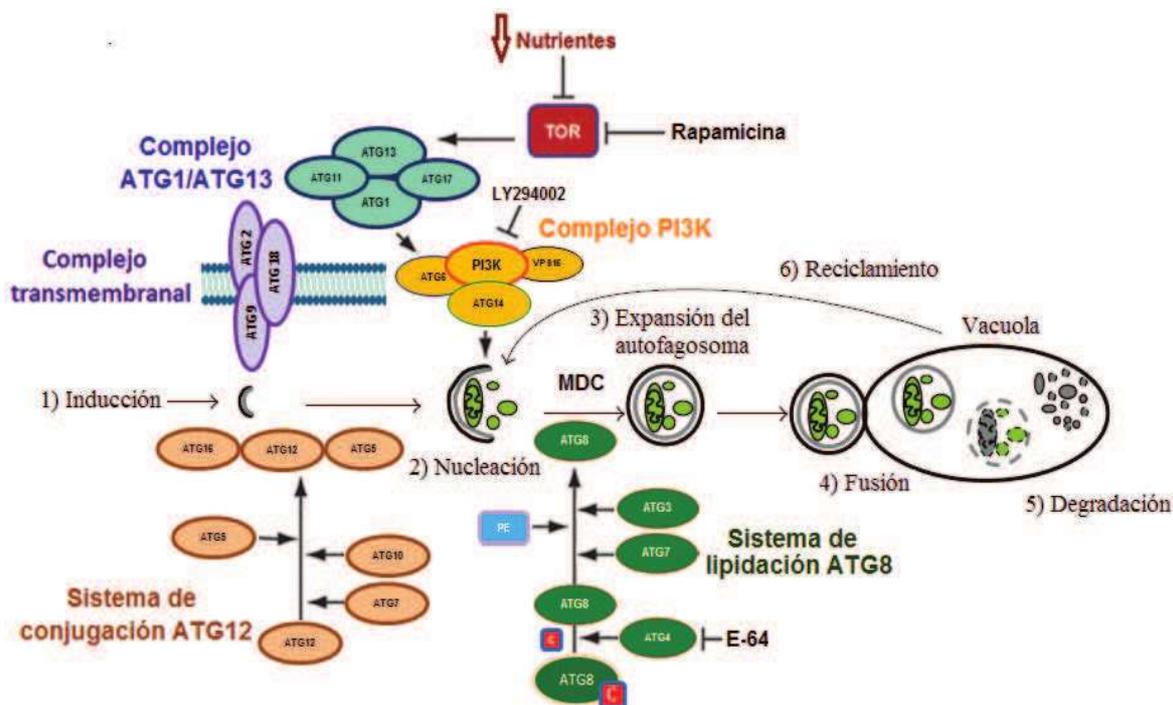


Figura 1. Vía de autofagia en células vegetales. Al inducirse la autofagia, un autofagosoma se forma alrededor de una porción del citoplasma. Posteriormente, el autofagosoma se cierra, expande y transporta la carga citoplasmática a la vacuola. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana de la vacuola y la membrana sencilla resultante (cuerpo autofágico), es liberada en el interior de la vacuola. Los cuerpos autofágicos son degradados por enzimas hidrolíticas vacuolares, y los productos de la degradación son exportados de la vacuola al citoplasma para su reutilización. Para el estudio de la autofagia se emplean inhibidores de TOR (rapamicina), de PI3K (LY294002, wortmanina) y de ATG4 (la proteasa de cisteína, E-64c) (Modificado de Mitou *et al.*, 2009; Suttangkakul *et al.*, 2011; Liu y Bassham, 2012).

1.4) Ejemplos de la autofagia en plantas

En investigaciones sobre la autofagia realizados en *Arabidopsis*, se ha analizado la participación de los sistemas de conjugación ATG8 y ATG12, componentes clave para el crecimiento y fusión del autofagosoma, además de que dichos complejos son importantes para la sobrevivencia bajo condiciones limitantes de nutrientes. Mutaciones en *Arabidopsis* en los componentes de los sistemas antes mencionados como *atg5* y *atg7* mostraron una formación de autofagosomas defectuosa, lo que impidió el correcto reciclamiento de nutrientes. Además, las plantas mutantes *atg5* y *atg7* tuvieron senescencia prematura y mayor sensibilidad a la carencia de nitrógeno y carbono, lo que condujo a una mayor

pérdida de orgánulos y proteínas citoplasmáticas. Fenotipos similares fueron observados en plantas de la doble mutante *atg4a4b*, sin embargo en mutantes simples de *atg4a* o *atg4b* se observó una autofagia normal, lo que indica una redundancia de *ATG4* en *Arabidopsis* (Yoshimoto *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005).

Recientemente, se determinó que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la autofagia presentaron un crecimiento reducido bajo condiciones de día corto. Dicha inhibición en el crecimiento, fue revertida en luz continua o en día corto con la adición exógena de sacarosa, lo que sugiere que en la noche la autofagia estaba participando en la producción de energía para el crecimiento. Las plantas, acumulan almidón durante el día y lo degradan en la respiración durante la noche, donde la disponibilidad energética se encuentra disminuida en mutantes que no acumulan almidón. En una doble mutante en la acumulación de almidón y *atg5* se observó mayor sensibilidad al periodo de día corto, las plantas mostraron reducción en el crecimiento y muerte celular temprana en hojas. Los autores concluyeron que la autofagia contribuía a la disponibilidad de energía durante la noche al proporcionar una fuente alternativa de energía como los aminoácidos (aa). El contenido de aa libres incrementó, y los niveles del transcrito de varios genes involucrados en el catabolismo de aa también aumentaron en las mutantes (Izumi *et al.*, 2013).

Por otro lado, el almidón transitorio es el principal producto fotosintético de hojas en plantas que se acumula en los cloroplastos durante el día y, es hidrolizado a maltosa y glucosa durante la noche para mantener la respiración y el metabolismo. Estudios previos en *Arabidopsis* sugieren que la degradación transitoria del almidón solo ocurre en el cloroplasto. Sin embargo, Wang y colaboradores (2013), reportaron que la autofagia, proceso que no involucra a los cloroplastos, participa en la degradación de almidón en hojas de tabaco. La acumulación excesiva de almidón fue observada en plántulas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con 3-metiladenina (3-MA), inhibidor de autofagia y en mutantes *ATG*. La actividad autofágica en las hojas respondió a una dinámica del contenido de almidón durante la noche. Mientras que, los análisis de microscopía revelaron que estructuras similares a gránulos pequeños de almidón (SSGL, por sus siglas en inglés) fueron localizadas alrededor del cloroplasto y subsecuentemente secuestradas por cuerpos autofágicos que se dirigen a la vacuola. Además, se observó un aumento en el número de

SSGLs durante la degradación del almidón y el inhibir la autofagia disminuyó el número de SSGLs localizados en la vacuola, sugiriendo, que la autofagia contribuye a la degradación transitoria del almidón por medio del transporte de SSGLs a la vacuola para su subsecuente degradación.

2) Insulina

En metazoarios, las hormonas se sintetizan en las glándulas endocrinas y se segregan directamente al torrente sanguíneo para transmitir y controlar la actividad de las células blanco. Las hormonas estimulan actividades metabólicas en tejidos situados a distancia del órgano secretor y son activas a concentraciones extraordinariamente bajas del orden de micro a picomoles (Mathews *et al.*, 2002). Tal es el caso de la insulina, hormona proteica con un peso molecular de ~6 kDa, que en mamíferos es segregada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre. Las células capaces de responder a la insulina poseen un receptor proteico transmembranal formado por dos cadenas polipeptídicas α y dos β (Karp, 2005). La insulina incrementa la absorción de glucosa en las células blanco por la translocación de transportadores de glucosa desde sitios intracelulares hacia la superficie. La insulina también activa dos cascadas de transducción de señales: la vía del fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) y la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). La activación de las cascadas de señalización por insulina o factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs), inicia cuando éstos se enlazan al receptor de la insulina tipo tirosina-cinasa que se autofosforila y cataliza la fosforilación de proteínas celulares como: el receptor de insulina (IRS), y las proteínas adaptadoras Shc y Cbl, que proveen una interfase entre el receptor activado y los efectores localizados río abajo. Cuando se fosforilan estas últimas proteínas, interactúan con moléculas de señalización a través de sus dominios SH2, resultando en la estimulación de diversas rutas de señalización como 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, y la diferenciación y crecimiento celular (Fig. 2) (Saltiel y Kahn, 2001).

2.1) Vías de transducción de señales activadas por la insulina

La insulina o factores de crecimiento como insulina –IGFs- se unen al receptor transmembranal (IR), éste a su vez se autofosforila desencadenando con ello la activación de tres rutas de señalización diferentes. La primera vía (I) activa al complejo proteico Cbl/Cap/Crk/C3G/TC10, que promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática, favoreciendo así, la entrada de glucosa a la célula (Wang *et al.*, 1999). En la segunda ruta (II) el sustrato receptor de insulina (IRS) fosforila a la cinasa PI3K, la cual a su vez, por medio de una serie de fosforilaciones de proteínas río abajo (AKT, PKC, mTOR, S6K y 4EBP) regula la síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno, así como la expresión específica de genes. Finalmente, en la tercera vía (III) proteínas con dominios de homología SH2 como la Grb2 y SHC interactúan con el IRS, y estimulan la ruta a través de Ras, MEK y ERK-1, lo que conduce a la expresión general de genes y al igual que la ruta PI3K regula también el crecimiento y diferenciación celular (Fig. 2) (Saltiel y Kahn, 2001).

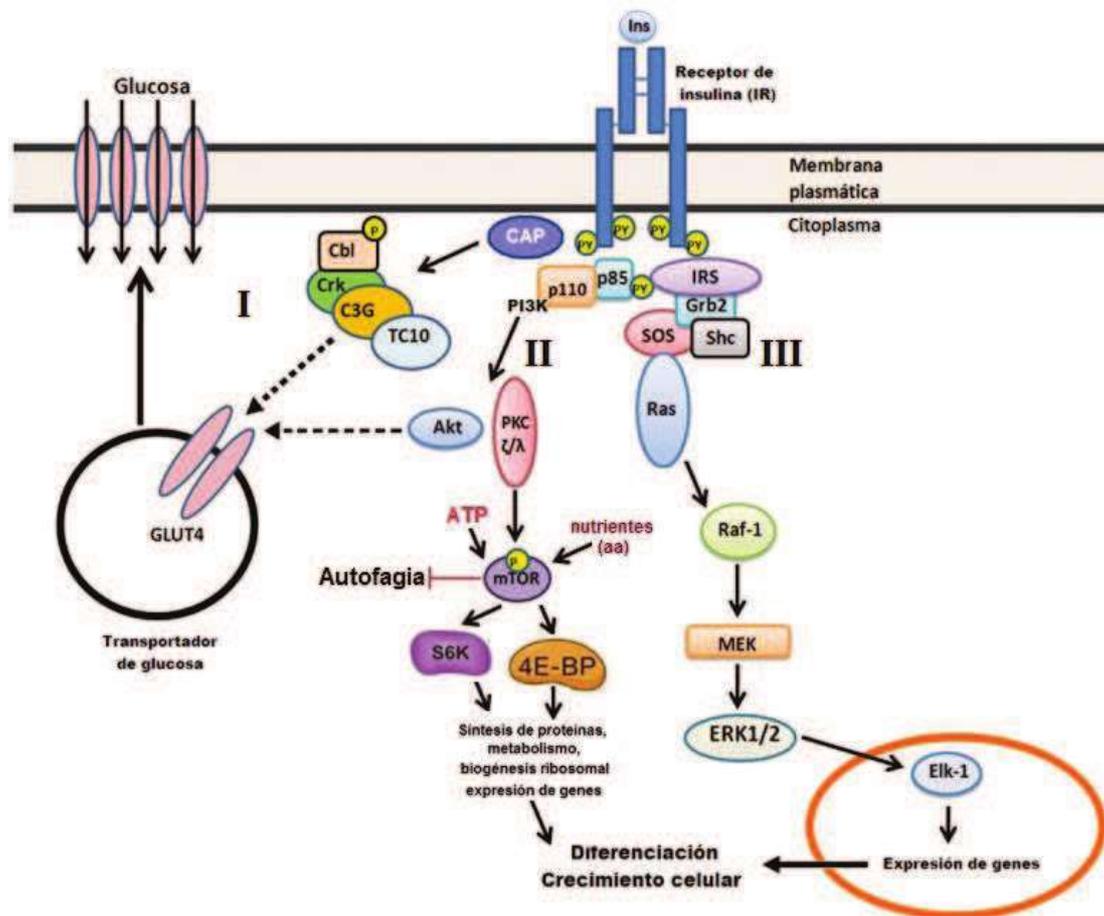


Figura 2. Cascadas de transducción de señales encendidas en respuesta a la insulina. El receptor de insulina es una tirosina cinasa que se autofosforila, catalizando la fosforilación de proteínas de la familia IRS, Shc y Cbl. Activando así moléculas de señalización a través de sus dominios SH2 de diversas vías de señalización. La activación de PI3K y de las cinasas río abajo dependientes de PIP3, y la vía MAPK, actúan en una manera concertada para coordinar la regulación del tráfico vesicular, síntesis de proteínas, activación e inactivación de enzimas y expresión de genes que regulan el metabolismo de glucosa, lípidos y de proteínas. Las flechas representan activación, las barras inhibición y las líneas discontinuas una relación que aún no ha sido descrita completamente (Modificado de Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

2.2) Cascada de señalización PI3K/TOR/S6K

La insulina se une a su receptor induciendo la activación de la cinasa PI3K a través del sustrato receptor de la insulina (IRS: Fig. 3) (Saltiel and Kahn, 2001). La PI3K cataliza la fosforilación de un lípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5 difosfato (PIP2) en la posición 3'OH produciendo el 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 al complejo de las proteínas de esclerosis tuberosa TSC1 (harmatina) y TSC2 (tuberina) e inhibe la actividad de la proteína RHEB lo que activa a 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 eIF4E se una al 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 trectos 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).

Ortólogos potenciales de varios de los componentes de la cascada de señalización PI3K/TOR como PI3K, PDK1, TOR, S6K y S6 están presentes en las plantas. En *Arabidopsis* se ha identificado un tipo de cinasa PI3K que pertenece a la clase III de la subfamilia de las PI3Ks que tiene como sustrato al fosfatidilinositol produciendo el fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Turck *et al.*, 1998; Deak *et al.*, 1999).

Las plantas, al igual que otros eucariontes poseen un gen que codifica para TOR (Menand *et al.*, 2002; Turck *et al.*, 2004). Sin embargo, carecen de genes ortólogos de la proteína de unión a eIF4E. Para el estudio de la cascada PI3K-TOR se utilizan compuestos químicos, 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) en cultivos en suspensión de *Arabidopsis*, observaron que 50 μ M 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

inactivándola, 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 se ha reportado que el maíz y las algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* son susceptibles a dicho compuesto (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 2005).

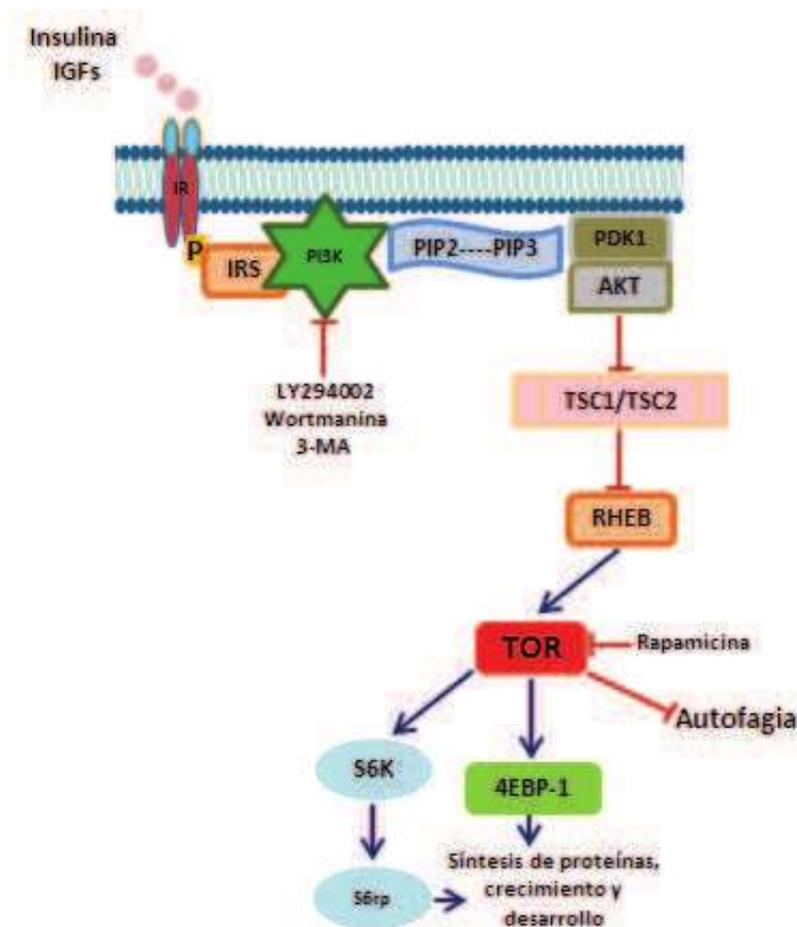


Figura 3. Activación de la cascada PI3K-TOR por insulina. El receptor de la insulina (IR) al unirse a su agonista se autofosforila y a través de la activación de PI3K estimula la fosforilación de TOR. Esta última cinasa activa a sus blancos: 4EBP-1 y S6K promoviendo así la síntesis de proteínas, el crecimiento y la diferenciación (Saltiel y Kahn, 2001). Para estudiar esta cascada se han utilizado los inhibidores LY294002 y wortmanina que bloquean a la PI3K. En tanto que la rapamicina, al formar un complejo con la proteína FKBP12 inhibe a TOR (Vezina *et al.*, 1975). En condiciones nutricionales adecuadas, la activación de TOR inhibe la autofagia, mientras que en inanición la inactivación de TOR favorece la inducción de la autofagia (Modificado de Klionsky, 2005).

2.3) Efecto de la insulina en plantas

Existen evidencias de que la insulina puede estar involucrada en el crecimiento de las plantas, los primeros reportes en cebollas, hojas de lechuga, raíces de cebada, remolacha, germinados de papa y arroz indican la presencia de sustancias parecidas a la insulina inicialmente denominadas “glucocininas” (Best, 1923; Collip, 1923). En maíz se observó que concentraciones altas de insulina y glucocinina (1%) retardaban la germinación, mientras que concentraciones bajas (0.005%) la aceleraban (Ellis y Eyster, 1923). Otros estudios reportaron 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 también se observó que la hormona aceleraba la emergencia de la radícula (Goodman y Davis, 1993). A nivel molecular se reportó que la insulina promueve la germinación del maíz a través del 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.*, 1999). Por otra parte, también se observó la presencia de dos péptidos reconocidos por anticuerpos contra insulina de bovino de aproximadamente 8 y 24 kDa en extractos de maíz germinado por 46 horas (Beltrán-Peña, 1997). Dichos péptidos fueron posteriormente purificados, caracterizados y reportados como factores de crecimiento parecido a insulina de maíz (ZmIGF) (García Flores *et al.*, 2001; Rodríguez-López *et al.*, 2011). ZmIGF y la insulina regulan el crecimiento y la división celular en maíz, promoviendo la síntesis de proteínas ribosomales y del DNA (Rodríguez-López *et al.*, 2011). Por otro lado, fue reportado que concentraciones crecientes de insulina bovina estimularon un incremento de masa y tamaño de los epicotilos y raíces, así como del número de raíces laterales en *Phaseolus vulgaris* (Santos, 2003).

Avila-Alejandre y colaboradores (2013), reportaron que 1.23 nM de insulina en ejes embrionarios de maíz regula la reiniciación del ciclo celular durante la germinación y promueve el crecimiento, la fosforilación de S6K, la acumulación del transcrito *S6rp* en la fracción polisomal y la síntesis *de novo* del DNA en la radícula y los coleoptilos. También observaron, que dicha hormona incrementó los niveles de los transcrito de *E2F* y *PCNA* lo que sugiere su efecto en la transición G1/S y en la activación de la proliferación celular. Por

otro lado, Villa-Hernández y colaboradores (2013), reportaron que imbibición de ejes embrionarios de maíz en insulina por 3 h estimulaba la transcripción del rDNA y un mayor procesamiento del pre-rRNA, ambos eventos necesarios en la reactivación metabólica en la germinación. Además, la insulina también incrementó la síntesis *de novo* de las proteínas ribosomales RPS6 y RPL7 después de 24 h de imbibición. De ahí que los autores sugieran que, la biogénesis del ribosoma en los primeros estadios de imbibición es realizada con ribosomas formados con rRNA recién sintetizado y la traducción de proteínas ribosomales de transcritos almacenados.

En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que la insulina promueve el crecimiento de la raíz, de pelos radiculares, el desarrollo reproductivo y el rendimiento de semillas en *Arabidopsis* (Juárez-Domínguez *et al.*, 2010; Pascual-Morales *et al.*, 2012; Rodríguez-Andrade, 2012). Mientras que, en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* (NT-1) la adición de 1.23 y 12.3 nM de insulina estimuló la proliferación de las células mediante la activación de la cascada de señalización PI3K-TOR y dicho efecto fue dependiente de las auxinas (Fierros-Romero *et al.*, 2010; Fierros-Romero, 2012).

3) Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son pequeñas moléculas o iones altamente reactivos generados constantemente bajo condiciones normales como consecuencia del metabolismo. Las ERO se forman por la reducción incompleta de un electrón del oxígeno, e incluyen al ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical oxidrilo (OH \cdot), singulete de oxígeno (1O_2), óxido nítrico (NO), y peroxinitrito ($ONOO^-$) y pueden oxidar proteínas, lípidos, y DNA (Chen y Gibson, 2008). A pesar de los múltiples sistemas de modulación redox que poseen las células, cierta proporción de ERO escapan continuamente de la cadena respiratoria mitocondrial. La célula está equipada con un amplio sistema de defensa antioxidante (enzimático y no enzimático) para eliminar las ERO, ya sea directamente por intercepción o indirectamente revirtiendo el daño oxidativo. Cuando las ERO sobrepasan a los sistemas de defensa de la células la homeostasis es alterada, lo que resulta en un estrés oxidativo (Erusnalov y Kusmartsev, 2010).

Los organismos vivos que se encuentran en un medio oxidante producen constantemente ERO en mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas y otros sitios de la células debido a procesos metabólicos como la respiración o fotosíntesis. Estas moléculas altamente reactivas pueden dañar las biomoléculas y consecuentemente estructuras celulares (Tripathy y Oelmuller, 2012).

Las ERO contribuyen al desarrollo de varias enfermedades relacionadas con la edad, y quizás, al propio proceso de envejecimiento a causa del estrés y daño oxidativo (Sohal *et al.*, 2002). Además, enfermedades en las cuales han sido implicadas las ERO incluyen cáncer, arterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y diabetes (Hagen *et al.*, 1994; Chowienzyk *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003).

3.1) Especies reactivas de oxígeno (ERO) en plantas

La generación de ERO en plantas es activada por diferentes señales del ambiente, como alta iluminación, temperaturas bajas y altas, salinidad, sequía, deficiencia de nutrientes y ataque por patógenos (Tripathy y Oelmuller, 2012). Las plantas y otros organismos han desarrollado una gran cantidad de antioxidantes, y otras moléculas pequeñas para disipar las ERO y que éstas no causen daño. El desbalance entre la producción de ERO y su destoxificación mediante reacciones enzimáticas y no enzimáticas produce estrés oxidativo. Como resultado de la elevada formación de ERO, se produce daño foto-oxidativo al DNA, proteínas y lípidos lo que conduce a la muerte celular (Apel y Hirt, 2004). Las ERO también actúan como moléculas de señalización involucradas en procesos de crecimiento y desarrollo, respuestas de defensa tales como la respuesta hipersensible, resistencia sistémica, producción de hormonas, aclimatación y muerte celular programada (Apel y Hirt, 2004).

3.2) Producción de intermediarios de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en plantas

Orgánulos con una alta actividad de oxidación metabólica o con una tasa intensa de flujo electrónico, como los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, son las principales fuentes

de ERO en plantas. Junto con estos orgánulos, las peroxidasas y las amino-oxidasas presentes en la pared celular y las NADPH oxidasas localizadas en la membrana plasmática producen a menudo ERO, en respuesta a señales de estrés. El oxígeno producido continuamente dentro del cloroplasto debido al transporte de electrones durante la fotosíntesis, es simultáneamente removido por reducción y asimilación (Tripathy y Oelmuller, 2012).

La fotorreducción del oxígeno a radical superóxido, ocurre debido a la reducción de los componentes del transporte de electrones asociados con el fotosistema I y a una reacción relacionada con el ciclo fotorrespiratorio en el peroxisoma. Cuando la disponibilidad de CO₂ está restringida en el interior de las hojas debido a varios estreses ambientales, la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxidasa/oxigenasa cataliza una reacción competitiva, donde el oxígeno predomina sobre el CO₂ como un sustrato. Esta reacción de oxigenación produce el glicolato, que es transportado a los peroxisomas, lo que resulta en la formación de H₂O₂ después de una subsecuente oxidación por la glicolato oxidasa (Tripathy *et al.*, 2007).

Las NADPH oxidasas de membrana plasmática contienen un flavocitocromo multimérico que forma una cadena transportadora de electrones capaz de reducir el O₂ a O₂⁻. Inhibidores de estas oxidasas impiden la producción de ERO (Allan y Fluhr, 1997). Además de la NADPH oxidasa, la peroxidasa de pared celular dependiente de pH, la oxalato oxidasa y las amino-oxidasas han sido propuestas como enzimas productoras de ERO en el apoplasto (Xu *et al.*, 2003; Walters, 2003).

La mitocondria es la principal fuente de ERO en mamíferos, mientras que en tejidos fotosintéticos su contribución en la síntesis de ERO no es significativa (Purvis, 1997). La cadena transportadora de electrones mitocondrial puede producir ERO, que transfieren un electrón simple al oxígeno formando O₂⁻. La oxidasa alternativa mitocondrial (AOX por sus siglas en inglés) cataliza la oxidación de O₂⁻ dependiente de ERO. La carencia de la inducción de AOX causa un incremento de estas últimas (Maxwell *et al.*, 1999), mientras que en plantas que sobreexpresan a AOX muestran pequeñas lesiones de respuesta hipersensible en comparación con la línea silvestre en respuesta a infección por virus (Robson y Vanlerberghe, 2002). El tratamiento de células de *Arabidopsis* con H₂O₂ y su

acumulación en tabaco deficiente en la catalasa, conduce a la inducción de defensas antioxidantes y aumento en los niveles de AOX en la mitocondria (Sweetlove *et al.*, 2008).

3.3) NADPH oxidasas en plantas

Los homólogos de oxidasas de explosión respiratoria (RBOHs por sus siglas en inglés) oxidan el NADPH citosólico y transfieren el electrón al O₂, generando de este modo superóxido el cual es subsecuentemente convertido a H₂O₂. Diez genes *RBOH* están presentes en el genoma de *Arabidopsis*, y codifican para proteínas localizadas en la membrana plasmática, donde el dominio oxidasa apoplástico es el responsable de la generación de superóxido en el apoplasto y el extremo N-terminal contiene regiones reguladoras de unión a calcio y dominios de fosforilación (Ogasawara *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008). Existe un cruce de señalización entre el calcio y la fosforilación en el control de la producción de ERO en el apoplasto (Kobayashi *et al.*, 2007). Las RBOHs participan en defensa contra el ataque de patógenos, mediante la activación de la respuesta hipersensible y regulación de la inmunidad innata en plantas (Torres *et al.*, 2002; Proels *et al.*, 2010). También están involucradas en la formación de nódulos en *Medicago truncatula* (Marino *et al.*, 2011) y en respuestas a estrés abiótico como calor, frío, sequía, salinidad y alta luz. La señalización por ERO es conducida célula a célula a través de su difusión, a su vez, también a larga distancia pueden participar en la resistencia sistémica adquirida (Miller *et al.*, 2009). La NADPH oxidasa RbohC media la producción de ERO, que regula la expansión celular polarizada en pelos radiculares y el crecimiento en punta del polen, este último por las enzimas RbohH y RbohJ (Foreman *et al.*, 2003; Potocky *et al.*, 2007).

3.4) Explosión oxidativa, ERO en interacción planta/microorganismo

Después del ataque de patógenos, la producción de ERO incrementa rápidamente para establecer la resistencia local y sistémica. En el sistema *Arabidopsis-Alternaria* se describe el papel dual de las ERO y de la RbohD. Esta última activa la muerte en células dañadas por infección fúngica, y simultáneamente inhibe la muerte en las células vecinas mediante la supresión de los niveles de ácido salicílico y etileno (Pogány *et al.*, 2009).

Un ejemplo comparable, es el hongo necrótrofo, *Sclerotinia sclerotiorum*, que presenta un amplio rango de huéspedes, y produce ácido oxálico como factor clave de patogenicidad (induce muerte celular programada tipo apoptosis en la planta huésped). Este tipo de muerte requiere la generación de ERO en el huésped, proceso inducido por el ácido oxálico secretado por el hongo. Inicialmente, *S. sclerotiorum* genera un ambiente reductor en las células hospederas vía el ácido oxálico que suprime las respuestas de defensa, incluyendo la explosión oxidativa y la deposición de callosa. Una vez que la infección se establece, el hongo induce ERO en la planta lo que conduce a la muerte celular programada del tejido huésped, que tiene un efecto benéfico para el patógeno (Williams *et al.*, 2011). Recientemente, en mutantes deficientes en ácido oxálico de *S. sclerotiorum* (no patogénicas), se observó un fenotipo de muerte celular restringida en el huésped que inexplicablemente muestra marcas asociadas con la respuesta hipersensible de la planta (la deposición de callosa y una explosión oxidativa pronunciada) lo que indica que la planta lo reconoce y responde al ataque. Los autores muestran que este tipo de muerte celular restringida es autofágica y que la inhibición de esta última rescata el fenotipo de la mutante no patogénica, implicando a la autofagia en una respuesta de defensa en la interacción planta/hongo y una nueva función asociada con el ácido oxálico; llamada, supresión de la autofagia. Lo anterior indica que no todas las muertes celulares son equivalentes, y aunque la muerte celular programada ocurre en ambas situaciones, el resultado se basa en el control de la maquinaria de muerte celular (Kabbage *et al.*, 2013).

3.5) ERO y la transducción de señales

Los receptores/sensores de ERO inducen cascadas de señalización que conducen a la expresión diferencial de genes. Las células vegetales sensan las ERO por al menos tres mecanismos diferentes:

1. Receptores proteicos no identificados.
2. Componentes sensibles al balance redox que incluyen factores de transcripción, tales como NPR1 o HSFs.
3. Inhibición directa de fosfatasas por ERO

Las ERO son sensadas por receptores desconocidos. La especificidad en las respuestas y las diversas localizaciones donde las ERO son generadas, sugieren distintos blancos o mecanismos de percepción. Se cree que la percepción de las ERO es transducida por cambios en el estatus redox de los componentes de la señalización (Tripathy y Oelmuller, 2012).

Para el estudio del sensado apoplástico de las ERO, una herramienta ampliamente utilizada es el contaminante del aire, el ozono, que genera ERO en el apoplasto. En diferentes ecotipos de *Arabidopsis* se ha observado varios grados de sensibilidad al ozono, desde tolerantes hasta extremadamente sensibles. Mediante un mapeo se identificaron genes regulados por ozono en poblaciones nativas de *Arabidopsis*. Las respuestas inducidas por ozono fueron similares a las mostradas por patógenos o por patrones moleculares asociados a patógenos, sugiriendo que el ozono en el apoplasto dispara respuestas de muerte celular programada tipo hipersensible (Brosché *et al.*, 2010). Recientemente, se identificaron en *Arabidopsis* dos miembros de una familia de genes receptores cinasa ricos en cisteína y una proteína con repeticiones ricas en leucina (LRR-RLK por sus siglas en inglés), los cuales fueron inducidos transcripcionalmente después del tratamiento con ozono (Gauthier *et al.*, 2011). También, se ha determinado que una cinasa serina/treonina inducible por la señal oxidativa 1 (OXI1 por sus siglas en inglés), juega un papel central en el sensado de ERO por activación de las MAPK 3 y 6 a través de Ca^{2+} . La expresión de OXI1 y su actividad es inducida en respuesta a un amplio rango de estímulos generados por H_2O_2 . Dicha proteína es requerida para la inmunidad de la planta contra *Pseudomonas syringae* en *Arabidopsis*, y para dos procesos mediados por explosión oxidativa: la resistencia basal contra patógenos microbianos y el crecimiento de los pelos radiculares (Rentel *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2009).

3.6) ERO y autofagia

Bajo condiciones fisiológicas normales y niveles moderados, las ERO funcionan como señales en varias vías de señalización incluyendo la autofagia (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). Es conocido que la inanición induce la producción de ERO y, los niveles incrementados de éstas provoca la activación de la autofagia. Mediante el estudio de la

autofagia inducida por inanición, por inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (mETC, por sus siglas en inglés), y adición exógena de H_2O_2 , se delimitó que el O_2^- se forma selectivamente por inanición de glucosa. La inanición de aminoácidos y suero estimuló la producción de O_2^- y H_2O_2 (Chen y Gibson, 2008). Sin embargo, la autofagia inducida por inhibidores de la mETC junto con el 2-metoxiestradiol (2-ME) - inhibidor de la superóxido-dismutasa (SOD)- incrementó los niveles de O_2^- y disminuyó los de H_2O_2 . La adición exógena de H_2O_2 indujo autofagia incrementando los niveles intracelulares de O_2^- pero no los de H_2O_2 (Chen *et al.*, 2009). Por otra parte, en una línea celular de ratón se observó que la autofagia inducida por H_2O_2 involucra dos mecanismos, uno dependiente y otro independiente a Beclina-1 (ATG6) (Seo *et al.*, 2011).

3.7) Mecanismos reguladores de la autofagia activada por ERO en mamíferos

Existen varias vías de señalización que regulan la autofagia en mamíferos, la clásica que involucra la inhibición de TOR (Klionsky, 2005; ver Fig. 5.3 Capt 5, Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de plantas, 2013). Adicionalmente, se han reportado moléculas que regulan la autofagia inducida por ERO de forma dependiente o independiente a la cinasa TOR (Fig. 4) (Gibson, 2013).

La proteína TOR también es un sensor de cambios energéticos a través de la cinasa AMPK que percibe las fluctuaciones de los niveles de ATP/AMP intracelular (Meijer y Codogno, 2006). Recientemente, se demostró que la inanición induce la activación de AMPK y la autofagia, mientras que la activación de Akt/PKB (un componente de la vía TOR), la disminuye. Esta activación de AMPK es regulada por ERO, el bloqueo en la formación de ERO reduce la activación de AMPK y la autofagia inducida por inanición (Li *et al.*, 2013). También se han reportado otras proteínas como reguladoras de la autofagia; por ejemplo LkB-1 induce la autofagia mediante la activación de AMPK y la inhibición de TOR (Criollo *et al.*, 2010) (Fig. 4). Por otro lado, se ha determinado la sobre expresión de *ATG6* bajo estrés oxidativo, lo cual sugiere que las ERO pueden estar involucradas en la expresión de genes relacionados con autofagia, de tal forma que la expresión de *ATG6* puede servir como biomarcador de autofagia activa (Chen *et al.*, 2008). Otro componente importante de la regulación de la autofagia por ERO es la proteína nuclear asociada a la

3.8) Regulación de la autofagia por ERO en plantas

Las ERO actúan como segundos mensajeros que transmiten las señales de estrés iniciales, permitiendo a las células reaccionar y adaptarse a las diferentes condiciones ambientales (Mittler *et al.*, 2011). En plantas y algas, el cloroplasto es una de las principales fuentes de ERO. Los aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) son generados como productos del transporte electrónico fotosintético y en seguida convertidos a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el interior del cloroplasto a través de reacciones químicas y enzimáticas. El singlete de oxígeno (1O_2) y los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) son también formados durante la fotosíntesis y pueden causar daño oxidativo. Además del cloroplasto, las ERO son producidas en las mitocondrias, peroxisomas y en la membrana plasmática por las NADPH oxidasas (Fig. 5) (Pérez-Pérez *et al.*, 2012 b).

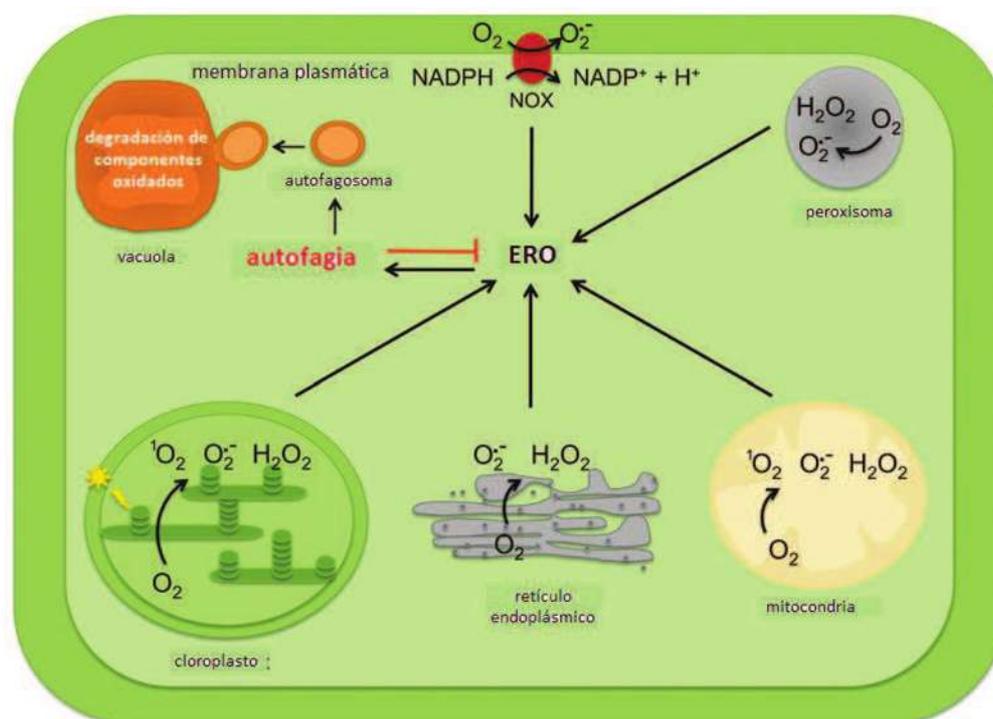


Figura 5. Diferentes fuentes de ERO controlan la autofagia en plantas y algas. Las ERO se generan por las enzimas NOX localizadas en la membrana plasmática y en diferentes orgánulos: los cloroplastos, la mitocondria, el peroxisoma y el retículo endoplásmico. El exceso de ERO induce la autofagia, la cual regula negativamente la producción de ERO y remueve componentes celulares dañados (modificado de Pérez-Pérez *et al.*, 2012 b).

De los diferentes tipos de ERO generadas en el cloroplasto, el H_2O_2 es la molécula más estable y se difunde a través de la membrana, en contraste al $\text{O}_2^{\cdot-}$ y los radicales OH^{\cdot} , los que no son liberados de cloroplastos funcionales. El singulete $^1\text{O}_2$, es generado principalmente en el centro de la reacción del fotosistema II (PSII), y a pesar de su tiempo de vida corto (alredor de 200 ns), puede participar en eventos de señalización por difusión hacia el exterior de la membrana del tilacoide (Fischer *et al.*, 2007) o a través de segundos mensajeros, como la oxidación del β -ciclocitral (Ramel *et al.*, 2012). De hecho, además de su efecto tóxico, el $^1\text{O}_2$ activa en plantas y algas, diferentes cascadas que conducen a muerte celular programada, mediante la regulación de la expresión de genes específicos (Gadjev *et al.*, 2006). Entre los diferentes tipos de ERO, el H_2O_2 cumple con todos los requerimientos para funcionar como segundo mensajero: estabilidad, permeabilidad a la membrana, reactividad que provee especificidad para la oxidación de los grupos tioles y producción enzimática y degradación. Las características antes mencionadas, le proporcionan al H_2O_2 especificidad en tiempo y espacio donde se requiere una señalización (Forman *et al.*, 2010). El H_2O_2 regula procesos como la división celular, la diferenciación, el crecimiento, la apoptosis, el desarrollo vegetal y la adaptación a estreses bióticos y abióticos (Foyer y Noctor, 2009). Estudios recientes en organismos fotosintéticos describen la activación de la autofagia en respuesta a varios estímulos que incrementan la generación de ERO, independientemente del origen y localización de la producción de las ERO en la célula (Pérez-Pérez *et al.*, 2010, 2012 a).

En *Arabidopsis* se ha observado que el tratamiento con H_2O_2 resulta en un severo estrés oxidativo que conduce a la inducción de la autofagia. Bajo estas condiciones, se produce oxidación de proteínas irreversible, como la carbonilación, formación de ácido sulfónico, o nitración de tirosina. Además, plantas mutantes en genes relacionados con autofagia como *atg2* y *atg5*, fueron hipersensibles al H_2O_2 , y acumularon proteínas carboniladas, demostrando que este proceso degradativo es necesario para la adaptación celular al estrés oxidativo (Xiong *et al.*, 2007).

La actividad de las NADPH oxidasas (NOX), ha sido implicada en la regulación de la autofagia en plantas. La inhibición de NOX con yoduro de difenileno (DPI, por sus siglas en inglés) reveló que la inducción de la autofagia por limitación nutricional o por estrés

salino requiere de su activación. Por lo tanto, las ERO generadas por NOX parecen ser necesarias para la activación de la autofagia en respuesta a estrés nutricional y salino, enfatizando un posible papel de las ERO en el control de la autofagia en plantas. No obstante, en estrés osmótico, el cual también dispara autofagia en plantas, no parece estar mediado por NOX. Este hallazgo indica que la autofagia está regulada diferencialmente bajo inanición, estrés salino y osmótico; mientras que la inducida por inanición y estrés salino es regulada por una vía dependiente a NOX que involucra ERO, la inducción de este proceso por estrés osmótico está regulada por una vía independiente a NOX (Liu *et al.*, 2009).

La infección por patógenos es un potente inductor de la autofagia en células vegetales. Después de la infección, las ERO son generadas en la membrana plasmática por NOX, participando en la activación de la autofagia durante el estadio inicial de la infección (Liu *et al.*, 2005).

El estrés en el retículo endoplásmico (ER) por la acumulación de proteínas mal plegadas, también es una fuerte señal de estrés que induce la autofagia y, se ha establecido que la generación de ERO y el estrés en el retículo se encuentran asociados. En respuesta al estrés en el retículo, las células pueden iniciar un proceso autofágico para remover proteínas mal plegadas y moléculas dañinas como ERO, lo que contribuye a mejorar la supervivencia celular (Malhotra y Kaufman, 2007).

3.9) Vía TOR-ATG1 en plantas

Las vías de señalización de los complejos de ATG1/ATG13, TOR y SnRK1 (AMPK de plantas) se encuentran conservadas en *Arabidopsis*. Aunque se desconocen las señales río arriba de la función de ATG1/ATG13, a las proteínas TOR y SnRK1 se les ha otorgado un papel central en el sensado energético y nutricional de organismos fotosintéticos (Robaglia *et al.*, 2012). La disminución en la función de TOR en *Arabidopsis* por reducción en los niveles del transcrito o por tratamiento con rapamicina en *Chlamydomonas* resultó en un aumento en la actividad autofágica similar a la observada en células en inanición de nutrientes (Liu y Bassham, 2010; Pérez-Pérez *et al.*, 2010). El papel de TOR en el control de la autofagia en organismos fotosintéticos implica un mecanismo conservado

evolutivamente entre eucariontes. Sin embargo, en organismos fotosintéticos se desconoce si TOR puede percibir directamente las señales redox para regular la autofagia. No obstante, en base al papel de TOR en la regulación de la autofagia, y las evidencias de un cruce de señales entre la vía redox y TOR en otros sistemas, se ha especulado que en algunas condiciones de estrés, las ERO inactivan a TOR, lo que activaría a ATG1, con la consecuente inducción de la autofagia en plantas y algas (Pérez-Pérez *et al.*, 2012 b) (Fig. 6).

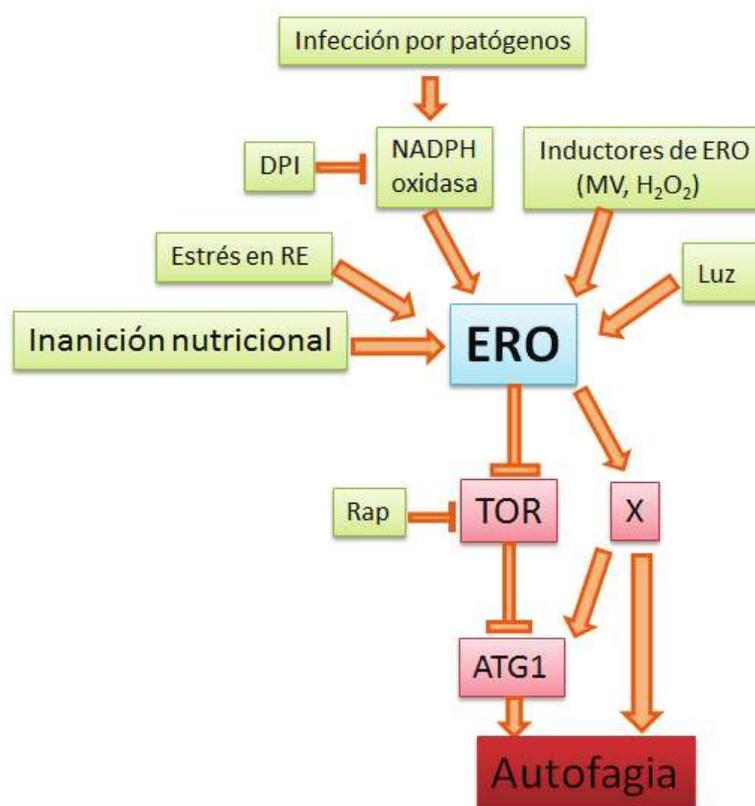


Figura 6. Modelo propuesto de la regulación de la autofagia por ERO en plantas y algas. Los niveles intracelulares de ERO son modulados por diferentes señales, que incluyen el estrés por luz alta, la limitación nutricional, el estrés en el retículo endoplásmico y la infección por patógenos. Las ERO en última instancia conducen a la activación de ATG1 y al aumento de la inducción de la autofagia ya sea mediante la inactivación de TOR o por un mecanismo independiente a TOR, mostrado con una X. Esta última vía desconocida, podría controlar la autofagia a través de la regulación de ATG1, como se ha reportado en células de mamífero para AMPK (SnRK1 en plantas), o por un mecanismo diferente como se describe para la proteasa ATG4. **DPI**, yoduro de difenileno; **Rap**, rapamicina; **MV**, metil violágeno (modificado de Pérez-Pérez *et al.*, 2012 b).

4) Línea celular NT-1 como modelo de estudio

En 1985, se estableció la línea celular NT-1 a partir de la línea BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (An, 1985; Robledo-Paz *et al.*, 2006). La línea celular NT-1 es genéticamente igual a la 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, 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 para el crecimiento de las células NT-1, esta compuesto por sales 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% de sacarosa y 0.2 mg/l de 2,4-D (Nagata y Hasezawa, 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).

Las cinéticas de crecimiento de las líneas celulares BY-2 y NT-1 presentan las tres fases características de células vegetales en suspensión: lag o de adaptación al medio, log o de crecimiento exponencial y estacionaria en la que se presenta un agotamiento de nutrientes. En cada una de las diferentes fases de crecimiento se observan formas variadas de las células: redondas formando racimos en la fase log y alargadas (3 a 5 veces más largas en uno de sus ejes) que forman cadenas en las fases lag y estacionaria; además una gran variedad de genes se expresan diferencialmente en cada una de estas fases (Nagata *et al.*, 2004). La clasificación de dichos genes se realizó por microarreglos a partir de cDNAs de las fases lag, log y estacionaria. Durante la fase estacionaria se encontraron proteínas

cinasas transmembranales y factores de transcripción, además, receptores de tipo no cinasa, canales iónicos y transportadores, lo cual sugiere que durante esta fase se activa el transporte de nutrientes (Matsuoka *et al.*, 2004). Esto también sugiere que en dicha fase, las células BY-2 presentan la capacidad de responder a señales extracelulares como la adición de fitohormonas y, en nuestro modelo de estudio, la adición de mitógenos como la insulina. 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 por *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, éstas se han convertido en sistemas útiles para la localización subcelular de proteínas a través del marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP) (Kost *et al.*, 1998; Granger y Cyr, 2000; Boruc *et al.*, 2010).

Diversas investigaciones acerca del ciclo celular se realizan en cultivos en suspensión de tabaco por su comportamiento comparable a la división continua de los meristemas en plantas (Nagata y Kumagai, 1999; Geelen e Inze, 2001). No obstante, se ha cuestionado si los estudios relacionados con el metabolismo, pueden ser válidos en procesos diferentes a la división celular y ser comparables a lo que ocurre *in situ* en plantas (Nagata y 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. Así, fueron determinadas alteraciones similares en la organización y elongación en células BY-2 y en embriones de *Arabidopsis* de líneas transgénicas con antisentido del receptor de auxina ABP1 (Chen *et al.*, 2001). Se ha reportado que una mutación de tap 46 (subunidad reguladora de una fosfatasa A2) afectó 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). Ganguly y colaboradores (2010), observaron una localización similar del transportador de eflujo PIN8 en la membrana plasmática en células BY-2 y en raíces de *Arabidopsis*. Lo

antes mencionado muestra que los cultivos de células en suspensión representan una herramienta útil en la investigación del desarrollo vegetal.

En el estudio de la autofagia, los cultivos celulares de tabaco han sido ampliamente utilizados debido a que en condiciones limitantes de nutrientes, como sacarosa y nitrógeno inducen la autofagia de forma marcada (Moriyasu y Oshumi, 1996; Guiboileau *et al.*, 2012). Además, en estas células, se ha observado que fracciones del citoplasma son envueltas por estructuras de doble membrana (autofagosomas) y posteriormente degradadas en la vacuola central. Los autofagosomas presentan estructuras de gran tamaño, fácilmente visibles por varios tipos de microscopía desde la óptica, de fluorescencia, confocal, hasta electrónica de transmisión (Takatsuka *et al.*, 2004; Contento *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013).

Las auxinas participan activamente en el crecimiento de cultivos celulares de tabaco regulando los procesos de división celular a concentraciones de alrededor de 1 μM , y cuando se eliminan del medio inducen la elongación celular y la acumulación de gránulos de almidón (Sakai *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 2004). A la fecha, no existe información acerca del efecto que tiene el retirar las auxinas sobre el proceso de autofagia. Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo se ha determinado en cultivos de células de tabaco NT-1, que la insulina estimula el crecimiento a través de la proliferación celular. Además, debido a que en estos cultivos las auxinas también regulan la proliferación celular, se evaluó si la insulina era capaz de favorecer la división celular en carencia de auxinas, encontrando que para que la insulina tenga efecto sobre el crecimiento se requiere la presencia de las auxinas en el medio. Sin embargo, en estos cultivos sin auxinas y en presencia de insulina se observó la formación de estructuras similares a autofagosomas (Fierros-Romero, 2012).

II) JUSTIFICACIÓN

Debido a que la autofagia es un proceso inducido para el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones de estrés y a observaciones que en cultivos celulares NT-1 en ausencia de auxinas y presencia de insulina se indujo la formación de estructuras similares a autofagosomas, es importante determinar si dichas estructuras son autofagosomas y dilucidar el mecanismo que induce la autofagia en dichas condiciones.

III) HIPÓTESIS

La insulina y la carencia de auxinas estimulan la autofagia en cultivos de células de tabaco NT-1.

IV) OBJETIVOS

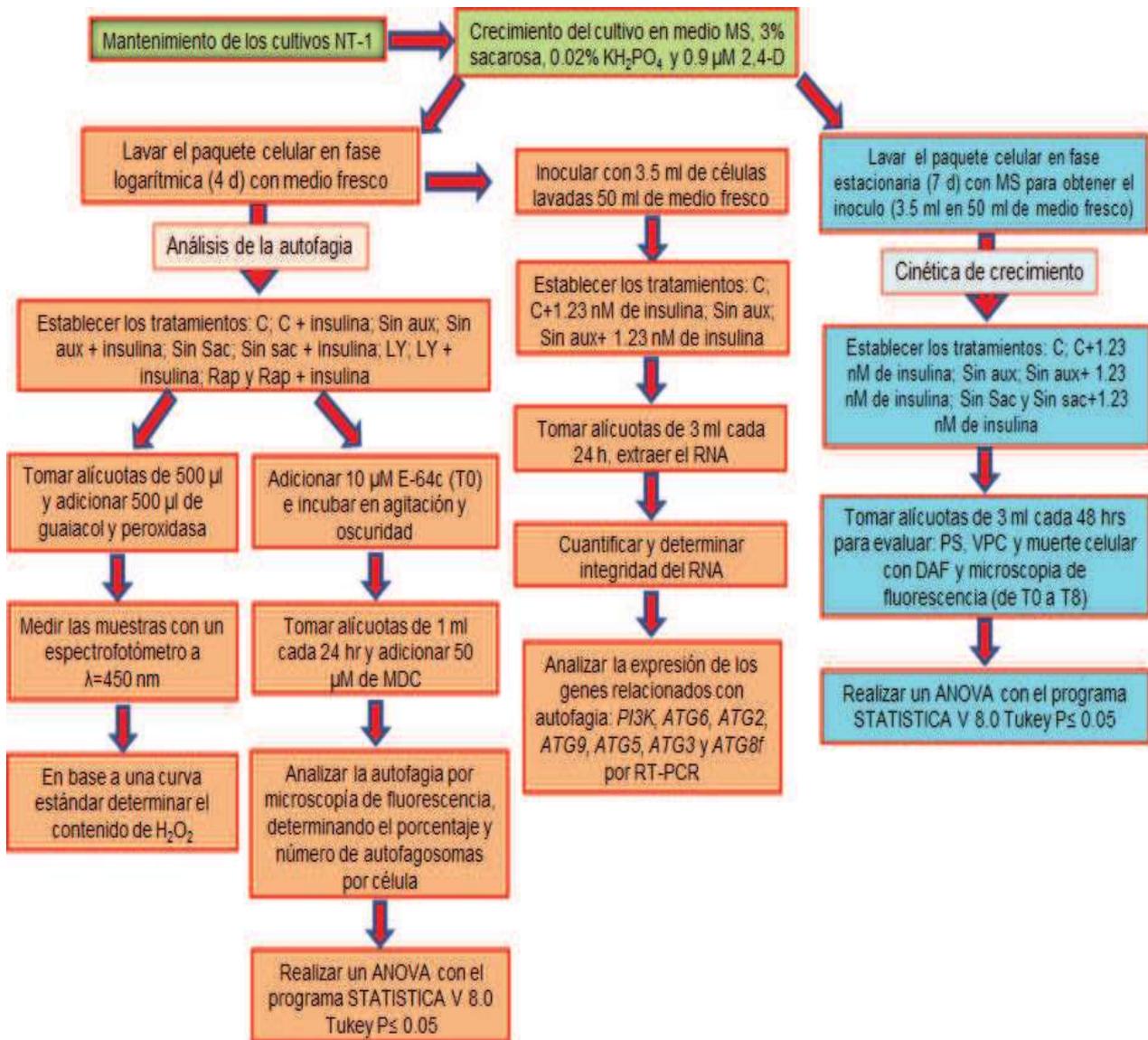
4.1) Objetivo general

Analizar la participación de la insulina y la carencia de auxinas sobre la autofagia en cultivos de tabaco NT-1.

4.2) Objetivos específicos

- 1.- Determinar en cultivos NT-1 sin sacarosa, en presencia de insulina y carencia de auxinas la inducción de la autofagia.
- 2.- Analizar la producción de H_2O_2 en los cultivos con distintos tratamientos.
- 3.- Analizar la expresión de los genes relacionados con autofagia: *PI3K*, *ATG6*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG5*, *ATG3* y *ATG8f* en los cultivos suplementados con insulina y en carencia de auxinas.
- 4.- Determinar el efecto de los inhibidores de las cinasas TOR y PI3K sobre el proceso de autofagia en cultivos suplementados con insulina.

V) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI) MATERIALES Y MÉTODOS

6.1) Mantenimiento del cultivo celular NT-1

Los cultivos de células de tabaco NT-1 en suspensión se mantuvieron por subcultivos semanales, incubación en oscuridad a 25°C y agitación a 150 rpm. Se inoculan 3.5 ml de células -de un cultivo previo en fase estacionaria (día siete)- a 50 ml de medio Murashige and Skoog (MS) 1X (4.3g/l de sales MS), 30 g/l de sacarosa, 0.2 g/l de KH₂PO₄, 0.9 μM de 2,4-D, 100 mg/l de mio-inositol y 1 mg/l de tiamina. En condiciones asépticas, se filtra el total del cultivo de células en suspensión en fase estacionaria y se lava con 1 L de medio MS 1X (sin vitaminas ni auxinas). El paquete celular se resuspende en 50 ml de medio MS 1X y a partir de dicho cultivo se toman alícuotas para inocular los diferentes tratamientos. Las cinéticas de crecimiento se realizan, adicionando 3.5 ml del inóculo antes mencionado a 50 ml de medio MS 1X (suplementado con 1.23 nM de insulina con auxinas; sin auxinas y sin auxinas + insulina). Los cultivos se incuban y se toman alícuotas de 3 ml cada 48 h. Adicionalmente, se prepara medio sin sacarosa para los experimentos de inanición de la fuente de carbono. El pH de todos los medios de cultivo fue ajustado a 5.8 con KOH 1 M antes de la esterilización.

6.2) Determinación del volumen de paquete celular (VPC)

Las muestras de 3 ml tomadas durante las cinéticas de crecimiento se centrifugan a 3500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Hermle Z400k con un rotor de columpio Hermle 221.08 V01. El volumen del paquete celular se determina de acuerdo a la graduación del tubo (VPC en μl/3 ml).

6.2.1) Determinación del peso seco

Las alícuotas del cultivo a las que se les determinó previamente el VPC, se filtran al vacío a través de un papel filtro Whatman[®] a peso constante, se secan en una estufa a 80° C por 24 h y se registra el peso. Por diferencia de pesos entre el papel y papel con muestra filtrada se obtiene el peso seco expresado en mg/3 ml (Dixon, 1985).

6.3) Determinación de la muerte celular

La muerte de las células de tabaco NT-1 fue evaluada mediante tinción con una solución al 0.5% de DFA (Diacetato de fluoresceína) disuelto en acetona, y almacenada a -20° C. Se agrega 5 µl de la solución en una relación 1:10 y se incuba 1 min (5 µl de solución: 45 µl de células). Las células viables se tiñen de color verde por la reacción de las esterasas con los grupos acetato del DFA (Smith *et al.*, 1982), mientras que las muertas permanecen sin cambios en presencia del colorante. Las preparaciones se observan en un microscopio de epifluorescencia Nikon® OPTIPHOT-2 modelo HD 10101AP, con lámpara de mercurio y filtros de luz UV para la proteína verde fluorescente (GFP) acoplado a una cámara fotográfica Nikon Coolpix S 10.

El porcentaje de muerte celular se determinó de la siguiente manera:

Muerte celular (%) = no. de células muertas / no. de células totales (100)

6.4) Tratamientos de cultivos NT-1 en carencia de sacarosa y de auxinas

La condición de inanición se indujo en células de tabaco NT-1 de un subcultivo de 5 ml de células de cuatro días de edad -que corresponde a la fase logarítmica en una cinética de crecimiento-, dichas células se lavaron tres veces con medio MS 1X sin vitaminas y auxinas para las muestras control o con el medio mencionado pero carente de sacarosa para los tratamientos en inanición. Después del tercer lavado, las células se inoculan en el medio apropiado y se dejan crecer por 72 h en las condiciones descritas anteriormente, se analiza el porcentaje de células en autofagia y la actividad autofágica relativa cada 24 h, tomando el día del lavado como t=0.

6.5) Tinción con MDC

La tinción se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Contento y colaboradores (2005). 1 ml de células de tabaco de los distintos tratamientos, se tiñen con monodansil cadaverina (MDC, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µM, posteriormente se incuban por 10 min en frío y oscuridad, seguido de dos lavados con un buffer de fosfatos salinos (PBS 1X) para remover el exceso del colorante. Las observaciones de las células, se realiza en un microscopio de epifluorescencia Nikon® OPTIPHOT-2 modelo HD 10101AP,

con lámpara de mercurio y filtros de luz UV para detectar longitudes de onda entre los 490 y 580 nm acoplado a una cámara fotográfica Nikon Coolpix S 10.

6.5.1) Determinación del porcentaje de células en autofagia

Inmediatamente después del lavado del paquete celular, se tomaron muestras de 5 ml y se crecen en tubos falcon de 50 ml. A partir de ese momento se tomaron alícuotas de 1 ml a las que se adiciona 2 μ l del inhibidor de proteasa de cisteína, E-64c (Invitrogen), a una concentración de 5 mM. Posteriormente, se procedió a la tinción con MDC. En las muestras, la concentración final para E-64c fue 10 μ M y de MDC 50 μ M. A los 4 ml restantes se adicionó 8 μ l de E-64c y se almacenaron en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente. Posterior a esto, se hicieron observaciones al microscopio de epifluorescencia, determinando el porcentaje de células en autofagia como el número de células teñidas entre el total de células analizadas por 100.

6.5.2) Determinación de la actividad autofágica relativa

De las células teñidas con MDC se tomaron fotografías en luz UV y visible, posteriormente se procedió a contar el número de autofagosomas en al menos 20 células y se obtuvo un promedio para determinar el número de autofagosomas por célula. Estos últimos datos corresponden a la actividad autofágica relativa normalizada respecto al control. El valor del control fue igual a 1 y sobre este valor, se calculó el número de veces que es mayor o menor el número de autofagosomas.

6.6) Cuantificación del peróxido de hidrógeno

La cuantificación se realizó de acuerdo a la reacción de guaiacol-peroxidasa reportado por Thordal-Christensen y col. (1997). La cual consiste en hacer reaccionar a la peroxidasa con el guaiacol en presencia de H_2O_2 . El producto de la reacción forma el tetra-guaiacol, compuesto que se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

6.7) Extracción del RNA

Se molieron 500 mg de células NT-1 con nitrógeno líquido, el polvo se transfirió a un tubo estéril y se agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen). Se homogenizó e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se 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. El sobrenadante se eliminó, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se dejó secar en campana de flujo laminar por 15 min, en seguida se resuspendió en 50 µl de agua grado biología molecular a 60°C por 10 min. Se agregaron 0.5 µl de inhibidor de RNasa y se almacenó a -20°C. La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa al 1% con 1 µl de gelred Biotium® 10000 X, tomando 1 µl de la muestra que se mezcló con 4 µl 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 2H₂O aforado a 500 ml) a 90 volts. Después de la corrida, el gel se observó en un transiluminador con luz UV. La cuantificación del RNA se realizó mezclando 1 µl de muestra con 999 µl de agua tridestilada, y la absorbancia (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: $\mu\text{g RNA/ml} = (\text{Abs } 260 \text{ nm}) (40) (1/1000)$.

6.7.1) Reacciones de RT-PCR

Se utilizó el Kit SuperScript III™ One-Step RT-PCR System with Platinum® *taq* DNA polymerase, en base a las especificaciones establecidas por la casa comercial Invitrogen™. Las reacciones se llevaron a un volumen total de 12.5 µl adicionando los siguientes componentes en un tubo Eppendorf estéril de 0.2 ml para PCR: 6.25 µl de buffer de reacción 2X, 0.5 µl del RNA (320 ng), 0.5 µl de oligonucleótidos sentido, 0.5 µl del antisentido a una concentración final de 5 pM, 0.25 µl de SuperScript III™ RT/Platinum® *taq* Mix, 4.5 µl de agua, para llevar a 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 la amplificación de cada gen.

6.8) Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación para todos los genes relacionados con autofagia (*ATGs*) fueron las mismas y se describen a continuación: 30 min a 55°C, 94°C por 5 min y 30 ciclos de 20 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 68°C. Mientras que para *ACTINA* usada como control de carga se emplearon las siguientes condiciones: 30 min a 50°C, 5 min a 94°C y 30 ciclos de 15 seg a 94°C, 1 min a 55°C y 45 seg a 68°C.

Todos los oligonucleótidos fueron específicos de las secuencias de tabaco. La amplificación de los cDNAs de *PI3K*, *ATG6* y *ATG8f* se realizó con las secuencias reportadas por Wang y colaboradores (2013), para la *ACTINA* se emplearon las secuencias reportados por Peña-Correa (2010) y para *ATG2*, *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* y *ATG9* se diseñaron en base a los cDNA reportados en el NCBI. En la siguiente tabla se enlistan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio:

Gen	Organismo	Acceso NCBI	Oligo Fw	Oligo Rv	Tamaño de amplificación
<i>PI3K</i>	<i>N. tabacum</i>	AY701317	5'-TTAGCAACTGGGCACGATGA-3'	5'-CGGTGGAAAGGGCTTAGGAT-3'	309 pb
<i>ATG2</i>	<i>N. tabacum</i>	JX175262	5'-ACTGACACTCTCTGGAATGC-3'	5'-GAAGATGAACCGCCAGATA-3'	476 pb
<i>ATG3</i>	<i>N. benthamiana</i>	AY701318	5'-TGGGAGAGTACGAGGAAACT-3'	5'-GGATCAAAGTCCATGGTGTAGT-3'	454 pb
<i>ATG5</i>	<i>N. benthamiana</i>	JX175258	5'-ATGAATATGTCCAACCTGACC-3'	5'-TCAACATCTCTCCACTTGTCC-3'	496 pb
<i>ATG6</i>	<i>N. benthamiana</i>	AY701316	5'-CCTTCTTCTCATAAATGGCTCA-3'	5'-AGACGGTTGCAGAAAGTGGC-3'	425 pb
<i>ATG7</i>	<i>N. benthamiana</i>	AY701319	5'-TCCTCTACGCCAGTCTTTAT-3'	5'-CCCAATCTCTGTGACCCATTT-3'	456 pb
<i>ATG8f</i>	<i>N. tabacum</i>	JX175260	5'-ATGGCAAAGAGTTCATTCAAGCAAG-3'	5'-TTACACCAAGTTGAGGTCGCCAAT-3'	369 pb
<i>ATG9</i>	<i>N. benthamiana</i>	JX175259	5'-CGCTAGTGGCCTTAACATATTC-3'	5'-GAGTCCATTCCATCCAACATAC-3'	334 pb
<i>ACTINA</i>	<i>N. tabacum</i>	X63603	5'-CCTCTTAACCCGAAGGCTAA-3'	5'-GAAGGTTGGAAAAGGACTTC-3'	469 pb

6.9) Análisis de datos

Se utilizó el programa STATISTICA ver 8.0 para analizar los resultados de los experimentos presentados mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía tomando en cuenta el error estándar y realizando una prueba de Tukey. Los asteriscos indican diferencia estadística de los tratamientos con respecto al control ($P \leq 0.05$).

VII) RESULTADOS

7.1) Crecimiento de los cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa

Se evaluó el efecto de la insulina sobre el crecimiento de cultivos de células de tabaco NT-1 en condiciones de inanición de sacarosa, debido a que previamente ha sido reportado que la adición de insulina favorece el crecimiento de dichos cultivos en presencia de la fuente de carbono (Fierro-Romero, 2012). Además, se ha mostrado que retirar la sacarosa disminuye el crecimiento y aumenta la degradación de proteínas (Rose *et al.*, 2006), por lo que fue de interés determinar el efecto de la insulina sobre la estimulación del crecimiento en condiciones de inanición. En la figura 7A y 7B, se puede observar que la insulina estimula el crecimiento evaluado por volumen de paquete celular y por peso seco, en tanto que la carencia de sacarosa lo inhibe.

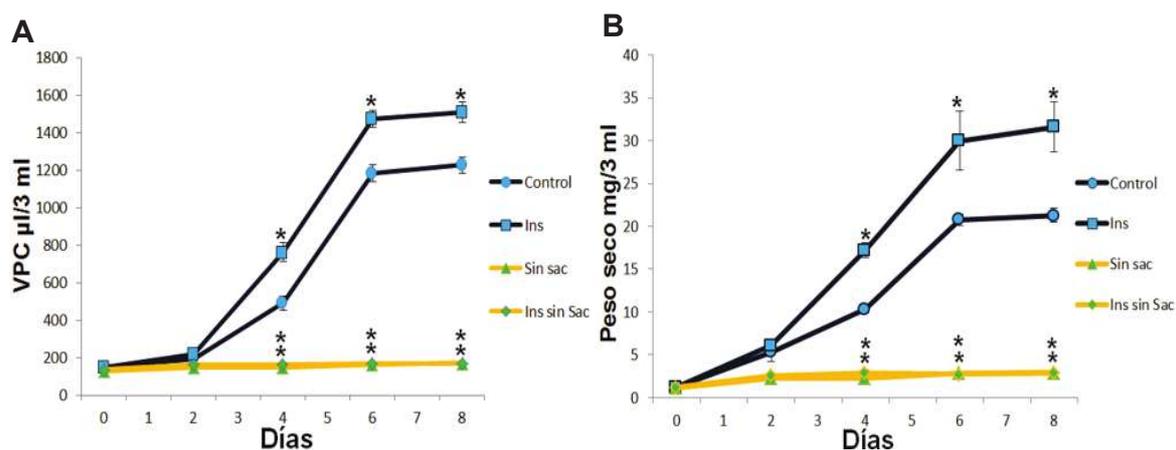


Figura 7. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en carencia de sacarosa. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) Volumen de paquete celular en cultivos suplementados con 1.23 nM de insulina y sin sacarosa y B) Peso seco en cultivos sin sacarosa y suplementados con 1.23 nM de insulina. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

7.1.1) Autofagia en cultivos de células NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa

En la literatura se ha reportado ampliamente que retirar la fuente de carbono del medio de cultivo induce la autofagia. (Takatsuka, *et al.*, 2004; Contento *et al.*, 2005), de ahí que para establecer los parámetros de evaluación de dicho proceso, en el presente estudio se realizaron experimentos en cultivos de células de tabaco NT-1 en carencia de sacarosa y presencia de insulina. En la figura 8A se observa que la ausencia de sacarosa aumenta la autofagia de forma significativa a partir de las 24 h, llegando a un máximo a las 48 h, mientras que la actividad autofágica relativa (Fig. 8B) aumentó a las 48 h, manteniéndose hasta las 72 h, lo que indica que la inanición de sacarosa produce una autofagia fuertemente activada. Inesperadamente en el tratamiento control, la insulina favoreció la autofagia (Fig. 8A y 8B) a partir de las 24 h, hecho contrario a lo reportado en mamíferos donde dicha hormona al activar la vía TOR, inhibe la autofagia (Klionsky, 2005). Para explicar este efecto y debido a que en *Arabidopsis*, y en *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha observado que la producción de especies reactivas de oxígeno induce la autofagia al inhibir a la cinasa TOR o, de manera independiente de esta última por la activación directa de componentes río abajo a TOR, como el complejo de cinasas ATG1/ATG13 o ATG4, se sugiere que esta inducción por insulina podría deberse a un aumento en la producción de ERO (Xiong *et al.*, 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2012a).

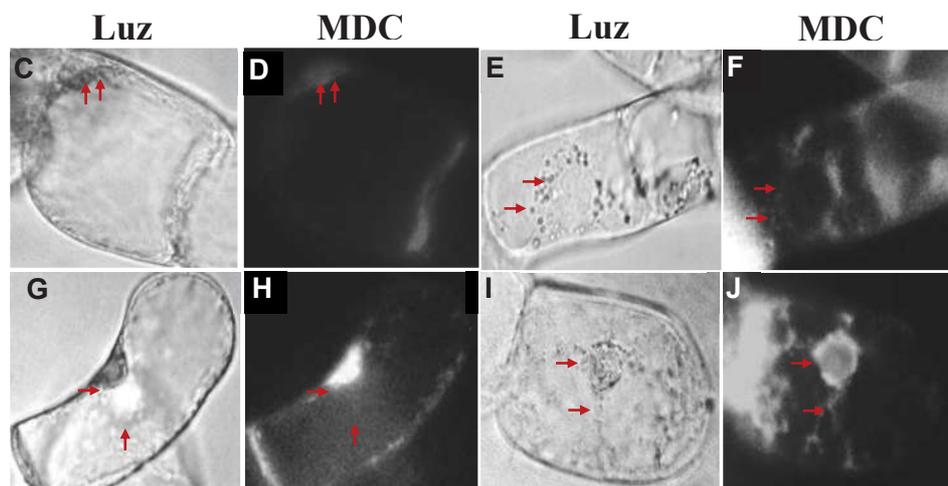
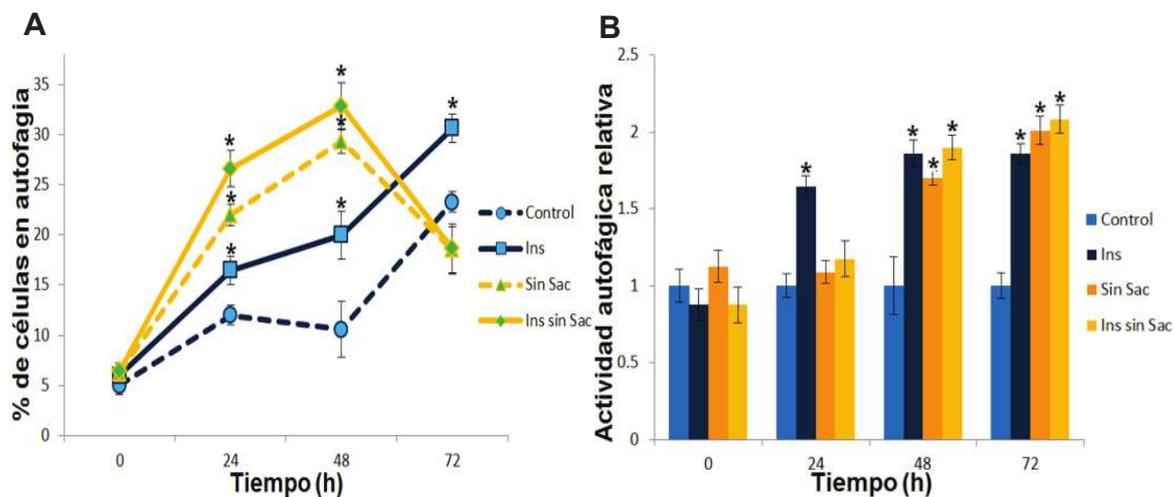


Figura 8. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y en carencia de sacarosa. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) Porcentaje de células en autofagia en cultivos sin sacarosa y suplementados con 1.23 nM de insulina; B) actividad autofágica relativa normalizada al control. Cuantificación de los autofagosomas de 20 células teñidas con MDC en los distintos tratamientos probados; C-J) fotos representativas de los diferentes tratamientos a las 48 h. C) Control campo claro; D) Control luz UV; E) Insulina campo claro; F) Insulina luz UV; G) Sin sacarosa campo claro; H) Sin sacarosa luz UV; I) Sin sacarosa + insulina campo claro; J) Sin sacarosa + insulina luz UV. Las flechas indican la presencia de autofagosomas. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

7.1.2) Muerte celular de los cultivos de células NT-1 en presencia de insulina y carencia de sacarosa

Debido a los resultados obtenidos sobre el crecimiento en los tratamientos sin sacarosa, se evaluó la muerte celular para determinar si dicha condición podría haber afectado el crecimiento por una disminución en la viabilidad celular. En la figura 9, se observa que en los tratamientos sin sacarosa, la insulina no presentó ningún efecto sobre la muerte celular. Sin embargo, el retirar la sacarosa del medio, ocasionó un aumento en la muerte celular de un 25% respecto al control.

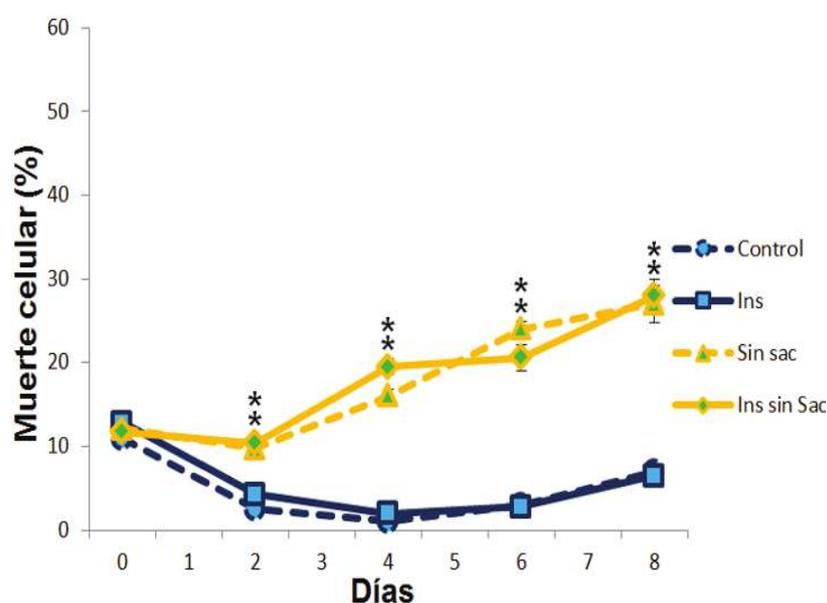


Figura 9. Muerte celular de los cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de sacarosa. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; $n=4$ STATISTICA ver. 8.0.

7.2) Crecimiento de los cultivos NT-1 en presencia insulina y carencia de auxinas

Como se ha reportado previamente la insulina favorece el crecimiento de cultivos celulares de tabaco NT-1 estimulando la división celular (Fierros-Romero, 2012). En cultivos en suspensión de tabaco se ha determinado que las auxinas a concentraciones menores a $1 \mu\text{M}$ promueven la elongación celular, mientras que a concentraciones mayores a $1 \mu\text{M}$ activan

la división celular (Nagata *et al.*, 2004); en este estudio, se evaluó si la insulina podía sustituir el efecto de las auxinas sobre el crecimiento de cultivos de células de tabaco NT-1. En la figura 10A y 10B, se puede observar en los cultivos sin auxinas una disminución en el crecimiento respecto al control, el cual no fue recuperado por la insulina. Sin embargo, en estudios previos (Fierros-Romero, 2012) y por análisis de las células al microscopio en los tratamientos sin auxinas o sin auxinas y suplementados con insulina, se observó la formación de estructuras similares a autofagosomas, por lo que en los siguientes experimentos se procedió a evaluar si en estas condiciones se podría inducir la autofagia.

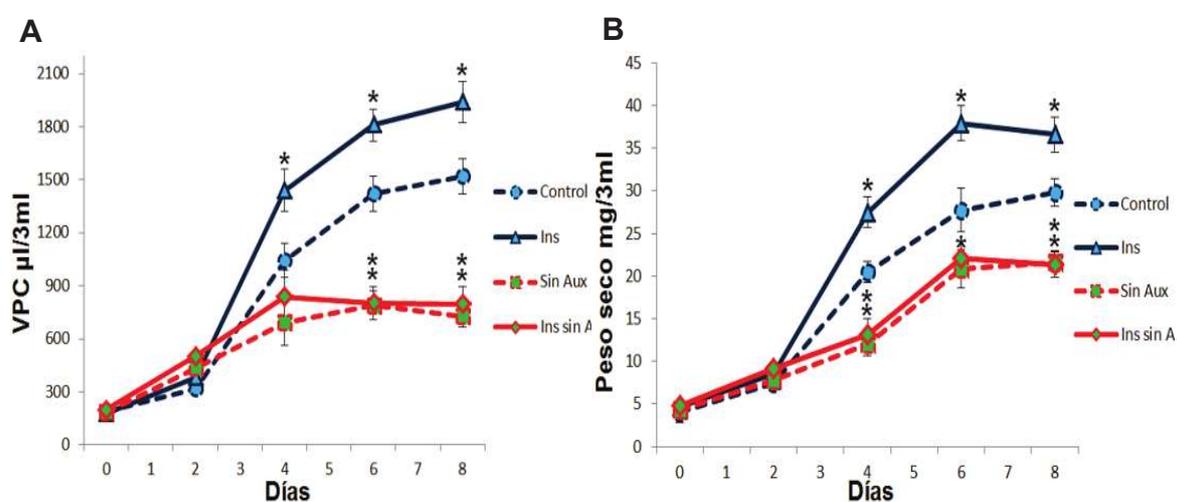


Figura 10. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en carencia de auxinas. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) VPC en cultivos sin auxinas; B) peso seco en cultivos en carencia de auxinas. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.2.1) Autofagia en cultivos de células NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

El proceso de autofagia se analizó en condiciones limitantes de auxinas, ya que en estudios preliminares en cultivos sin auxinas y en presencia de insulina se reportó la formación de estructuras similares a autofagosomas (Fierros-Romero, 2012). En la figura 11A, en cultivos sin auxinas y suplementados con insulina, se observó que el porcentaje de células en autofagia aumentó conforme transcurre el tiempo, mientras que la actividad autofágica

relativa (Fig. 11B) se incrementó alcanzando un máximo a las 24 h, donde se mantuvo hasta las 72 h (fotos representativas Fig. 11G-J). Los resultados antes mencionados podrían sugerir que la carencia de auxinas induce la autofagia posiblemente a través de la producción de ERO esto por el cambio de coloración observado en las células de crema a café. Respecto a la actividad autofágica relativa, se ha reportado que dicho parámetro llega a un punto máximo antes de la muerte celular. Además, en tabaco y *Arabidopsis* existen reportes en que la muerte celular programada (PCD) por una respuesta hipersensible (HR) altera los flujos iónicos, la producción ERO y de óxido nítrico para activar respuestas de defensa ante un estrés (McDowell y Dangl, 2000; Liu *et al.*, 2005). Cabe mencionar que la insulina en estos cultivos sin auxinas no mostró efecto aditivo sobre la autofagia.

Con base a los resultados antes mostrados, la hipótesis es que la producción de ERO podría ser la causa de la inducción de la autofagia, la cual se determinará con los experimentos posteriores.

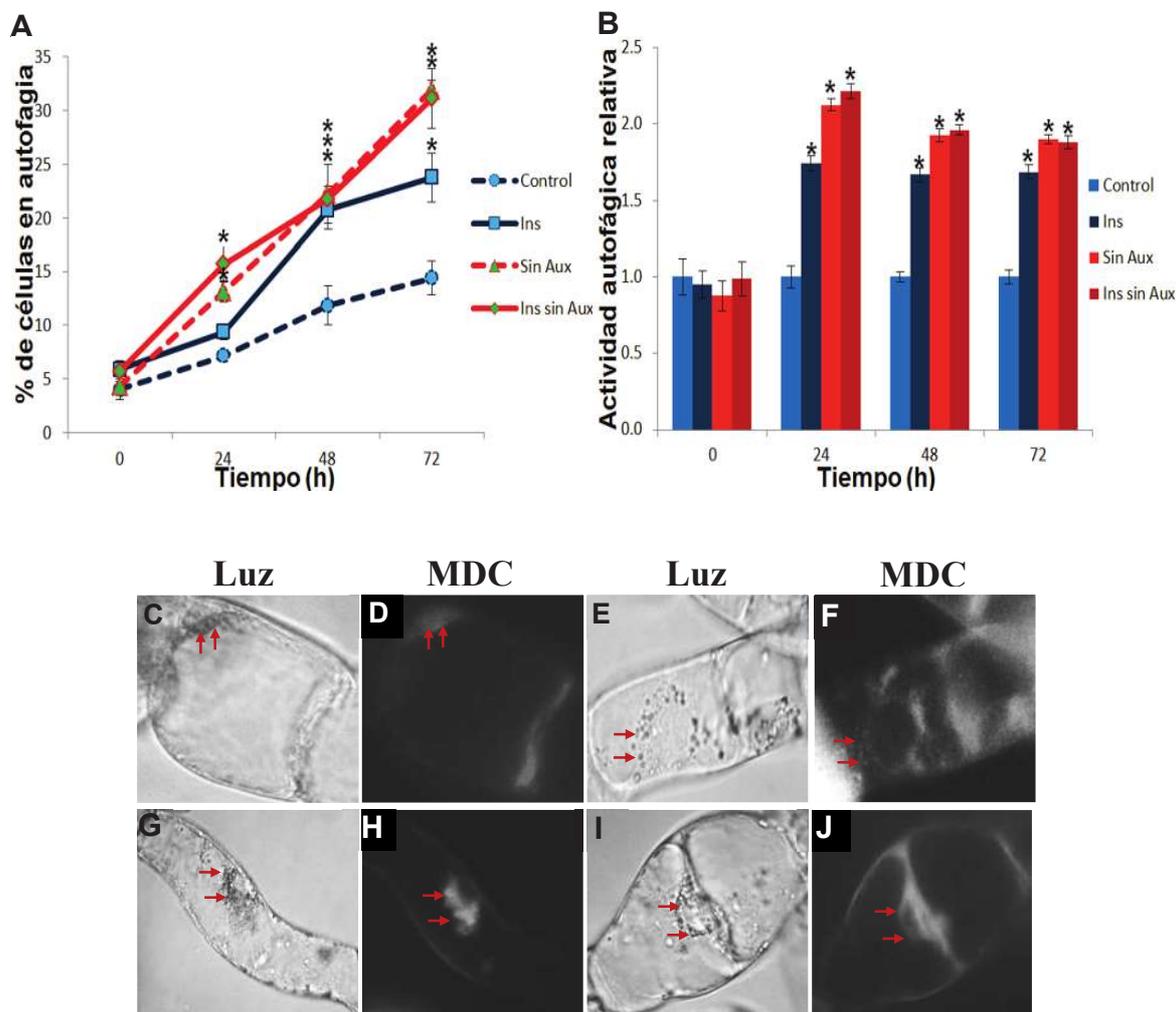


Figura 11. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) Porcentaje de células en autofagia en cultivos sin auxinas y suplementados con 1.23 nM de insulina; B) actividad autofágica relativa normalizada al control. Cuantificación de los autofagosomas teñidos con MDC en los tratamientos probados a un mismo tiempo, alrededor de 20 células fueron tomadas por cada tratamiento para contabilizar los autofagosomas; C-J) fotos representativas para cada tratamiento a las 48 h. C) Control campo claro; D) Control luz UV; E) Insulina campo claro; F) Insulina luz UV; G) Sin auxinas campo claro; H) Sin auxinas luz UV; I) Sin auxinas + insulina campo claro; J) Sin auxinas + insulina luz UV. Las flechas indican la presencia de autofagosomas. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.2.2) Producción de H₂O₂ en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

Para determinar si la insulina o la ausencia de las auxinas favorecen la autofagia por un incremento en la producción de ERO, se cuantificó la producción intracelular de H₂O₂ mediante la reacción de guaiacol-peroxidasa, en donde la enzima reacciona con el guaiacol en presencia de H₂O₂ formando un compuesto que puede ser medido por absorbencia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos indican que la insulina estimuló la producción de H₂O₂ de forma significativa a partir de las 48 hasta las 72 h respecto al control (autofagia basal) (Fig. 12). Los resultados anteriores correlacionan con la inducción de la autofagia, en donde al inicio se presentó una autofagia basal que se incrementó gradualmente desde las 48 hasta las 72 h, sugiriendo que la insulina activaría la autofagia a través de la producción de ERO, las cuales a su vez inhibirían a la cinasa TOR (Pérez-Pérez *et al.*, 2012a).

Por otra parte, la carencia de auxinas en el medio estimuló los niveles de H₂O₂ desde las 24 hasta las 72 h respecto al control (Fig. 12). La insulina en los cultivos sin auxinas mostró un aumento en el H₂O₂ similar al tratamiento donde solo se eliminan las auxinas, no observándose ningún efecto aditivo por la adición de insulina (Fig. 12). Estos resultados sugieren que tanto la adición de insulina en el medio de cultivo así como la inanición de auxinas favorecen la autofagia a través de la producción de H₂O₂.

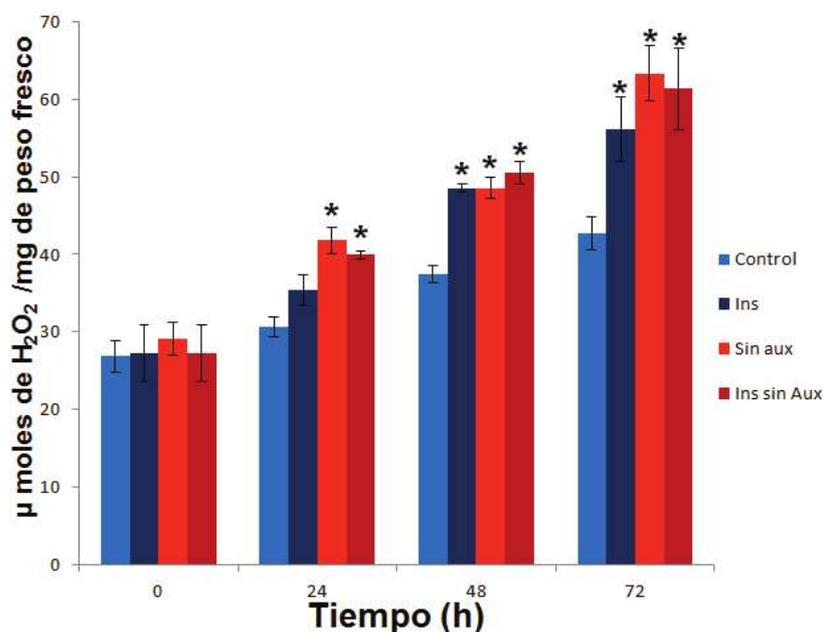


Figura 12. Producción de H_2O_2 en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. μ moles de H_2O_2 por mg de peso fresco en células molidas de cultivos tratados con 1.23 nM de insulina y en carencia de auxinas. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.2.3) Muerte celular de cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

Se evaluó la muerte celular para determinar si el retirar las auxinas podría afectar el crecimiento debido a un aumento en la muerte celular. En la figura 13, se observa que en los tratamientos sin auxinas, la insulina no mostró efecto sobre la muerte celular. Sin embargo, el retirar las auxinas del medio, ocasionó un incremento de un 45% en la muerte celular respecto al control.

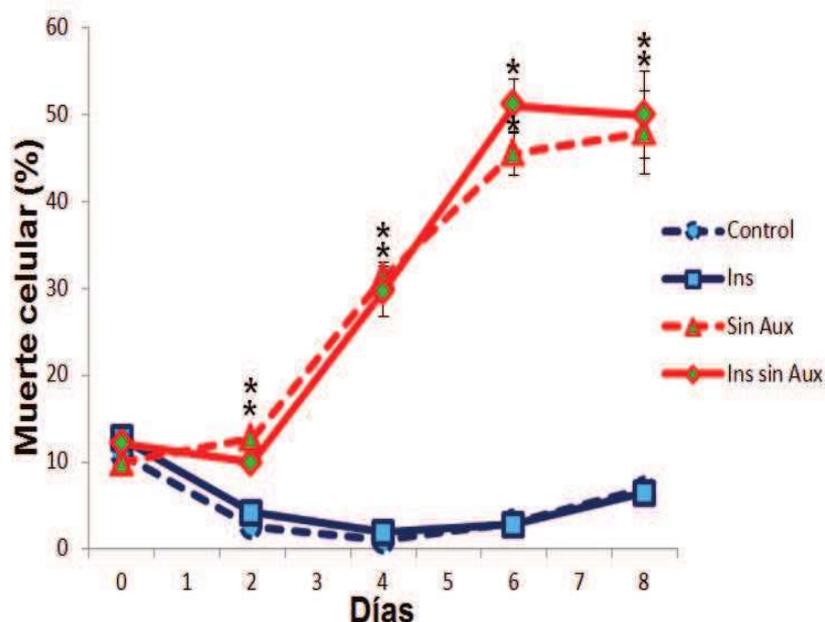


Figura 13. Muerte celular en cultivos celulares de tabaco NT-1 suplementados con insulina y carencia de auxinas. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.2.4) Expresión de los genes de autofagia *PI3K* y *ATG6* en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

En el presente estudio se analizó si la expresión de algunos genes *ATG* en presencia de insulina y en carencia de auxinas corroboraba la inducción de la autofagia, por la expresión de los genes *PI3K* y *ATG6* que forman un complejo esencial para la nucleación de los autofagosomas (Xie y Klionsky, 2007; Mizushima *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos muestran que *PI3K* (Fig. 14A), se expresa fuertemente a las 48 h en todos los tratamientos respecto al control, siendo mayor la expresión en los cultivos que carecen de auxinas. Para *ATG6* (Fig. 14B), el aumento en los niveles de expresión comienza a partir de las 24 h para los tratamientos sin auxinas incrementándose fuertemente a las 48 h y de forma más discreta en los cultivos suplementados con insulina. En conjunto esta expresión correlaciona con lo observado anteriormente con la tinción con MDC, donde la carencia de auxinas indujo de forma más marcada y a partir de las 24 h la

autofagia en comparación con la suplementación de insulina (determinado por porcentaje de células en autofagia), indicando que el complejo PI3K se activa en ambas condiciones.

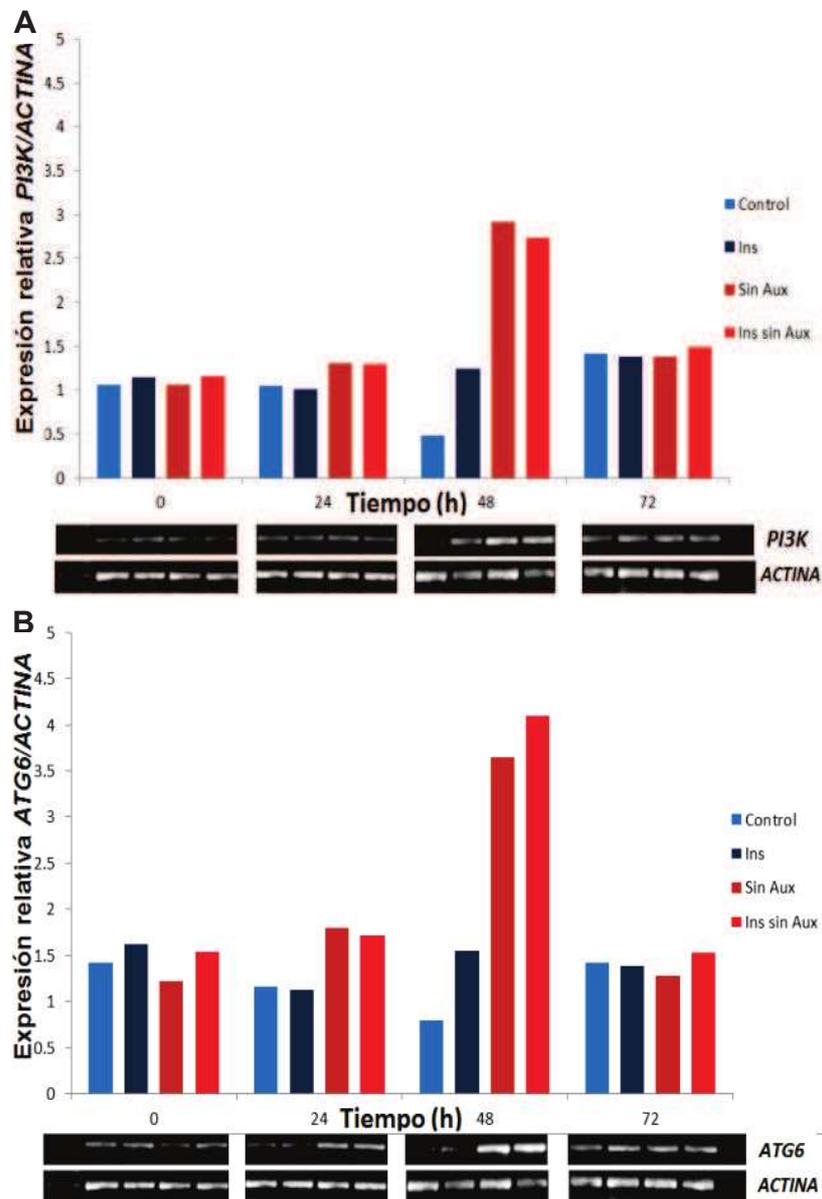


Figura 14. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de *PI3K* y de *ATG6*. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos: Control; Insulina 1.23 nM; Sin Auxinas y Sin Auxinas adicionados con 1.23 nM de insulina. Se tomó como 0 h el día del lavado, posteriormente cada 24 h se tomaron muestras hasta las 72 h, de las cuales se extrajo el RNA y se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes: A) *PI3K* (309 pb) y B) *ATG6* (425 pb). Las fotografías mostradas representan los productos de amplificación de cada gen (bandas superiores) en gel de agarosa al 1%, *ACTINA* fue utilizada como control de carga (bandas inferiores de 469 pb); n=2.

7.2.5) Expresión de los genes de autofagia *ATG2* y *ATG9* en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

En el proceso de autofagia, participa el complejo transmembranal *ATG9/ATG2/ATG18*, en donde *ATG9* es una proteína integral de membrana y se piensa que es un acarreador de membrana durante el ensamblaje del autofagosoma y se sabe, que *ATG9* se localiza en la estructura pre-autofagosomal (PAS), lo que es esencial para la formación del autofagosoma (Noda *et al.*, 2000). Por otro lado, *ATG2* y *ATG18* son dos proteínas de membrana que interactúan en la periferia con *ATG9*, su localización en la PAS depende una de la otra, y la interacción entre estas tres proteínas permite la liberación de *ATG9* para otra parte de la membrana, la ausencia de alguna de éstas resulta en la acumulación de *ATG9* en la PAS (Reggiori *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2007).

Estudios en *Arabidopsis*, indican que la expresión de *ATG9* y de *ATG18a* es necesaria para la inducción de la autofagia, además dicha expresión fue sobre regulada en una línea de baja expresión de *TOR* lo que indica que existe una autofagia activada de forma constitutiva (Liu y Bassham, 2010). Por otro lado, en *Nicotiana benthamiana* el gen *ATG9* se expresa en la noche durante la degradación de almidón lo que sugiere la participación de la autofagia para dicho proceso degradativo (Wang *et al.*, 2013), por lo que se decidió analizar si la insulina y carencia de auxinas modificaba la expresión de los genes *ATG2* y *ATG9*, integrantes del complejo transmembranal *ATG9/ATG18*. Se observa que a las 48 h en medio control la expresión de *ATG2* (Fig. 15A) prácticamente se abate, contrariamente a la expresión elevada en medio con insulina y en medio sin auxinas. No obstante, a las 72 h *ATG2* y *ATG9* (Fig. 15B) en medio con insulina y sin auxinas, muestran una expresión muy discreta, con una diferencia remarcable entre ambos genes en medio con insulina en comparación al resto de tratamientos; *ATG2* incrementa y *ATG9* disminuye. Tales resultados sugieren que el complejo transmembranal se activa en ambas condiciones (al retirar la auxina y en presencia de insulina). Interesantemente, la expresión disminuida de *ATG9* a las 72 h sugiere que la insulina podría estar deteniendo la formación de autofagosomas, debido a que *ATG9* proporciona las membranas que darán lugar a los autofagosomas.

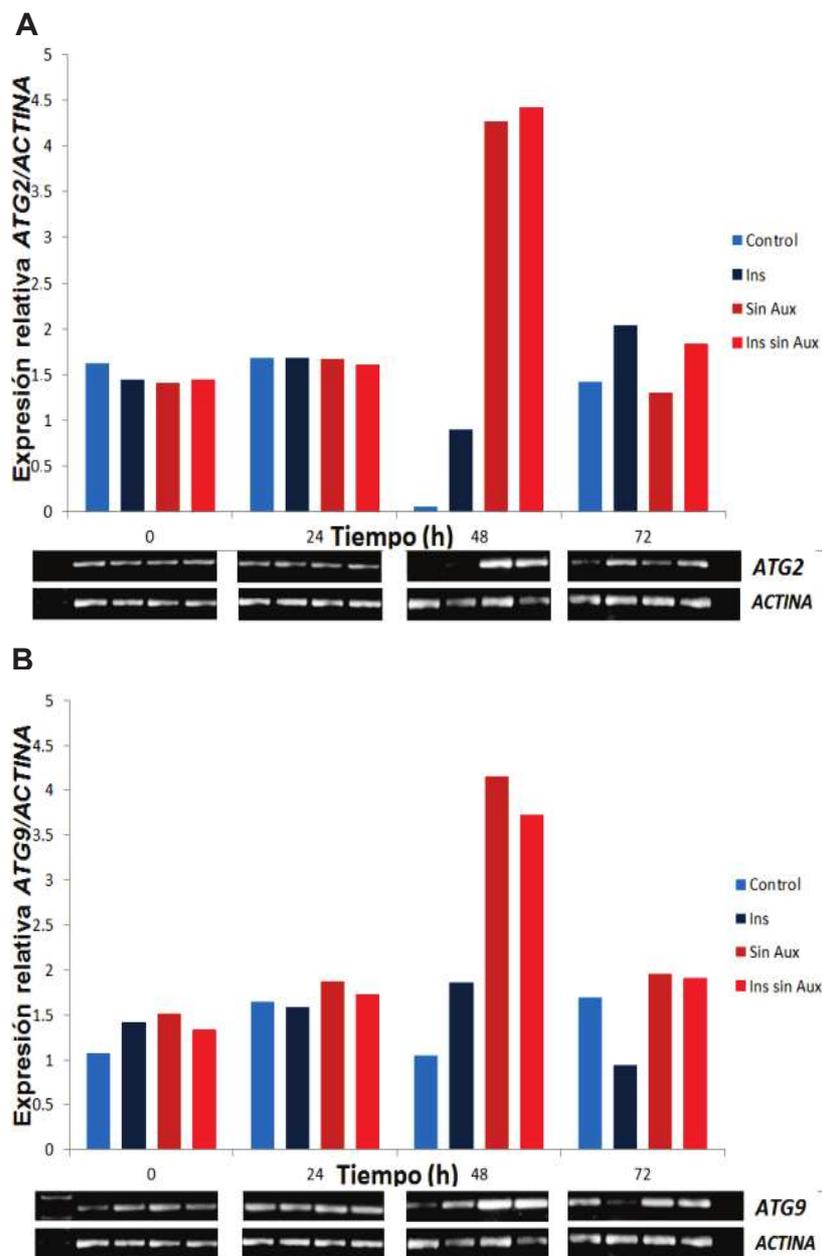


Figura 15. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de *ATG2* y *ATG9*. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos: Control; Insulina 1.23 nM; Sin Auxinas y Sin Auxinas adicionados con 1.23 nM de insulina. Se tomó como 0 h el día del lavado, posteriormente cada 24 h se tomaron muestras hasta las 72 h, de las cuales se extrajo RNA y se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes: A) *ATG2* (476 pb) y B) *ATG9* (334 pb). Las fotografías mostradas representan los productos de amplificación de cada gen (bandas superiores) en gel de agarosa al 1%, *ACTINA* fue utilizada como control de carga (bandas inferiores de 469 pb); n=2.

7.2.6) Expresión del gen de autofagia *ATG5* en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

Además de los genes antes mencionados se determinó la expresión de *ATG5* (Fig. 16), la proteína que expresa este gen participa en uno de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina en donde mediante reacciones enzimáticas se conjuga ATG12 con ATG5. El proceso comienza con la activación por ATG7 (primera enzima) que hidroliza ATP y así activa a ATG12 formando un puente tioéster entre la glicina del C-terminal de ATG12 y el sitio activo de cisteína de ATG7. Subsecuentemente, ATG12 activado es transferido al sitio activo de cisteína de ATG10 (segunda enzima), la cual cataliza la conjugación de ATG12 a ATG5 a través de la formación de un enlace isopeptídico entre la glicina activa de ATG12 y un residuo interno de lisina de ATG5. Finalmente ATG12-ATG5 es ensamblado con ATG16 y con esto se favorece la expansión del autofagosoma (Yang y Klionsky, 2009). En la figura 16 se observa que la expresión de *ATG5* se ve favorecida a las 48 h, especialmente en los cultivos sin auxinas. Por otro lado, la insulina favoreció la expresión a las 72 h lo que contrasta con el comportamiento de *ATG9* (Fig. 15), y sugiere que la insulina estimula la expansión de los autofagosomas.

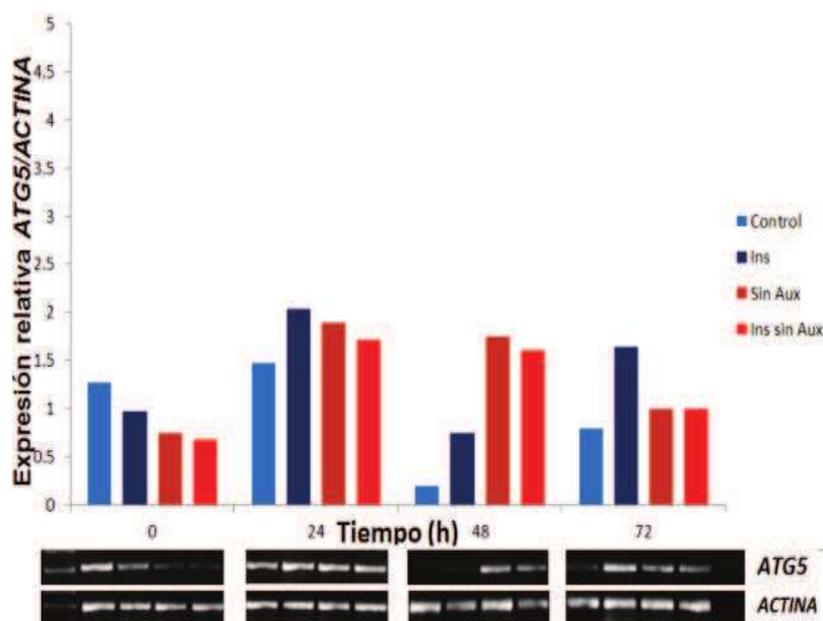


Figura 16. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de *ATG5*. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos: Control; Insulina 1.23 nM; Sin Auxinas y Sin Auxinas adicionados con 1.23 nM de insulina. Se tomó como 0 h el día del lavado, posteriormente cada 24 h se tomaron muestras hasta las 72 h, de las cuales se extrajo RNA y se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo del gen *ATG5* (496 pb). Las fotografías mostradas representan los productos de amplificación del gen (bandas superiores) en gel de agarosa al 1%, *ACTINA* fue utilizada como control de carga (bandas inferiores de 469 pb); n=2.

7.2.7) Expresión de los genes de autofagia *ATG3* y *ATG8f* en cultivos NT-1 en presencia de insulina y carencia de auxinas

Por último, del sistema de lipidación ATG8, se analizó la expresión de los genes *ATG3* (Fig. 17A) y *ATG8f* (Fig. 17B), en donde la conjugación de ATG8 con PE comienza con el corte en un residuo de arginina del C-terminal de ATG8 por la proteasa ATG4, este corte deja expuesta una glicina de ATG8 que es unida al sitio activo de cisteína de ATG7 (primera enzima). Posteriormente ATG8 es transferida a ATG3 (segunda enzima) y con esto se cataliza la conjugación de ATG8 con PE. ATG8-PE recubrirá el autofagosoma permitiendo el reconocimiento de este con la vacuola para su fusión (Yang y Klionsky, 2009). Los resultados muestran que la expresión de *ATG3* (Fig. 17A) aumentó a las 48 h en los tratamientos sin auxinas, mientras que la adición de insulina también incremento

ligeramente la expresión. Sin embargo, a diferencia de los tratamientos sin auxinas este aumento en el tratamiento con insulina se mantuvo a las 72 h, lo que sugiere que la insulina permite que continúe el recubrimiento de los autofagosomas con ATG8-PE y de esta manera la fusión con la vacuola. No obstante la expresión de *ATG8f* (Fig. 17B) no mostró diferencias marcadas.

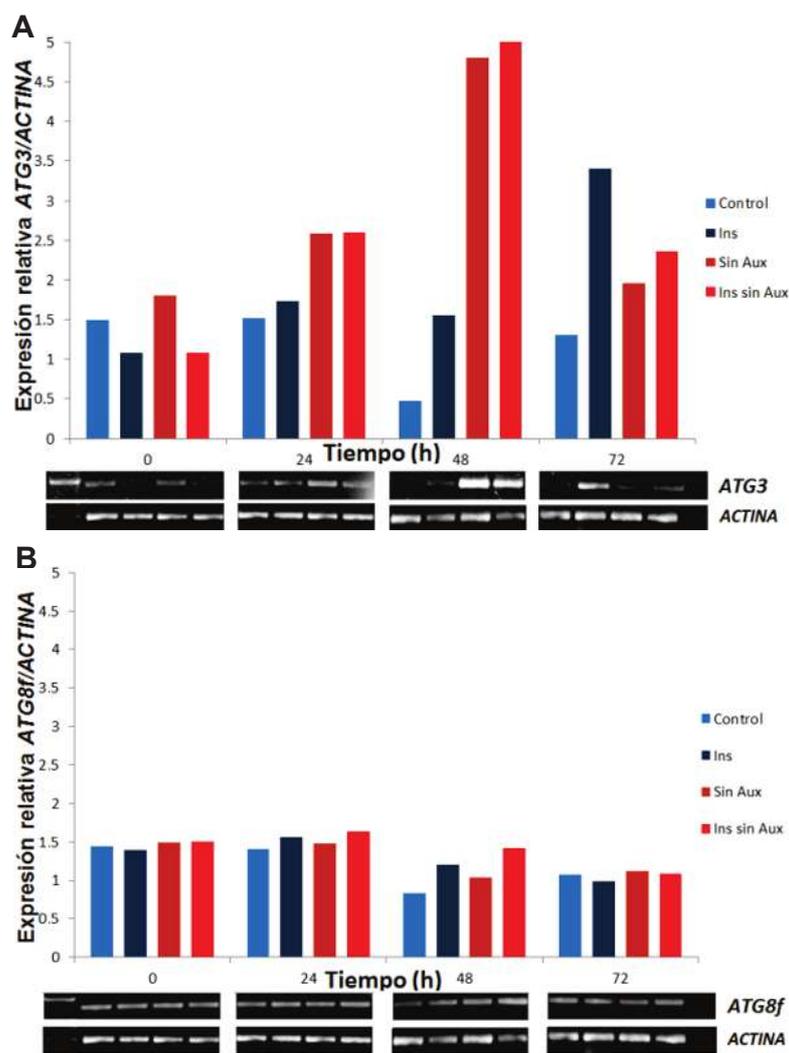


Figura 17. Efecto de la insulina y la carencia de auxinas sobre la expresión de *ATG3* y *ATG8f*. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos: Control; Insulina 1.23 nM; Sin Auxinas y Sin Auxinas adicionados con 1.23 nM de insulina. Se tomó como 0 h el día del lavado, posteriormente cada 24 h se tomaron muestras hasta las 72 h, de las cuales se extrajo RNA y se realizó un análisis de RT-PCR semi cuantitativo de los genes: A) *ATG3* (454 pb) y B) *ATG8f* (369 pb). Las fotografías mostradas representan los productos de amplificación de cada gen (bandas superiores) en gel de agarosa al 1%, *ACTINA* fue utilizada como control de carga (bandas inferiores de 469 pb); n=2.

7.3) Autofagia en cultivos de células NT-1 suplementados con insulina y en presencia de los inhibidores de las cinasas PI3K y de TOR

Para determinar el posible mecanismo por el cual la insulina podría activar la autofagia se evaluó el efecto de los inhibidores de las cinasas PI3K y TOR sobre el proceso de autofagia, ya que se ha reportado la participación de ambas cinasas en dicho proceso. La primera promoviendo la nucleación de los autofagosomas por la activación de PI3K o regulándola negativamente a través de la activación de TOR (Liu y Bassham, 2012). Con los resultados obtenidos (Fig. 18), se mostró que el LY294002 disminuyó el porcentaje de células en autofagia y la actividad autofágica relativa (fotos representativas Fig. 18G y 18H), lo que indica que la inhibición de PI3K (Vps34) impidió la nucleación de los autofagosomas y por lo tanto se detuvo la autofagia (Takatsuka *et al.*, 2004). Por otra parte, la rapamicina estimuló el porcentaje de células en autofagia y la actividad autofágica relativa (fotos representativas Fig. 18K y 18L), debido a que la inactivación de TOR estimula la autofagia a través de la activación del complejo de cinasas que participan en la fase previa a la nucleación de los autofagosomas (Liu y Bassham, 2012) (Fig. 18A y 18B). La insulina en los cultivos tratados con LY294002 (Fig. 18I y 18J) no favoreció el proceso de autofagia, probablemente debido a que esta hormona estimuló la producción de ERO y éstas podrían estar actuando río arriba a la cinasa TOR. En el proceso de autofagia PI3K se localiza río abajo de TOR y es importante para la nucleación de los autofagosomas, así que aunque esté presente el estímulo por insulina no se puede activar la autofagia en presencia del inhibidor LY294002. Por otro lado, en los cultivos tratados con rapamicina y en presencia de insulina se observó una mayor inducción de la autofagia evaluado como porcentaje de células en autofagia y actividad autofágica relativa (Fig. 18M y 18N) lo que sugiere que el efecto estimulador de la autofagia es independiente de la cinasa TOR.

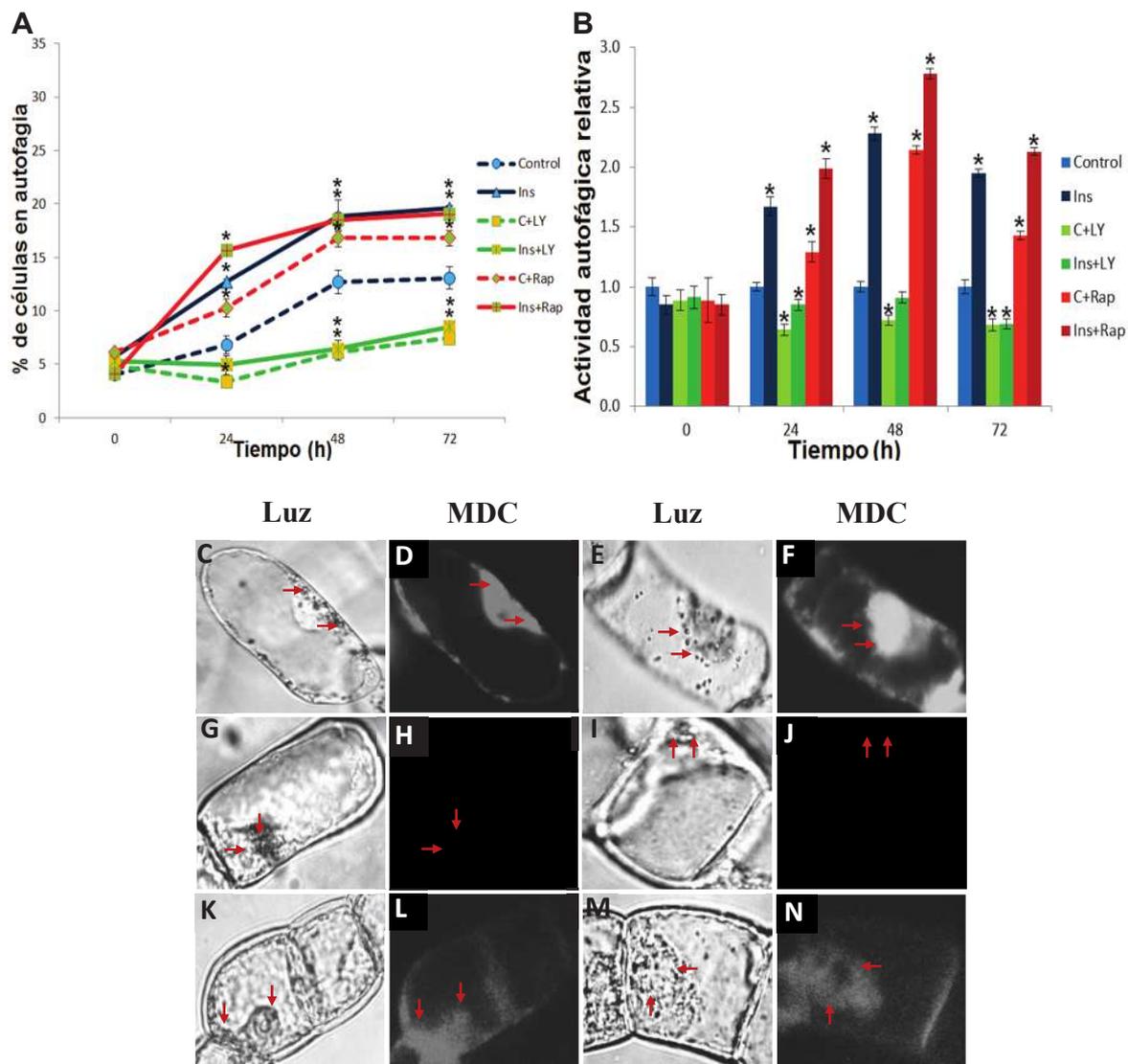


Figura 18. Autofagia en cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y de TOR. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) porcentaje de células en autofagia en cultivos tratados con LY294002 (10 μ M) y rapamicina (10 nM) en presencia de 1.23 nM de insulina; B) actividad autofágica relativa normalizada al control. Cuantificación de los autofagosomas teñidos con MDC en los tratamientos con LY294002 (10 μ M) y rapamicina (10 nM) y adicionados con 1.23 nM de insulina probados a un mismo tiempo, alrededor de 20 células fueron tomadas por cada tratamiento para contabilizar los autofagosomas; C-N) fotos representativas para cada tratamiento a las 48 h. C) Control campo claro; D) Control luz UV; E) Insulina campo claro; F) Insulina luz UV; G) Control + LY294002 campo claro; H) Control + LY294002 luz UV; I) Insulina + LY294002 campo claro; J) Insulina + LY294002 luz UV; K) Control + rapamicina campo claro; L) Control + rapamicina luz UV; M) Insulina + rapamicina campo claro; N) Insulina + rapamicina luz UV. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.3.1) Crecimiento de cultivos NT-1 suplementados con insulina y con los inhibidores de PI3K y de TOR

Debido a los resultados obtenidos sobre el aumento de autofagia en presencia de rapamicina y la disminución por el inhibidor de PI3K, se evaluó una posible correlación entre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 y la inducción de la autofagia, en presencia de los inhibidores antes mencionados.

Se observó que el crecimiento de los cultivos en presencia de LY294002 fue fuertemente inhibido (Fig. 19), desapareciendo por completo el efecto promotor del crecimiento promovido por la insulina. Mientras que, en el efecto de la rapamicina sobre el cultivo control y el suplementado con insulina, la disminución observada sobre el crecimiento por VPC fue discreta (Fig. 19A), y no se encontraron cambios en el crecimiento por peso seco (Fig. 19B). En el tratamiento con insulina en presencia de rapamicina, no se observó el efecto estimulador por la hormona, lo que muestra sensibilidad a este fármaco de los cultivos de tabaco NT-1, similar a lo observado en *Chlamydomonas reinhardtii* y maíz (Sánchez de Jiménez et al., 1999; Crespo et al., 2005).

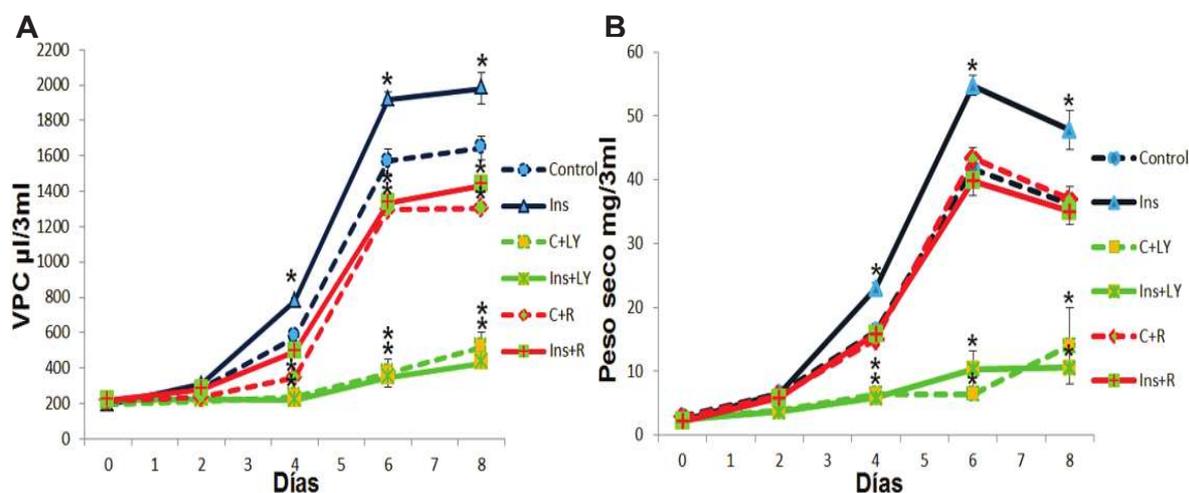


Figura 19. Efecto de la insulina sobre el crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y de TOR. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. A) y B) VPC y peso seco en cultivos tratados con 10 µM de LY294002 y con 10 nM de rapamicina respectivamente. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.3.2) Producción de H₂O₂ en cultivos NT-1 suplementados con insulina y con los inhibidores de PI3K y de TOR

Con base a los resultados obtenidos, se sugiere que la inducción de la autofagia por un aumento en los niveles de H₂O₂ se encuentra río arriba de ATG1 o ATG4 y estaría inactivando a TOR. Así que, para dilucidar el posible mecanismo se evaluó la producción de H₂O₂ en presencia de los inhibidores de PI3K y de TOR.

Los resultados obtenidos (Fig. 20) indican que la insulina estimuló la producción de H₂O₂ a partir de las 48 y hasta las 72 h (autofagia basal). Mientras que en presencia de LY294002 se mantuvieron los niveles igual al control, por lo que en este caso la cinasa PI3K no estaría participando en la producción de H₂O₂. La rapamicina, favoreció la producción de H₂O₂ de forma similar a los cultivos en presencia de insulina, lo que podría sugerir que el H₂O₂ induce la autofagia por un mecanismo dependiente a la inhibición de TOR. Sin embargo, como no se observó un efecto aditivo en el tratamiento dual con rapamicina e insulina, podría ser que el H₂O₂ no fuera el único mecanismo para la inducción de la autofagia.

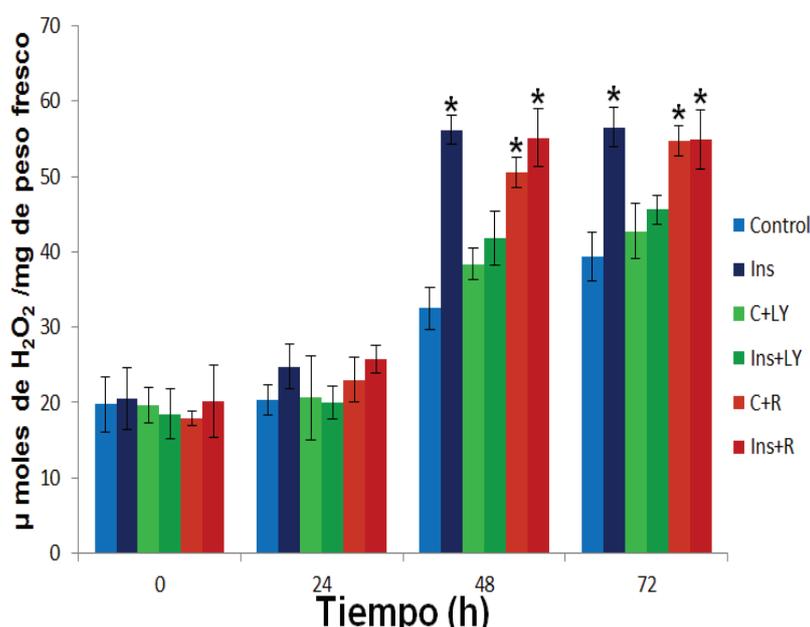


Figura 20. Producción de H₂O₂ en cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR. Los cultivos NT-1 fueron lavados después de 4 días de crecimiento y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. μ moles de H₂O₂ por mg de peso fresco en células molidas de cultivos tratados con insulina y suplementadas con 10 μ M de LY294002 y con 10 nM de rapamicina. ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

7.3.3) Muerte celular de los cultivos NT-1 suplementados con insulina y los inhibidores de PI3K y TOR

De los resultados obtenidos sobre el crecimiento en los tratamientos con los inhibidores, se encontró pertinente evaluar la muerte celular con DFA, para determinar si el LY294002 o la rapamicina podrían haber alterado el crecimiento por un aumento en la muerte celular. En la figura 21, se observa que en los cultivos en presencia de los inhibidores LY294002 y rapamicina, no se afectó de forma significativa la muerte celular, lo cual indica que el efecto de los inhibidores no fue causado por toxicidad.

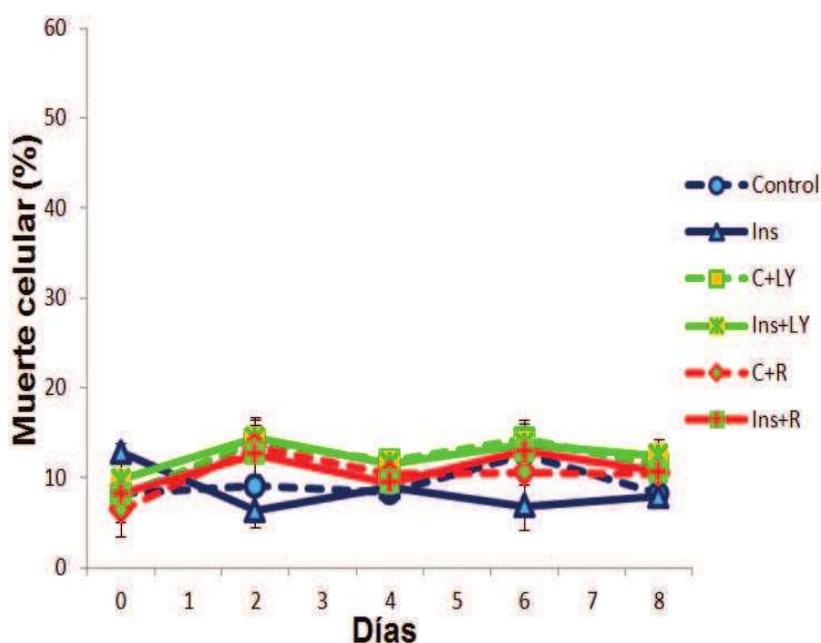


Figura 21. Muerte celular de los cultivos celulares de tabaco NT-1 en presencia de los inhibidores de PI3K y TOR. Los cultivos NT-1 en fase estacionaria (7 d) fueron lavados y las células se inocularon en cada uno de los tratamientos. Cultivos adicionados con insulina y con los inhibidores LY294002 (10 μ M) y rapamicina (10 nM). ANOVA Tukey $P \leq 0.05$ * diferencia significativa respecto al control; n=4 STATISTICA ver. 8.0.

VIII) DISCUSIÓN

En células vegetales, la autofagia funciona en respuestas de estrés a la disminución de la disponibilidad de nutrientes (carbono y nitrógeno), en defensa a patógenos y durante la senescencia. En cultivos de células de tabaco BY-2 y NT-1, ha sido ampliamente reportado que las auxinas regulan la proliferación celular a concentraciones de alrededor de 1 μM , mientras que a concentraciones menores a 1 μM regulan la elongación celular. Por lo que estos cultivos se han propuesto como un excelente modelo para estudiar el crecimiento dependiente de auxinas (Nagata *et al.*, 2004). Sin embargo, nada se conoce sobre la participación de las auxinas en el proceso de autofagia cuando se encuentran en concentraciones limitantes; debido a que en cultivos NT-1 sin auxinas en el medio y suplementados con insulina se observó la formación de estructuras similares a autofagosomas, procedimos a determinar si dichas condiciones favorecían la autofagia.

Los resultados obtenidos para las cinéticas de crecimiento evaluadas por volumen de paquete celular (Fig. 7A) y peso seco (Fig. 7B) muestran que la insulina en cultivos de células de tabaco NT-1 favorece el crecimiento y este mayor crecimiento es debido a un aumento en la proliferación celular (Fierros-Romero, 2012). Mientras que, la carencia de sacarosa del medio de cultivo, inhibió el crecimiento de las células (Fig. 7A y 7B), efecto semejante al reportado por Rose y col. (2006) en cultivos celulares de *Arabidopsis*, lo que muestra que la inanición por sacarosa causa un impacto fisiológico sobre el metabolismo basal y la producción de biomasa limitando el crecimiento. Sin embargo, la degradación de los componentes citoplásmicos permite el mantenimiento del metabolismo esencial impidiendo la muerte celular (Rose *et al.*, 2006).

Para determinar si la insulina promueve la formación de estructuras autofagosomales en plantas, se evaluó el efecto de esta hormona sobre la inducción de la autofagia y la actividad autofágica relativa, la cual refleja el número de autofagosomas por célula en los medios control y sin sacarosa (Fig. 8A y 8B). Inesperadamente, los resultados mostraron que la insulina favoreció el proceso de autofagia, contrario a lo que sucede en células animales, donde la hormona y factores de crecimiento parecidos a insulina activan a la cinasa PI3K clase I, y ésta a su vez inhibe a la cinasa TOR, la cual actúa como un regulador negativo de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000). Cabe mencionar, que a diferencia de

metazoarios las plantas únicamente tienen a PI3K clase III, así que, dicha cinasa se encuentra participando además de la vía PI3K/TOR/S6K, en la nucleación de los autofagosomas, por lo que posiblemente la insulina active a esta cinasa y con ello favorezca la autofagia. Respecto a la inducción de la autofagia mediante la inanición por sacarosa, los resultados del presente estudio concuerdan con un gran número de estudios en donde se observó que la carencia de sacarosa incrementa el número de células en autofagia, así como la actividad autofágica relativa y dicho aumento llega a un punto máximo, disminuyendo posteriormente debido a que las células comienzan a entrar en muerte celular por una degradación masiva de proteínas intracelulares (Fig. 9) (Liu *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2006; Hofius *et al.*, 2009; Takatsuka *et al.*, 2011). Sin embargo, la adición de insulina a cultivos sin sacarosa no mostró un efecto aditivo sobre el proceso de autofagia.

Se sabe que en mamíferos, las células integran información con respecto a la disponibilidad de nutrientes, la activación de receptores hormonales y de factores de crecimiento, el estrés, y el estatus energético a través de la vía de señalización PI3K/TOR/S6K activada por la insulina y, que estando activa TOR, la autofagia es inhibida (Rabinowitz y White, 2010). Como se menciono anteriormente, la insulina favorece el crecimiento de cultivos celulares de tabaco NT-1 al estimular la división celular y dicho efecto es dependiente de las auxinas (Fierros-Romero, 2012). Se determinó en que medida, la insulina como promotora del crecimiento celular podría revertir el efecto de inanición por auxinas. La carencia de auxinas (Fig. 10A y 10B), mostró una disminución en el crecimiento respecto al control, el cual no fue re-establecido por la insulina; una elongación celular y una disminución en la viabilidad a partir del cuarto día -característica de la carencia de auxinas-, coincidiendo con reportes donde en cultivos de tabaco, la carencia de auxinas detiene el ciclo celular en la fase G1, promueve la elongación de las células y finalmente la muerte celular (Mlejnek y Prochazka, 2002; Petrsek *et al.*, 2002).

Al analizar el proceso de autofagia en las células de los tratamientos sin auxinas o sin auxinas y suplementados con insulina, se observó que el porcentaje de células en autofagia aumentó conforme transcurre el tiempo (Fig. 11A), mientras que la actividad autofágica relativa (Fig. 11B) incrementó alcanzando un punto máximo a las 24 h, donde se mantuvo hasta las 72 h. Bajo ciertos estreses como la producción masiva de ERO, la célula regula de

forma coordinada la eliminación de componentes tóxicos mediante su degradación en vacuola o en lisosomas por autofagia, aunque el cruce de señales entre la autofagia y la señalización redox aún no es bien conocido (Minibayeva *et al.*, 2012). Como, la proteasa ATG4 presenta múltiples residuos de cisteína conservados en su estructura, se ha sugerido que podría funcionar como un sensor redox. En células animales ATG4, se ha mostrado que es un blanco directo para la oxidación por H_2O_2 , y que señales oxidativas conducen a la inactivación de ATG4 promoviendo con esto la lipidación de ATG8. Conforme madura el autofagosoma hacia la fusión con el lisosoma, su localización cambia a un ambiente con bajo contenido de H_2O_2 donde ATG4 es activo y puede deslipidar y reciclar a ATG8, lo antes mencionado ha permitido sugerir que las ERO funcionan como moléculas de señalización que disparan la autofagia como un mecanismo de sobrevivencia (Scherz *et al.*, 2007). Además, cuando la oxidación intracelular se eleva, existe una acumulación progresiva de proteínas oxidadas, orgánulos dañados y esto último representa una amenaza para la célula. La desregulación de la autofagia conduce a un incremento en el estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2012). En base a éstos antecedentes y a los resultados en carencia de auxinas, se sugiere que dichas condiciones inducen la autofagia posiblemente a través de la producción de ERO.

Respecto a la actividad autofágica relativa (Fig. 11B), se ha reportado que dicho parámetro llega a un punto máximo antes de la muerte celular. Al evaluar la muerte celular de los cultivos (Fig. 13) no se observó diferencia por la adición de insulina. Sin embargo, la carencia de auxinas en el medio de cultivo disminuyó en un 50% la viabilidad celular; como se mencionó antes, las auxinas participan en la progresión del ciclo celular y la carencia de ellas arresta el ciclo celular en la fase G1, además de que en su ausencia se activan proteasas tipo caspasas que inducen la apoptosis a partir del cuarto día (Mlejnek y Prochazka, 2002). El tema sobre la contribución de la autofagia en la muerte celular ha sido muy debatido, debido a que la autofagia destaca en el cruce entre la sobrevivencia y la muerte celular. La autofagia promueve la degradación de proteínas y orgánulos dañados durante el estrés oxidativo, pero también se activa como parte de programas de muerte celular, cuando el daño no puede ser reparado (Scherz *et al.*, 2007). De hecho algunos investigadores consideran a la autofagia como un tipo de muerte celular programada y otros como un regulador negativo de dicho proceso (Kang *et al.*, 2011).

El principal centro intracelular para la integración de señales relacionadas con autofagia es TORC1 (Efeyan y Sabatini, 2010). En presencia de nutrientes abundantes y de factores de crecimiento incluyendo la insulina, TORC1 promueve el crecimiento celular y la actividad metabólica con lo cual se suprime al complejo ULK (ATG1/ATG13 en plantas) y la autofagia. En privación o estrés, numerosas vías de señalización inactivan a la cinasa TORC1. Este cambio no sólo suprime el crecimiento de las células para reducir la demanda de energía sino que también induce la autofagia para permitir la adaptación al estrés y la sobrevivencia. Río arriba de TORC1 está la vía de detección de energía celular controlada por la proteína cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK). Altas concentraciones de AMP impiden la señalización energética, activan AMPK, e inhiben a TORC1, promoviendo con esto la autofagia (Shackelford y Shaw, 2009).

Por otro lado, la autofagia es importante para la regulación de la capacidad metabólica celular. Un ejemplo notable es la capacidad de las levaduras de vivir con metanol o ácidos grasos, sustratos que son quemados en los peroxisomas. Cuando existen mejores fuentes de carbono disponibles, los peroxisomas ya no son requeridos y son eliminados por autofagia. La función de la autofagia en la remoción de los peroxisomas está conservada desde levaduras hasta mamíferos (Oku y Sakai, 2010).

Además, la autofagia también se ha reportado que contribuye a la secreción de insulina y a la sensibilidad a la hormona. Esto es esencial para la salud de las células β del páncreas y para la expansión de la masa de células β que ocurre en respuesta a dieta alta en grasas (Ebato *et al.*, 2008). En los modelos genéticos y alimenticios de obesidad, se observa una disminución marcada de la autofagia, particularmente en los niveles de expresión de *ATG7* en el hígado y la supresión de dicho gen resultó en una resistencia a insulina. En contraste, la restauración de la expresión de *ATG7* en hígado, mejoró la acción de la insulina hepática, y en la tolerancia sistémica a la glucosa en ratones obesos. La acción benéfica de *ATG7* en ratones obesos puede ser completamente evitada por el bloqueo de un mediador río abajo, *ATG5*, soportando su dependencia en la autofagia regulada por la acción de la insulina (Yang *et al.*, 2009). En plantas, ha sido determinado recientemente que la autofagia contribuye a la degradación de almidón en hojas mediante el secuestro de pequeños granulos de almidón en la vacuola y posterior degradación. Además, con el uso de

inhibidores para la autofagia, líneas mutantes para genes *ATG* y análisis de los niveles de expresión de genes *ATG*, se determinó la participación de la autofagia en la degradación del almidón durante la noche. Los niveles de expresión de los genes *ATG2*, *ATG4*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG9* y *PI3K* de tabaco fueron analizados, encontrando que la expresión de *ATG6*, *ATG7*, *ATG9* y *PI3K* aumentó en tiempos tempranos de adaptación a la oscuridad y posteriormente disminuyeron a niveles basales lo que sugiere que la maquinaria autofágica se activó bajo dicha condición (Wang *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se observó que en el tratamiento control, la insulina favoreció la autofagia (Fig. 11), este hecho fue contrario a lo reportado en mamíferos donde dicha hormona inhibe la autofagia a través de la activación de la vía PI3K/TOR (Klionsky, 2005; Rabinowitz y White, 2010). Sin embargo, en *Arabidopsis*, y el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha observado que la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) induce la autofagia por inhibición de la cinasa TOR o de manera independiente de esta última, por la activación directa de componentes río abajo a TOR (Scherz *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2012b). Mientras que, en nuestro grupo de trabajo se ha observado que la adición de insulina además de promover el crecimiento, induce la producción de H₂O₂, esto sugiere que el mecanismo por el cual la insulina activa la autofagia podría involucrar la producción de H₂O₂.

En mamíferos, muchas de las vías que controlan la autofagia son desreguladas en cáncer, y los blancos terapéuticos contra el cáncer están dirigidos hacia la activación de la autofagia, debido a que promueve la homeostasis metabólica y previene las enfermedades degenerativas. Algunos de ellos actúan directamente mediante la inhibición de TOR, mientras que otros inhiben vías de señalización o de nutrientes. Una posibilidad particularmente interesante es que la autofagia favorece la sobrevivencia de células tumorales. Si esto es correcto, entonces la inhibición de la autofagia podría sinergizar con los tratamientos de cáncer existentes (White y DiPaola, 2009; Rabinowitz y White, 2010).

En tabaco y *Arabidopsis* se sabe que la muerte celular programada (PCD) por una respuesta hipersensible (HR) altera la producción ERO, mimetizando el silenciamiento de algunos componentes de la vía de autofagia como son *ATG6*, *Vps34*, *ATG3* y *ATG7* (McDowell y Dangl, 2000; Liu *et al.*, 2005).

Mientras que en nuestro estudio, la producción de H_2O_2 (Fig. 12), estimulada por insulina fue significativa a partir de las 48 y hasta las 72 h respecto al control (autofagia basal). Estos resultados correlacionan con la inducción de la autofagia, en donde al inicio se presentó una autofagia basal que se incrementó gradualmente desde las 48 hasta las 72 h, sugiriendo que la insulina activa la autofagia a través de la producción de ERO, las cuales a su vez inhibirían a la cinasa TOR, o por un mecanismo independiente de TOR activarían a ATG1 o a la proteína ATG4. Esta última en otros eucariontes se ha propuesto como integradora de las señales redox porque es rica en residuos de cisteína y este aminoácido es sensible a las ERO (Scherz et al., 2007; Pérez-Pérez *et al.*, 2012b). Por otra parte, la carencia de auxinas estimuló la producción de H_2O_2 desde las 24 hasta las 72 h (Fig. 12). El adicionar insulina a los cultivos en carencia de auxinas no mostró ningún efecto aditivo en la producción de H_2O_2 (Fig. 12). Estos resultados sugieren que tanto la adición de insulina como la inanición por auxinas favorecen la autofagia a través de la producción de H_2O_2 .

Actualmente, independientemente del organismo se sabe que la inducción de la autofagia requiere la activación del complejo de la fosfatidil inositol 3-cinasa de la clase III (PI3K), el cual está involucrado tanto en la regulación de la actividad de TOR como en la formación del autofagosoma. El complejo PI3K está compuesto de tres subunidades conservadas, la subunidad catalítica PI3K (Vps34), una cinasa activadora Vps15 que ancla el complejo a la membrana, y ATG6 que actúa como un andamio para la actividad de PI3K. El complejo PI3K enriquece la membrana que dará lugar al autofagosoma con fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P). Se ha determinado que las membranas ricas en PI3P participan directamente en el tráfico a la vacuola (Kim *et al.*, 2001; Backer, 2008; Hayward y Dinesh-Kumar, 2011).

Como mediante el colorante MDC, se observó un aumento en la inducción de la autofagia y en la actividad autofágica relativa (Fig. 11), para determinar de forma específica si la carencia de auxinas y la presencia de insulina en el medio de cultivo involucraba la etapa de nucleación de autofagosomas se evaluó la expresión de los genes *PI3K* y *ATG6*. Dichos genes forman un complejo esencial para la nucleación de los autofagosomas (Xie y Klionsky, 2007; Mizushima *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Para *PI3K*, existe una fuerte expresión a las 48 h en todos los tratamientos (Fig. 14A), siendo mayor en los cultivos sin

auxinas. Mientras que para *ATG6* (Fig. 14B), el aumento en los niveles de expresión comienza a partir de las 24 h para los tratamientos sin auxinas incrementándose fuertemente a las 48 h y, de forma más discreta para el tratamiento sólo con insulina; lo que muestra una correlación con los datos observados por el colorante MDC e indica que el complejo PI3K se encuentra activo.

Posteriormente en el proceso de autofagia, participa el complejo transmembranal ATG9/ATG2/ATG18, en donde ATG9 es una proteína integral de membrana y se piensa que es un acarreador de membrana durante el ensamblaje del autofagosoma (Noda *et al.*, 2000). Se sabe que, ATG9 localiza en la estructura pre-autofagosomal (PAS), esencial para la formación del autofagosoma. Asimismo, ATG2 y ATG18 son dos proteínas de membrana que interactúan en la periferia con ATG9, su localización en la PAS depende una de la otra, y la interacción entre estas tres proteínas permite la liberación de ATG9, la ausencia de alguna de éstas resulta en la acumulación de ATG9 en la PAS (Reggiori *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2007). Estudios en *Arabidopsis*, indican que la expresión de *ATG9* y de *ATG18a* son necesarias para la inducción de la autofagia, además, dicha expresión fue sobre regulada en una línea de baja expresión de *TOR* lo que indica que existe una autofagia activada de forma constitutiva (Liu y Bassham, 2010). Por otro lado, estudios recientes en *Nicotiana benthamiana*, indican que el gen *ATG9* se expresa en la noche durante la degradación de almidón lo que sugiere la participación de la autofagia en dicho proceso degradativo (Wang *et al.*, 2013). Bajo nuestras condiciones de trabajo se pudo observar tanto para *ATG2* (Fig. 15A) como para *ATG9* (Fig. 15B) un aumento en los niveles de expresión a las 48 h siendo más marcado en los tratamientos a los cuales se les retiraron las auxinas del medio, que aquél al que se le adicionó insulina, indicando que el complejo transmembranal se activa al retirar auxinas y suplementar con insulina. Sin embargo, la expresión de *ATG9* disminuyó a las 72 h en el tratamiento con insulina con respecto al control lo cual podría indicar que está deteniendo la formación de autofagosomas en dicho tratamiento, debido a que *ATG9* proporciona las membranas que darán lugar a los autofagosomas.

Además de los genes antes mencionados se determinó la expresión de *ATG5* (Fig. 16), por su participación en un sistema de conjugación tipo ubiquitina en donde mediante reacciones enzimáticas se da la conjugación de ATG12 con ATG5, comenzando con la activación por ATG7 (primera enzima) la cual hidroliza ATP y con esto activa a ATG12 a través de la formación de un puente tioéster entre la glicina del C-terminal de ATG12 y el sitio activo de cisteína de ATG7. Subsecuentemente, ATG12 activado es transferido al sitio activo de cisteína de ATG10 (segunda enzima), la cual cataliza la conjugación de ATG12 a ATG5 a través de la formación de un enlace isopeptídico entre la glicina activa de ATG12 y un residuo interno de lisina de ATG5. Finalmente ATG12-ATG5 es ensamblado con ATG16 y esto se permite la expansión del fagóforo (Yang y Klionsky, 2009). La expresión de *ATG5* (Fig. 16) se estimuló sólo a las 48 h en los cultivos sin las auxinas. Sin embargo, la insulina incrementó su expresión a las 72 h, lo que contrasta con *ATG9* y podría indicar que los autofagosomas formados presentan una mayor expansión debido a la participación de *ATG5* en dicho proceso.

Por último, del sistema de lipidación ATG8, se analizó la expresión de los genes ATG3 (Fig. 17A) y ATG8f (Fig. 17B). La expresión de ATG3 se incrementó a las 48 h tanto en los tratamientos sin auxinas como con insulina, aunque la insulina lo estimuló hasta las 72 h, lo que podría sugerir que dicha hormona permite que continúe el recubrimiento de los autofagosomas con ATG8-PE y de esta manera la fusión con la vacuola. No obstante, la expresión de ATG8f no mostró diferencias marcadas, lo cual podría atribuirse a que cualquier otro miembro de la familia de ATG8 (ATG8a-ATG8i) podría estarse expresando bajo las condiciones analizadas (Doelling *et al.*, 2002).

En otro orden de ideas, se sabe que la autofagia puede ser estudiada mediante varias estrategias, tanto farmacológicas como genéticas; en 1982 Seglen y Gordon, realizaron una búsqueda de compuestos químicos con la capacidad de inhibir la autofagia en hepatocitos de ratas, encontrando que 3-Metiladenina (3-MA) es un potente inhibidor de la autofagia. Este compuesto bloquea la formación de autofagosomas e inhibe eficientemente la degradación de proteínas intracelulares sin afectar su síntesis, la degradación de proteínas eliminadas por endocitosis y los niveles intracelulares de ATP. Los efectos de 3-MA son

reversibles después de lavar las células. Desde entonces, 3-MA ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor de la autofagia en células de mamífero. Dicho inhibidor actúa sobre la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), además, recientemente se han utilizado wortmanina y LY294002 cuyo blanco es PI3K, para bloquear el proceso de autofagia en hepatocitos de rata y también en cultivos celulares de tabaco en inanición de sacarosa (Blommaert *et al.*, 1997; Takatusuka *et al.*, 2004).

El uso de inhibidores ha sido empleado para demostrar la inhibición o estimulación de la autofagia, sin embargo la mayoría de los inhibidores químicos para autofagia no son completamente específicos. Ya que la autofagia es un proceso en multipasos, ésta puede ser inhibida en diferentes estadios. Entre los compuestos que inhiben la autofagia están el 3-MA, LY294002 y wortmanina, cuyos efectos recaen sobre las PI3K clase I y III. Las enzimas de la clase I generan productos que inhiben la autofagia, mientras que las de clase III proporcionan moléculas que estimulan la autofagia. El efecto global de estos inhibidores es bloquear la autofagia debido a que las enzimas clase III son requeridas para activar este proceso actuando río abajo de las enzimas clase I (Klionsky *et al.*, 2008). Por otro lado, el inductor de autofagia más específico y normalmente utilizado es la rapamicina, el cual inhibe a la cinasa TOR (Kamada *et al.*, 2000).

Para establecer el posible mecanismo por el cual la insulina podría estar activando la autofagia se usaron los inhibidores de las cinasas PI3K y TOR. La participación de dichas cinasas en este proceso ha sido reportada por Liu y Bassham (2012). También se ha observado que la autofagia puede ser estimulada por las ERO de manera dependiente o independiente de la activación de TOR (Pérez-Pérez *et al.*, 2012a). Los resultados obtenidos (Fig. 18A y 18B), mostraron que el LY294002 disminuyó el porcentaje de células en autofagia y la actividad autofágica relativa, debido a que la inhibición de PI3K (Vps34) impide la nucleación de los autofagosomas y por lo tanto detiene la autofagia (Takatsuka *et al.*, 2004). Mientras que la rapamicina estimuló el porcentaje de células en autofagia y la actividad autofágica relativa; la inhibición de TOR estimula la autofagia a través de la activación de un complejo de cinasas que participa en la fase previa a la nucleación de los autofagosomas (Klionsky, 2005; Liu y Bassham, 2012) (Fig. 18A y 18B). La insulina en los cultivos tratados con LY294002 no favoreció el proceso de autofagia,

probablemente porque al ser estimulada la producción de ERO por la hormona éstas actúan sobre TOR, y en la autofagia PI3K se localiza río abajo de TOR, por lo que aunque esté presente el estímulo por insulina no se activa la autofagia en presencia de LY294002. En los cultivos tratados con rapamicina y en presencia de insulina se observó una mayor inducción de la autofagia lo que sugiere que el efecto promotor de la autofagia por insulina es independiente de la activación de TOR debido a que se observó un efecto aditivo al adicionar la rapamicina.

Para correlacionar el proceso de autofagia con el crecimiento de dichos cultivos se observó que el LY294002 inhibió fuertemente el VPC (Fig. 19A), y que la insulina en presencia del inhibidor no lo estimuló. En el tratamiento con rapamicina, la disminución de dicho parámetro fue más discreta. Sobre el peso seco (Fig. 19B), el inhibidor de PI3K mostró una disminución muy marcada en este parámetro; sin embargo, la rapamicina no presentó efecto sobre dicho parámetro coincidiendo con otros estudios en cultivos en suspensión y en plántulas de *Arabidopsis* en donde se presenta insensibilidad a la rapamicina (Turck *et al.*, 2004; Sormani *et al.*, 2007). Sin embargo, en el tratamiento con insulina en presencia de rapamicina, no se observó el efecto estimulador de la hormona, lo que muestra cierto grado de sensibilidad a este fármaco de los cultivos de tabaco NT-1, similar a lo observado en *Chlamydomonas reinhardtii* y maíz (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 2005).

Al analizar si el efecto observado sobre la inducción de la autofagia se debía a la inhibición de la cinasa TOR por el aumento en la producción de H₂O₂ y para determinar si la inhibición de PI3K favorecía la producción de ERO se probaron los inhibidores de dichas cinasas (Fig 20). Se observó que la adición de LY294002 aumentó discretamente la producción de H₂O₂ con respecto al control, lo que podría deberse a la participación de PI3K en la movilización del H₂O₂ relacionado con el crecimiento en punta en *Arabidopsis* y que su inhibición acumula H₂O₂ (Lee *et al.*, 2008). La presencia de insulina no tuvo un efecto aditivo. La adición de rapamicina, inhibidor de TOR, favoreció la producción de H₂O₂ de forma similar a cuando se adiciona insulina, lo que sugiere que el H₂O₂ induce la autofagia por un mecanismo dependiente de la inhibición de TOR, sin embargo no se observó un efecto aditivo en el tratamiento dual con rapamicina e insulina posiblemente

porque la autofagia llega a un punto máximo previo a la inducción de la muerte celular (Scherz *et al.*, 2007). Al analizar la muerte celular en los cultivos en presencia de los inhibidores LY294002 y rapamicina (Fig. 21), se determinó que dichos compuestos no la afectaron de forma significativa, lo cual muestra que el efecto observado por los inhibidores no fue causado por su toxicidad.

IX) CONCLUSIONES

La insulina y la carencia de auxinas en los cultivos NT-1 estimularon la autofagia por un incremento en los niveles de H_2O_2 .

La estimulación de la autofagia por efecto de la insulina es mediante el H_2O_2 de manera independiente de la activación de TOR.

La insulina presenta una acción protectora sobre el crecimiento celular a través del peróxido de hidrógeno como molécula de señalización de autofagia.

X) PERSPECTIVAS

Con el objetivo de determinar si más de una ERO participa en la inducción de la autofagia, se debe evaluar la formación de otras ERO diferentes al H₂O₂ en cultivos suplementados con insulina y en carencia de auxinas, mediante el uso del colorante H₂DFDA.

Evaluar los niveles de expresión de los genes *PI3K*, *ATG6*, *ATG2*, *ATG9*, *ATG5*, *ATG3* y *ATG8f* en los tratamientos con los inhibidores LY294002 y rapamicina.

Analizar la inducción de la autofagia en cultivos de células de tabaco suplementados con insulina y en carencia de auxinas, mediante la línea marcadora de autofagosomas ATG8-GFP y microscopía confocal.

Evaluar el efecto de agentes antioxidantes y oxidantes sobre el proceso de autofagia en cultivos NT-1 suplementados con insulina y en carencia de auxinas.

Determinar el efecto de la insulina sobre el proceso de autofagia en líneas mutantes de *Arabidopsis* para genes *ATG*.

XI) LITERATURA CITADA

- Ahn C. S., Han J. A., Lee H. S., Lee S. and Pai H. S. 2011. The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *Plant Cell* 23:185-209.
- Allan A. C. and Fluhr R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9:1559-1572.
- Alvarez R. C., Nissen S. J. and Ernst S. G. 1994. Selection, enrichment and initial characterization of an elongated cell culture of tobacco. *Plant Sci.*103:73-79.
- An G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79:568-570.
- Apel K. and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Avila-Alejandre A. X., Espejel F., Paz-Lemus E., Cortés-Barberena E., de León-Sánchez F.D., Dinkova T. D., Sánchez de Jiménez E. and Pérez-Flores L. 2013. Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). *Seed Sci. Res.* 23:3-14.
- Backer J. M. 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410:1-17.
- Bassham D. C. 2007. Plant autophagy more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:587–593.
- Beltrán-Peña E. 1997. Expresión genética de las proteínas ribosomales durante la germinación del maíz. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Best C.S. 1923. Possible sources of insulin. *Metabol. Res.* 3:177-179.
- Blommaart E. F. C., Krause U., Schellens J. P. M., Vreeling-Sindelarova H. and Meijer A. J. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243:240-246.

- Brosché M., Merilo E., Mayer F., Pechter P., Puzđrjova I., Brader G., Kangasjarvi J. and Kollist H. 2010. Natural variation in ozone sensitivity among *Arabidopsis thaliana* accessions and its relation to stomatal conductance. *Plant Cell Environ.* 33:914-925.
- Brunn G. J., Williams J., Sabers C., Wiederrecht G., Lawrence J. C. and 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.
- Boruc J., Mylle E., Duda M., de Clercq R., Rombauts S., Geelen D., Hilson P., Inze D., van Damme D. and Russinova E. 2010. Systematic localization of the *Arabidopsis* core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiol.* 152:553-565.
- Chang Y., Phillips A. R. and Vierstra R. D. 2009. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 37:232-236.
- Chen J. G., Ullah H., Young J. C., Sussman M. R. and Jones A. M. 2001. ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 15:902-911.
- Chen Y. and Gibson S. B. 2008. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* 4:246-248.
- Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., Israels S. J. and Gibson S. B. 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ.* 15:171-182.
- Chen Y., Azad M. B. and Gibson S. B. 2009. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* 16:1040-1052.
- Chowienczyk P. J., Brett S. E., Gopaul N. K., Meeking D., Marchetti M., Russel-Jones D. L., Anggard E. E. and Ritter J. M. 2000. Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. *Diabetologia* 43:974-977.
- Collip J. 1923. Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. *J. Biol. Chem.* 56:513-543.
- Collier E., Watkinson A., Cleland C. F. and Roth J. 1987. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *J. Biol. Chem.* 262:6238-6247.

- Contento A. L., Xiong Y., and Bassham D. C. 2005. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J.* 42:598-608.
- Crespo J. L., Díaz-Troya S. and Florencio F. J. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 139:1736-1749.
- Criollo A., Senovilla L., Authier H., Maiuri M. C., Morselli E., Vitale I., Kepp O., Tasdemir E., Galluzzi L., Shen S., Tailler M., Delahaye N., Tesniere A., De Stefano D., Younes A. B., Harper F., Pierron G., Lavandro S., Zityogel L., Israel A., Baud V. and Kroemer G. 2010. The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J.* 29:619-631.
- Deak M., Casamayor A., Currie R. A., Downes C. P. and Alessi D. R. 1999. Characterization of a plant 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 homologue which contains a pleckstrin homology domain. *FEBS Lett.* 451:220-226.
- Dixon R. A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. 1-20. In: *Plant cell culture a practical approach.* (R. A. Dixon, Ed.) IRL PRESS. Oxford-Washington DC.
- Doelling J. H., Walker J. M., Friedman E. M., Thompson A.R. and Vierstra R. D. 2002. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277:33105-33114.
- Ebato C., Uchida T., Arakawa M., Komatsu M., Ueno T., Komiya K., Azuma K., Hirose T., Tanaka K., Kominami E., Kawamori R., Fujitani Y. and Watada H. 2008. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 8:325-332.
- Efeyan A. and Sabatini D. M. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.* 22:169-176.
- Ellis M. M. and Eyster W. H. 1923. Some effects of insulin and glucokinin on maize seedlings. *Science* 58:541-542.
- Eruslanov E. and Kusmartsev S. 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Met. Mol. Biol.* 594:57-72.

- Fierros-Romero G., Peña-Correa R., Mellado Rojas M. E. y Beltrán Peña E. M. 2010. Crecimiento de las células de *Nicotiana tabacum* NT-1 en suspensión activado por insulina. *Biológicas* 12:82-89.
- Fierros-Romero G. 2012. Efecto de la insulina en la activación de las cascadas PI3K-TOR y MAPK en cultivos de células de tabaco NT-1. Tesis de maestría. IIQB de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Fischer B. B., Krieger-Liszkay A., Hideg E., Snyrychová I., Wiesendanger M. and Eggen R. I. 2007. Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 581:5555-5560.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M. and Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442-446.
- Forman H. J., Maiorino M. and Ursini F. 2010. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49:835-842.
- Foyer C. H. and Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antiox. Red. Sign.* 11:861-905.
- Gadjev I., Vanderauwera S., Gechev T. S., Laloi C., Minkov I. N., Shulaev V., Apel K., Inzé D., Mittler R. and Van Breusegem F. 2006. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141:436-445.
- Ganguly A., Lee S. H., Cho M., Lee O. R., Yoo H. and Cho H. T. 2010. Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Physiol.* 153:1046-1061.
- García Flores C., Aguilar R., Reyes de la Cruz H., Albores M. and Sánchez de Jiménez E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochem. J.* 358:95-100.
- Gauthier A., Idanheimo N., Brosché M., Kollist H., Wrzaczek M. and Kangasjarvi J. 2011. Characterization of RLSs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants* P5.

- Geelen D. N. and Inze D. G. 2001. A bright future for the bright yellow-2 cell culture. *Plant Physiol.* 127:1375-1379.
- Gibson S. B. 2013. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. *Meth. Enzymol.* 528:217-235.
- Gingras A. C., Raught B. and Sonenberg N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15:807-826.
- Goodman D. B. and Davis W. L. 1993. Insulin accelerates the post germinative development of several fat-storing seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:440-446.
- Granger C. L. and Cyr 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.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C. and Masclaux-Daubresse C. 2010. Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C. R. Biol.* 333:382–391.
- Guiboileau A., Yoshimoto K., Soulay F., Bataille M. P., Avice J. C. and Masclaux-Daubresse J. C. 2012. Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 194:732-740.
- Hagen T. M., Huang S., Curnutte J., Flower P., Martinez V., Wehr C. M., Ames B. N. and Chisari F. 1994. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:12808-12812.
- Hayward A. P. and Dinesh-Kumar S. P. 2011. What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:557-576.
- Hofius D., Schultz-Larsen T., Joensen J., Tsitsigiannis D. I., Petersen N. H., Mattsson O., Ibl V. and Stoger E. 2012. The formation, function and fate of protein storage compartments in seeds. *Protoplasma* 249:379-392.
- Inoue Y., Suzuki T., Hattori M., Yoshimoto K., Ohsumi Y. and Moriyasu Y. 2006. *AtATG* genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant Cell Physiol.* 47:1641-1652.

- Izumi M., Hidema J., Makino A. and Ishida H. 2013. Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161:1682-1693.
- Juárez -Domínguez A., Santillán-Mendoza R., Mellado-Rojas M. E. y Beltrán-Peña E. M. 2010. Insulina estimula el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de la cinasa MAPK3. *Biológicas* 12:14-19.
- Kabbage M., Williams B. and Dickman M. B. 2013. Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS Pathog.* 9:e1003287.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, and Ohsumi Y. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150:1507-1513.
- Kang R., Livesey K. M., Zeh H. J., Loze M. T. and Tang D. 2010. HMGB1: A novel Beclin-1-binding protein active in autophagy. *Autophagy* 6:1209-1211.
- Kang R., Tang D., Lotze M. T. and Zeh H. J. 2011. RAGE regulates autophagy and apoptosis following oxidative injury. *Autophagy* 7:442-444.
- Karp, G. 2005. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill-Interamericana, México, D. F., pp. 899.
- Kim D. H., Eu Y. J., Yoo C. M., Kim Y.W., Pih K. T., Jin J. B., Kim S. J., Stenmark H. and Hwang I. 2001. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell* 13:287-301.
- Klionsky D. J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell. Sci.* 118:7-18.
- Klionsky D. J., Abeliovich H., Agostinis P., Agrawal D. K., Aliev G., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175.
- Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N. and Yoshioka H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 19:1065-1070.
- Kost B., Spielhofer P. and 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.

- Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang W.-I., Cho H.-T. and Lee Y. 2008. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiol.* 147:624-635.
- Lee J., Giordano S. and Zhang J. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* 441:523-540.
- Li L., Chen Y. and Gibson S. B. 2013. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Sign.* 25:50-65.
- Liu Q., Raina A. K., Smith M. A., Sayre L. M. and Perry G. 2003. Hydroxynonenal, toxic carbonyls, and Alzheimer disease. *Mol. Asp. Med.* 24:305-313.
- Liu M. C., Schiff M., Czymmek K., Tallozy Z., Levine B. and Dinesh-Kumar S. P. 2005. Autophagy regulates Programmed Cell Death during the plant innate immune response. *Cell* 121:567-577.
- Liu Z. and Lenardo M. J. 2007. Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases. *Dev. Cell* 12:484-485.
- Liu Y., Xiong Y. and Bassham D. C. 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5:954-963.
- Liu Y. and Bassham D. C. 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 5:1-9.
- Liu Y. and Bassham D. C. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:215-237.
- Malhotra J. D. and Kaufman R. J. 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antiox. Red. Sign.* 9:2277-2293.
- Manning B. D. and 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.
- Marino D., Andrio E., Danchin E. G., Oger E., Gucciardo S., Lambert A., Puppo A. and Pauly N. 2011. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* 189:580-592.
- Mathews C. K., Van Holde K. E. and Ahern K. G. 2002. *Bioquímica*. Pearson Addison Wesley. España. 931-982.

- Matsuoka K., Demura T., Galis I., Horiguchi T., Sasaki M., Tashiro G. and Fukuda H. 2004. A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 45:1280-1289.
- Maxwell D. P., Wang Y. and McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8271-8276.
- McDowell J. M. and Dangl J. L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* 25:79-82.
- Meijer A. J. and Codogno P. 2006. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol. Asp. Med.* 27:411-425.
- Meijer A. J. 2008. Amino acid regulation of autophagosome formation. Chapter 4. *Methods in Molecular Biology*, vol 445: Autophagosome and Phagosome. Edited by: Deretic V. Humana Press.
- Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. and Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:6422-6427.
- Meyuhas O. 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* 267:6321-6330.
- Mijaljica D., Prescott M. and Devenish R. J. 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7:673-682.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M. A., Shulaev V., Dangl J. F. and Mittler R. 2009. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Sign.* 2:ra45.
- Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A. and Ryabovol V. 2012. Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 59:11-19.
- Mitou G., Budak H. and Gozuacik D. 2009. Techniques to study autophagy in plants. *Int. J. Plant Gen.* doi:10.1155/2009/451357.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V. B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. and Van Breusegem F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16:300-309.

- Mizushima N., Yoshimori T., and Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:107-132.
- Mlejnek P. and Prochazka S. 2002. Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215:158-166.
- Moriyasu Y. and Ohsumi Y. 1996. Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 111:1233-1241.
- Nagata T. and 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.
- Nagata T. and Kumagai F. 1999. Plant cell biology through the window of the highly synchronized tobacco BY-2 cell line. *Meth. Cell Sci.* 21:123-127.
- Nagata T. 2004. When I encountered tobacco BY-2 cells! In Nagata T.; Inzé D. (eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Springer, New York, Vol. 53, pp. 1-5.
- Nagata T., Sakamoto K. and Shimizu T. 2004. Tobacco BY-2 cells: The present and beyond. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant* 40:163-166.
- Noda T., Kim J., Huang W. P., Baba M., Tokunaga C., Ohsumi Y. and Klionsky D. J. 2000. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.* 148:465-480.
- Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M. and Kuchitsu K. 2008. Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283:8885-8892.
- Oku M. and Sakai Y. 2010. Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J.* 277:3289-3294.
- Olivares-Reyes J. A. y Arellano-Plancarte A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 27:9-18.
- Orenstein S. J. and Cuervo A. M. 2010. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:719-26.
- Pascual-Morales E. J., Arteaga-Tinoco I., García-Pineda E., Mellado-Rojas M. E. y Beltrán-Peña E. 2012. La insulina promueve el crecimiento de los pelos radiculares de *Arabidopsis thaliana*. *Biológicas* 14:1-6.

- Peña-Correa R. 2010. Crecimiento de los cultivos celulares de tabaco NT-1 por insulina a través de la ruta de señalización PI3K/TOR. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia.
- Pérez-Pérez M. E., Florencio F. J. and Crespo J. L. 2010. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152:1874-1888.
- Pérez-Pérez M. E., Lemaire S. D. and Crespo J. L. 2012 a. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol.* 160:156-164.
- Pérez-Pérez M. E., Couso I. and Crespo J. L. 2012 b. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 8:376-388.
- Petersen L. N., Ingle R. A., Knight M. R. and Denby K. J. 2009. OX11 protein kinase is required for plant immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 60:3727-3735.
- Petrasek J., Elckner M., Morris D. A. and Zazimalova E. 2002. Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta* 216:302-308.
- Pogány M., von Rad U., Grün S., Dongó A., Pintye A., Simoneau P., Bahnweg G., Kiss L., Barna B. and Durner J. 2009. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. *Plant Physiol.* 151:1459-1475.
- Potocky M., Jones M. A., Bezdova R., Smirnov N. and Zársky V. 2007. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol.* 174:742-751.
- Proels R. K., Oberhollenzer K., Pathuri I. P., Hensel G., Kumlehn J. and Hüchelhoven R. 2010. RBOHF2 of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. *Mol Plant Microbe Interact.* 23:1143-1150.
- Purvis A. C. 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 100:165-170.
- Rabinowitz J and White E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science* 3:1344-1348.

- Ramel F., Birtic S., Ginies C., Soubigou-Taconnat L., Triantaphylidès C. and Havaux M. 2012. Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:5535-5540.
- Reggiori F., Tucker K. A., Stromhaug P. E. and Klionsky D. J. 2004. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev. Cell* 6:79-90.
- Reggiori F. and Klionsky D. J. 2005. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:415-422.
- Rentel M. C., Lecourieux D., Ouaked F., Usher S. L., Petersen L., Okamoto H., Knight H., Peck S. C., Grierson C. S., Hirt H. and Knight M. R. 2004. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427:858-861.
- Reumann S., Voitsekhovskaja O. and Lillo C. 2010. From signal transduction to autophagy of plant cell organelles: lessons from yeast and mammals and plant-specific features. *Protoplasma* 247:233-236.
- Robaglia C., Thomas M. and Meyer C. 2012. Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:301-307.
- Robledo-Paz. A. V., Adame-Álvarez. R. M., Jofre-Garfias A. E. 2006. Callus and suspension culture induction, maintenance and characterization. In Loyola-Vargas, V.M.V.F. (eds.), *Plant Cell Culture Protocols: Meth. Mol. Biol.*, Humana Press Inc, USA, Vol. 318, pp. 59–86.
- Robson C. A. and Vanlerberghe G. C. 2002. Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol.* 129:1908-1920.
- Rodríguez-Andrade E. 2012. Estudio del desarrollo vegetativo y reproductivo de *Arabidopsis thaliana* por efecto de la insulina. Tesis de licenciatura. Facultad de QFB de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Rodríguez-López C. D., Rodríguez-Romero A., Aguilar R. and Sánchez de Jiménez E. 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Pept. Lett.* 18:84-91.

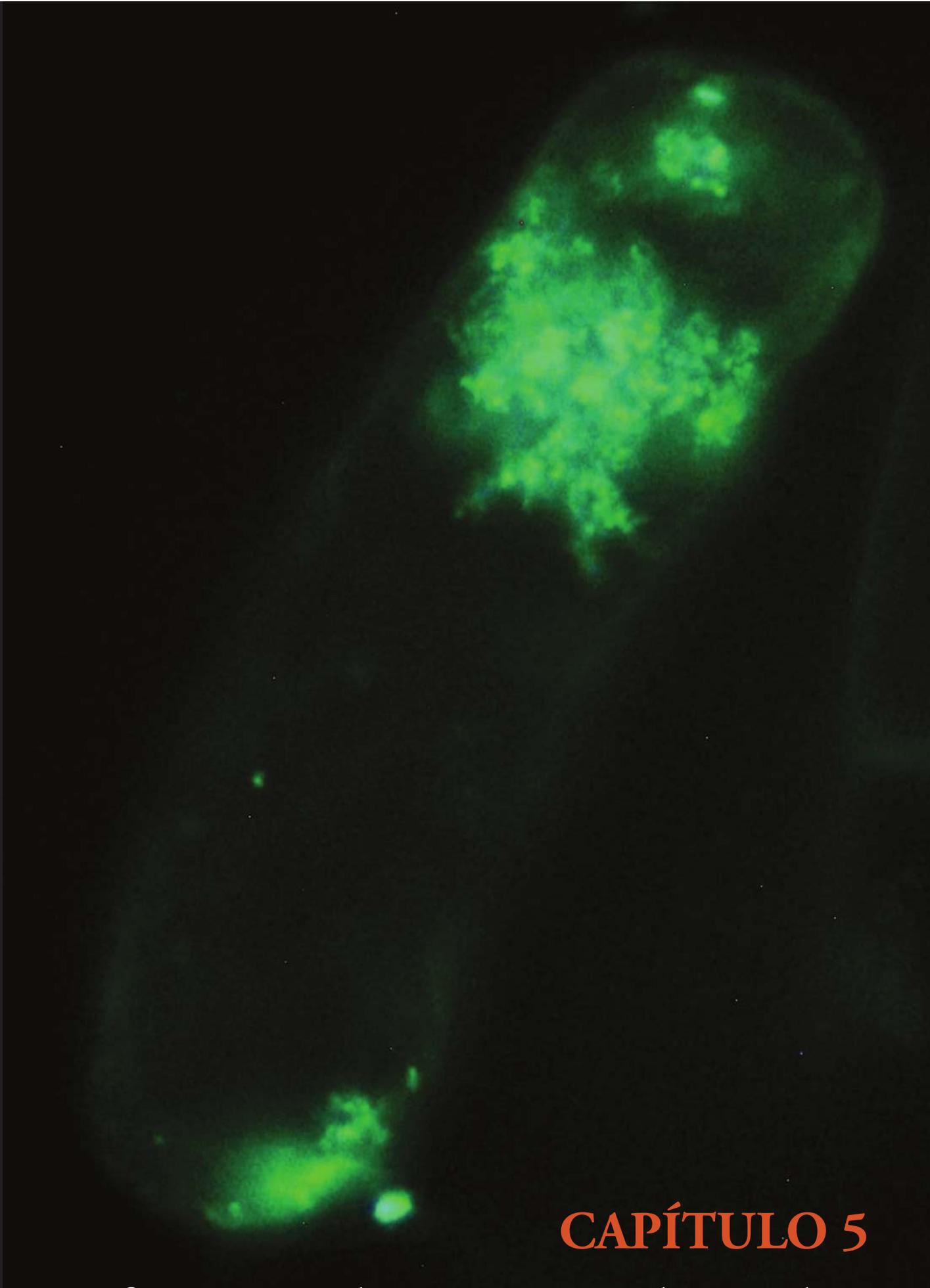
- Rose T. L., Bonneau L., Der C., Marty-Mazars D. and Marty F. 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol. Cell* 98:53-67.
- Sakai A., Miyazawa Y., Saito C., Nagata N., Takano H., Hiramoto H. Y. and Kuroiwa T. 1999. Amyloplast formation in cultured tobacco cells. III Determination of the timing of gene expression necessary for starch accumulation. *Plant Cell Rep.* 18:589-594.
- Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. 2001 Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E. and Ortíz-López A. 1999. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 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.
- Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L. and Elazar Z. 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 26:1749-1760.
- Scherz-Shouval R. and Elazar Z. 2011. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 36:30-38.
- Seglen P. O. and Gordon P. B. 1982. 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:1889-1892.
- Seo G., Kim S. K., Byun Y. J., Oh E., Jeong S. W., Chae, G. T. and Lee S. B. 2011. Hydrogen peroxide induces Beclin-1-independent autophagic cell death by suppressing the mTOR pathway via promoting the ubiquitination and degradation of Rheb in GSH-depleted RAW 264.7 cells. *Free Radic. Res.* 45:389-399.
- Shackelford D. B. and Shaw R. J. 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 9:563-575.
- Smith B. A., Reider M. L. and Fletcher J. S. 1982. Relationship between vital staining and subculture growth during the senescence of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 70:1228-1230.
- Sohal R. S., Mockett R. J. and Orr W. C. 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* 33:575-586.

- Sormani R., Yao L., Menand B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C. and Robaglia C. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7:26-33.
- Suttangkakul A., Li F., Chung T. and Vierstra R. D. 2011. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3761-3779.
- Suzuki K., Kubota Y., Sekito T. and Ohsumi Y. 2007. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cell* 12:209-218.
- Sweetlove L. J., Fell D. and Fernie A. R. 2008. Getting to grips with the plant metabolic network. *Biochem. J.* 409:27-41.
- Takatsuka C., Inoue Y., Matsuoka K. and Moriyasu Y. 2004. 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol.* 45:265-274.
- Takatsuka C., Inoue Y., Higuchi T., Hillmer S., Robinson D. G. and Moriyasu Y. 2011. Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant Cell Physiol.* 52:2074-2087.
- Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K. and Dolan L. 2008. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* 319:1241-1244.
- Thompson A. R., Doelling J. H., Suttangkakul A. and Vierstra R. D. 2005. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol.* 138:2097-2110.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y. and Collinge D. B. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:1187-1194.
- Torres M. A., Dangl J. L. and Jones J. D. 2002. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:517-522.
- Tripathy B. C., Mohapatra A. and Gupta I. 2007. Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. *Biochim. Biophys. Acta* 1767:860-868.

- Tripathy B. C. and Oelmuller R. 2012. Reactive Oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Sign. Behav.* 7:1-13.
- Turck F., Kozma S. C., Thomas G. and Nagy F. 1998. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18:2038-2044.
- Turck F., Zilbermann F., Kozma S. C., Thomas G. and Nagy F. 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134:1527-1535.
- Van der Fits L., Deakin E. A., Hoge J. H. and 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.
- Vanhee C., Guillon S., Masquelier D., Degand H., Deleu M., Morsomme P. and Batoko H. 2011. A TSP0-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast. *J. Exp. Bot.* 62:497-508.
- Vezina C., Kudelski A. and Sehgal S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28:721-726.
- Villa-Hernández J. M., Dinkova T. D., Aguilar-Caballero R., Rivera-Cabrera F., Sánchez de Jiménez E. and Pérez-Flores L. J. 2013. Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination. *Biochimie* 95:1871-1879.
- Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y. and Brown R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269:5241-5248.
- Walters D. R. 2003. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64:97-107.
- Wang Q., Somwar R., Bilan P. J., Jin J., Woodgett J. R. and Klip A. 1999. Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19:4008-4018.
- Wang Y., Yu B., Zhao J., Guo J., Li Y., Han S., Huang L., Du Y., Hong Y., Tang D. and Liu Y. 2013. Autophagy contributes to leaf starch degradation. *Plant Cell* 25: 1383-1399.

- White E. and DiPaola R. S. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 15: 5308-5316.
- Williams B., Kabbage M., Kim H. J., Britt R. and Dickman M. B. 2011. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog.* 7:e1002107.
- Xie Z. and Klionsky D. J. 2007. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9:1102-1109.
- Xiong Y., Contento A. L. and Bassham D. C. 2007. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* 3:257-258.
- Xu J., Yu S., Sun A. Y. and Sun G. Y. 2003. Oxidant-mediated AA release from astrocytes involves cPLA(2) and iPLA(2). *Free Radic. Biol. Med.* 34:1531-1543.
- Yang Z. and Klionsky D. J. 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335:1-32.
- Yang Z. and Klionsky D. J. 2009. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:124-131.
- Yang Z. and Klionsky D. J. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12:814-822.
- Yoshimoto K., Hanaoka H., Sato S., Kato T., Tabata S., Noda T. and Ohsumi Y. 2004. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16:2967-2983.

ANEXO I. Autofagia vegetal: mecanismo de reciclaje en eucariontes (Capítulo 5. Libro Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de las Plantas. Beltrán-Peña y López-Bucio eds. 2013 ISBN: 978-607-424-392-5).



CAPÍTULO 5

Autofagia vegetal: mecanismo de reciclaje
en eucariontes

Autofagia vegetal: mecanismo de reciclaje en eucariontes

Ricardo Santillán-Mendoza, Ma. Elena Mellado-Rojas y Elda Beltrán-Peña

Las plantas por su forma de vida sésil, enfrentan condiciones ambientales desfavorables tales como las climáticas y la disponibilidad de nutrientes, de ahí que hayan desarrollado mecanismos sofisticados para su sobrevivencia. El proceso de autofagia consiste en la degradación de macromoléculas que recicla materiales celulares dañados o no requeridos, que permite a las plantas enfrentarse a condiciones adversas o adecuarse a procesos de desarrollo específicos como la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo. La maquinaria requerida para la autofagia se encuentra conservada entre organismos eucariontes y, cuando es inducida se produce el reciclaje de nutrientes mediante el transporte de materiales del citoplasma hacia los lisosomas o vacuolas por vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas, lo que resulta en el mantenimiento de la homeostasis celular. Hasta hace poco, nuestro conocimiento sobre los aspectos moleculares de la autofagia vegetal era escaso comparado con el de levaduras y mamíferos. No obstante, los avances recientes logrados sobre el entendimiento de dicho proceso ponen de manifiesto la relevancia de este campo, el cual será abordado en este capítulo.

5.1. Introducción

La autofagia funciona a niveles basales como un proceso de eliminación de los componentes celulares dañados y es inducida durante el estrés ambiental (Bassham, 2009). En células vegetales, la vacuola es el principal sitio de degradación de macromoléculas bajo condiciones normales de crecimiento y durante la exposición a estrés biótico y abiótico. El proceso básico de autofagia está conservado entre los organismos eucariontes desde levaduras hasta animales y plantas. Varios tipos de autofagia se han descrito, sin embargo, se ha mostrado que en plantas la microautofagia y la macroautofagia son los procesos que se llevan a cabo. El primero involucra la formación de una pequeña vesícula intravacuolar por invaginación del tonoplasto llamada cuerpo autofágico que engulle componentes del citoplasma, mientras que en la macroautofagia los autofagosomas citoplásmicos encierran los componentes celulares que van a ser degradados (Thompson y Vierstra, 2005; Bassham, 2007).

Normalmente cuando se hace referencia a la macroautofagia se le designa solamente como autofagia, cuya principal característica es la formación de estructuras de doble membrana conocidas como autofagosomas. Después de la inducción de la autofagia, se forma un autofagosoma alrededor del material que está destinado para degradación y dicha estructura libera este material en la vacuola, donde proteasas, lipasas, nucleasas y otras enzimas hidrolíticas presentes en el interior de la vacuola lo degradan. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana vacuolar (tonoplasto)

y posteriormente las hidrolasas vacuolares degradan tanto la carga como la membrana interna del autofagosoma (Fig. 5.1) (Muntz, 2007).

5.2. Genes implicados en el proceso de autofagia

Un gran número de genes requeridos para la autofagia fueron identificados inicialmente en levaduras mediante la selección de mutantes con defectos en la autofagia. Se reportaron más de treinta genes, los cuales se clasificaron en varios grupos funcionales: a) el complejo cinasa Atg1-Atg13; b) el complejo fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y c) dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. Estos estudios en levadura han facilitado la identificación de genes homólogos en plantas requeridos para llevar a cabo el proceso de autofagia y han proporcionado una guía para la investigación de sus funciones moleculares (Yang y Klionsky, 2010).

La búsqueda en plantas de los componentes de la vía de autofagia ha sido enfocada en *Arabidopsis thaliana* y ha incluido el aislamiento de mutantes afectadas en genes homólogos de levaduras. Tales mutantes presentaron fenotipos defectuosos en el reciclamiento de nutrientes como hipersensibilidad a la deficiencia de macronutrientes y senescencia prematura, lo que sugiere que la autofagia en plantas es un componente importante para la vía de reciclamiento (Tabla 5.1) (Mitou *et al.*, 2009).

El estudio de la autofagia en plantas ha requerido el desarrollo de varios marcadores, los más comunes se basan en la producción de proteínas

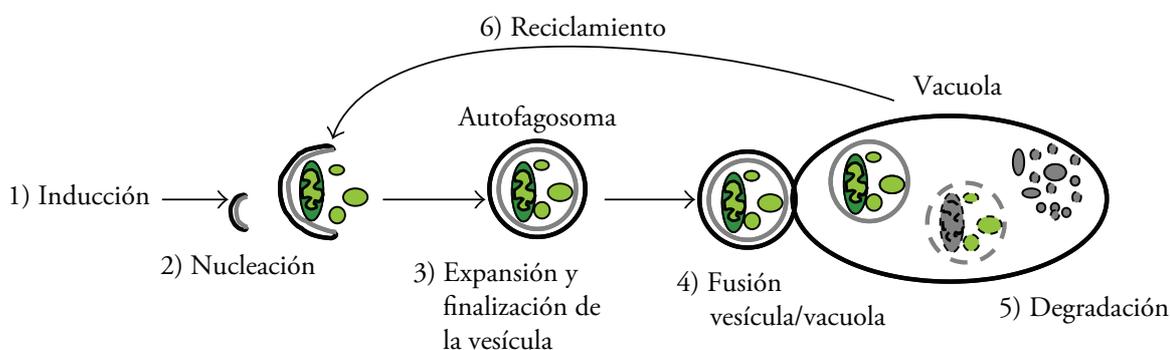


Figura 5.1. Mecanismos de la autofagia en plantas. Después de un estímulo como la inanición, aparece una vesícula de doble membrana (autofagosoma) que envuelve una porción del citoplasma, proteínas de vida larga y organelos como mitocondrias. Los autofagosomas eventualmente se fusionan con la vacuola donde se degradan junto con su carga. Los monómeros de los polímeros degradados son regresados al citosol para su reuso (Modificado de Mitou *et al.*, 2009).

Tabla 5.1. Fenotipos causados por modificaciones en los genes ATG de *Arabidopsis thaliana* (Modificada de Mitou *et al.*, 2009).

Genotipo	Fenotipo	Referencia
Deficiente Atg2	No forma estructuras autofágicas en la punta de la raíz. Después del tratamiento con E64c.	Inoue <i>et al.</i> , 2006
Deficiente Atg4a/ Atg4b	En carencia de nitrógeno no se observan autofagosomas y no hay entrega de Atg8-6 a la vacuola.	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2004
	No forma estructuras autofágicas en la punta de la raíz.	Inoue <i>et al.</i> , 2006.
	Inhibición de la formación de cuerpos que contienen rubisco.	
Deficiente Atg5	No hay formación del complejo Atg5/12.	Suzuki <i>et al.</i> , 2005.
	Senescencia prematura bajo condiciones limitantes de luz, carbono o nitrógeno.	Thompson <i>et al.</i> , 2005.
Deficiente Atg6	Esterilidad masculina.	Fujiki <i>et al.</i> , 2007.
	Senescencia temprana, sensibilidad a HR-PCD.	Patel y Dinesh, 2008.
	Defectos en el desarrollo y en germinación del polen.	Harrison y Olsen, 2008.
Deficiente Atg7	Hipersensibilidad a deficiencia nutricional y senescencia prematura.	Doelling <i>et al.</i> , 2002.
Transgénica Atg8	Expresión inducida por carencia de nutrientes, estrés conduce a envejecimiento prematuro.	Sláviková <i>et al.</i> , 2005.
Deficiente Atg9	Clorosis acelerada bajo condiciones de inanición nutricional.	Sláviková <i>et al.</i> , 2008.
	Defectos en germinación y senescencia de hojas acelerada. Disminución en la acumulación de autofagosomas, seguida del tratamiento con E64c.	Inoue <i>et al.</i> , 2006.
Deficiente Atg10	Senescencia temprana y PCD. Hipersensibilidad a carencia de nitrógeno y carbono.	Phillips <i>et al.</i> , 2008.
	No se forma el complejo Atg5/12.	Suzuki <i>et al.</i> , 2005.
Transgénica Atg18a	Hipersensibilidad a deficiencia de sacarosa y nitrógeno. Senescencia prematura.	Xiong <i>et al.</i> , 2005.

recombinantes relacionadas con la autofagia (ATG) y la proteína verde fluorescente (GFP) y también el uso del colorante monodensilcadaverina (MDC). Estos marcadores por su especificidad en el marcaje de autofagosomas, han permitido la detección rápida de la autofagia en células vegetales (Liu y Bassham, 2012).

5.3. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina que participan en la autofagia

El primer mecanismo de autofagia observado en levaduras fue el sistema de conjugación tipo ubiquitina que involucra dos proteínas: Atg8 y Atg12. Después de que Atg8 es sintetizada, su

extremo carboxilo terminal es cortado por la proteasa de cisteína, Atg4, para exponer un residuo de glicina. La glicina expuesta es enlazada por Atg7 (enzima tipo E1) y la Atg8 posteriormente es transferida a Atg3 (tipo E2). Finalmente, la proteína Atg8 es conjugada al lípido de membrana fosfatidil etanol amina (PE). Por otra parte, Atg12 también es activada por Atg7 y transferida a la enzima Atg10 (tipo E2) y finalmente conjugada con Atg5. El conjugado Atg12-Atg5 interacciona con la proteína Atg16, para formar el complejo Atg12-Atg5·Atg16, esencial para la autofagia. Así, el conjugado Atg8-PE y el complejo Atg12-Atg5·Atg16 se localizan en la estructura pre autofagosomal (doble membrana que encapsula la carga autofágica, PAS), y después

de la inducción de la autofagia se encuentran en el fagóforo en expansión. El conjugado Atg8-PE muestra una localización semejante en el interior y exterior de la membrana del autofagosoma, mientras que el complejo Atg12-Atg5-Atg16 se asocia principalmente con la membrana externa (Yang y Klionsky, 2009).

En *Arabidopsis*, el sistema de conjugación está conservado (Fig. 5.2), pero a diferencia de los genes simples *ATG8*, *ATG4* y *ATG12* de levadura, *Arabidopsis* contiene nueve miembros de la familia *AtATG8* (a-i), dos de la familia *AtATG4* (a-b), y dos para *AtATG12* (a-b) (Doelling *et al.*, 2002). En una línea doble mutante *Atatg4a Atatg4b*, los

autofagosomas no pueden formarse, lo que indica que tanto en levadura como en plantas *AtATG4* es esencial para la autofagia. Además, se ha determinado la existencia de un sistema de conjugación tipo ubiquitina de *AtATG8* con PE en *Arabidopsis*, en donde el extremo carboxilo terminal de *AtATG8* es cortado por *AtATG4* para unirse a una enzima tipo E1, *AtATG7*, posteriormente transferida a una enzima tipo E2, *AtATG3* y finalmente conjugada al PE (Yoshimoto *et al.*, 2004).

Por otro lado, los componentes del sistema de conjugación *AtATG12* han sido caracterizados en *Arabidopsis*, estos miembros muestran una redundancia funcional, sin embargo *AtATG12b*

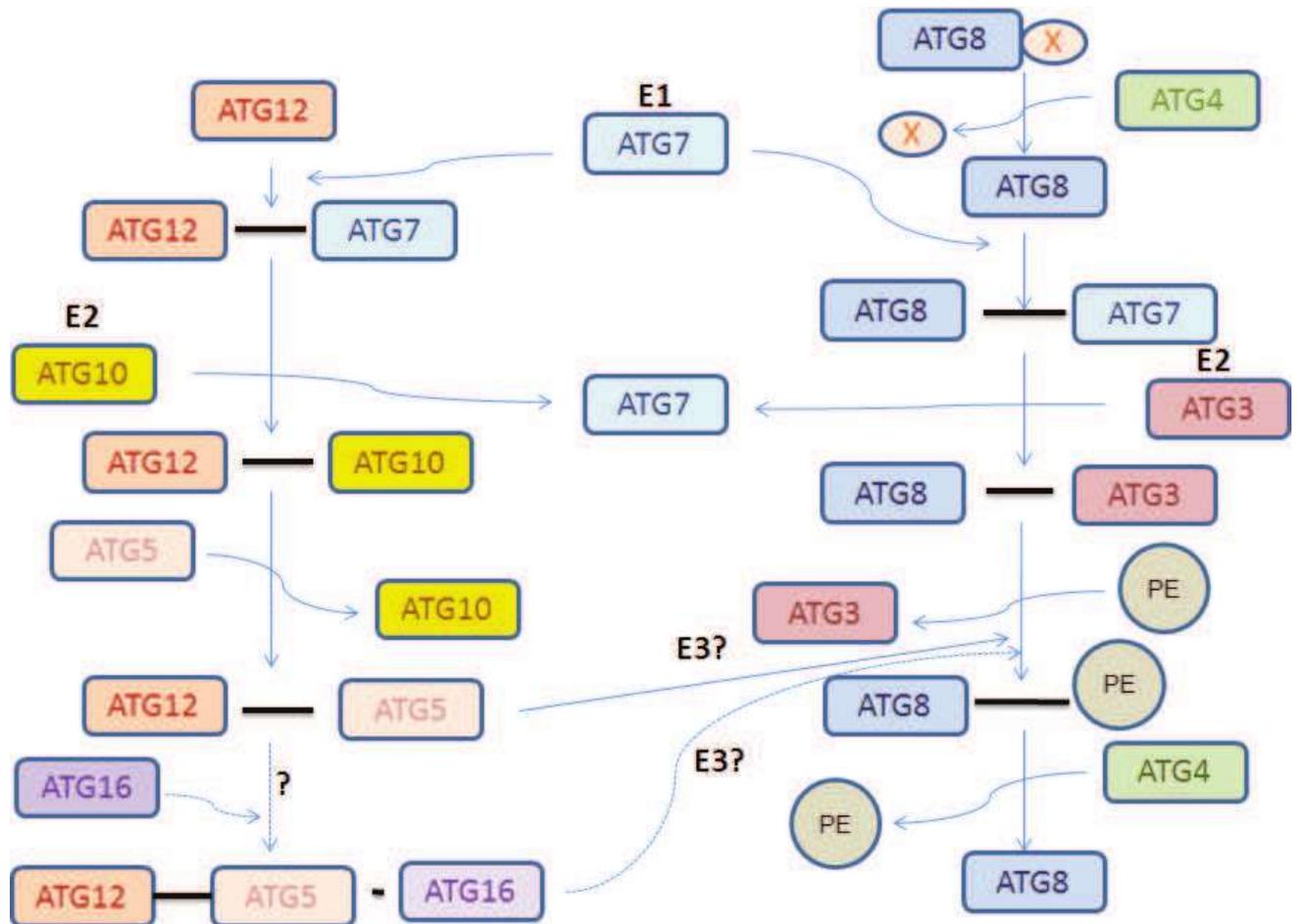


Figura 5.2. Sistemas de conjugación tipo ubiquitina en *Arabidopsis thaliana*. A la derecha se muestra el sistema de conjugación *AtATG8* donde esta proteína por una serie de reacciones al final es conjugada a la fosfatidiletanolamina (PE). Los círculos naranjas con las Xs representan la secuencia carboxilo terminal de la *AtATG8*. Del lado izquierdo, se observa el sistema de conjugación *AtATG12*, donde esta última se une a una enzima tipo E1, *AtATG7* y después ambas son transferidas a una enzima tipo E2, *AtATG10* para finalmente conjugarse con *AtATG5*. El complejo *AtATG12-AtATG5* puede también funcionar como una enzima tipo E3 durante la conjugación de *AtATG8-PE* y si interactúa con *AtATG16* formará el complejo *ATG12-ATG5-ATG16* (como en levaduras). No se sabe si este último es capaz de funcionar como una enzima tipo E3 (líneas discontinuas) (Tomada de Liu y Bassham, 2012).

participa durante la autofagia basal, mientras que AtATG12a lo hace durante la autofagia inducida. Las mutantes para *Atatg5*, *Atatg7*, *Atatg10* y *Atatg12a12b* mostraron defectos en el mecanismo de autofagia, observándose fenotipos de senescencia temprana e hipersensibilidad en condiciones limitadas de nutrientes; lo que sugiere un sistema de conjugación ATG12 conservado y esencial para la vía de autofagia vegetal (Chung *et al.*, 2010).

5.4. Complejo PI3K involucrado en la autofagia

En células animales, se ha propuesto que la membrana del autofagosoma se deriva del retículo endoplásmico, de la mitocondria y de la membrana plasmática. El complejo PI3K es funcional en la autofagia durante la nucleación del autofagosoma y para la localización de la PAS y consta de la cinasa serina/treonina PI3K

clase III conocida como Vps34, cuya actividad es regulada por la proteína Beclina 1. Por otra parte, Vps15 es requerida para la asociación de Vps34 con la membrana; donde Atg14 se conecta a Vps34. El complejo PI3K recluta proteínas como la Atg18 y la PAS en la región de la membrana rica en fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P), el cual es el producto de la cinasa PI3K (**Fig. 5.3**) (Yang y Klionsky, 2009).

En *Arabidopsis*, sólo se ha identificado una PI3K que pertenece a la clase III (*AtVPS34*), la cual participa en diversos procesos de desarrollo. Por otra parte, AtG6 (Beclina 1 en mamíferos) regula al complejo PI3K para producir PI3P, fosfolípido involucrado en la nucleación de la vesícula autofágica. Para AtG6 solo un gen ha sido reportado y se ha observado que la proteína colocaliza con las AtATG8 en los autofagosomas. Asimismo, la mutante *atg6*, incrementa la producción de antocianinas, disminuye la longitud de la raíz primaria, muestra senescencia

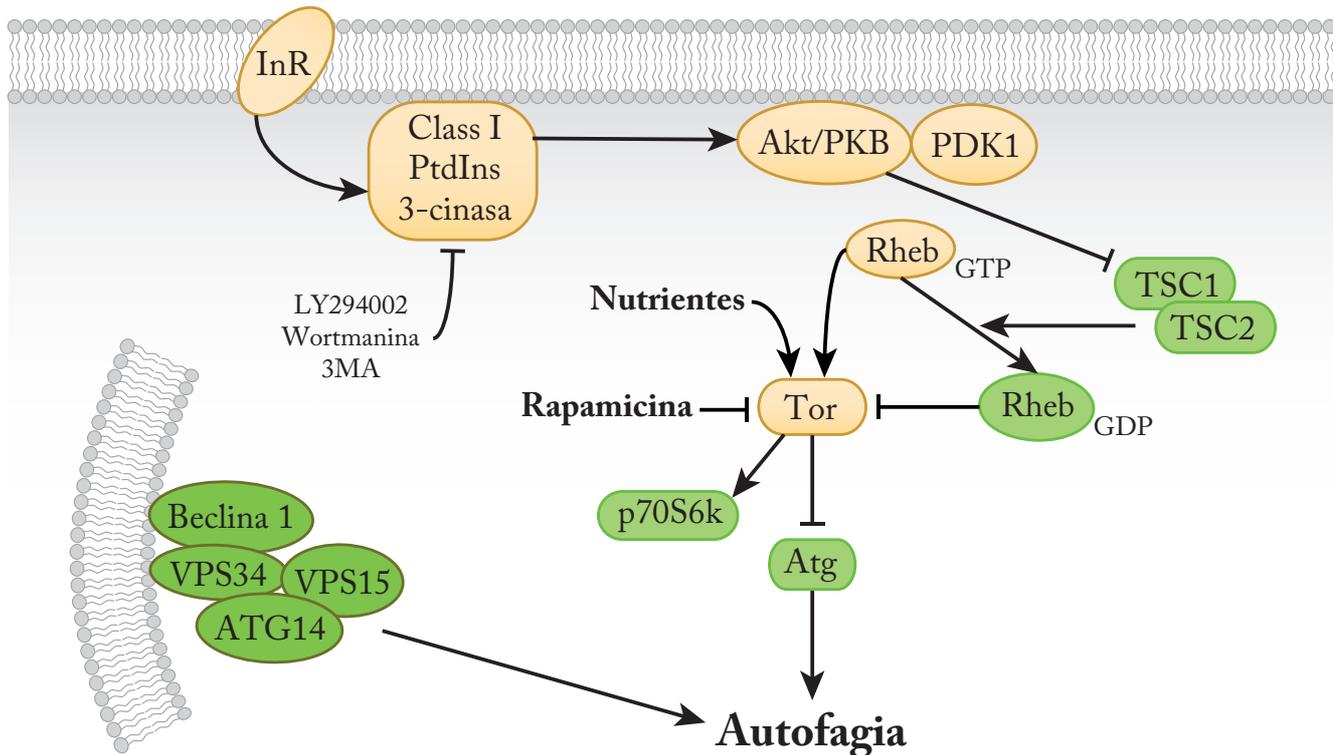


Figura 5.3. Participación de la cascada PI3K/TOR en el proceso de autofagia. En células animales, la PI3K clase I es estimulada en respuesta a la unión de un ligando (insulina) al receptor de insulina (InR). El PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato) generado en la membrana plasmática permite la unión y activación de PDK1 (proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos) y de Akt/PKB. Akt inhibe la actividad GTPasa del complejo proteico TSC1-TSC2, lo que permite la estabilización de la GTP Rheb, la activación de TOR y la inhibición de la autofagia. En condiciones ricas de nutrientes, la activación de TOR inhibe la autofagia para regular el nivel homeostático, mientras que en inanición, la inactivación de TOR favorece la inducción de la autofagia. Se ha determinado la participación de las cinasas PI3K y TOR en el proceso de autofagia mediante estudios farmacológicos con el uso de inhibidores como LY294002, wortmanina y 3-Metil adenina para PI3K y rapamicina para TOR (Modificado de Klionsky, 2005).

prematura, enanismo, menor número de flores y baja fertilidad (Qin *et al.*, 2007).

5.5. Factores que inducen la autofagia

El estrés abiótico más común que induce el proceso de autofagia es la deficiencia de nutrientes, debido a que dicho proceso es requerido para la movilización de nutrientes, aunque también se ha involucrado al estrés oxidativo (Xiong *et al.*, 2007). Además, se ha determinado la participación de la autofagia en la tolerancia de las plantas a sequía y estrés salino, lo que implica a la autofagia en la remoción de proteínas y organelos dañados durante tales condiciones. Por otro lado, una proteína inducida por el ácido abscísico (AtTSPO), se degrada por la vía de la autofagia, sugiriendo su participación en respuestas al ácido abscísico (Liu y Bassham, 2009; Vanhee *et al.*, 2011).

Debido a que la deficiencia de nutrientes (carbono y nitrógeno) puede activar la autofagia, esa condición ha sido usada para su inducción en plantas. Durante la deficiencia de nutrientes, ocurre la formación de autofagosomas y la degradación de materiales citoplásmicos en los compartimientos líticos de cultivos de células vegetales. Mutaciones en genes de la familia *ATG* inducen la expresión de marcadores de senescencia, indicando que las condiciones limitantes de nutrientes aceleran la senescencia. En conjunto se sugiere que la autofagia sirve como un núcleo del sistema regulador que facilita el suministro de nutrientes bajo condiciones de inanición (Rose *et al.*, 2006).

5.6. Autofagia en el desarrollo vegetal

Debido a que la autofagia recicla materiales citoplásmicos, es comprensible que funcione durante la senescencia y la germinación, ejemplo de esto es el reciclamiento del nitrógeno, el cual se encuentra contenido en un 80% en los cloroplastos. Durante la senescencia, las plantas reciclan el nitrógeno de las hojas viejas hacia los órganos en desarrollo (Guiboileau *et al.*, 2010). Otro ejemplo de la participación de la autofagia durante el desarrollo, es la germinación, donde las plantas sintetizan grandes cantidades de proteínas en las semillas y las conservan en vacuolas de almacenamiento; después de la germinación, dichas proteínas son degradadas para aportar nutrientes para el crecimiento de los nuevos órganos en formación (Ibl y Stoger, 2012).

La muerte celular programada (PCD, de sus siglas en inglés) es un mecanismo importante que controla el crecimiento y desarrollo. También actúa como una respuesta de defensa a varios estreses ambientales en organismos eucariontes. En plantas, la PCD es esencial para una gran cantidad de procesos de desarrollo, incluyendo la especificación de órganos florales, la diferenciación del xilema y la senescencia de hojas. Estudios de las interacciones planta-microbio han mostrado que la respuesta hipersensible disparada por la infección de los patógenos, también es una forma de PCD. La autofagia es un mecanismo que facilita la supervivencia celular en respuesta a estreses bióticos y abióticos y controla la PCD mediante la degradación de componentes celulares tóxicos (Kwon y Park, 2008).

Asimismo, se define a la autofagia como un mecanismo de sobrevivencia que protege a las células contra condiciones ambientales desfavorables tales como carencia nutricional, infección microbiana por patógenos, estrés oxidativo y la eliminación de proteínas dañadas. Sin embargo, a menudo se observan estructuras autofágicas dentro de células dañadas y cuando se hiperactiva la autofagia por la sobreexpresión de proteínas ATG, ésta conduce a la muerte. Aunque a niveles fisiológicos la autofagia suprime la PCD promueve así, la sobrevivencia celular y la adaptación al estrés. Lo anterior indica que la autofagia puede participar en dos mecanismos opuestos: el de sobrevivencia y muerte celular, ambos regulados por el grado de activación de dicho proceso. Existe un gran número de evidencias que muestran que la sobrevivencia o la muerte celular dependiente de la autofagia están sujetas a una estrecha regulación que responde a las condiciones ambientales, estadio de desarrollo y tipo celular (Maiuri *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2007).

5.7. Regulación de la autofagia de forma dependiente o independiente de TOR

La cinasa blanco de la rapamicina (TOR), es un miembro de la familia de las PI3K que fosforila los residuos serina/treonina de sus proteínas blanco. TOR fue identificada como el blanco directo del complejo rapamicina-FKBP12, que en conjunto bloquea la actividad de TOR, la cual es esencial para la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Estudios posteriores han identificado un amplio rango de procesos celulares dependientes

de TOR, incluyendo la traducción, la transcripción, el transporte de nutrientes, la endocitosis, la acumulación de glucógeno y la autofagia (Wullschleger *et al.*, 2006). En levaduras dos genes TOR han sido identificados, mientras que las plantas, animales y otros eucariontes sólo presentan un gen. En levaduras y animales, TOR forma dos complejos funcionales diferentes, TORC1 y TORC2. Este último, controla el crecimiento celular regulando la polarización del citoesqueleto de actina de manera independiente a rapamicina, mientras que TORC1 es sensible a rapamicina y regula el crecimiento celular promoviendo la traducción, la transcripción, la biogénesis ribosomal y controla negativamente la autofagia (Díaz-Troya *et al.*, 2008).

TOR funciona como un sensor nutricional; bajo condiciones limitantes de nutrientes disminuye su actividad, lo que resulta en la remoción de transportadores de nutrientes de la superficie celular y conduce a una posterior disminución en la

disponibilidad de ellos (Edinger, 2007). La pérdida del suministro de nutrientes externos es compensada por un aumento en la producción de nutrientes de almacenes intracelulares vía autofagia (Fig. 5.4). Este proceso catabólico procede a niveles basales, en casi todas las células eucariontes para proveer de una función de auto-renovación, que parece ser especialmente importante en células altamente activas y de larga vida como las neuronas. Nutrientes, estreses oxidativo y energéticos dan como resultado una inducción marcada de la autofagia en la mayoría de los tipos celulares para mantener la sobrevivencia celular bajo condiciones adversas. El papel central de TOR como regulador de la autofagia en respuesta a distintos estreses ha conducido al estudio de los mecanismos por los cuales la señalización por TOR suprime la autofagia (Chang *et al.*, 2009).

En plantas, específicamente en *Arabidopsis*, se determinó mediante líneas de baja expresión de TOR que la autofagia es inducida de forma constitutiva.

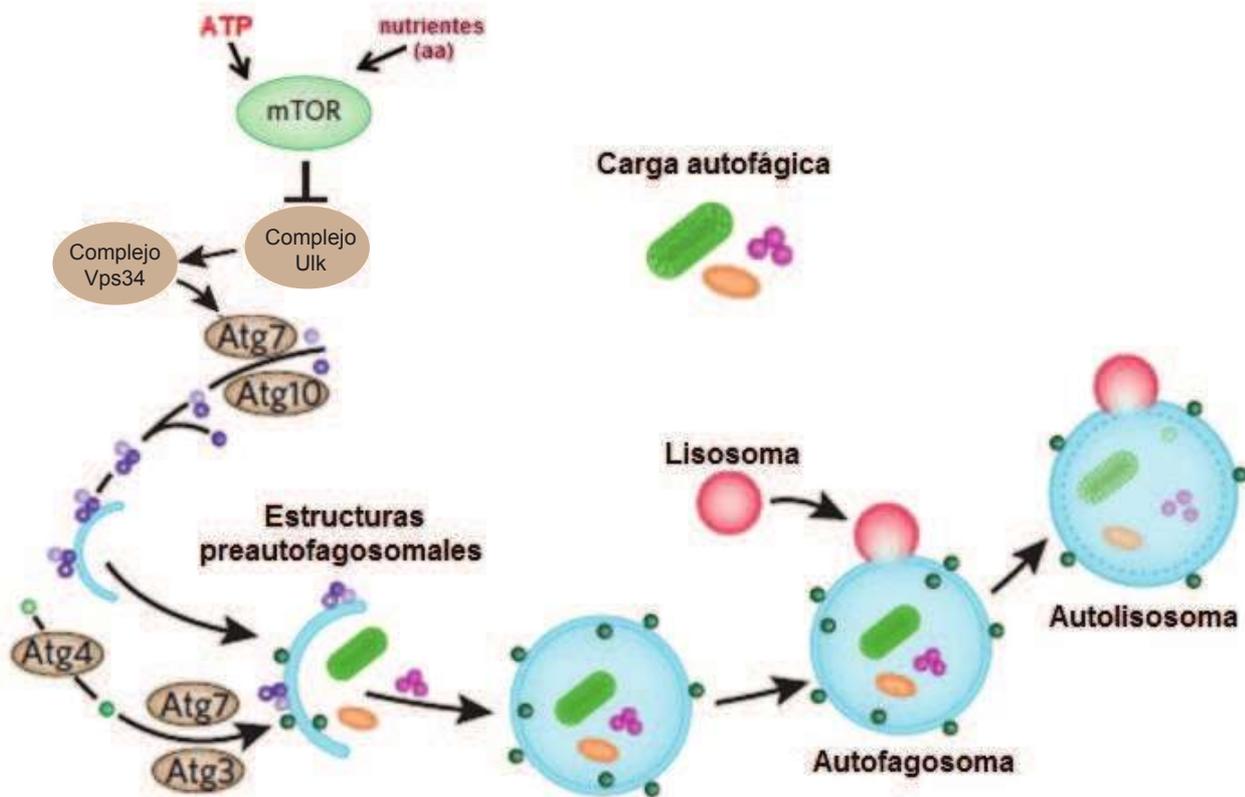


Figura 5.4. Maquinaria molecular de la autofagia. En células animales, el complejo ULK que comprende ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101, es responsable de la iniciación de la autofagia, en respuesta a niveles energéticos bajos. La formación de la doble membrana dentro del citosol requiere la acción del complejo Vps34 (formado por Vps34-Vps15, Beclina-1-Barkor). La actividad de PI3K de la clase III es requerida para la formación del fagóforo. El crecimiento de la vesícula envuelve una porción del citosol, formando un autofagosoma. En el paso final de este proceso, el lisosoma se fusiona con el autofagosoma, liberando hidrolasas lisosomales en el interior, lo que resulta en la degradación del contenido de la vesícula (Modificada de Fleming *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* se encontró que la rapamicina induce la autofagia debido a la inhibición de TOR. En conjunto, estos estudios proporcionaron evidencias de la participación de TOR, en plantas al igual que en otros eucariontes, en la regulación negativa del proceso de autofagia (Liu y Bassham, 2010; Pérez-Pérez *et al.*, 2010).

El mecanismo molecular que se conoce sobre la regulación de la autofagia por TOR en levaduras es el siguiente: TORC1 regula al complejo Atg1-Atg13-Atg17 de manera dependiente del estatus nutricional. Bajo condiciones normales, TORC1 se encuentra activa y fosforila a Atg13; esta forma hiperfosforilada tiene baja afinidad por Atg1 y Atg17. En inanición o por tratamiento con rapamicina, TORC1 es inactivada, lo que provoca la desfosforilación de Atg13. Esta última forma tiene una alta afinidad por Atg1 y Atg17 y la actividad de cinasa de Atg1 es promovida después de su interacción con Atg13 y Atg17, conduciendo con ello a la inducción de la autofagia (Kamada *et al.*, 2000).

Investigaciones en *Arabidopsis* han identificado un sistema de autofagia con un mecanismo similar al de metazoarios (Bassham, 2009). Los elementos caracterizados a la fecha, incluyen al sistema de conjugación ATG8/ATG12, algunos componentes del complejo PI3K como ATG6 (Beclina 1 en mamíferos) que media la nucleación de la vesícula y del complejo transmembranal ATG9/ATG2/ATG18, el cual está involucrado en la promoción de la expansión del fagóforo y finalmente elementos que participan en la vía de conjugación que decora a la membrana del fagóforo con las proteínas ATG8 y ATG12 ligadas a PE y a la proteína ATG5 respectivamente (Suttangkakul *et al.*, 2011).

En levaduras y animales, existen reportes de otras vías de señalización que regulan la autofagia. Un ejemplo de ello, es la proteína cinasa de mamíferos activada por AMP (AMPK) y su homólogo en levaduras SNF1, las cuales han sido relacionadas con la regulación de la autofagia (Yang y Klionsky, 2009). En plantas, cinasas relacionadas a SNF1/AMPK (SNRKs) también han sido identificadas. En *Arabidopsis*, se observó que la SNRK-AKIN10 indujo la expresión de varios genes de autofagia, sugiriendo con ello un papel conservado de la AMPK en la regulación de la autofagia en plantas (Baena-González *et al.*, 2007).

Recientemente se identificaron catorce

compuestos que inducen y siete que suprimen la autofagia y que funcionan de forma independiente a la vía de la cinasa TOR. Estos compuestos parece que actúan sobre una gran variedad de blancos funcionales que incluyen: agonistas del receptor de imidazolina y antagonistas de los canales de calcio tipo L y las calpainas. Sin embargo, aún faltan estudios para conocer la vía de señalización que activa la maquinaria de autofagia de forma independiente a TOR (Fleming *et al.*, 2011).

5.8. Métodos de estudio de autofagia en plantas

Existe una gran variedad de técnicas para monitorear y evaluar la autofagia. A continuación se describen algunas de estas metodologías:

- » La microscopía electrónica. Esta técnica favoreció la caracterización de la autofagia y aún continúa siendo una de las más utilizadas para el análisis de este proceso (Ashford y Porter, 1962).
- » Marcadores moleculares. Consiste en el uso de proteínas que participan en el proceso de autofagia o que se degradan por medio de este proceso, por lo que se han empleado para el monitoreo de la actividad autofágica. Ejemplos de ella son plantas transgénicas que expresan marcadores moleculares (He *et al.*, 2009).
- » Detección de ATG6 y PI3K. Estos son marcadores maestros del proceso, debido a que la primera regula al complejo PI3K de la clase III, el cual produce PI3P (involucrado en la nucleación de vesículas autofágicas); la proteína recombinante entre la fusión de ATG6 con la verde fluorescente (GFP) puede ser cuantificada y analizada por microscopía confocal (Vieira *et al.*, 2001).
- » Pruebas de actividad vacuolar. Éstas se realizan con colorantes específicos de compartimentos ácidos como los autofagosomas y la vacuola debido a su contenido de enzimas hidrolíticas, los cuales al teñirse permiten el análisis de la inducción autofágica (Moriyasu *et al.*, 2003; Kanazawa *et al.*, 2004; Contento *et al.*, 2005).
- » Degradación de proteínas de larga vida dependiente de la autofagia. La determinación de este parámetro es un método eficiente para

monitorear los niveles de autofagia en las células (Mitou *et al.*, 2009).

- » Uso de inhibidores de la autofagia. Principalmente se utilizan los bloqueadores de la cinasa PI3K como la 3-metiladenina, el LY294002 y la wortmanina (Mitou *et al.*, 2009).
- » Uso de las fuentes de nitrógeno y de carbono marcadas radioactivamente. En combinación con tratamientos de limitación nutricional, nos permite la cuantificación de la inducción de la autofagia (Nelson *et al.*, 2007).

5.9. Conclusiones y perspectivas

La autofagia es una vía que regula el reciclamiento de constituyentes intracelulares necesarios para el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia bajo condiciones limitadas de nutrientes (carbono y nitrógeno). Es una ruta evolutivamente conservada en todos los eucariontes incluyendo las plantas. Genes de autofagia identificados en levaduras (*ATG*) están presentes también en plantas, lo que facilita el estudio de esta vía en vegetales. Por otro lado, mutantes en genes *ATG* han sido caracterizadas; la mayoría de ellas muestran alteraciones como una senescencia temprana e hipersensibilidad a condiciones de inanición nutricional. Además, la autofagia ha sido considerada ampliamente como una maquinaria simple de reciclamiento en las células. Sin embargo, los datos que se han acumulado sugieren que dicha vía es mucho más compleja, al regular una amplia variedad de respuestas biológicas. La identificación de genes *ATG* en levaduras y plantas, junto con el desarrollo de sistemas del monitoreo de la autofagia, ha permitido el análisis espacial y temporal de los procesos autofágicos, lo que ha contribuido ampliamente a la disección del proceso. Estos estudios han revelado los papeles biológicos de la autofagia en el reciclamiento de nutrientes, respuestas a muerte celular programada, adaptaciones a estreses ambientales y biogénesis de la vacuola. Por otro lado, se ha determinado en plantas que TOR, al igual que en levaduras y animales, regula negativamente la autofagia; esto se ha inferido debido a la presencia de algunos componentes del complejo TOR y de sus sustratos en dichos organismos. Sin embargo, en plantas las señales río arriba y los sustratos río abajo que controlan la autofagia permanecen desconocidos. Finalmente, aunque existe un gran progreso en el

conocimiento de la autofagia, muchas preguntas quedan por ser elucidadas, por lo que se necesitan estudios sobre la estructura y función de las proteínas ATG, el control de la señalización y las bases de los mecanismos que ocasionan defectos fisiológicos asociados con la activación de la autofagia.

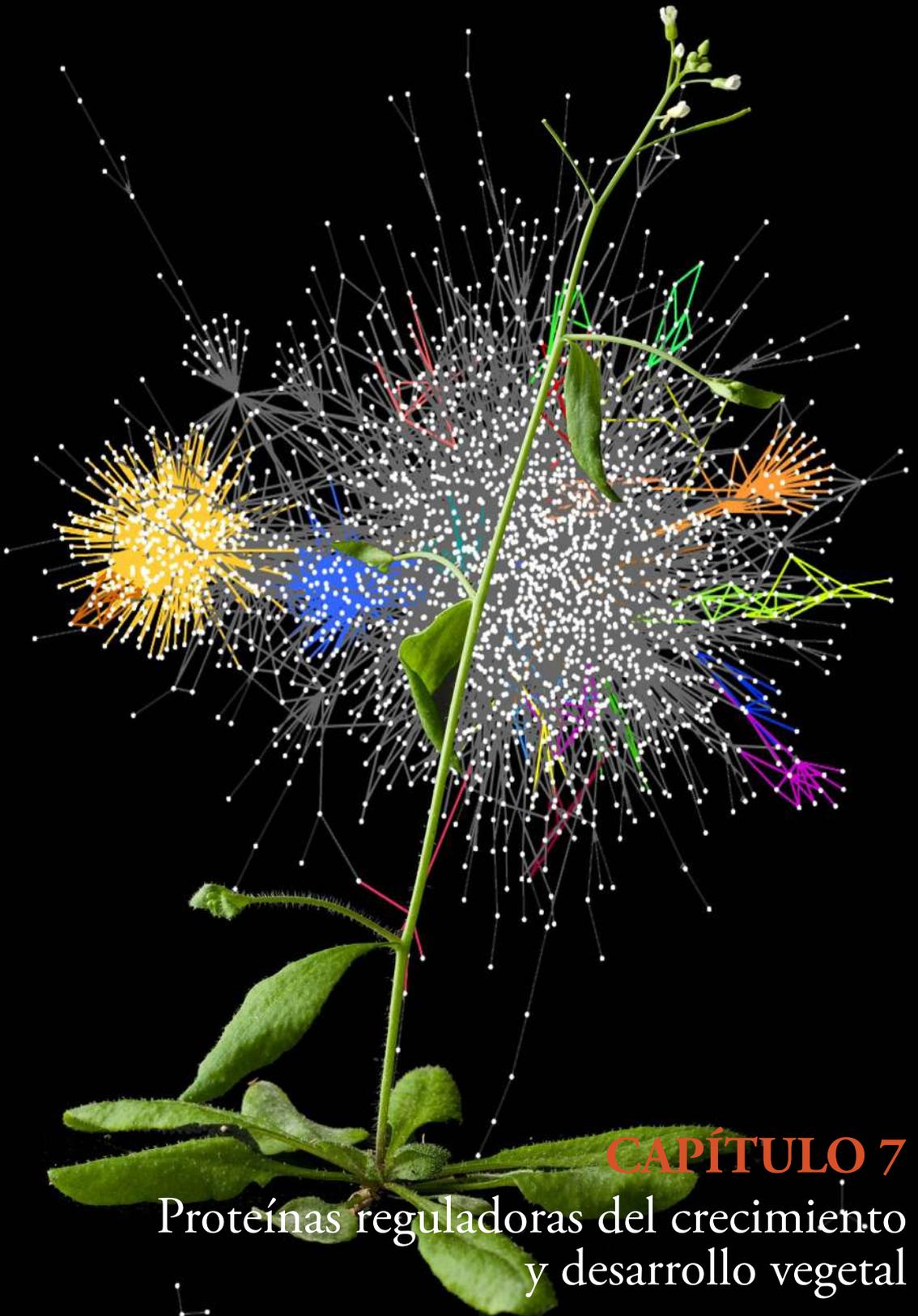
5.10. Referencias

- Ashford T.P. y Porter K.R. 1962. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.* 12: 198–202.
- Baena-Gonzalez E., Rolland F., Thevelein J.M. y Sheen J. 2007. A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448: 938–942.
- Bassham D.C. 2007. Plant autophagy more than a starvation response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 587–593.
- Bassham D.C. 2009. Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 1397–1403.
- Chang Y., Phillips A.R. y Vierstra R.D. 2009. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 232–236.
- Chung T., Phillips A.R. y Vierstra R.D. 2010. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A and ATG12B loci. *Plant J.* 62: 483–493.
- Contento A.L., Xiong Y. y Bassham D.C. 2005. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *Plant J.* 42: 598–608.
- Díaz-Troya S., Pérez-Pérez M.E., Florencio F.J. y Crespo J.L. 2008. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4: 851–865.
- Doelling J.H., Walker J.M., Friedman E.M., Thompson A.R. y Vierstra R.D. 2002. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 33105–33114.
- Edinger A.L. 2007. Controlling cell growth and survival through regulated nutrient transport expression. *Biochem J.* 406:1–12
- Fleming A., Noda T., Yoshimori T. y Rubinsztein D.C. 2011. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 7: 9–17.
- Fujiki Y., Yoshimoto K. y Ohsumi Y. 2007. An *Arabidopsis* homolog of yeast *ATG6/VPS30* is essential for pollen germination. *Plant Physiol.* 143: 1132–1139.
- Guiboileau A., Sormani R., Meyer C. y Masclaux-Daubresse C. 2010. Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C. R. Biol.* 333: 382–391.
- Harrison-Lowe N.J. y Olsen L.J. 2008. Autophagy

- protein 6 (ATG6) is required for pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Autophagy* 4: 339-348.
- He P., Peng Z., Luo Y., Mang L., Yu P., Deng W., An Y., Shi T. y Ma D.** 2009. High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene. *Autophagy* 5: 52-60.
- Ibl V. y Stoger E.** 2012. The formation, function and fate of protein storage compartments in seeds. *Protoplasma* 249: 379-392.
- Inoue Y., Suzuki T., Hattori M., Yoshimoto K., Ohsumi Y. y Moriyasu Y.** 2006. AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in *Arabidopsis* root tip cells. *Plant Cell Physiol.* 47: 1641-1652.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, y Ohsumi Y.** 2000. TOR-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150: 1507-1513.
- Kanazawa T., Taneike I., Akaishi R., Yoshizawa F., Furuya N., Fujimura S. y Kadowaki M.** 2004. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 8452-8459.
- Klionsky D.J.** 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell. Sci.* 118: 7-18.
- Kwon S.I.I. y Park O.K.** 2008. Autophagy in plants. *J. Plant Biol.* 51: 313-320.
- Liu Y., Xiong Y. y Bassham D.C.** 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5: 954-963.
- Liu Y. y Bassham D.C.** 2010. TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 5: 1-9.
- Liu Y. y Bassham D. C.** 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 215-237.
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A. y Kroemer G.** 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 741-752.
- Mitou G., Budak H. y Gozuacik D.** 2009. Techniques to study autophagy in plants. *Int. J. Plant Gen.* Article ID 451357, 14 pages. doi:10.1155/2009/451357.
- Moriyasu Y., Hattori M., Jauh G.Y. y Rogers J.C.** 2003. Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol.* 44: 795-802.
- Muntz K.** 2007. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* 58: 2391-2407.
- Nelson C.J., Huttlin E.L., Hegeman A.D., Harms A.C. y Sussman M.R.** 2007. Implications of 15N-metabolic labeling for automated peptide identification in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 7: 1279-1292.
- Patel S. y Dinesh-Kumar S.P.** 2008. *Arabidopsis* ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* 4: 20-27.
- Pérez-Pérez M.E., Florencio F.J. y Crespo J.L.** 2010. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 152: 1874-1888.
- Phillips A.R., Suttangkakul A. y Vierstra R.D.** 2008. The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 178: 1339-1353.
- Qin G., Ma Z., Zhang L., Xing S., Hou X., Deng J., Liu J., Chen Z., Qu L. y Gu H.** 2007. *Arabidopsis* AtBECLIN1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res.* 17: 249-263.
- Rose T.L., Bonneau L., Der C., Marty-Mazars D. y Marty F.** 2006. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biol. Cell* 98: 53-67.
- Slavikova S., Shy G., Yao Y. y Galili G.** 2005. The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis*. *Plants. J. Exp. Bot.* 56: 2839-2849.
- Sláviková S., Ufaz S., Avin-Wittenberg T., Levanony H. y Galili G.** 2008. An autophagy-associated Atg8 protein is involved in the responses of *Arabidopsis* seedlings to hormonal controls and abiotic stresses. *J. Exp. Bot.* 59: 4029-4043.
- Scott R.C., Juhasz G. y Neufeld T.P.** 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* 17: 1-11.
- Suttangkakul A., Li F., Chung T. y Vierstra R.D.** 2011. The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3761-3779.
- Suzuki N.N., Yoshimoto K., Fujioka Y., Ohsumi Y. y Inagaki F.** 2005. The crystal structure of plant ATG12 and its biological implication in autophagy. *Autophagy* 1: 119-126.
- Thompson A.R. y Vierstra, R.D.** 2005. Autophagic recycling: Lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 165-173.
- Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A. y Vierstra R.D.** 2005. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol.* 138: 2097-2110.
- Um S.H, Frigerio F., Watanabe M., Picard M., Joaquin M., Sticker M., Fumagalli S., Allegrini P. R., Kozma S.C. y Auwerx J.** 2004. Absence of S6K1 protects against age and diet induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431: 200-205.
- Vanhee C., Guillon S., Masquelier D., Degand H., Deleu M., Morsomme P. y Batoko H.** 2011. A TSPO-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast. *J. Exp. Bot.* 62: 497-508.
- Vieira O.V., Botelho R.J., Rameh L., Branchmann S.M., Matsuo T., Davidson H.W., Schreiber A., Backer**

- J.M., Cantley L.C. y Grinstein S.** 2001. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* 155: 19-26.
- Wullschleger S., Loewith R. y Hall M.N.** 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
- Xiong Y., Contento A.L. y Bassham D.C.** 2005. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 42: 535-546.
- Xiong Y., Contento A.L. y Bassham D.C.** 2007. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* 3: 257-258.
- Yang Z. y Klionsky D.J.** 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335: 1-32.
- Yang Z. y Klionsky D.J.** 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12: 814-822.
- Yoshimoto K., Hanaoka H., Sato S., Kato T., Tabata S., Noda T. y Ohsumi Y.** 2004. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16: 2967-3983.

**ANEXO II. Proteínas reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal (Capítulo 7.
Libro Fronteras en la Bioquímica del Desarrollo de las Plantas. Beltrán-Peña y López-
Bucio eds. 2013 ISBN: 978-607-424-392-5)**



CAPÍTULO 7

Proteínas reguladoras del crecimiento
y desarrollo vegetal



Proteínas reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal

Ma. Elena Mellado-Rojas, Ricardo Santillán-Mendoza y Elda Beltrán-Peña

Debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado una capacidad de adaptación a las condiciones dinámicas propias del medio ambiente, lo que se traduce en una plasticidad que les permite alterar programas de desarrollo y metabolismo. La formación de estructuras callosas a partir de casi cualquier tipo de tejido es una forma de adaptación. El cultivo de callos *in vitro* como una herramienta en los estudios de diferenciación de tejidos y propagación, permitió mostrar los requerimientos nutricionales y hormonales (reguladores de crecimiento) indispensables en la señalización de los procesos de crecimiento y desarrollo, que son transmitidos por una comunicación célula-célula. Recientemente, se ha investigado el papel que tiene la señalización de estos procesos por medio de péptidos, ya que una parte de esos péptidos son secretados y actúan con señales locales que median la comunicación célula-célula. Análisis bioquímicos y genéticos de estas moléculas, han determinado su participación en el crecimiento y desarrollo vegetal. Los receptores específicos para varios péptidos han sido identificados como proteínas cinasas de localización membranal y representan la familia de receptores más amplia en plantas. Estos hallazgos muestran la importancia de la señalización por péptidos en la regulación del crecimiento vegetal, funciones que habían sido atribuidas a la acción de pequeños compuestos lipófilos conocidos como fitoreguladores vegetales tradicionales. En este capítulo se analizan los avances en el conocimiento de los péptidos biológicamente activos en plantas.

7.1. Introducción

El desarrollo de organismos multicelulares como animales y plantas a partir de una célula (cigoto) requiere que la expresión genética espacial y temporal se lleve a cabo correctamente. En estos organismos las células individuales también requieren ubicar su posición a partir de su ambiente celular, lo que les permite coordinar patrones de división y diferenciación adecuadamente. Los procesos anteriores son coordinados por sistemas de señalización celulares. En animales la comunicación intercelular es mediada principalmente por péptidos pequeños y en menor grado por esteroides (Li, 2001). En plantas la mayor parte de la comunicación celular conocida está mediada por fitohormonas, tales como auxinas, citocininas, etileno, giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides y ácido jasmónico. Estos metabolitos secundarios usualmente actúan como señales a larga distancia para permitir la comunicación celular en respuesta a cambios internos y externos. Es interesante cómo un número tan pequeño de compuestos químicos, pueden regular la gran diversidad de respuestas celulares que se llevan a cabo en las plantas.

Otros estudios han mostrado un entrecruzamiento de señales entre las hormonas vegetales; por ejemplo, se observó que la mutante resistente a auxinas *axr1* de *Arabidopsis* también presentaba resistencia al etileno y que la mutante insensible al etileno *eir2* (también conocida como *pin2*, *agr1* y *wav6*) mostraba respuestas deficientes a las auxinas, por lo cual, se propuso que interacciones combinadas

entre las fitohormonas podían proporcionar nuevas actividades que no eran observadas cuando las hormonas individuales se añadían exógenamente y ello podría de alguna manera explicar cómo un pequeño número de moléculas podían coordinar el desarrollo vegetal (Lindsey *et al.*, 2002).

Posteriormente, se encontró que otra clase de moléculas que habían sido consideradas específicas de animales, como derivados de esteroides, esteroles y lípidos también presentaban propiedades de señalización importantes en los sistemas vegetales. El óxido nítrico (ON), se identificó en plantas como una señal en las respuestas de defensa contra patógenos, pero lo más controversial fueron las evidencias del papel de los péptidos en la señalización de plantas.

7.2. Péptidos de señalización en plantas

Hasta la fecha se han identificado varios péptidos secretados y sus receptores en plantas (Matsubayashi y Sakagami, 2000; Boller, 2005; Matsubayashi y Sakagami, 2006). Los péptidos reportados fueron de tamaño pequeño (usualmente <20 aa. en su forma madura y rara vez mayores a 120 aa. como precursores) con bajas concentraciones fisiológicas (rango nM), lo que dificultó su identificación. Además, microarreglos y otras herramientas diseñadas para la identificación de genes expresados diferencialmente no han sido de gran utilidad para la caracterización de los péptidos de señalización, debido a que genes pequeños son a menudo pasados por alto o no representados adecuadamente en los microarreglos y los enfoques

Tabla 7.1. Péptidos de señalización en plantas (Modificado de Lindsey *et al.*, 2002).

Clase de péptido	Especies	Función	Referencia
CLAVATA 3	<i>Arabidopsis</i>	Organización del meristemo apical	Fletcher <i>et al.</i> , 1999
ENDO40	Leguminosas y arroz	Nodulación de la raíz	van de Sye <i>et al.</i> , 1996
Fitosulfocinas	Esparrago, arroz y <i>Arabidopsis</i>	División celular	Yang <i>et al.</i> , 2000
POLARIS	<i>Arabidopsis</i>	Expansión celular	Yang <i>et al.</i> , 2000
RALF	Tomate, tabaco y alfalfa	Desconocida	Ryan y Pearce, 2001
SCR	Familia Brassicaceae	Auto-incompatibilidad	Schopfer <i>et al.</i> , 1999
Sistemina	Tomate, papa, tabaco, pimiento	Respuesta sistémica a herida	Pearce <i>et al.</i> , 1991; Constabel <i>et al.</i> , 1998

utilizando algoritmos para la predicción de genes, no interpretan correctamente los marcos de lectura abiertos para dichos péptidos (Olsen *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2012). Estos péptidos juegan papeles muy importantes en la comunicación célula a célula en una gran cantidad de procesos biológicos (Tabla 7.1); por ejemplo, la sistemina que está involucrada en la respuesta al daño, las fitosulfocinas que regulan la división celular, la proteína rica en cisteína del locus S (SCR) que participa en la interacción antera-estigma y la ENDO40 que está involucrada en el desarrollo de los nódulos (Fiers *et al.*, 2007).

Por otra parte, se han acumulado evidencias que indican que los péptidos secretados están sujetos a diversas modificaciones post-traduccionales, tales como

hidroxilación de prolina, arabinosilación de hidroxiprolina y sulfatación de tirosina (Fig. 7.1) (Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2008; Ohyama *et al.*, 2009; Matsusaki *et al.*, 2010).

7.3. Sistemina

El primer péptido vegetal donde se mostró una actividad de señalización fue la sistemina, aislada del jitomate (*Lycopersicon esculentum*) e identificada como un componente de la respuesta sistémica al daño mecánico ocasionado por insectos (Pearce *et al.*, 1991). En respuesta a tal daño, la planta activa la transcripción de genes que codifican para las proteínas de respuesta al daño SWRPs, las cuales se

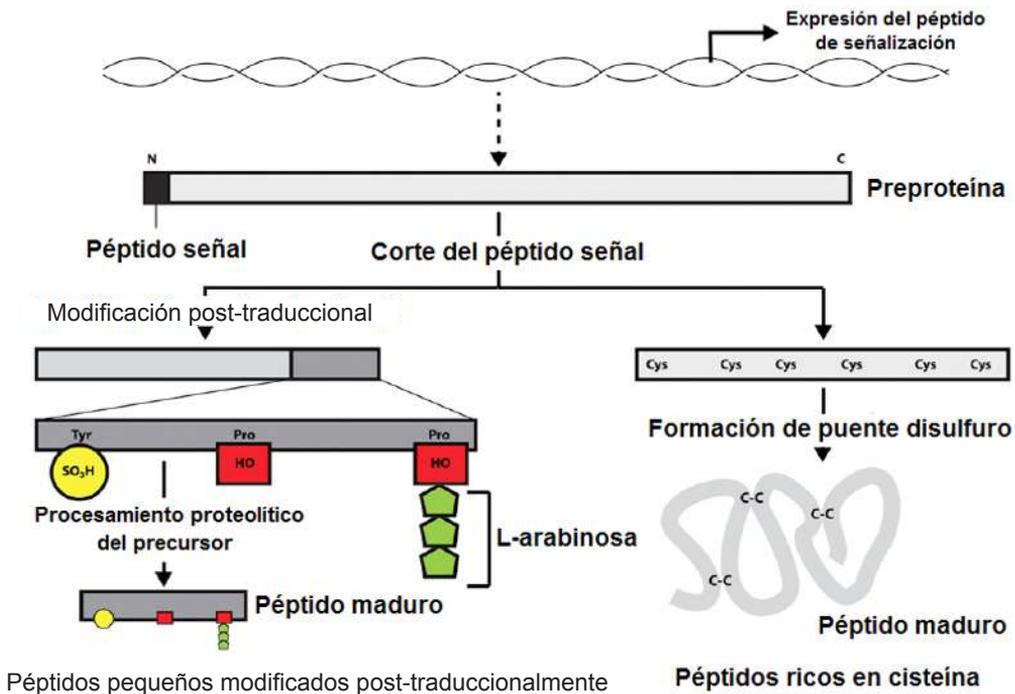


Figura 7.1. Modificaciones post-traduccionales y procesamiento de péptidos de señalización. Después de la entrada del propéptido codificado por un mRNA a la vía secretora, el péptido señal hidrofóbico localizado en el extremo N-terminal es cortado por una peptidasa. Péptidos pequeños modificados post-traduccionales y ricos en cisteína siguen diferentes vías para producir una proteína activa. Todos los péptidos pequeños modificados post-traduccionales descubiertos en plantas hasta este momento sufren una o más de los tres tipos de modificaciones post-traduccionales: sulfatación en tirosina (amarillo), hidroxilación en prolina (rojo), y/o arabinosilación en hidroxiprolina (verde). El corte proteolítico de los péptidos modificados a partir de la secuencia precursora completa la activación. Los péptidos ricos en cisteína muchas veces no requieren procesamiento proteolítico del precursor y su activación es completada por la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína del péptido conservado, lo que le proporciona una conformación activa (Modificado de Murphy *et al.*, 2012).

acumulan no solo en la hoja dañada sino en las no dañadas localizadas en otra parte de la planta (Fig. 7.2). Para la transmisión de dicha señal se propusieron dos candidatos: un fragmento de pectina pequeño, producto de la pared dañada y otro el péptido de 18 aminoácidos, la sistemina que se moviliza en la planta a través del floema y es biológicamente activa a concentraciones femtomolares. El péptido de 18 aa. de sistemina no es el producto de traducción primario de su gen. El cDNA de jitomate codifica para una preproteína de 200 aa., la prosistemina, considerada el precursor de la sistemina. Interesantemente, la ruptura para obtener este último péptido no es un requisito para su actividad, ya que ambas formas son activas (Dombroski *et al.*, 1999; Vetsch *et al.*, 2000), a diferencia de otras proteínas -CLEL y GOLVEN- que se revisarán posteriormente.

También han sido purificados candidatos a receptores de la sistemina en la membrana plasmática del jitomate (Meindl *et al.*, 1998; Scheery y Ryan, 1999) y se ha



Figura 7.2. Activación sistémica de genes relacionados a defensa. En especies solanáceas, la activación sistémica está mediada por una señal transmisible de la hoja dañada a otras. El péptido señal móvil de 18 aminoácidos, sistemina, ha sido identificado en varias especies, incluidas el tomate, la papa y el pimiento y es generado por la ruptura de la preproteína de 200 aminoácidos, prosistemina. En tabaco, se ha identificado una preproteína de 165 aminoácidos que da lugar a dos péptidos de 18 aminoácidos distintos: Tob Sys I (guinda) y Tob Sys II (rojo). La secuencia señal está representada en color verde (Modificada de Lindsey *et al.*, 2002).

sugerido que preproteínas de tabaco son secretadas como “prohormonas”, las cuales son procesadas para generar péptidos de señalización involucrados en las respuestas sistémicas al daño. Si bien, tales prohormonas ya habían sido identificadas en animales y levaduras, este fue el primer ejemplo de dichas proteínas en plantas.

7.4. Factor rápido de alcalinización (RALFs)

Durante una investigación sobre la sistemina en tabaco, se descubrió otro péptido no relacionado con la sistemina que alcalinizaba el medio de cultivo en suspensión más rápido que la primera. Este factor fue denominado RALF de las siglas **R**apid **A**lkalization **F**actor (Tabla 7.2). Los péptidos RALF fueron purificados primero de hojas de tabaco utilizando el ensayo de alcalinización de las células en suspensión, obteniéndose así la secuencia amino terminal del péptido. Esta secuencia permitió la identificación de un cDNA completo, el cual mostraba que RALF codificaba para una preproteína de 115 aa, que al procesarse liberaba a un péptido activo de 49 aa. a partir del extremo carboxilo terminal.

Al principio se propuso que RALF podría participar en defensa, debido a que éste al igual que la sistemina inducía la alcalinización del medio y la activación de la cascada MAPK, sin embargo, posteriormente se mostró que RALF funcionaba como un regulador negativo del crecimiento vegetal (Bedinger *et al.*, 2010). En cuanto a los mecanismos de acción de RALF, se ha observado que dichas proteínas afectan procesos celulares que incluyen el flujo de protones y activación de la vía MAPK, así como también el incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de Ca^{2+} citoplásmico (Pearce *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007; Haruta *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2009).

7.5. Familia de genes SCR y auto incompatibilidad en el género *Brassica*

Las plantas han desarrollado una gran variedad de mecanismos estructurales y genéticos para promover el entrecruzamiento y prevenir la autofertilización. Específicamente, las Brasicáceas, presentan un mecanismo genético de autocompatibilidad esporifítica (SI), en el cual los genes que se expresan en el polen y el estigma determinan si las interacciones polen-estigma son compatibles (permitiendo la fertilización) o incompatibles (impidiendo el crecimiento del tubo

polínico y por tanto la fertilización). El mecanismo SI asegura que el polen de la misma planta sea reconocido y rechazado por el estigma (Brugiere *et al.*, 2000). El sistema de reconocimiento del polen en *Brassica* está determinado por un simple locus polimórfico, el locus S.

Las papilas estigmatales expresan dos proteínas designadas como glucoproteínas del locus S (SLG) y un receptor tipo cinasa del locus S (SRK). La identificación de este último ha permitido proponer que dicha proteína actúa como receptor para el determinante masculino del SI (péptido que hace abortar al polen), promoviendo que la cascada de transducción de señales culmine con el rechazo del polen. La identidad de los péptidos que causan el aborto del polen permaneció elusiva, sin embargo, recientemente se encontró que consiste de una familia de péptidos pequeños (≤ 8 kDa) que son proteínas ricas en cisteína del locus S (SCR) (Fig. 7.3) (Schopfer y Nasrallah, 2000).

Estudios de expresión revelaron que los genes *SCR* se expresan gametofíticamente en las microsporas y en el tapete y que las proteínas pueden difundir entre los granos de polen en desarrollo. Con

el uso de proteínas recombinantes, SRK y SCR fueron marcadas con reporteras y se mostró que SCR se enlaza al ectodominio de SRK y que este enlace es alelo específico (Kachroo *et al.*, 2001). Esto indica que SRK y SCR actúan como un par receptor-ligando durante el reconocimiento del polen propio, con SCR induciendo la autofosforilación de SRK (Takayama *et al.*, 2001).

7.6. Fitosulfocinas

Durante muchos años las personas dedicadas al cultivo de tejidos vegetales, han reconocido el beneficio de los medios condicionados, en los cuales las células habían sido crecidas previamente, para el establecimiento de nuevas líneas celulares particularmente de baja densidad (Street, 1973). Sin embargo, las bases bioquímicas de los medios condicionados permanecieron desconocidas, debido a que dichos medios no podían ser sustituidos por auxinas ni citocininas. El estudio de los componentes activos de los medios condicionados, permitió la identificación de una clase de péptidos vegetales con actividad mitótica. Un bioensayo para identificar

Tabla 7.2. Estudios funcionales de genes y péptidos RALF (Modificado de Bedinger *et al.*, 2010).

Especies	Tejido	Gen	Actividad	Referencias
<i>Solanum lycopersicum</i>	Hojas	<i>SIRALF</i>	Péptido exógeno alcaliniza el medio de crecimiento e inhibe el crecimiento de la raíz	Pearce <i>et al.</i> , 2001
Híbridos <i>Populus</i>	Mayoría de los tejidos	<i>PtdRALF1</i> <i>PtdRALF2</i>	Péptido exógeno causa alcalinización del medio de crecimiento del cultivo celular	Haruta y Constabel, 2003
<i>Nicotiana attenuata</i>	Raíz y peciolos	<i>NaRALF</i>	RNAi de baja expresión causa raíces largas y pelos radiculares anormales	Wu <i>et al.</i> , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Raíces y brotes	<i>AtRALF1</i>	Sobre expresión causa enanismo y adición exógena del péptido inhibe elongación de hipocotilo	Matos <i>et al.</i> , 2008
<i>Medicago truncatula</i>	Raíces	<i>MtRALF1</i>	Sobre expresión presenta menos nódulos y su desarrollo es anormal	Combiere <i>et al.</i> , 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plántulas	<i>AtRALF23</i>	Sobre expresión causa enanismo y reduce la elongación del hipocotilo	Srivastava <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccharum spp</i>	Raíz y hojas en expansión	<i>SaRALF1</i>	Péptido exógeno inhibe el desarrollo del microcallos	Mingossi <i>et al.</i> , 2010
<i>Solanum lycopersicum</i>	Polen	<i>SIRALF</i>	Péptido inhibe el crecimiento del tubo polínico	Covey <i>et al.</i> , 2010

los componentes mitogénicos fue desarrollado en cultivos en suspensión de células de *Asparagus officinalis* (Matsubayashi y Sekagami, 1996). Los cultivos celulares de células simples de espárragos, obtenidos a partir de las cladodas (tallos parecidos a hojas), no pueden dividirse eficientemente a densidades subóptimas. Se purificaron fracciones del medio condicionado y con ello se identificaron dos factores sensibles a pronasas que promovieron la división celular de los cultivos antes mencionados a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-9} M, a los cuales se les denominó fitosulfocinas (PSK- α y PSK- β). Las proteínas PSK- α y PSK- β son péptidos disulfatados de cinco y cuatro aa. respectivamente, las versiones sintéticas de estos péptidos son activas, confirmando así su función. Al igual que la sistemina, PSK- α se deriva del procesamiento de un polipéptido precursor más largo. Cuatro genes que codifican para precursores de PSK- α han sido identificados en *Arabidopsis* y se designaron como *AtPSK1-AtPSK4* (Yang *et al.*, 1999).

7.7. CLAVATA3 y la organización del meristemo apical del brote

En las plantas superiores, el meristemo aéreo es una estructura dinámica cuyo mantenimiento depende de la coordinación de dos procesos antagónicos: iniciación de órganos y renovación de la población de las células fuente. El meristemo apical del brote (SAM) es una fuente de nuevas células para el desarrollo de hojas y retiene su carácter meristemático en forma análoga a las células fuente de animales. Tal organización del SAM está regulada genéticamente y uno de los genes involucrados es *CLAVATA* (*CLV*), ya que mutantes de dicho gen en *Arabidopsis* dan como resultado una hiperacumulación de células fuente en la zona central del ápice del brote, permitiendo con ello el alargamiento de los meristemas vegetativos y florales. Específicamente, cada una de las mutante *clv1* y *clv3* mostraron un fenotipo de alargamiento de meristemo similar, y esta característica junto con experimentos de epistasia, sugirieron que ambos genes funcionan en la misma ruta, lo cual ha sido sustentado por datos moleculares (Clark *et al.*, 1995).

El gen *CLV1* codifica para un receptor tipo cinasa que controla el número de las células fuente y la diferenciación del brote y del meristemo floral de *Arabidopsis* (Dievart *et al.*, 2003). *CLV1* presenta dominios repetidos de leucina extracelulares y un

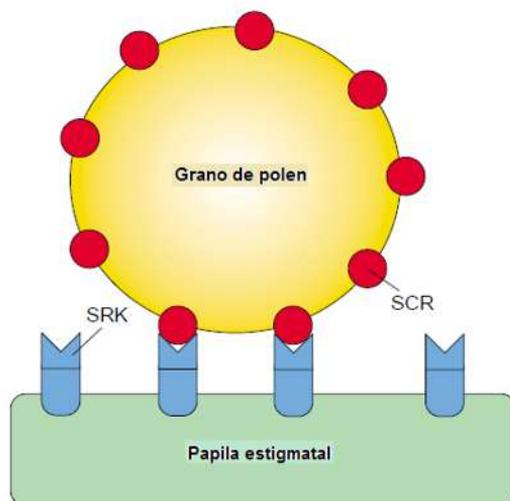


Figura 7.3. Determinación masculina de autoincompatibilidad en el género *Brassica*. En este género se encuentra el locus S, que codifica para una familia de polipéptidos pequeños (<8 kDa) ricos en cisteína (SCR). Las SCR son producidas en microsporas y se localizan a un costado del polen y pueden interactuar directamente con el receptor tipo cinasa del locus S (SRK) localizado en la papila estigmatal para distinguir entre polen compatible o incompatible (Modificada de Lindsey *et al.*, 2002).

dominio intracelular tipo cinasa serina/treonina, mientras que *CLV3* codifica para un péptido señal de 12 aa, derivado del motivo conservado CLE de *CLV3* que promueve la diferenciación celular (Fiers *et al.*, 2007). Ambos *CLV1* y *CLV3* se expresan en el SAM, donde *CLV3* es el ligando para *CLV1*, por otra parte, *WUSCHEL* (*WUS*) codifica para una proteína que promueve la formación y mantenimiento de las células fuente, donde ocurre su expresión y por lo tanto el tamaño del meristemo se mantiene constante debido a una retroalimentación negativa que involucra a la vía de señalización donde participan las proteína *CLV1* y *CLV3* (Fig. 7.4) (Brand *et al.*, 2002).

7.8. Factores de crecimiento del meristemo radicular (RGFs)

Los péptidos secretados son ahora reconocidos como miembros importantes de la señalización intercelular que coordinan y especifican las funciones celulares de las plantas. Algunas de las hormonas peptídicas secretadas sufren modificaciones postraduccionales complejas que son mediadas por enzimas. Debido a que tales modificaciones son críticas para la función

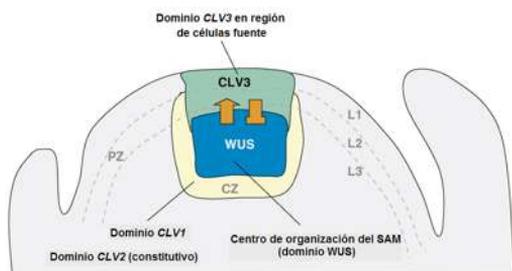


Figura 7. 4. Estructura del SAM y los dominios de expresión de varios genes relacionados a SAM. *CLV1* es expresado en las capas L2 y L3 en la zona central (CZ), mientras que *CLV3* está expresado en las capas L1, L2 y L3 de la misma zona. *WUS* se expresa solo en la capa L3 de la CZ. PZ es la zona periférica (Modificada de Fiers *et al.*, 2007).

de las hormonas, la presencia de hormonas peptídicas no identificadas, debería poder revelarse a través del análisis fenotípico de las mutantes de las enzimas que realizan tales modificaciones postraduccionales. La sulfatación de tirosina es una modificación postraduccional que se ha encontrado en varias hormonas peptídicas animales y vegetales (Moore, 2003). Esta modificación está mediada por las tirosil proteín sulfotransferasas (TPST), las cuales catalizan la transferencia del grupo sulfato a los grupos fenólicos de la tirosina. En *Arabidopsis*, la AtTPST es una proteína transmembranal localizada en el cis-Golgi, se encuentra como un gen de copia simple y pérdida de función en la mutante *tpst1*, muestra un fenotipo pleiotrópico de raíz corta, caracterizado por una reducción en el tamaño del meristemo radicular y pérdida de coordinación entre la elongación celular y la expansión en la zona de diferenciación (**Fig. 7.5**) (Matsuzaki *et al.*, 2010).

La disminución de la expresión del marcador del ciclo celular *CYCB1;1:GUS* indicó que la actividad meristemática de la raíz de la mutante *tpst1* está sumamente disminuída, en contraste al máximo de auxinas en *tpst1*, visualizado por el marcador *DR5:GUS*, el cual fue comparable a la línea silvestre, lo que sugirió que este fenotipo de raíz corta no estaba asociado con la distribución de auxinas. En base a los resultados anteriores Matsuzaki *et al.* (2010), identificaron a un polipéptido que contenía un dominio con la secuencia Asp-Tir y determinaron que el péptido maduro de 13 aa. que portaba una sulfatación en tirosina derivaba del extremo carboxilo terminal de la proteína At5g60810. Para probar si esta última era responsable del fenotipo

de la raíz en la mutante *tpst1*, cultivaron a las plántulas mutantes en medio líquido suplementado con la forma sulfatada -sintetizada químicamente- de la proteína At5g60810, observando la restauración al fenotipo silvestre. A este péptido, lo renombraron como factor de crecimiento meristemático de la raíz (RGF). Estudios complementarios les permitieron demostrar que los RGFs son una familia de péptidos sulfatados redundantes, que mantienen post-embriónicamente el nicho de las células fuente en la raíz a través de la definición de los niveles y patrones de expresión del factor de transcripción PLETORA (PLT), genes que se expresan específicamente en el meristemo radicular y que codifican para factores de transcripción con dominio AP2 que median el patrón del nicho de las células fuente y funcionan independientemente de la vía de las auxinas. La fisiología y las características moleculares de los RGFs son tales que se les considera morfógenos (Aida *et al.*, 2004).

7.9. Péptidos relacionados a CLV3/ERS (CLEL)

En plantas se han reportado una gran cantidad de péptidos secretados derivados del procesamiento proteolítico de proteínas precursoras y que actúan como ligandos que activan corriente abajo una cascada de señalización después de enlazarse a receptores tipo cinasas (RLK) y/o a proteínas receptoras en la membrana plasmática. El grupo más grande de tales péptidos de 12 y 13 aa. identificados hasta el momento, denominados *CLE* por la familia de genes relacionados a *CLV3/ESR* (Clavata3/Embryo-Surrounding-Region) (Bonello *et al.*, 2000), los cuales se cree que funcionan como péptidos ligandos y que regulan la actividad meristemática en los brotes y la raíz, así como también en el tejido vascular (Cock y McCormick, 2001; Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2008; Ohyama *et al.*, 2009).

En varios estudios, estos péptidos que son codificados por genes *CLE* específicos, han sido detectados en plantas y sus formas sintéticas mimetizan la sobre expresión de los genes correspondientes (Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006; Ohyama *et al.*, 2008; Ohyama *et al.*, 2009). Todos los precursores *CLE* contienen un péptido señal en el extremo amino terminal y un motivo de 14 aa. conservado en el extremo carboxilo terminal (motivo *CLE* relacionado a *CLV3/ESR*), a partir del cual se deriva el péptido *CLE* maduro. Un miembro de la familia, *CLE18*,

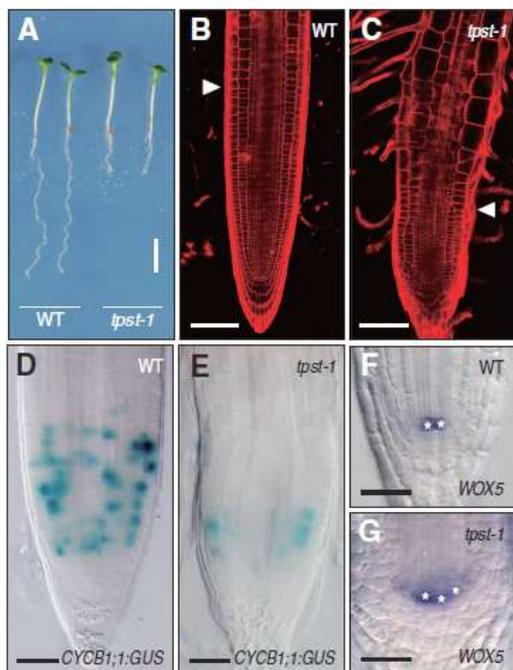


Figura 7.5. Fenotipo del meristemo radicular en la mutante *tpst-1*. (A) Plántulas silvestres y mutantes *tpst-1* 7 días después de la germinación. (B y C) Imágenes confocales del meristemo radicular de plántulas silvestres y *tpst-1* de 5 días después de la germinación. Las cabezas de flecha indican el final del meristemo radicular. (D y E) Expresión a los 5 días del gen reportero de ciclo celular, *CYCB1:1::GUS*. (F y G) Hibridación *in situ* del marcador específico de centro quiescente, *WOX5*. Los asteriscos muestran las células expresando a *WOX5*. La escala de la barra es (A) 5 mm; (B y C) 100 μ m; (D a G) 50 μ m (Tomada de Matsuzaki *et al.*, 2010).

difiere de las otras CLEs en que su motivo CLE está posicionado en la región variable, no en la región carboxilo terminal.

La sobreexpresión de *CLE18* en *Arabidopsis* causa un fenotipo de raíz larga (Strabala *et al.*, 2006), mientras que un péptido sintético de 12 aa, derivado del motivo CLE de la región variable del gen, suprime el crecimiento de la raíz y causa un fenotipo de raíz corta. Al analizar la proteína precursora de *CLE18*, se identificó una secuencia de 13 aa. en su extremo carboxilo terminal, como un nuevo motivo potencialmente responsable del fenotipo de raíz larga causado por la sobre expresión de *CLE18 in planta*. Además, se ha observado la participación de otros péptidos CLE en varios procesos de desarrollo como

el de las anteras de *Arabidopsis*, en donde se incluyen la expresión de *CLE1*, *CLE11*, *CLE12*, *CLE13* durante varias etapas del desarrollo del polen, dentro de los gránulos del polen y en el tapete de las anteras y *CLE25*, únicamente expresado en el desarrollo temprano de las anteras. Por otro lado, *CLE8* se expresa durante la diferenciación y proliferación del embrión y del endospermo (Jun *et al.*, 2010). Recientemente Meng *et al.* (2012), reportaron que a diferencia de los factores RGFs, los péptidos CLEL no requieren modificaciones postraduccionales y funcionan en la regulación de la dirección del crecimiento de la raíz y el desarrollo de las raíces laterales.

7.10. GOLVEN, péptido que modula la distribución de auxinas

Las fitohormonas pueden sintetizarse y percibirse en distintos tejidos, de ahí que lleven la información a grandes distancias, además las células vegetales también emplean un repertorio de péptidos que llevan las señales a distancias cortas (Butenko *et al.*, 2009). Estas dos clases de moléculas son importantes en la modulación del crecimiento y desarrollo de plantas y pueden estar involucradas en el mismo proceso, tal como la elongación celular (Santner y Estelle, 2009), el control de la proliferación celular (Matsubayashi y Sakagami, 2006) y la organización de los meristemos apical y cambial (Hirakawa *et al.*, 2008; Matsuzaki *et al.*, 2010). No obstante se conoce muy poco de la integración entre las acciones de las fitohormonas y la señalización de los péptidos en el microambiente celular.

Las plantas responden a la luz y a la gravedad cambiando la dirección del crecimiento de los órganos y de las auxinas (reguladores clave en estas respuestas trópicas) a través de la formación de gradientes. El establecimiento de tales gradientes depende a su vez del transporte polar de auxinas intercelular (PAT), el cual está mediado por la familia de acarreadores de flujo AUX1/LIKE-AUX1 y de los transportadores de eflujo de la familia PIN-FORMED (PIN) (Vieten *et al.*, 2007).

Experimentos con inhibidores químicos del PAT (Parry *et al.*, 2001) y con plantas mutantes en los genes *AUX1*, *PIN2* y *PIN3* (Friml *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2003) mostraron una pérdida en la distribución lateral de las auxinas después de una estimulación gravitropica y una inhibición en la respuesta a la

gravedad. El establecimiento y mantenimiento de los gradientes de auxinas por la red de las proteínas PIN también controlan la posición del nicho de las células fuente, desde la embriogénesis y durante todo el desarrollo de la planta adulta. Los péptidos vegetales también se han visto involucrados en la homeostasis de las células fuente (Sthal y Simon, 2010). Como mencionamos antes, recientemente se reportó que una familia de péptidos secretados, los RGFs, se requieren para el mantenimiento del meristemo radicular (Matsuzaki *et al.*, 2010).

La caracterización molecular de tales péptidos maduros reveló que su bioactividad dependía de una sulfatación en tirosina. Whitford *et al.* (2012), reportaron que los genes que codifican para unos péptidos pequeños secretados, denominados GOLVEN (GLV), modulan la distribución de las auxinas y que la desregulación de las funciones de los GVL impide la formación de los gradientes de auxinas y altera la reorientación de los brotes y raíces después de un estímulo gravitropico (**Fig. 7.6**).

Específicamente los autores mostraron que GLV modula la dinámica del tráfico del acarreador de flujo de auxinas, PIN2 involucrado en la respuesta trópica de la raíz y la organización meristemática, siendo uno de los primeros reportes que enlazan la acción local de los péptidos secretados con los transportadores de las auxinas.

7.11. Insulina

En la mayoría de los eucariontes se ha demostrado que la cascada de transducción de señales conservada evolutivamente, PI3K/TOR/S6K, regula el crecimiento y la proliferación celular. Esta cascada finaliza con la activación del aparato traduccional de la célula, el cual selectivamente induce la traducción de mRNAs ribosomales y estimula la transición de las fases G₁/S del ciclo celular. La vía es activada por señales como nutrientes, niveles energéticos y factores de crecimiento como la insulina o factores de crecimiento parecidos a insulina (IGFs), lo que permite a los organismos regular su crecimiento y división celular en respuesta a tales estímulos (Garrocho-Villegas y Sánchez de Jiménez, 2012).

En plantas un gran número de reportes han descrito la presencia de varios componentes de la cascada PI3K/TOR/S6K, tales como TOR, RAPTOR y las cinasas S6K1 y S6K2 (Menand *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2004; Mahfouz *et al.*, 2006), al igual que otras proteínas involucradas en la activación de TOR como FKBP12 (Sormani *et al.*, 2007) y TCPT (Berkowitz *et al.*, 2008) (**Fig. 7.7**). Previamente se había demostrado que durante la germinación de ejes embrionarios de maíz, la insulina estimulaba la fosforilación de S6K y aceleraba la síntesis de las proteínas ribosomales (Sánchez de Jiménez *et al.*, 1999). Rodríguez-López *et al.* (2011), aislaron un péptido de 6 kDa de maíz, al cual denominaron ZmIGF y que al igual que la insulina, activaba la

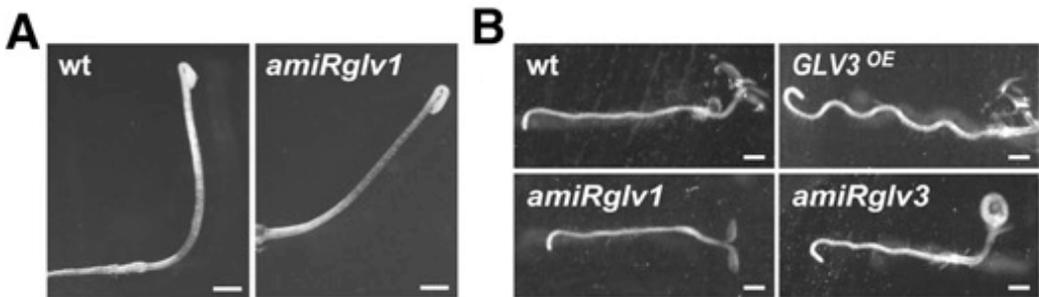


Figura 7.6. Fenotipos en líneas de baja y sobre expresión de GLV. (A) Respuesta a estimulación gravitropica en hipocotilos etiolados de plantas silvestres y de baja expresión *amiRglv1*. (B) Respuesta a estimulación gravitropica en raíces de plantas silvestres, de baja expresión *amiRglv1*, *amiRglv3* y de sobre expresión *GLV3^{OE}*. La escala de la barra es, (A) 1 mm y (B) 0.2 mm (Tomada de Whitford *et al.*, 2012).

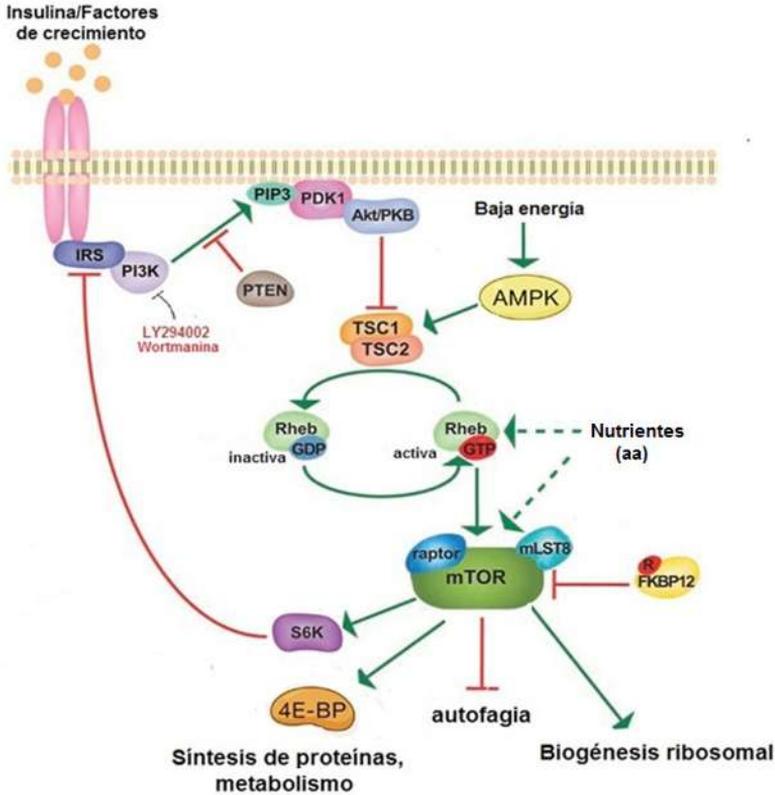


Figura 7.7. Regulación de la ruta mTOR por insulina. La cinasa TOR está regulada por tres rutas disparadas por diferentes factores; nutrientes, estrés e insulina/IGF. Esta última activa a PI3K la cual permite la fosforilación e inactivación del complejo TSC1/ TSC2 por Akt, lo que permite que Rheb active al complejo mTORC1. La segunda vía de TOR sensa nutrientes (aminoácidos) mediante la proteína hVps34, esta última se activa por unión del complejo Ca²⁺/Calmodulina (CaM) en respuesta a un aumento de aminoácidos. La tercera ruta se activa por estrés energético (aumento en la relación AMP/ATP) a través de la fosforilación y activación del complejo TSC1/TSC2 por la cinasa AMPK (Modificado de Hinault *et al.*, 2006 y de Díaz-Troya *et al.*, 2008).

cascada PI3K/TOR/S6K induciendo con ello el crecimiento y la síntesis de proteínas ribosomales y del DNA. Así, parece ser que los metazoarios superiores y las plantas conservan vías bioquímicas similares para regular el crecimiento celular a través de agonistas y blancos equivalentes que conducen a la activación de la cascada PI3K/TOR/S6K.

7.12. Conclusiones y perspectivas

En animales las proteínas reguladoras del crecimiento y desarrollo se conocen desde hace más de 60 años, sin embargo, investigaciones en las últimas dos décadas han revelado su importancia en plantas.

Varias hormonas peptídicas vegetales incluyen a la sistemina, CLV3, RALFs, SCR, PSK, RGFs, CLEL, GOLVEN e insulina y aunque esta última no es sintetizada en vegetales se ha determinado que existe un factor de crecimiento parecido a insulina en maíz (*ZmIGF*) el cual participa en el crecimiento y desarrollo vegetal.

Los primeros estudios mostraron que los péptidos PSK, CLV3 y sistemina son secretados e interactúan directamente con sus receptores. Mientras que, SCR es sintetizado, después transportado al polen y por último a los receptores del estigma. Los precursores de la prosistemina no tienen secuencia señal y aparentemente son sintetizados en el citosol por

ribosomas libres, lo cual no ha sido observado en los precursores de hormonas peptídicas animales. Sin embargo, la sistemina debe ser transportada a los espacios extracelulares después del daño, por un mecanismo desconocido, donde puede interactuar con su receptor sobre la superficie celular. A la fecha, los receptores para las hormonas polipeptídicas caracterizados, son proteínas ricas en repeticiones de leucina (receptores de CLV y sistemina) o receptores cinasas ricos en cisteína (SRK). Estas y otras investigaciones que están surgiendo sobre los péptidos RGF, CLEL, GOLVEN e insulina en plantas, proveerán información sobre las interacciones ligando-receptor y en la determinación de como dichos complejos transmiten información a través de las membranas plasmáticas de la planta facilitando la señalización intracelular.

En la actualidad, aunque sólo un pequeño número de señales polipeptídicas vegetales y sus receptores han sido identificados, la señalización por polipéptidos en plantas se ha convertido en un tema nuevo para la investigación científica. Además, un mayor número de investigaciones en esta área son necesarias para obtener un panorama completo de la importancia de la señalización de polipéptidos en las plantas y de la bioquímica fundamental de las interacciones polipéptido-receptor, así como los mecanismos que subyacen a su señalización en el crecimiento y desarrollo vegetal, la defensa y en las respuestas de la planta al medio ambiente. Esta área de investigación es muy prometedora para el desarrollo de los conocimientos fundamentales sobre la biología de la planta, así como para proporcionar nuevas aproximaciones biotecnológicas que beneficien la agricultura y la salud humana.

7.13. Referencias

Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.S., Amasino R. y Scheres B. 2004. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.

Bedinger P.A., Pearce G. y Covey P.A. 2010. RALFs, peptide regulators of plant growth. *Plant Signal. Behav.* 5: 1342-1346.

Berkowitz O., Jost R., Pollmann S. y Masle J. 2008. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 3430-3447.

Boller T. 2005. Peptide signalling in plant development

and self/non-self perception. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 116-122.

Bonello J.F., Opsahl-Ferstad H.G., Pérez P., Duman C. y Rogowsky P.M. 2000. ESR genes show different levels of expression in the same region of maize endosperm. *Gene* 246: 219-227.

Brand U., Grunewald M., Hobe M. y Rudiger S. 2002. Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 565-575.

Brugiére N., Rothstein S.J. y Cui Y. 2000. Molecular mechanisms of self-recognition in *Brassica* self-incompatibility. *Trends Plant Sci.* 5: 432-438.

Butenko M.A., Vie A.K., Brembu T., Aalen R.B. y Bones A.M. 2009. Plant peptides in signalling: looking for new partners. *Trends Plant Sci.* 14: 255-263.

Clark S.E., Running M.P. y Meyerowitz E.M. 1995. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121: 2057-2067.

Cock J.M. y McCormick S. 2001. A large family of genes that share homology with *CLAVATA3*. *Plant Physiol.* 126: 939-942.

Combiér J.P., Kuster H., Journet E.P., Hohnjec N., Gamas P. y Niebel A. 2008. Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes *MtRALF1* y *MtDVL1*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 1118-1127.

Constabel C.P., Yip L. y Clarence A.R. 1998. Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Mol. Biol.* 36: 55-62.

Covey P.A., Subbiah C.C., Parsons R.L., Pearce G., Lay F.T., Yerson M.A., Ryan C.A. y Bedinger P.A. 2010. A pollen specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant Physiol.* 153: 703-715.

Díaz-Troya S., Pérez-Pérez M.E., Florencio F.J. y Crespo J.L. 2008. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4: 851-865.

Dievart A., Dalal M., Tax F.E., Lacey A.D., Huttly A., Li J. y Clark S.E. 2003. *CLAVATA1* Dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development. *Plant Cell* 15: 1198-1211.

Dombrowski J.E., Pearce G. y Ryan C.A. 1999. Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. 96: 12947-12952

Fiers M., Ku K.L. y Liu C.M. 2007. CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 39-43.

Fletcher J.C., Bry U., Running M.P., Simon R. y Meyerowitz E.M. 1999. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.

Friml J., Wisniewska J., Benkova E., Mendgen K. y

- Palme K. 2002. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809.
- Friml J., Vieten A., Saucer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R. y Jurgens G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426: 147-153.
- Garrocho-Villegas V. y Sanchez de Jimenez E. 2012. TOR pathway activation in *Zea mays* L. tissues. *Plant Signal. Behav.* 7: 1-3.
- Haruta M. y Constabel C.P. 2003. Rapid alkalinization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leave y methyl jasmonate-treated cells. *Plant Physiol.* 131: 814-823.
- Haruta M., Monshausen G., Gilroy S. y Sussman M.R. 2008. A cytoplasmic Ca²⁺ functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry* 47: 6311-6321.
- Hinault C., Van Obberghen E. y Mothe-Satney I. 2006. Role of amino acids in insulin signaling in adipocytes and their potential to decrease insulin resistance of adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* 17: 374-378.
- Hirakawa Y., Shinohara H., Kondo Y., Inoue A., Nakanomyo I., Ogawa M., Sawa S., Ohashi-Ito K., Matsubayashi Y. y Fukuda H. 2008. Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15208-15213.
- Ito Y., Nakanomyo I., Motose H., Iwamoto K., Sawa S., Dohmae N. y Fukuda H. 2006. Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* 313: 842-845.
- Jun J., Fiume E., Roeder A.H., Meng L., Sharma V.K., Osmont K.S., Baker C., Ha C.M., Meyerowitz E.M., Feldman L.J. y Fletcher J.C. 2010. Comprehensive analysis of CLE polypeptide signaling gene expression and overexpression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154: 1721-1736.
- Kachroo A., Schopfer C.R., Nasrallah M.E. y Nasrallah J.B. 2001. Allele-specific receptor-lyg interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science* 7: 1824-1826.
- Kondo T., Sawa S., Kinoshita A., Mizuno S., Kakimoto T., Fukuda H. y Sakagami Y. 2006. A plant peptide encoded by *CLV3* identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* 313: 845-848.
- Li K.W. 2001. Peptide neurotransmitters and hormones. *Encyc. Life Sci. Nat. Pub. Group*. DOI: 10.1038/npge.els.0000063.
- Lindsey K., Casson S. y Chilly P. 2002. Peptides: new signalling molecules in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 78-83.
- Mahfouz M.M., Kim S., Delauney A.J. y Verna D.P.S. 2006. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18: 477-490.
- Matos J.L., Fiori C.S., Silva-Filho M.C. y Moura D.S. 2008. A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 582: 3343-3347.
- Matsubayashi Y. y Sakagami Y. 1996. Phytosulfokine, sulfated polypeptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7623-7627.
- Matsubayashi Y. y Sakagami Y. 2000. 120- and 160-kDa receptors for endogenous mitogenic peptide, phytosulfokine-alpha, in rice plasma membranes. *Biol. Chem.* 275: 15520-15525.
- Matsubayashi Y. y Sakagami Y. 2006. Peptide hormones in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:649-674.
- Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A. y Matsubayashi Y. 2010. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 27: 1065-1067.
- Meindl T., Boller T. y Felix G. 1998. The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 10: 1561-1570.
- Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C. y Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6422-6427.
- Meng L., Buchanan B.B., Feldman L.J. y Luan S. 2012. CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth y lateral root development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 1760-1765.
- Mingossi F.B., Matos J.L., Rizzato A.P., Medeiros A.H., Falco M.C., Silva-Filho M.C. y Moura D.S. 2010. SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. *Plant Mol. Biol.* 73: 271-281.
- Moore K.L. 2003. The biology and enzymology of protein tyrosine *o*-sulfation. *J. Biol. Chem.* 278: 24243-24246.
- Murphy E., Smith S. y De Smet I. 2012. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *Plant Cell* 24: 3198-3217 DOI 10.1105/tpc.112.099010.
- Ohyama K., Ogawa-Ohnishi M. y Matsubayashi Y. 2008. Identification of a biological active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by *in silico* gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *Plant J.* 55: 152-160.
- Ohyama K., Shinohara H., Ogawa-Ohnishi M. y Matsubayashi Y. 2009. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Chem. Biol.* 5: 578-580.
- Olsen A.N., Mundy J. y Skriver K. 2002. Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. *In Silico Biol.* 2: 441-451.
- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C. y Bennett M.J. 2001.

- Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* 25: 399–406.
- Pearce G., Strydom D., Johnson S. y Ryan C.A.** 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 23: 895–897.
- Pearce G., Moura D.S., Stratmann J. y Ryan C.A.** 2001. RALFs, a 5 kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12843–12847.
- Reyes de la Cruz H., Aguilar R. y Sanchez de Jimenez E.** 2004. Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70^{S6K}. *Biochemistry* 43: 533–539.
- Rodríguez-Lopez C.D., Rodríguez-Romero A., Aguilar R. y Sánchez de Jiménez E.** 2011. Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Prot. Pept. Lett.* 18: 1–8.
- Ryan C.A. y Pearce G.** 2001. Polypeptide hormones. *Plant Physiol.* 125: 65–68.
- Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E. y Ortiz-López A.** 1999. Insulin stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Physiol. Plant.* 105: 148–154.
- Santner A. y Estelle M.** 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071–1078.
- Scheer J.M. y Ryan C.A.** 1999. A 160-kD Systemin Receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* 11: 1525–1535.
- Schopfer C.R., Nasrallah M.E. y Nasrallah J.B.** 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697–1700.
- Schopfer C.R. y Nasrallah J.B.** 2000. Self-incompatibility: Prospects for a novel putative peptide-signalind molecule. *Plant Physiol.* 124: 935–940.
- Smith S. y De Smet I.** 2012. Root system architecture: Insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367: 1441–1452.
- Sormani R., Yao L., Meny B., Ennar N., Lecampion C., Meyer C. y Robaglia C.** 2007. *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR y its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7: 26–33.
- Srivastava R., Liu J.X., Guo H., Yin Y. y Howell S.H.** 2009. Regulation y processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis*. *Plant J.* 29: 930–939.
- Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C. y Simon R.** 2009. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol.* 19: 909–914.
- Stahl Y. y Simon R.** 2010. Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 53–58.
- Strabala T.J., O'Donnell P.J., Smit A.M., Ampomah-Dwamena C., Martin E.J., Netzler N., Nieuwenhuizen N.J., Quinn B.D., Foote H.C.C. y Hudson K.R.** 2006. Gain-of-function phenotypes of many *CLAVATA3/ESR* genes, including four new family members, correlate with them variations in the conserved *CLAVATA3/ESR* domain. *Plant Physiol.* 140: 1331–1344.
- Street H.E.** 1973. Single-cell clones. Chapter 8 in Plant Tissue and Cell Culture. Street H. E., ed, pp. 191–204, Black. Sci. Pub.
- Takayama S., Shimamoto H., Shiba H., Funato M., Che F.S., Watanabe M., Iwano M. y Isogai A.** 2001. Direct lity-receptor complex interaction controls *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 413: 534–538.
- Van de Sye K., Pawlowski K., Czaja I., Wieneke U., Schell J., Schmidt J., Walden R., Matvienko M., Wellink J., van Kammen A., Franssen H. y Bisseling T.** 1996. Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume. *Science* 273: 370–373.
- Vetsch M., Janzik I. y Schaller A.** 2000. Characterization of prosystemin expressed in the baculovirus/insect cell system reveals biological activity of the systemin precursor. *Planta* 211:91–97.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B. y Friml J.** 2007. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12: 160–168.
- Whitford R., Fernyez A., Tejos R., Cuellar-Perez A., Kleine-Vehn J., Vanneste S., Drozdzecki A., Leitner J., Abas L., Aerts M., Hoogewijs K., Baster P., De Groot R., Lin C.Y., Storme V., Van de Peer Y., Beeckman T., Madder A., Devreese B. Luschnig C., Friml J. y Hilson P.** 2012. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Dev. Cell* 22: 678–685.
- Wu J., Kurten E.L., Monshausen G., Hummel G.M., Gilroy S. y Baldwin I.T.** 2007. NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuate*, is required for root hair development and plant growth in native soils. *Plant J.* 52: 877–890.
- Yang H.P., Matsubayashi Y., Nakamura K. y Sakagami Y.** 1999. *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine- α , a sulfated peptide growth factor in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13560–13565.
- Yang H.P., Matsubayashi Y., Hanai H. y Sakagami Y.** 2000. Phytosulfokine- α , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol.* 41: 825–830.