Universidad Autónoma Metropolitana

**“EFECTO DE LA INSULINA EN LA ACTIVACIÓN Y
LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA VÍA TOR-S6K EN
EMBRIONES DE MAÍZ (*Zea mays* L.) EN GERMINACIÓN”**

Tesis

Que para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

Presenta:

Biól. Exp. David González Gedeón

Codirectores:

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Dr. David Manuel Díaz Pontones

Asesora:

Dra. Tzventanka Dimitrova Dinkova

Junio 2019

El programa de posgrado de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 001481, en Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo consejo con clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 615964.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológica y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis Titulada: "Efecto de la insulina en la activación y localización de proteínas de la vía TOR-S6K en embriones de maíz (*Zea mays* L.) en germinación", que presenta David González Gedeón el día 14 de Junio del 2019.

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, adscripción: Facultad de Química UNAM, correo: cesy@unam.mx

Dr. José Isaac Corona Carrillo, adscripción: Departamento de Ciencias de la Salud, correo: jicc@virtuami.izt.uam.mx

Dra. Claudia Barbosa Martínez, adscripción: Departamento de Biología CBS UAM-I, correo: clbm@xanum.uam.mx

Dra. Helia Reyna Osuna Fernández, adscripción: Facultad de Ciencias UNAM, correo: hrof@ciencias.unam.mx

Comité Tutorial

Directora: Dra. Laura Josefina Pérez Flores Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Correo: ljpf@xanum.uam.mx

Teléfono: 015558046481

Codirector: Dr. David Manuel Díaz Pontones Laboratorio de Bioquímica Tisular. Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Correo: dmdp@xanum.uam.mx

Teléfono: 015558044736

Asesora: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Conjunto E, edificio de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio 103

Correo: cesy@unam.mx

Teléfono: 015556225277

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Laura Josefina Pérez Flores por todo el apoyo y dedicación, su participación fue indispensable para la realización de este proyecto. De corazón reconozco que su determinación y experiencia ha hecho posible culminar una etapa más en el desarrollo de mi formación y de mi vida, sus consejos me servirán para seguir creciendo como persona.

Agradezco al Dr. David Manuel Díaz Pontones por la paciencia, apoyo emocional y determinación durante la realización de este proyecto. El Dr. David Pontones es un gran guía, un gran amigo y consejero. De corazón admiro su persona y su trabajo como investigador, las experiencias que adquirí con usted me servirán para toda la vida.

Agradezco a mi asesora la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova por el enorme apoyo que me brindó en tiempos difíciles, sus correcciones y comentarios durante la elaboración de la tesis. La atención que me otorgó, su gran paciencia y conocimiento hicieron posible culminar la maestría, de corazón usted es una persona que inspira a seguir creciendo en el ámbito científico.

También aparte de agradecer a mi comité tutorial quiero dedicar este trabajo especialmente y con mucho amor a mi familia que siempre son los que han dado todo por mi bien estar y desarrollo, nada de lo que he logrado en mi vida hubiera sido posible sin ustedes, este nuevo éxito en mi vida te lo dedico a ti papá y mamá que siempre serán la base y el motor de vida, siendo ustedes el mayor ejemplo a seguir me siento pleno, feliz y con un gran orgullo de lo que he logrado. A mi hermano, que me ha ayudado en momentos difíciles, a desarrollarme como persona y a siempre salir adelante. De corazón los amo mucho y agradezco eternamente su apoyo.

A mis compañeros que siempre me apoyaron durante la maestría, los admiro como amigos y como personas, ustedes también son una gran inspiración y siempre me han motivado a seguir en la lucha.

Índice

1) Resumen	1
1.1) Summary	3
2) Antecedentes	5
2.1) Importancia del maíz	5
2.2) Anatomía del grano de maíz	6
2.3) Germinación	8
2.3.1) Germinación de semillas de maíz	10
2.4) Inducción de la germinación y crecimiento de maíz por ZmIGF e insulina	12
2.5) Participación de la vía TOR-S6K en la regulación del crecimiento en eucariotes	14
2.6) Intermediarios de la vía TOR-S6K identificados en plantas	15
2.7) Participación de la vía TOR-S6K en la biogénesis de ribosomas, síntesis de proteínas, germinación y crecimiento en plantas en respuesta a distintos efectores	17
2.8) Proteínas ribosomales en plantas	19
3) Justificación	23
4) Pregunta de investigación	23
5) Hipótesis	23
6) Objetivo General	24
7) Objetivos Particulares	24
8) Metodología	24
8.1) Material biológico y tratamientos	24
8.2) Obtención de cortes histológicos de los embriones	25
8.2.1) Pre-tratamientos de los cortes para exponer los epítopes estudiados	25
8.2.2) Inmunolocalización de las proteínas estudiadas en embriones de maíz en germinación	25
8.2.3) Localización de PRL7 en tejidos de radícula de embriones de maíz en germinación mediante inmunocitoquímica	25
8.3) Morfometrías de las micrografías con microscopía confocal	27
9) Resultados	28
9.1.1) Figura 2	29
9.1.2) Figura 3	30
9.1.3) Figura 4	32
9.1.4) Figura 5	33
9.1.5) Figura 6	35
9.1.6) Figura 7	36
9.1.7) Figura 8	38
9.1.8) Figura 9	39
9.1.9) Figura 10	40
9.1.10) Figura 11	41
9.2) Localización de PRL7 en tejidos de radícula de embriones de maíz en germinación mediante inmunocitoquímica	42
9.2.1) Figura 12	43
9.2.2) Figura 13	44

9.2.3) Figura 14.....	46
9.2.4) Figura 15.....	47
9.2.5) Figura 16.....	48
9.2.6) Figura 17.....	49
9.3) Morfometrías de células de la radícula	50
9.3.1) Figura 21.....	51
9.3.2) Figura 22.....	52
 10) Discusión	 57
10.1) ILocalización de los intermediarios de la vía TOR-S6K.	57
10.2) Proteínas ribosomales.....	60
11) Conclusión.....	64
12) Referencias.....	65
13) Anexo 1.....	79

1) Resumen

En el proceso de germinación de las semillas, la reactivación del metabolismo inicia desde las primeras horas de imbibición, hay síntesis de proteínas, aumenta la biomasa, inicia el crecimiento por expansión celular necesario para la protrusión de la radícula y en etapas postgerminativas hay proliferación celular y crecimiento de la plántula.

En eucariotas está conservada la vía de señalización TOR-S6K que integra señales ambientales, hormonales, insulina (factores de crecimiento semejantes a insulina o IGFs) y de nutrimentos para modular la proliferación y el crecimiento celular a través de estimular la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas.

En maíz se ha detectado un factor de crecimiento similar a la insulina, denominado ZmIGF que estimula la germinación y el crecimiento principalmente en la radícula, se han reportado algunos intermediarios de la vía TOR-S6K que se activan en presencia de insulina/ZmIGF, promoviendo la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas. Entre las proteínas sintetizadas están las ribosomales (PR), pero no todas se regulan de la misma manera. Se ha reportado que la insulina induce la síntesis de PRS6 y PRL7, mientras que en el caso de PRL3 hay un incremento de los transcritos pero no de la proteína. Las proteínas PRS6 y PRL7 aparte de formar parte de la estructura del ribosoma regulan el reclutamiento de ARNm específicos y de factores de inicio de la traducción.

En este trabajo se estudió la localización tisular de proteínas de la vía TOR-S6K, así como PRS6, PRL7 y PRL3 mediante inmunohistoquímica. Se observó que a las 24 h de imbibición, la insulina estimula proteínas de la vía como RAPTOR, TOR, S6K y sus formas fosforiladas: P-TOR (Ser-2448) y P-S6K (Tre-389). Las marcas de inmunotinción se ubicaron en tejidos como el primer primordio foliar, en el mesocotilo; también en la zona de alargamiento, zona meristemática y la cofia del ápice radicular. PRS6 y PRL7 se localizaron en la zona de alargamiento, la zona meristemática y la cofia de radículas de embriones en germinación. En tejidos de la plúmula, la zona de alargamiento de la raíz y la cofia se ubicó con un patrón polarizado a P-S6K y P-TOR en la cara lateral cercanas a la membrana plasmática de la célula en un patrón polarizado.

Para estudiar la localización celular polarizada observada, se analizó mediante microscopía confocal la localización de PRL7 en radículas de embriones de maíz a distintos tiempos de imbibición estimulados con insulina. PRL7 es una de las dianas finales de la vía TOR-S6K que incrementa su biosíntesis por insulina. Se observó que en los tratamientos con insulina, las marcas de fluorescencia de PRL7 se incrementan conforme aumenta el tiempo de imbibición (18, 24 y 36 h), con respecto a radículas de embriones testigo. A las 24 h se observó mejor la localización polarizada de esta proteína en una de las caras de la célula.

Como se mencionó la proteína PRL7 se detectó en tejidos como la zona de alargamiento, zona meristemática y la cofia del ápice radicular, en embriones estimulados con insulina. En tejidos de la raíz desde la corteza, la zona de alargamiento y las células madre del floema, la PRL7 se ubicó en la cara lateral en dirección al cilindro central; en las células del cilindro central se ubicó sobre la cara apical y en células de la columela se ubicó sobre la cara basal. Al realizar un análisis de morfometría de las estirpes celulares a partir del centro quiescente se observó que la insulina acelera la polarización y estimula preferencialmente el crecimiento longitudinal.

Los resultados de este trabajo evidencian la participación de la vía TOR-S6K en la inducción de la germinación por insulina y aportan nuevo conocimiento sobre los tejidos del eje embrionario que son estimulados por este efector. Además de mostrar que a nivel celular la insulina induce su ubicación polarizada. Esta localización polarizada y sus implicaciones fisiológicas requieren estudios posteriores.

1.1) Summary

In the seed germination process, reactivation of metabolism starts from the first hours of imbibition, protein synthesis takes place, biomass increases and there is growth through cellular expansion for the protrusion of the radicle, while in post-germination stages cell proliferation and growth of the seedling occur.

In eukaryotes, the TOR-S6K signaling pathway that integrates environmental signals, hormonal signals, insulin (insulin-like growth factors or IGFs) and nutrients to modulate cell growth and proliferation, is preserved by stimulating ribosome biogenesis and protein synthesis.

An insulin-like growth factor, namely ZmIGF, has been detected in maize. This factor stimulates germination and growth, mainly in the radicle, some intermediaries of the TOR-S6K pathway that are activated in the presence of insulin / ZmIGF have been reported, promoting ribosome biogenesis and protein synthesis. Among the proteins synthesized are the ribosomal protein (RP), but not all are regulated in the same way. It has been reported that insulin induces the synthesis of RPS6 and RPL7. In the case of RPL3 there is an increase in transcripts but not in the protein levels. RPS6 and RPL7 proteins, apart from being part of the ribosome structure, regulate the recruitment into ribosomes of specific mRNAs and translation initiation factors.

In this work, tissue localization of proteins of the TOR-S6K pathway, as well as RPS6, RPL7 and RPL3 were studied by means of immunohistochemistry. It was observed that at 24 h of imbibition, insulin stimulates pathway proteins such as RAPTOR, TOR, S6K and their phosphorylated forms P-TOR (Ser-2448) and P-S6K (Tre-389). Immunostaining marks were located in tissues such as the first leaf primordium, in the mesocotil; as well as in the zone of cell elongation, the meristematic zone and the cap at the root apex. RPS6 and RPL7 were located in tissues of the radicle such as the zone of cell elongation, the meristematic zone and the root cap of germinating embryos. In tissues of the plumule, elongation zone and root-cap, it was observed that P-S6K and P-TOR were located on the lateral side near the plasma membrane of the cell, in a polarized pattern.

To study the observed polarized cell localization, RPL7 localization in radicles of maize embryos at different times of imbibition in the presence of insulin, was

analyzed by confocal microscopy. RPL7 is one of the final products of TOR-S6K pathway whose synthesis is stimulated by insulin. In treatments with insulin, an increase of RPL7 fluorescence marks was observed as imbibition time increased (18, 24 and 36 h), with respect to control embryos. At 24 h, the polarized localization of this protein on one side of the cell was better observed. As mentioned, RPL7 was detected in tissues such as the zone of cell elongation, the meristematic zone and the root- cap, in embryos stimulated with insulin. In root tissues RPL7 was located, from cortex, the zone of cell elongation and the phloem stem cells, on the lateral side in the direction of the central cylinder; in the apical side of cells of the central cylinder and on the basal side of columella cells. When performing a morphometric analysis of cell lines from the quiescent center, it was observed that insulin accelerates polarization and preferentially stimulates longitudinal growth.

The results of this work confirm the participation of the TOR-S6K pathway in the induction of insulin germination and provide new knowledge about the tissues of the embryonic axis that are stimulated by this effector, in addition to showing that at cellular level insulin induces their polarized localization. This polarized location and their physiological implications require further studies.

2)Antecedentes.

2.1) Importancia del maíz.

El maíz es uno de los cereales que más se produce en el mundo. Debido a sus cualidades alimenticias para ganado, el consumo humano y el uso industrial se ha convertido en uno de los productos más importantes en los mercados internacionales. Adicionalmente, el cultivo y transformación del maíz son fuente de empleo para un número importante de personas en el mundo. De la producción de maíz 61.9 % se destina a consumo forrajero y el restante 38.1 % a consumo humano, industrial y para almacenamiento. Los principales productores mundiales de maíz son Estados Unidos, China, Brasil, Unión Europea y Argentina (OCDE-FAO, 2016). La producción de grano maíz en México en el año agrícola 2015 creció a una tasa anual de 6.1 por ciento para totalizar 24.69 millones de toneladas. Para este periodo, diez estados concentraron el 80 % de la producción nacional, destacando Sinaloa que se ubica como el principal productor de maíz con una participación de 21.8 %, seguido por Jalisco y el Estado de México. De acuerdo con el reporte Perspectivas Agrícolas 2016-2025 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción mundial de maíz crecerá a una tasa promedio anual del 1.5 por ciento en el periodo de proyección, debido principalmente a la obtención de mayores rendimientos (OCDE-FAO, 2016).

El maíz fue el alimento básico de los antiguos habitantes de Mesoamérica, pruebas arqueológicas indican que el maíz era el alimento básico de las antiguas civilizaciones Maya, Azteca y Olmeca de México, y su cultivo más venerado, incluso idearon una forma de procesarlo para mejorar su calidad: la nixtamalización. Después de generaciones de mejoramiento selectivo influenciado por las distintas preferencias de los agricultores y por diferentes climas y puntos geográficos, se potenciaron ciertas características que llevaron al maíz a convertirse en una especie llena de diversidad (CIMMYT, 2016).

2.2) Anatomía del grano de maíz.

El grano de maíz es un fruto denominado cariopsis, que presenta una semilla (Figura 1A). El fruto está constituido por diversas estructuras, la más externa es una capa denominada pericarpio. Adosada a ésta se encuentra la cubierta seminal, que consiste de una capa celular colapsada que rodea al endospermo el cual será descrito más adelante. Durante el desarrollo del grano de maíz se forman distintas estructuras como el pericarpio, el endospermo y el embrión. El grano pasa por varias etapas como el llenado de nutrientes y biomoléculas que se almacenan en el embrión y el endospermo, contribuyendo el establecimiento de la plántula. Una vez que termina el proceso de llenado de sustancias de reserva, el grano inicia su deshidratación (Doll y col., 2017).

El endospermo se diferencia en cuatro dominios celulares que presentan distinta morfología y expresión genética, el endospermo almidonoso, la capa de células basales de transferencia, la capa de la aleurona y la región que rodea al embrión (Doll y col., 2017).

Las células en la capa de transferencia en el endospermo basal, transportan nutrientes de la planta madre al endospermo en la fase inicial del desarrollo. La capa de células más externa en el endospermo se diferencian para formar la aleurona, estas células tienen una forma cúbica, acumulan lípidos de reserva y proteínas, esta capa de tipo epidérmica separa al endospermo de los tejidos maternos como la nucela y pericarpio. La aleurona está involucrada en la movilización de reservas durante la germinación (Chandler y col., 2008).

La región que rodea al embrión se distingue por poseer células pequeñas, tiene un citoplasma denso, un núcleo largo y abundante retículo endoplásmico (Cosségal y col., 2007). Esta región que rodea al embrión es una estructura dinámica que desaparece junto con el suspensor quince días después de la polinización, las células restantes del endospermo se diferencian en el endospermo con almidón compuesto por células grandes, dedicadas al almacenamiento de nutrientes durante la fase de llenado (Cai y col., 2002). En maíz este tipo de endospermo sufre una muerte celular programada y queda una capa fibrosa de células compactadas entre el endospermo almidonoso y el escutelo del embrión, la cual se permea durante la germinación provocando el traslado de reservas desde el endospermo almidonoso hacia el escutelo del embrión (Corona-Carrillo y col., 2014).

El embrión está compuesto por el eje embrionario y el escutelo. El escutelo es un cotiledón transformado que está a un lado del eje embrionario, tiene células epidérmicas, parénquima y componentes del sistema vascular, se encarga de secretar, absorber, transferir nutrientes, controlar la productividad y vigor requerido durante la germinación y la estabilidad genética del embrión (Enríquez-Arredondo y col., 2005; Sheridan y col., 2017).

En el eje embrionario se ubica el ápice apical del tallo en la parte superior del eje embrionario y el meristemo radicular en la parte inferior del eje. Los meristemos tienen tejidos que forman cubiertas de protección como la coleoriza que cubre a la raíz y la caliptra; el coleoptilo que encierra a la plúmula (Doll y col., 2017).

En el embrión de maíz la parte del ápice de tallo está compuesta por 5 o 6 primordios foliares, el meristemo de tallo, el coleoptilo y el mesocotilo (Figura 1B). La plúmula está compuesta por hojas embrionarias y el tallo, el coleoptilo es un estrato de células que cubre a las primeras hojas y el ápice meristemático del tallo, en el tallo se encuentran el mesocotilo que al crecer hacia la superficie expone al coleoptilo a la luz.

La organización longitudinal de la raíz es descrita en términos de zonas especializadas de desarrollo, y generalmente incluye la cofia, meristemo radicular, zona de alargamiento proximal y distal, zona de alargamiento celular y zona de maduración, la cual está caracterizada por la presencia de pelos radicales (Hochholdinger, 2009).

La raíz embrionaria posee una simetría radial, en la zona de maduración donde se ubica el cilindro central que incluye el periciclo y el cilindro vascular, los tejidos fundamentales que rodean el cilindro vascular central incluyen a la endodermis, el parénquima del futuro córtex y la epidermis. El parénquima cortical comprende varias células que forman la corteza, la endodermis está formada por una sola capa de células y la epidermis compuesta de por una sola capa celular. El cilindro vascular transporta agua, nutrientes y fotosintatos, mientras que el parénquima cortical tiene funciones metabólicas y también participa en el transporte de material hacia el tejido vascular (Hochholdinger y col., 2018).

La cofia (Figura 1D) es una estructura que presenta una hilera de estatocitos que forman el eje de la columela, estas células contienen amiloplastos para censar la gravedad y dirigir la raíz hacia el suelo. Las células laterales de la cofia tienen como función proteger a la raíz y ayudarla a penetrar los sustratos del suelo segregando mucílago como lubricante y regenerando las células del borde que se desprenden durante el alargamiento de la radícula (Saleem y col., 2017).

Figura 1- Estructuras del grano de maíz. Grano de maíz sección longitudinal 40X (A)(Buentello- Volante y col, 2010); Ápice caulinar (B); Ápice radicular (C);Cofia (D). Barra: 50 µm.
Símbolos: c, córtex; cc, cilindro central; cq, centro quiescente; cf, cofia; ep, epidermis; co, columela; cl, cofia lateral; mt, meristemo de tallo; m, mesocotilo; pf, primordio foliar; p, procambium; zc, zona central.

2.3) Germinación.

La germinación es un proceso que inicia con la incorporación de agua a través de los tejidos que rodean a la semilla deshidratada y termina con la protrusión de la radícula (Bewley, 1997). Se han descrito tres fases durante el proceso de imbibición: la fase I, inicia con la rápida imbibición de la semilla, la fase II donde

la entrada de agua es mucho más lenta, la protrusión de la radícula a través de las capas de la semilla ocurre entre las fases II y III, en la fase III nuevamente hay una toma rápida de agua, esta última es una etapa postgerminativa en que ocurre la movilización de reservas de los tejidos de almacenamiento, se produce la división celular e inicia el crecimiento de la plántula (Bewley, 1997; Weitbrecht y col., 2011).

Durante el proceso de germinación, se llevan a cabo muchas reacciones fisiológicas y bioquímicas, incluyendo la salida de solutos intracelulares (lixiviación), la reparación de membranas, organelos y ADN; la síntesis de proteínas con ARNm almacenados durante la maduración de las semillas; en etapas más avanzadas ocurre la síntesis de ADN, de nuevos ARN y la degradación del endospermo para el movimiento de reservas y la ruptura de la testa. La latencia y germinación de las semillas son reguladas por el balance de ácido abscísico/giberelinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) entre otros factores (Ma y col., 2017).

La movilización de reservas durante la germinación es primordial durante la diferenciación de los tejidos del embrión, el desarrollo del embrión y el posterior establecimiento de la plántula; compuestos como el almidón, proteínas y lípidos almacenados en el escutelo y el endospermo, son metabolizados en moléculas más sencillas que son usadas por el eje embrionario en crecimiento. La activación metabólica del embrión es esencial durante las primeras horas de imbibición ya que en éste se generará la energía y precursores para la síntesis de componentes celulares para sostener el crecimiento y la emergencia de la radícula, la cual demanda de la producción de nuevas moléculas y el transporte de nutrimentos hacia el embrión (Sánchez-Linares y col, 2012). El escutelo juega un papel importante suministrando compuestos nitrogenados y fuentes de carbono al embrión durante las primeras horas de germinación. En el caso de cebada se han reportado transportadores de dipéptidos y tripéptidos provenientes del escutelo que contribuyen al suministro al embrión (Waterworth y col., 2000; Antipova y col., 2003).

Durante la germinación en el ápice del tallo se demostró que las células meristematicas comienzan a sintetizar ADN 24 horas después de iniciada la imbibición y el proceso alcanza la actividad más alta a las 48 horas, al medir la incorporación de timidina marcada radiactivamente en el ADN (Zhu y col.,

2017) Además, se demostró que la primera división celular en el meristemo apical de tallo ocurre 72 horas después de la imbibición y el meristemo apical de tallo alcanza la tasa de división celular máxima después de la protrusión de la radícula (Zhu y col., 2017).

2.3.1) Germinación de semillas de maíz.

Varios eventos fisiológicos y bioquímicos ocurren durante la germinación de granos de maíz, como la reactivación del metabolismo de distintas capas celulares como la aleurona en etapas postgerminativas, el reinicio de la transcripción de genes, el ablandamiento de las paredes celulares y la reparación y/o biogénesis de organelos (Srivastava y col., 2002).

En las primeras etapas de la imbibición de maíz, los ARN mensajeros (ARNm) almacenados se ensamblan de manera diferencial en polisomas para su traducción, algunos mensajes son traducidos en etapas muy tempranas, mientras que otros se traducen en etapas más tardías de la germinación; a pesar de estar presentes desde el inicio de la imbibición (Sánchez de Jiménez y col., 2000).

Como se mencionó, la síntesis de nuevos ARNm, se observa en una etapa posterior al inicio de la traducción, ya que requiere de la reparación del material genético. A medida que avanza la germinación, la síntesis de proteínas se hace más dependiente de la transcripción de nuevos ARNm. En maíz, la síntesis replicativa de ADN inicia alrededor de las 15 horas de imbibición, y precede a la protrusión de la radícula. La utilización y el transporte de las reservas almacenadas en el endospermo se produce como un evento posterior a la germinación, ya que tiene lugar después de que ha emergido la radícula y está regulado por fitohormonas como el ácido giberélico y el ácido abscísico (Srivastava y col., 2002; Eastmond, 2006).

Finalmente, la división celular es un proceso que aumenta en etapas postgerminativas, ocurre primero en las zonas meristemáticas alrededor de las 24 a 36 horas de imbibición (Sánchez de Jiménez y col., 2000).

En la zona de alargamiento de la radícula, el crecimiento requiere del alargamiento celular que es promovido por cambios hormonales, aumento de la

turgencia y la relajación de la pared celular, lo cual se facilita mediante la acidificación del apoplasto (Kutschera, 2004). El bajo pH extracelular contribuye a aumentar la actividad de varias enzimas y proteínas que modifican la pared celular, tales como expansinas, endoglucanasas y endo-transglicosilasas de xiloglucano. La evidencia experimental indica que la H^+ - ATPasa de membrana plasmática genera dicha acidificación (Cosgrove, 2005). En cereales como arroz y maíz, esta enzima cataliza la hidrólisis de ATP acoplada a la translocación de H^+ del citosol al apoplasto, creando así una diferencia de pH transmembranal (ácido fuera de la célula) y una diferencia en el potencial eléctrico (negativo dentro de la célula) (Sondergaard y col., 2004; Sánchez-Linares y col., 2012).

La sacarosa y triglicéridos presentes en el escutelo, se moviliza hacia el eje embrionario contribuyendo al alargamiento de las células, principalmente en la región radicular. La sacarosa endógena de las células del escutelo se descarga en el simplasto y de ahí se distribuye a través de plasmodesmos y transportadores a células del eje embrionario. Los transportadores de sacarosa y hexosas, así como la H^+ - ATPasa son proteínas fundamentales para orquestar este transporte (Sánchez-Linares y col., 2012).

A continuación, el transportador de hexosas incorpora la glucosa y la fructosa al interior de las células del eje embrionario para su nutrición y para inducir la protrusión de la radícula. La activación y localización dependiente del tiempo H^+ - ATPasa en la membrana plasmática, correlaciona con la generación de un gradiente electroquímico de H^+ y la acidificación extracelular, provocando el alargamiento de la radícula, este gradiente de protones a su vez se asocia al cotransporte de azúcares desde el escutelo hasta el embrión y el gradiente eléctrico para generar la apertura de canales iónicos para otros nutrientes. Lo anterior, da por resultado la germinación por extensión de la radícula (Sánchez-Linares y col., 2012).

Durante las primeras 24 horas de imbibición en maíz se ha observado que la glucólisis es la principal fuente de energía durante la germinación, también hay un incremento significativo de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y oxidación de ácidos grasos como fuente de energía, muchos de estos procesos son regulados por hormonas como el etileno que se sabe que promueve la germinación de semillas en varias especies de plantas, en

semillas de maíz el ARNm de la ACC-oxidasa 1 muestra un incremento a las 24 horas de germinación (Jiménez-López y col., 2011).

La síntesis inicial de proteínas durante la imbibición temprana depende de los ribosomas preexistentes y de los ARNm almacenados, entre los cuales se encuentran los ARNm de proteínas ribosomales entre los más abundantes (Beltran-Peña y col., 2017). Más adelante, los ARNm almacenados se reemplazan por mensajes recién sintetizados y la síntesis de proteínas se vuelve más dependiente de los ARNm recién transcritos (Jiménez-López y col., 2011).

Un análisis durante las primeras 24 horas de germinación demostró que la síntesis *de novo* de proteínas ribosomales aumentaba durante el tiempo de imbibición incrementándose hasta 60 veces en comparación con las 3 horas de imbibición. Los ARNm de proteínas ribosomales se acumulan en altos niveles en los polisomas de los tejidos en crecimiento, lo que indica un mecanismo de control de la traducción para la síntesis rápida de ribosomas observada en este período (Villa-Hernández y col., 2013).

2.4) Inducción de la germinación y crecimiento de maíz por ZmIGF e insulina.

Se ha reportado el aislamiento y caracterización de un péptido semejante a la insulina denominado ZmIGF presente en maíz, que es reconocido por anticuerpos contra la insulina bovina y cuyo peso molecular es de 20 kDa (García-Flores y col., 2001). En otras plantas, varias evidencias han sugerido la presencia de péptidos tipo insulina, tales como los identificados en espinaca, *Lemna gibba* G3 y *Canavalia ensiformis* (Olivera y col., 1999).

El factor ZmIGF acelera la germinación y el crecimiento de embriones de maíz, a nivel celular induce la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (PRS6) y la síntesis de proteínas, estos mismos efectos se observan cuando se aplica insulina a ejes embrionarios de maíz en germinación (García-Flores y col., 2001). El uso de rapamicina para evaluar la participación de la vía de señalización de TOR ha sido una herramienta importante porque la síntesis de proteínas y la fosforilación de PRS6 y S6K en maíz es sensible a este inhibidor (García-Flores y col., 2001).

El análisis bioinformático de los ARNm de las proteínas ribosomales mostró que tienen secuencias 5'TOP (secuencia rica en pirimidinas); otros genes con secuencias 5'-TOP son EF1-A, eIF-4A, eIFiso-4E, eIF3, PCNA2 y CDC2K en maíz (Jiménez-López y col, 2011). Los mensajeros con secuencias 5'TOP son traducidos preferencialmente durante la germinación en respuesta a insulina (Jiménez-López y col, 2011).

Por otro lado, se ha reportado que embriones de maíz sometidos a tratamientos con insulina incrementan en 75% la incorporación de metionina en proteínas ribosomales a las 24 horas de imbibición. Sin embargo, cuando se aplica una mezcla de rapamicina, inhibidor de TOR, junto con insulina, la inducción de la síntesis de proteínas ribosomales observada con insulina se revierte (Villa-Hernández y col., 2013).

La insulina promueve un incremento de proteínas ribosomales, pero no todas las proteínas ribosomales se regulan de la misma forma. En un análisis a las 24 horas de germinación en ejes embrionarios de maíz se observó que los niveles de la proteína ribosomal S6 (PRS6) y L7 (PRL7) incrementaban un 300 % y un 70 %, respectivamente en los tratamientos con insulina. Sin embargo, los niveles de PRL3 no se afectaron en presencia de insulina, a pesar de que la insulina induce un incremento en la transcripción de PRL3 pero este mensaje no se recluta en la fracción polisomal a las 24 horas de imbibición, indicando una regulación traduccional (Villa-Hernández y col., 2013).

La activación de la vía de señalización de TOR, la estimulación de la síntesis de ADN y la traducción selectiva de ARNm se observó también en respuesta a la insulina o ZmIGF en callos de maíz en crecimiento (Rodríguez-Lopez y col., 2011).

En estudios recientes se ha estudiado la respuesta a insulina analizando el proteoma. Los resultados indican que la insulina regula la expresión de proteínas involucradas en diversos procesos, tales como la degradación de proteínas de reserva, el procesamiento de proteínas, el estrés redox, el estrés por desecación y el metabolismo de glucosa. Se encontró que la modulación de estas proteínas promueve una germinación exitosa en maíz y es independiente de la vía TOR indicando una vía alterna que no se conoce (Peña-Urbe y col., 2017).

2.5) Participación de la vía TOR-S6K en la regulación del crecimiento en eucariotas.

En muchos eucariotas se ha conservado la vía ancestral de transducción de señales TOR- S6K que coordina la progresión del ciclo celular regulando la transición entre las fases G1 a S, la biogénesis de ribosomas y procesos relacionados al crecimiento y proliferación celular.

Se ha reportado en diversos eucariontes que TOR integra las señales que perciben la disponibilidad de nutrientes para la célula, el estado energético, factores ambientales, insulina y factores de crecimiento; y regula procesos posteriores que requieren energía y que son esenciales para la proliferación y el crecimiento. Estos incluyen la biogénesis de ribosomas, la síntesis de proteínas y la regulación de la autofagia en mamíferos (Ma y Blenis, 2009). Las proteínas TOR de levaduras y mamíferos forman dos complejos multiproteicos ampliamente conservados que difieren estructural y funcionalmente, TORC1 y TORC2; solo TORC1 es sensible a la rapamicina (Ma y Blenis, 2009; Eltschinger y Loewith, 2016).

El complejo mTORC1 es el blanco de la rapamicina en mamíferos, contiene a la proteína mLST8 y a la proteína reguladora asociada a TOR (RAPTOR) en su núcleo, responde a aminoácidos, glucosa, insulina y factores de crecimiento promoviendo la proliferación y el crecimiento temporal de las células mediante la promoción de procesos anabólicos como la transcripción, la traducción y la biogénesis de ribosomas y regula negativamente la autofagia. Aunque se ha demostrado que mTORC1 ingresa al núcleo para regular directamente la transcripción (Cunningham y col., 2007), la mayoría de las funciones de mTORC1 están mediadas a través del control de la traducción por sus sustratos mejor caracterizados, la cinasa de PRS6 (S6K) y la proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción 4E (4E-BP1). En levaduras y animales, la activación de TORC1 por nutrientes controla de manera coordinada varios componentes de la maquinaria de inicio de la traducción mediante la fosforilación directa o indirecta de un subconjunto de proteínas (Ma y Blenis, 2009). Entre estas proteínas están los factores de iniciación de la traducción eIF4G, eIF4B, las antes mencionadas proteínas de unión a factores de iniciación 4E-BPs, y las cinasas de la proteína ribosomal S6 (S6K1 y S6K2).

Además, TORC1 puede controlar la síntesis general de proteínas y la traducción selectiva de ARNm específicos, incluidos aquellos con secuencias de oligopirimidinas (TOP) en su extremo terminal 5' (Thoreen y col., 2012).

Por el contrario, el complejo mTORC2, es insensible a la rapamicina, contiene a mTOR, mLST8 y una proteína insensible a la rapamicina asociada a mTOR (RICTOR) como componentes centrales, controla el crecimiento espacial de las células mediante la regulación de la estructura del citoesqueleto, así como la glucólisis, glucogénesis, lipogénesis y gluconeogénesis, a través de la fosforilación de Akt (Xiong y Sheen, 2014).

Como se mencionó anteriormente, se puede activar TOR-S6K a través de insulina y los IGF's, estos efectores interactúan con sus receptores (del tipo tirosin-cinasa) en membrana plasmática, activando a la cinasa del fosfatidil-3-inositol (PI3K), generando PIP3 que activa a su vez a la fosfatidil cinasa B (PKB, conocida también como Akt). La PKB fosforila e inactiva al complejo TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 1/2), un inhibidor del crecimiento celular, activando a Rheb (GTPasa homóloga a Ras) que lleva a su vez a la activación de la cinasa TOR (Target of Rapamycin), permitiendo la fosforilación de la S6K (cinasa de la proteína ribosomal S6), que fosforila a su vez a la PRS6, dando por resultado la traducción selectiva de RNAm 5'TOP (Harrington y col., 2005).

2.6) Intermediarios de la vía TOR-S6K identificados en plantas.

Se ha identificado un posible receptor de 55 kDa para el factor ZmIGF en extractos de proteínas membranales de maíz, mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo contra el receptor de insulina humana. En un ensayo de competencia para confirmar la interacción de insulina o ZmIGF con el receptor en los protoplastos de maíz se incubaron con insulina biotinilizada para saturar los receptores membranales y posteriormente se le agregó concentraciones de ZmIGF para desplazar a la insulina previamente unida al receptor que reconoce a ambos efectores ZmIGF e insulina, estos resultados fueron confirmados mediante inmunolocalización por microscopía confocal en callos de maíz (Garrocho-Villegas y col., 2013).

La proteína TOR está codificada por un único gen en mamíferos o en plantas (Shimobayashi y Hall, 2014). La parte N-terminal de AtTOR contiene dominios de repetición HEAT (Huntingtina, Factor de elongación 3, proteína fosfatasa 2A, TOR1) necesarios para su asociación con otras proteínas, seguidos de una secuencia FAT (dominios FRAP, ATM y TRRAP), de un dominio FRB (dominio que une al complejo FKBP12-rapamicina), dominios catalítico cinasa de Ser / Tre y FATC (dominio FAT carboxi terminal); juntos los dominios FAT y FATC contribuyen a la activación de la cinasa (Xiong y Sheen, 2014).

La rapamicina puede inhibir eficazmente la actividad TOR en *Arabidopsis* cuando se agrega en altas concentraciones (10 mM) a los cultivos líquidos de protoplastos o a plántulas de *Arabidopsis* (Xiong y Sheen, 2015). La rapamicina unida a FKBP12 inhibe a TOR por interacción directa con su dominio FRB en células vegetales. Sin embargo, en estudios previos no se logró detectar esta interacción mediante ensayos heterólogos de dos híbridos de levadura (Menand y col, 2002; Ren y col, 2011).

El estado de activación de mTOR puede monitorearse mediante la fosforilación en Ser-2448 que fosforila a S6K1 (Chiang y Abraham, 2005). El aminoácido correspondiente en el extremo carboxi terminal de *Arabidopsis* es Ser-2424 (Schepetilnikov y Ryabova, 2018).

Algunos de los componentes de mTORC1 y algunos intermediarios vía abajo se han identificado en eucariotas fotosintéticos, mediante búsquedas de similitud de secuencias desde *C. reinhardtii* hasta *Arabidopsis*, entre ellos se encuentran RAPTOR1 / RAPTOR2, LST8-1 / LST8-2, S6K1 / S6K2, la proteína ribosomal S6 (PRS6A / B) de la subunidad pequeña del ribosoma, la proteína fosfatasa tipo 2A asociada a la proteína de 46 kD (TAP46) y proteína receptora de unión al factor de crecimiento epidérmico ErbB-3 (EBP1). En *Arabidopsis* RAPTOR1 interacciona con huntingtina, factor de elongación 3, una subunidad de la proteína fosfatasa 2A y con el dominio HEAT de TOR1 (Xiong y Sheen, 2014).

Se ha reportado que la proteína AtRAPTOR 1 tiene funciones esenciales en el desarrollo del embrión y el crecimiento post-embrionario. Existen varias proteínas que interactúan con RAPTOR 1, entre ellas podemos mencionar a la cinasa 1 de la proteína ribosomal S6 (S6K1), uno de los intermediarios mejor caracterizados en la vía TOR en plantas (Son y col., 2016). AtS6K1 se localiza

exclusivamente en citoplasma, mientras que AtS6K2 está confinado en el núcleo (Xiong y col., 2017). AtS6K fosforila al factor de transcripción BRP1 en el nucléolo estimulando la transcripción de genes de proteínas ribosomales, fosforila a PRS6 en el nucléolo incrementando la transcripción del ARNr y actúa en el citosol promoviendo el reinicio de la traducción de proteínas mediada por el factor de inicio de la traducción (eIF3h). S6K1 también se une a la proteína represora del retinoblastoma (RBR) para modular su localización nuclear, inhibiendo la expresión de genes relacionados con el ciclo celular pero promoviendo la expansión celular y el crecimiento (Xiong y Sheen, 2015).

Hasta la fecha, no hay evidencia de un complejo TORC2 en plantas, porque los componentes específicos de este complejo, parecen no estar presentes en los genomas de los organismos fotosintéticos. Sin embargo, una posibilidad es que las plantas posean un equivalente funcional de TORC2, aunque sus componentes puedan diferir de sus homólogos en otros organismos.

2.7) Participación de la vía TOR-S6K en la biogénesis de ribosomas, síntesis de proteínas, germinación y crecimiento en plantas en respuesta a distintos efectores.

La señalización de TOR en plantas, está regulada principalmente por hormonas, luz, diferentes tipos de estrés abiótico y biótico. Así se ha reportado que la regulación de TOR en organismos fotosintéticos puede ser a través de fitohormonas como el ácido jasmónico, ácido abscísico, ácido salicílico, ácido indol acético, brasinosteroides y citocininas; se ha observado un entrecruzamiento entre las vías de señalización de hormonas con intermediarios de la vía de señalización de TOR. Recientemente se ha descrito que las auxinas y las citocininas promueven la fosforilación de S6K lo que a su vez provoca la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (PRS6) en plantas como *Arabidopsis* (Pu y col., 2017). En maíz ZmTOR fosforila a PRS6 a través de ZmS6K, que como se ha descrito, estimula la traducción de los ARNm 5'TOP. Estos ARNm representan un 30% de los ARNm totales en una célula, codifican para muchos de los componentes del aparato traduccional, incluyendo proteínas ribosomales, así como factores de iniciación y elongación de la traducción (Stolovich y col., 2002).

En células de tomate, se encontró que PRS6 era una de las principales proteínas ribosomales fosforiladas y que esta fosforilación disminuía después de un estrés por calor. En las raíces de maíz la fosforilación de PRS6 disminuía cuando disminuía el oxígeno y en respuesta a estrés por calor y aumentaba en estrés por frío (Williams y col., 2003). Posteriormente, en un estudio de las modificaciones postraduccionales de las proteínas ribosomales de *Arabidopsis* se identificaron como proteínas fosforiladas a PRS6 y a PRL13, junto con algunas proteínas ácidas (P0, P1, P2 y P3) (Carroll y col., 2008).

Se ha reportado que TOR está altamente expresada en tejidos en crecimiento y proliferación como los meristemos, el endospermo y el embrión en semillas de *Arabidopsis* (Yokawa y col., 2016).

La señalización de TOR activa más de 100 genes que codifican proteínas ribosomales de la subunidad pequeña y grande (PRS y PRL), proteínas de procesamiento del ARN ribosomal, proteínas que regulan la biogénesis de ribosomas y proteínas de inicio y elongación de la síntesis de proteínas en plantas (Xiong y col., 2015). En particular, en semillas de maíz se observó mediante microarreglos que en tejidos en rápido crecimiento, la expresión de ARNm que codifican para proteínas ribosomales casi no cambian durante la germinación, sugiriendo que estos genes no se regulan a nivel transcripcional, sino que los ARNm almacenados de proteínas ribosomales se acumulan en polisomas indicando principalmente un mecanismo de regulación traduccional, que explica el rápido incremento en la síntesis de proteínas. Las semillas tratadas con insulina presentaron un incremento en los transcritos de algunas PRs, aunque otros disminuyeron (Jiménez-López y col., 2011).

En semillas de maíz tratadas con insulina se observó que este efector induce la transcripción de genes que codifican PRs como la PRL7, PRS6 y PRL3; sin embargo, no todos los transcritos son traducidos por igual ya que el contenido de PRL3 no se incrementa (Villa-Hernández y col., 2013).

En algunos eucariotas se ha demostrado que la actividad de TOR regula la traducción de mensajes mediante la liberación de del factor (eIF4E) mediante la fosforilación de proteínas que unen a factores de inicio de la traducción. En plantas, se han encontrado proteínas como CBE1 (unión conservada a eIF4E) que interactúan con eIF4E, por lo que la existencia de proteínas que regulan la actividad de eIF4E a través de su asociación con ella, regulando la traducción y

su asociación con ARNm (Patrick y col., 2018). Se ha reportado la identificación de proteínas que tienen el consenso 4E-BM que se une a eIF4E y eIFiso4E (Lázaro-Mixteco y Dinkova, 2012), aunque su papel en la traducción aún no está claro. Aparte de estas proteínas, una búsqueda en la base de datos de *Arabidopsis*, recuperó más de 6900 proteínas que contienen uno o más dominios canónicos de unión a eIF4E que podrían unirse a dicho factor y regular su función (Toribio y col., 2016).

Debido a que se ha reportado que las auxinas y la insulina/ZmIGF tenían efectos similares acelerando la germinación y el crecimiento de semillas de maíz, induciendo la fosforilación de PRS6, se analizó el posible entrecruzamiento de sus vías de señalización en coleoptilos de maíz después de 24 horas de imbibición. Se observó que producen una estimulación diferencial cuantitativa y cualitativa en la fosforilación de proteínas citoplásmicas y ribosomales. Ambas hormonas estimularon la fosforilación de PRS6, aunque la fosforilación inducida por auxinas fue insensible a rapamicina. También se probó el efecto de ácido fosfatídico (PA), un intermediario de la vía TOR, se encontró que produce efectos similares a los de la insulina (Buentello-Volante, 2010).

En eucariotas superiores, incluidas las plantas, eIF3 es un complejo de 700 a 800 kD con trece subunidades diferentes (denominadas eIF3a – eIF3m), solo cinco subunidades: eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g y eIF3i, funcionan en *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnebusch, 2006). Se ha estudiado la función de eIF3 en el inicio de la traducción, se encontró que participa interaccionando con varias proteínas formando parte de los complejos de preiniciación 43S y 48S, participa en el reconocimiento de codón de inicio AUG y en la reiniciación de la traducción (Schepetilnikov y col., 2013).

En un estudio reciente en *Arabidopsis* se reportó que las auxinas estimulan la activación de TOR, los autores sugieren que TOR funciona en los polisomas manteniendo el estado de fosforilación activo de S6K1 y del factor eIF3h, que es crítico para el reinicio de la traducción (Schepetilnikov y col., 2017).

2.8) Proteínas ribosomales en plantas.

Una característica universalmente conservada en la estructura del ribosoma, es una protuberancia conocida como el tallo, que se ha mapeado en un lado de la

subunidad ribosomal grande (Clemons y col., 1999; Ban y col., 1999). En los eucariotas, el tallo está conformado por cinco proteínas ribosomales que pueden fosforilarse durante la germinación (denominadas proteínas P), P0, dos proteínas ácidas P1 y dos P2 (PRAs), correspondiente a sus homólogos procariotas no fosforilados L10 y dímero L7 / L12 (Aguilar y col., 1998).

En los eucariotas se ha visto que las proteínas P1 y P2 no son ensambladas en los ribosomas en el nucléolo, como la mayor parte de las proteínas ribosomales; en cambio, las PRAs se encuentran en el citoplasma libres, y se incorporan en los ribosomas durante el proceso de la traducción (Zambrano y col., 1997). La fosforilación de PRAs es una característica distintiva de los ribosomas eucariotas que, sin embargo, no parece ser necesaria para el ensamblaje del ribosoma, sino que es relevante para su actividad (Ballesta y col., 1999). En plantas, existe escasa información sobre las PRAs; sin embargo, se sabe que sus pesos moleculares varían entre 12 y 17 kDa, como en la mayoría de los eucariotas, y sus secuencias de aminoácidos deducidas de ADNc indican una estructura similar a sus homólogos de animales y levaduras. Las proteínas P1 y P2 se han aislado de tejidos de maíz y sus secuencias de ADNc se han reportado, incluido un ADNc P3 expresado en las raíces durante la anoxia (Szick y col., 1998).

Dado que los 5'UTRs de P1 y P2 contienen secuencias de pirimidina similares a las reportadas en las secuencias 5'TOP de los ARNm de PRs, se ha sugerido que la síntesis de P1 y P2 está regulada por el mismo mecanismo (Gagou y col., 1999).

Durante la maduración de las semillas se van deshidratando y entran en un estado metabólico quiescente en el que se detiene la síntesis de proteínas (Bewley y col., 1997). En esta etapa, todos los elementos de la maquinaria de síntesis de proteínas están presentes en el embrión. Estos ribosomas contienen solo PRAs no fosforiladas. Durante el proceso de imbibición, hay un decaimiento de ribosomas individuales (monosomas) mientras éstos están siendo reclutados en polisomas. En estas primeras etapas la formación de polisomas depende de la presencia de ribosomas pre-existentes y ARNm almacenados, entre los cuales los ARNm de proteínas ribosomales son de los más abundantes; esto sucede hasta que los ARNm almacenados las PRAs se fosforilan y la síntesis de proteínas se reinicia, posteriormente los ARNm

almacenados son remplazados por ARNm recién sintetizados, (Beltrán - Peña y col., 1995; Aguilar y col.,1998).

Se ha reportado que durante la germinación de *Arabidopsis* la regulación para un conjunto específico de ARNm de proteínas ribosomales en diferentes tejidos del embrión, responden de manera distinta dependiendo del estímulo ambiental, mediante regulación transcripcional y traduccional (Tatematsu y col., 2008).

Como se mencionó previamente, en muchos eucariotas los dominios con secuencias 5'TOP se han encontrado en ARNm de proteínas ribosomales y de factores de traducción, actuando como un sitio blanco necesario durante el reclutamiento de dichos ARNm en los polisomas, regulada por factores de crecimiento a través de la ruta TOR-S6K, apoyando que este mecanismo está conservado en eucariotas incluidas las plantas (Meyuhas y col., 2000; Fumagalli y col., 2000; Gilbert, 2011). La participación de esta vía estimulada por insulina/ZmIGF se ha demostrado en semillas de maíz en germinación (García Flores y col., 2001). Los ejes embrionarios de maíz en germinación estimulados con insulina no mostraron un aumento en la síntesis de PRAs; por el contrario, se observó una leve pero reproducible inhibición en su síntesis. Por otro lado, la mayor parte de las PRs, mostró un fuerte incremento en su síntesis después de la estimulación con insulina (Montoya- García y col., 2002). Existen reportes de que tanto la insulina como el ZmIGF no inducen la síntesis *de novo* de PRAs en ejes embrionarios de maíz imbibidos por 24 horas, aunque si regulan su fosforilación (Montoya-García y col., 2002). Por otro lado, en estudios con microarreglos se encontró que la insulina induce el reclutamiento de algunos mensajes de PRs como PRP0 y PRSA en la fracción polisomal mientras que inhibe el reclutamiento de otros mensajes de PRs tales como PRL29 y PRS19 (Jiménez-López y col., 2011). Estos resultados apoyan que la expresión de las PRs no se regula por igual en todas ellas. La familia de genes de la proteína ribosomal L7 de *Arabidopsis* contiene miembros divergentes. La historia evolutiva de la familia de genes L7 indica que en el ancestro de PRL7 antes de la divergencia de monocotiledoneas y eudicotiledoneas tenía cinco intrones y uno de ellos se perdió en PRL7A (Barakat y col.,2007).

En ensayos donde se induce el silenciamiento de los genes PRL7 y PRS6 se ha observado que la plantas de *Nicotiana benthamiana* se detuvo el crecimiento, presentó una clorosis intensa y necrosis espontánea en hojas maduras y en hojas jóvenes se presentaban una forma plana, las plantas con PRS6 y PRL7 silenciados tienen fenotipos muy característicos, en el caso de PRS6 cuando se silencia soportaba la infección de TMV (virus de mosaico de tabaco) mientras que las plantas con PRL7 silenciado no soportaban la infección con TMV. Estas observaciones demuestran que los defectos generales en la maquinaria traduccional y sus efectos correspondientes en el desarrollo de la planta no necesariamente causan la inhibición en la acumulación del virus (Yang y col., 2009).

En plantas superiores, el estatus de fosforilación en proteínas ribosomales puede variar por cambios ambientales, mostrando que son procesos metabólicos cruciales para modular el proceso de traducción (Muench y col., 2012).

Estudios sobre la heterogeneidad ribosomal donde se analizó el estatus de fosforilación de proteínas ribosomales durante 24 horas de germinación en maíz en presencia de efectores como la insulina, se observó un incremento en la abundancia de cinco proteínas de la subunidad pequeña: S3 (uS3), S5 (uS7), S7 (eS7), dos isoformas de S17 (eS17), y S18 (uS13), así como también se observó un incremento de nueve proteínas de la subunidad grande del ribosoma: L1 (uL1), L5 (uL18), dos isoformas de P0 (uL10), L11 (uL5), L14 (eL14), L15 (eL15), L19 (eL19) y L27 (eL27), muchas de estas proteínas están involucradas en el reconocimiento de ARNm y modifican su abundancia en los ribosomas, el cual puede ser un mecanismo para regular la síntesis de proteínas.

Algunas de las proteínas ribosomales ácidas como P1 es fosforilada en los tratamientos con insulina durante 24 horas de germinación, sugiriendo una regulación en la síntesis de proteínas ribosomales en tejidos en proliferación. P1₂ fue la única isoforma de P1 que mostró cambios en su fosforilación en los tratamientos con insulina, mientras que otras isoformas de P1(P1₃ y P1₇) son fosforiladas en los ribosomas de semillas no germinadas y permanecen sin cambios durante la germinación (Hernández- Hermenegildo y col., 2018).

3) Justificación.

El maíz es uno de los cereales más producidos en México, tiene su zona de origen en Mesoamérica y su importancia alimentaria lo hace pertenecer a un alimento básico en la dieta del mexicano. El maíz tiene su principal uso como alimento y también para la producción de biocombustibles.

Es de importancia contribuir a su investigación ya que es de los principales cereales que abastece de productos alimenticios en México. La investigación de especies nativas de maíz como la variedad criolla Chalqueño, adaptado a condiciones de los valles centrales de México, mantiene características deseables para investigar procesos que controlan la germinación que son clave en el establecimiento de las plantas y para analizar el efecto morfo-fisiológico de reguladores del crecimiento que contribuyan a mejorar el desarrollo de maíz durante la germinación.

El estudio de los mecanismos de acción de factores como la insulina/ZmIGF en la regulación de la germinación de granos de maíz y crecimiento de la plántula, contribuirá a:

Aportar conocimiento sobre la participación de la vía TOR-S6K en la respuesta a insulina/ZmIGF y el aumento de proteínas el cual es un requisito para establecer el crecimiento a nivel celular.

A mediano plazo a mejorar el rendimiento de los cultivos de esta especie.

4) Pregunta de investigación.

¿La estimulación de la germinación y crecimiento de embriones de maíz por insulina/ZmIGF promueven la activación de la vía TOR-S6K y la síntesis de proteínas ribosomales en forma diferencial en los tejidos del embrión de maíz en germinación?

5) Hipótesis.

La insulina incrementará la síntesis de proteínas ribosomales, a través de la vía TOR-S6K, promoviendo en forma diferencial el crecimiento en distintos tejidos del embrión de maíz estimulando inicialmente la radícula.

6) Objetivo General.

Determinar el efecto de la insulina en la activación de intermediarios de la vía TOR-S6K (TOR, TOR-P, RAPTOR, S6K y S6K-P) y contenido de algunas proteínas ribosomales en distintos tejidos de embriones de maíz en germinación.

7) Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto de la insulina en la activación de intermediarios de la vía TOR-S6K (TOR, TOR-P, RAPTOR, S6K y S6K-P) en distintos tejidos de embriones de maíz en germinación.
2. Determinar la localización de proteínas ribosomales (PRL3, PRS6 y PRL7) en tejidos de la radícula de embriones de maíz en germinación tratados con insulina.
3. Determinar la cinética de inducción y localización celular de PRL7 en tejidos de radículas de embriones de maíz en germinación tratados con insulina.
4. Determinar el efecto de la insulina en el crecimiento de células de la radícula.

8) Metodología

8.1) Material biológico y tratamientos.

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) de variedad Chalqueño, se desinfectaron sumergiendo las semilla en una solución de etanol al 70% v/v durante 5 min, posteriormente, se lavaron con hipoclorito de sodio 10% v/v durante 5 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas en algodón estéril se imbibieron con agua destilada a 24°C durante 16, 22 y 34 horas en obscuridad, al final de ese tiempo se disectaron los embriones de los granos de maíz, se les aplicó un tratamiento de 2 horas con 200 μ U de insulina recombinante (Humulina)/ml de medio MS (Murashige y Skoog) dentro de una caja Petri; en los controles se empleó únicamente medio MS 1 ml por cada 0.5 gramos de embriones de maíz. Transcurridas las 2 horas de tratamiento, los embriones se lavaron con agua destilada estéril y, para estudios de inmunohistoquímica se fijaron en paraformaldehído 4% p/v en

agua, pH 6.9 . Para estudios de inmunolocalización los embriones se fijaron en etanol 70% v/v con agua destilada.

8.2) Obtención de cortes histológicos de los embriones.

Se siguió la técnica de inmunolocalización como lo reporta Enríquez – Arredondo y col, 2005 con algunas modificaciones. Una vez fijados los ejes embrionarios, se deshidrataron los tejidos haciendo lavados con etanol en concentraciones graduales y se transfirió a xileno, para ser infiltrados con cambios graduales de xileno-paraplast hasta paraplast puro

Una vez infiltrados los tejidos con paraplast, se incluyeron en moldes (Ruzin 1999), se dejan enfriar los bloques a temperatura ambiente y se guardaron en refrigeración a 4°C.

Se realizaron cortes de 8 µm en el micrótopo recuperando los cortes en un porta objetos. Se retiró el paraplast de las laminillas gradualmente con distintas concentraciones de etanol para poder aplicar la técnica inmunohistoquímica.

8.2.1) Pre-tratamientos de los cortes para exponer los epítopes estudiados.

Debido a que algunas proteínas forman complejos proteicos, el epítipo queda críptico para que sea reconocido por el anticuerpo, para exponer los epítipes y mejorar los resultados de la inmunohistoquímica, se utilizó un amortiguador desnaturizante (Tris 10mM pH 8, 0.05% v/v Triton X-100, 20 0.05% v/v Tween, EDTA 1mM, β-mercaptoetanol 6mM) durante 24 horas a 4°C.

8.2.2) Inmunolocalización de las proteínas estudiadas en embriones de maíz en germinación

Para la inmunolocalización se siguió la técnica reportada por Corona-Carrillo y col, 2014 con algunas modificaciones. Se utilizaron laminillas sin paraplast, con tejidos fijados con paraformaldehído y pretratadas para exponer el epítipo, se lavaron 15 min con agua destilada, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena del tejido incubando por 1 hora en solución de H₂O₂ al 3% v/v en metanol. A continuación se procedió a lavar las laminillas tres veces cada uno de 5 min con amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4. Durante 2 horas se bloquearon los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo con una solución de

leche 0 % grasa al 2.5% p/v en amortiguador para bloqueo (amortiguador fosfatos 10mM, pH-7.4 con 150 mM de NaCl, 5mM de MgSO₄, 0.01% Triton X-100 y 5mM EDTA). Se realizaron tres lavados sucesivos de 5, 10 y 15 min para eliminar el exceso de amortiguador de bloqueo usando un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 con 150 mM de NaCl. Las laminillas se incubaron durante 24 horas en una cámara húmeda a 7°C en condiciones de esterilidad, con el primer anticuerpo para PRL3, PRL7, PRS6, P-TOR o P-S6K (ver anexo 1). Los anticuerpos se usaron en una dilución 1:100 v/v en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.2 con 150 mM de NaCl. Pasadas las 24 horas las laminillas se lavaron tres veces con buffer PBS pH 7.2 por 5, 10 y 15 min, para eliminar el anticuerpo que no se unió específicamente. A continuación las laminillas se incubaron durante 75 minutos con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano diluido (1:50) en amortiguador PBS pH 7.2 a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron tres lavados de 5, 10 y 15 min con amortiguador de fosfatos 10 mM , pH 7.2 para eliminar el segundo anticuerpo no unido. Las laminillas se colocan en una solución de 0.5 mg AEC (amino etil carbazol) solubilizado con 300 µl de DFA (difenil formamida) al que se le adicionó 8.95 ml de buffer acetato de sodio 50mM pH 4.5 y se agregó 75 µl de H₂O₂ al 3% v/v con agua destilada por 6 min, posteriormente, las laminillas se lavaron con agua destilada y se detiene la reacción de la peroxidasa con etanol 70% v/v durante 6 min. Las preparaciones se montaron en un medio acuoso y se observaron utilizando microscopia de contraste diferencial de fases con un microscopio Axoskop Zeiss.

8.2.3) Localización de PRL7 en radícula mediante inmunocitoquímica con fluorescencia

El método que se empleó para esta sección es una modificación del protocolo reportado por Corona-Carrillo y col (2014). Las laminillas sin paraplast, fijadas con etanol y pretratadas con buffer desnaturalizante, se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 durante 5 min, se lavaron una vez con amortiguador de citratos (citrato de sodio 10 mM pH 6.0, 0.05% v/v Tween-20,) durante 15 min, a continuación las laminillas se sumergieron en solución amortiguadora para bloquear sitios inespecíficos de unión del anticuerpo por medio de una solución al 2.5% p/v de leche 0% grasa (amortiguador fosfatos

10mM, pH-7.4 con 150 mM de NaCl, 5mM de MgSO₄, 0.01% Triton X-100 y 5mM EDTA).

Las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario PRL7 (ver anexo 1) diluido 1:100 v/v con amortiguador de fosfatos 10mM pH 7.2 con 150 mM de NaCl durante 24 horas a 7°C en cámara húmeda y en condiciones estériles.

Transcurridas las 24 horas de incubación, se retira el anticuerpo primario que no se unió con tres lavados de 5, 10 y 15 min con amortiguador de fosfatos pH 7.2 con 10mM de NaCl. Las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa Fluor® 555 (ver anexo 1) diluido 1:200 v/v con amortiguador de fosfatos pH 7.2, durante una 75 min a 25°C en oscuridad y en cámara húmeda. Posteriormente, las laminillas se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos 10mM pH 7.2, durante 5, 10 y 15 min, para eliminar el segundo anticuerpo que no se unió específicamente. Los tejidos en las laminillas se cubrieron con amortiguador de fosfatos 10mM, pH 7.2 se colocaron los cubre objetos y se sellaron para posteriormente ser analizados mediante microscopía confocal (Microscopio Zeiss LSM 700), utilizando una longitud de onda excitación de 555 nm y una longitud de onda de emisión de 576nm.

8.3) Morfometrías de las micrografías con microscopía confocal.

Se realizó un análisis morfométrico de las micrografías obtenidas por microscopía confocal, donde se ubicó a nivel celular a PRL7 con mayor detalle en el ápice de la radícula a las 24 horas de imbibición. Se midió el ancho y largo de distintas estirpes celulares de la columela, células madre del floema conocidos como pre-pro elementos de la savia (PPSE) y células de la protodermis, tanto en tejidos control como en tejidos con 24 horas de imbibición tratados con insulina. Se tomó como punto inicial de medición el centro quiescente, se utilizó el programa ImageJ 2.

9) Resultados

En la inmunolocalización utilizando microscopía de luz, permitió ubicar a nivel tisular los intermediarios de la vía TOR-S6K en distintos tejidos del embrión de maíz a las 24 horas iniciada la imbibición.

Analizando la parte aérea del embrión de maíz en los tejidos testigo (Figura 2) se observa el meristemo de tallo junto a 4 o 5 primordios foliares, considerando al más externo como el primer primordio foliar, en donde las marcas de inmunotinción de TOR (Figura 2A, 2B) y P-TOR (Figura 2C y 2D) se ubican en el citoplasma de las células del parénquima cercano a la epidermis del primer primordio foliar, el ápice de tallo donde está el meristemo tiene una tinción muy tenue o basal propia del tejido.

La proteína RAPTOR (Figura 2E y 2F) se ubica en el citoplasma de células del parénquima del primer y segundo primordio foliar, con marcas más intensas en comparación a las proteínas TOR y P-TOR. En el meristemo del tallo las marcas de tinción de RAPTOR se presentan en menor medida comparándolas con los primordios foliares.

Las marcas de tinción de S6K (Figura 2G) son mayores en el primer primordio foliar y va disminuyendo en los primordios cercanos al meristemo de tallo donde las marcas de tinción son más tenues, en las células del parénquima del primordio foliar más externo se logra observar que las marcas de tinción de S6K están distribuidas homogéneamente en el citoplasma (Figura 2G) mientras que en otras células (Figura 2H) la ubicación se encuentra polarizada en la cara lateral superior en el interior de la célula.

La mayor intensidad en la inmunotinción para P-S6K (Figura 2I y 2J) están ubicadas en el primer y segundo primordio foliar de manera similar a las marcas de tinción de P-TOR. Comparando las marcas de tinción de S6K y P-S6K, P-S6K presenta menor intensidad. En el ápice de tallo no se observan marcas de tinción de P-S6K. En células parenquimáticas del primer primordio foliar se ubica a P-S6K cercana a la membrana sobre la cara lateral superior (Figura 2J) similar a S6K.

Comparando las mismas zonas del ápice del tallo en tejidos tratados con insulina (Figura 3) se observa marcas de tinción más intensas de las proteínas TOR y P-TOR (Figura 3A, 3B, 3C y 3D), presentan una distribución homogénea sobre el primer primordio foliar comparándolo con los

TOR

P-TOR

RAPTOR

S6K

P-S6K

Figura 2- Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en el ápice de tallo, testigos a las 24 horas de imbibición.

A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K; I y J, P-S6K.

Barra: 500 μ m A, B, C, D y E; 50 μ m F, G, H, I y J. Símbolos: mt, meristemos de tallo; pf, primordio foliar; $\blacktriangleleft$, marcas de tinción.

Flechas indican las marcas de precipitación color rojizo.

Figura 3- Ubicación de los intermediarios vía TOR-S6K en el ápice de tallo, tratados con insulina a las 24 horas de imbibición. A y B, TOR; C y D, P-TOR; C y H, RAPTOR; D y I, S6K; E y J, P-S6K. Barra: 500 μ m, A, C, E, G e I; 50 μ m, B, D, F, H y J. Símbolos: mt, meristemo de tallo; pf, primordio foliar; $\blacktriangleleft$, marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojizo.

tejidos testigo. El meristemo de tallo tiene una tinción muy similar entre los tejidos testigo y los tratados con insulina. En las células parenquimáticas del primordio foliar las marcas de TOR y P-TOR (figura 3B y 3D) las marcas de tinción están en el citoplasma y cerca de la membrana lateral superior un patrón polarizado de manera similar a como se observa en tejidos testigo.

La proteína RAPTOR (Figura 3E y 3F) en tejidos tratados con insulina se ubica en el primer primordio foliar y en menor medida sobre el segundo primordio foliar, no hay marcas de tinción en el ápice de tallo. Comparando los tejidos controles y los tratados con insulina presenta una tinción similar en los primeros primordios pero disminuye en el ápice de tallo, las células parenquimáticas del primer primordio en los tejidos tratados con insulina se ubica a RAPTOR (Figura 3F) cercana la membrana plasmática en la cara superior.

En tejidos tratados con insulina las marcas de inmunotinción de S6K (Figura 3G, 3H) y P-S6K (Figura 3I y 3J) aparecen de manera más intensa sobre el primer primordio foliar en comparación a los tejidos testigo, en el caso de P-S6K se observan que las marcas de tinción se intensifican en células epidérmicas del primordio en comparación con los tejidos testigo. Las marcas de S6K y P-S6K (Figura 3I y 3J) también se presentan cercanas a la membrana lateral superior como se observa en células del primordio de tejidos testigo.

En la zona del mesocotilo se presenta parénquima de corteza, una zona central que contiene los haces vasculares y células epidérmicas. Analizando tejidos testigo se observa que las marcas de tinción de TOR y P-TOR (Figura 4A, 4B, 4C y 4D) se localizan en el parénquima cortical, en varios estratos celulares cercanos a la epidermis, en la zona central donde se ubica el tejido vascular en desarrollo hay pocas marcas de tinción. En células del parénquima cortical del mesocotilo en que se ubicó a TOR y P-TOR (Figura 4B y 4D; anexo 2) las células presentan a las proteínas distribuidas en el citoplasma y una porción de ella se localizó asociadas a la membrana plasmática en la cara superior, similar a como se describe en células del primordio foliar. En el caso de la proteína RAPTOR que forma parte del complejo TORC1 junto a TOR, también se ubica sobre estratos de células que darán la corteza del mesocotilo (Figura 4E y 4F)

Figura 4- Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en el mesocotilo de embrión de maíz, testigos a las 24 horas de imbibición. A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6; I y J, P-S6K. Barra: 500 μ m, A, C, E, G y I; 50 μ m, B, D, F, H y J. Símbolos: zc, zona central; c, corteza del mesocotilo; $\blacktriangledown$, marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojizo.

Figura 5- Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en el mesocotilo de embriones de maíz tratados con insulina a las 24 horas de imbibición.

A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K; I y J, P-S6K.

Barra: 500 μm , A, C, E, G e I; 50 μm , B ,D, F, H y J. Símbolos: zc, zona central; c, corteza del mesocotilo; , marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojo.

y en menor intensidad sobre la zona central, en células de la corteza del mesocotilo RAPTOR se ubica inmersa en el citoplasma.

Las proteínas S6K (Figura 4G, 4H) y P-S6K (Figura 4I, 4J) son proteínas intermediarias que actúan por debajo de TORC1 siendo S6K el efector directo de la vía TOR, presenta marcas de tinción en células de la corteza del mesocotilo y con menor intensidad en la zona central de manera similar a como se ubican TOR, P-TOR y RAPTOR. Analizando células de la corteza (Figura 4H y 4J) las proteínas S6K y P-S6K tiende a seguir su ubicación cercana a la membrana en la cara lateral superior.

Comparando tejidos del mesocotilo tratados con insulina y los testigo (Figura 5) las marcas de tinción de los intermediarios de la vía TOR-S6K se intensifican y se ubican en más estratos de células parenquimáticas de la corteza cercanas a la epidermis, en la zona central de tejidos tratados con insulina la tinción es muy tenue similar a la de los controles. En el caso de P-S6K (Figura 5I y 5J) cuando se le aplica el tratamiento con insulina se observa que la mayor intensidad de tinción está en células cercanas a la epidermis similar a las marcas de tinción de P-S6K en el primordio foliar.

En los tejidos de la radícula se observa corteza de la zona de alargamiento, el cilindro vascular y epidermis. En tejidos testigo ubicamos a TOR y P-TOR en estratos de la corteza de la zona de alargamiento principalmente (Figura 6A, 6B, 6C y 6D); mientras que el cilindro vascular presentó una tinción baja. En las micrografías 6B y 6D se muestran células de la epidermis donde las marcas de inmunotinción están en el citoplasma y en la cara apical en el interior de la célula cercanos a la membrana plasmática.

De manera similar a TOR y P-TOR, las marcas de tinción de RAPTOR (Figura 6F) se localizan en estratos de células de parénquima cortical y en células de la epidermis de la zona de alargamiento.

La localización de las proteínas S6K y P-S6K (Figura 6I y 6J) en el parénquima cortical de la zona de alargamiento, se encontró sobre estratos de células cercanas a la epidermis y coincide con la ubicación de TOR, P-TOR y RAPTOR. En tejidos del cilindro vascular se presentó marcas muy tenues de S6K y P-S6K similar a como se observó en las otras proteínas. En el caso de P-S6K se localizó cerca de la membrana plasmática en la cara superior de la célula (Figura 6J).

Figura 6- Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en la raíz embrionaria, testigos a las 24 horas de imbibición. A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K; I y J, P-S6K. Barra: 500 μ m, A, C, E, G e I; 50 μ m, B, D, F, H y J. Símbolos: cv, cilindro vascular; za, zona de alargamiento; $\nwarrow$, marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojo.

Figura 7- Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en la raíz embrionaria, tratados con insulina a las 24 horas de imbibición.

A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K, I y J, P-S6 K.

Barra: 500 μ m, A, C, E, G e I; 50 μ m, B, D, F, H y J. Símbolos: cv, cilindro vascular; za, zona de alargamiento; es, escutelo; , marcas de tinción.

Flechas indican las marcas de precipitación color rojo.

En tejidos de la radícula tratados con insulina las marcas de tinción de los intermediarios de la vía TOR-S6K coinciden en las mismas estructuras de la radícula de tejidos testigo, sin embargo, las marcas de inmunotinción incrementan en células epidérmicas y estratos de parénquima cortical cercano a la epidermis (Figura 7).

Las proteínas TOR y P-TOR se ubicaron en el citoplasma de células de la corteza en la zona de alargamiento y cercanas a la membrana en células de la epidermis.

La proteína RAPTOR, incrementó en la epidermis de la zona de alargamiento comparándolas con los tejidos testigo (Figura 7F). Las proteínas S6K y P-S6K se ubicaron cercanas a la membrana en la cara superior de la célula en un patrón polarizado (Figura 7I y 7J) coincidiendo con la ubicación de los intermediarios río arriba de la vía TOR antes mencionados.

En la zona del ápice radicular podemos encontrar a la zona meristemática que rodea al centro quiescente; además de la zona central y la zona lateral de la cofia (Figura 8 y 9). En estos tejidos la localización de los intermediarios de la vía TOR-S6K se encontró sobre la zona meristemática y en la cofia, en cuanto al centro quiescente tiene una tinción basal. Las proteínas TOR, P-TOR, RAPTOR, S6K y P-S6K (Figura 8) aparecen alrededor de la zona meristemática en células del parenquimatosas cercanas a la protodermis, en células epidérmicas y células periféricas de la cofia. En la cofia, las células laterales (Figura 8B y 8D) son las que presentaron mayor inmunotinción de TOR y P-TOR, y en menor medida las células de la columela. En la células periféricas de la cofia, RAPTOR está en el citoplasma (Figura 8E y 8F). La ubicación de P-S6K (Figura 8J) se ubicaron cercana a la membrana plasmática en la cara lateral superior.

Los tejidos de la raíz embrionaria tratados con insulina (Figura 9) incrementaron la intensidad de las marcas en la células laterales de la cofia y también incrementaron el número de estratos de células de la cofia en donde aparecieron marcas de tinción.

En una ampliación de la micrografía de estos tejidos, encontramos que las marcas estuvieron presentes en el citoplasma celular (Figura 9B, 9D, 9F, 9H y 9J) y en el caso de S6K y P-S6K presentaron una ubicación polarizada en la cara lateral superior cercana a la membrana en dirección a la columela

Figura 8. Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en la raíz embrionaria, testigos a las 24 horas de imbibición. A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K; I y J, P-S6K. Barra: 500 µm, A, C, E, G e I; 50 µm, B, D, F, H y J. Abreviaturas: es, escutelo; cf, cofia; cq, centro quiescente; , marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojo.

Figura 9. Ubicación de los intermediarios de la vía TOR-S6K en la raíz embrionaria, tratados con insulina a las 24 horas de imbibición.

A y B, TOR; C y D, P-TOR; E y F, RAPTOR; G y H, S6K; I y J, P-S6K,.

Barra: 500 μ m, A, C, E, G e I; 50 μ m, B, D, F, H y J. Símbolos: es, escutelo; cf, cofia; cq, centro quiescente; , marcas de tinción.

Flechas indican las marcas de precipitación color rojizo.

Figura 10- Ubicación de las proteínas PRL3, PRS6 y PRL7 en la raíz embrionaria , testigos a las 24 horas de imbibición. A y B, PRL3; C y D, PRS6; E y F, PRL7. Barra: 500 µm A, C y E; 50 µm B, D, y F. Símbolos: es, escutelo; cf, cofia; cq, centro quiescente; , marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojizo.

Figura 11- Ubicación de las proteínas PRL3, PRS6 y PRL7 en la raíz embrionaria , tratados con insulina a las 24 horas de imbibición.

A y B, PRL3; C y D, PRS6; E y F, PRL7.

Barra: 500 μ m A, C y E; 50 μ m B, D, y F. Símbolos: es, escutelo; cf, cofia; cq, centro quiescente; $\swarrow$, marcas de tinción. Flechas indican las marcas de precipitación color rojo.

(Figura 9H y 9J), de manera similar a la ubicación polarizada observada para P-S6K en tejidos testigo.

La inmunohistoquímica de proteínas ribosomales PRL3, PRS6 y PRL7 (Figuras 10 y 11) en tejidos testigo de la radícula de embriones de maíz imbibidos durante 24 horas, se detectó en el citoplasma de las células cercanas a la periferia de la cofia (Figura 10B, 10D y 10F). Los tejidos a los que se les aplicó el tratamiento con insulina incrementan las marcas de tinción para estas proteínas (Figuras 11B, 11D y 11F) en comparación con los tejidos testigo para las proteínas PRL7 y PRS6, mientras que la proteína PRL3 mostró una tinción muy similar en la zona de la cofia comparando los tejidos testigo con los tratados con insulina.

9.2) Localización celular de PRL7 a distintos tiempos de imbibición en tejidos de radícula de embriones de maíz tratados con insulina mediante inmunocitoquímica.

En los estudios de inmunohistoquímica se encontró que el tratamiento con insulina incrementó las marcas de inmunotinción de las proteínas ribosomales S6 y L7. Asimismo, se encontraron evidencias de una localización polarizada tanto de los intermediarios de la vía TOR-S6K como de las PRS6 y PRL7. Se utilizó como marcador la PRL7 ya que es una de las proteínas ribosomales que incrementan su traducción bajo estímulos con insulina gracias a la presencia de repeticiones de oligopirimidinas en el extremo 5' del ARNm, también PRL7 tiene un papel importante en la maduración ARN ribosomal y en el reclutamiento de ARNm y de proteínas ribosomales en monosomas y polisomas (Wu y col., 2007). Para estudiar en más detalle esta localización celular polarizada de estas proteínas, se realizó un análisis de inmunocitoquímica mediante microscopía confocal la cual permitió colocalizar en varios planos dimensionales a PRL7 con otras estructuras de la célula.

Se analizó la proteína ribosomal L7 en el ápice radicular de embriones de maíz en germinación a distintos tiempos de imbibición (18, 24 y 36 horas), las marcas de tinción de esta proteína incrementó durante el tiempo de imbibición siendo las 24 horas donde se ve el mayor efecto de la insulina. El análisis se realizó en la radícula debido a que ésta inicia su alargamiento antes que el coleoptilo.

Figura 12- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , testigos a las 18 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).
 Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cc, centro quiescente; cc, cilindro central.

Figura 13- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , tratados con insulina a las 18 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).

Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cq, centro quiescente; cc, cilindro central.

Respecto a la localización se observó que en la radícula de embriones testigo con 18 horas de imbibición (Figura 12) la PRL7 se ubicó principalmente en células del parénquima fundamental que dará el córtex de la zona de alargamiento proximal (Figura 12D).y en células periféricas de la cofia (Figura 12E), en menor proporción en células del cilindro central y en el caso del centro quiescente no presentó marcas de tinción (Figura 12F).

En los tejidos de la radícula tratados con insulina (Figura 13) con 18 horas de imbibición, se observó que incrementaban las marcas para PRL7 en comparación a los tejidos testigos. En las células del parénquima cortical en la zona de alargamiento PRL7 se ubicó inmersa en el citoplasma en la cara lateral de la célula en dirección al cilindro central (Figura 13D y 13 J); en algunas células del cilindro central también se ubicaron algunas marcas de tinción (Figura 13E). En el centro quiescente no hay presencia de PRL7(Figura 13 K) y en la cofia se ubica a PRL7 en células de la columela y células periféricas (Figura 13F y 13L).

Comparando los tejidos testigo de 18 horas y 24 horas, se observó que las marcas de PRL7 aumentan con el tiempo de imbibición. En tejidos testigo de raíz con 24 horas de imbibición (Figura 14) la PRL7 se ubicó en el citoplasma de células epidérmicas y en células del parénquima cortical de la zona de alargamiento (Figura 14G). En algunas de estas células se observó una localización polarizada en la cara lateral orientada en dirección al cilindro central. El centro quiescente tiene una tinción muy tenue (Figura 14K), en el caso de las células periféricas de la cofia se puede ubicar a PRL7 en la cara basal de la célula (Figura 14F y 14 L).

En tejidos de la raíz de embriones imbibidos 24 horas y tratados con insulina (Figura 15) las marcas de la proteína PRL7 aumentó respecto a las marcas observadas en tejidos testigo y tienden a ubicarse en forma polarizada. En células de la epidermis y del córtex de la zona de alargamiento se ubica a PRL7 en la cara lateral en dirección al cilindro central (Figura 15G y 15 J); mientras que en las células del cilindro central cambió la localización polarizada, ya que PRL7 está posicionada sobre la cara apical de la célula (Figura 15 D). En la zona meristemática el centro quiescente presentó poca marca de tinción.

Figura 14- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , testigos a las 24 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).

Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cq, centro quiescente; cc, cilindro central.

Figura 15- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , tratados con insulina a las 24 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).

Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cq, centro quiescente; cc, cilindro central.

Figura 16- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , testigos a las 36 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).

Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cq, centro quiescente; cc, cilindro central.

Figura 17- Ubicación de la proteína PRL7 en la raíz embrionaria , tratados con insulina a las 36 horas de imbibición. Azul, autofluorescencia de pared celular (A,B y C); rojo, PRL7 (D, E y F); violeta, unión de imágenes (G,H y I); ampliación de micrografía (J, K y L).
 Símbolos: za, zona alargamiento; cf, cofia; cc, cilindro central.

La cofia presentó un aumento de PRL7 en células de la columela y en células periféricas comparando con los tejidos testigo (Figura 15 H y 15 I).

En los tejidos testigo de la radícula de maíz con 36 horas de imbibición (Figura 16) las marcas de inmunotinción de PRL7 fueron más intensas que en tiempos de imbibición inferiores y la localización es homogénea en el interior de las células. Comparando los tejidos de 24 y 36 horas se detectó un incremento de las marcas de PRL7 en tejidos de la zona de alargamiento, la zona meristemática y la cofia. Las marcas de tinción de los tejidos testigo así como de los tratados con insulina (Figura 17) fueron muy similares en el ápice radicular. Las células del cilindro central, del córtex y la epidermis muestran a PRL7 en el citoplasma de la célula.

9.3) Morfometrías de células de la radícula

Los estudios realizados por (Villa- Hernández y col, 2013), demuestran que la insulina induce una mayor expansión de la raíz, por lo que es importante analizar a nivel celular la zona de maduración y la zona de alargamiento proximal para confirmar la expansión tisular.

Para ello se midió el ancho y largo (Figura 21 y 22) de las células de la zona de transición a la de expansión proximal al meristemo para demostrar que la insulina indujo el alargamiento celular y se marcaron las primeras células a partir del centro quiescente en las que se observó la localización polarizada de PRL7. Estos resultados se presentaran a continuación en las gráficas de las morfometrías.

En los distintos tiempos de imbibición, 24 horas de germinación fue donde mejor se observó la inducción de PRL7 con los tratamientos con insulina comparado con los testigos, ya que a las 18 horas se presentaban pocas marcas de inmunofluorescencia de PRL7 y a las 36 horas la distribución de las marcas de fluorescencia estaban más homogéneas en la célula.

En la zona meristemática de la raíz (Figura 21 y 22), se observó que el crecimiento celular por alargamiento a lo ancho haciendo la medición de la célula horizontalmente desde las caras laterales de la célula, fue similar en los tejidos tratados con insulina comparándolo con los tejidos testigo.

Figura 21 Ejemplo de morfometría en estirpes de la radícula de maíz a 24 horas de imbibición de tejidos testigo.
A, medidas de ancho celular de células madre del floema; B, medidas del ancho celular de la epidermis
Programa Image-J

Figura 22 Ejemplo de morfometría en estirpes de la radícula de maíz 24 horas de imbibición tejidos tratados con insulina. A, medidas del largo celular de células madre del floema; B, medidas del largo celular de la columela Programa Image-J

Figura 18 - Morfometría del ancho y largo de células madre del floema (pre-pro-elementos de savia) en la zona meristemática. A, Ancho de la célula; B, Largo de la célula.

Testigo (cuadros rojos); Tratados con insulina (rombos azules); Célula donde inicia la ubicación de la proteína ribosomal L7 en un patrón polarizado (rombos y cuadrados negros).

La ecuación del ancho celular de tejidos testigo ($y = 0.2987x + 19.463$; $R^2=0.64548$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 7.1601e^{0.0152x}$; $R^2 = 0.40136$).

La ecuación del ancho celular de tejidos tratados con insulina ($y = 0.269x + 17.77$; $R^2 = 0.64055$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 7.9592e^{0.0208x}$; $R^2 = 0.60099$).

En tejido testigo, la célula madre del floema (células PPSE- pre-pro- elementos de savia) más cercana al centro quiescente tiene un ancho de $20 \mu\text{m}$ y un largo

de 5.3 μm , llegando a un ancho de 30 μm y un largo de 11.8 μm en la zona de alargamiento proximal de la raíz, siguiendo un crecimiento que se ajustó en el mejor de los casos a un modelo lineal ($y = 0.2987x + 19.463$; $R^2=0.64548$). Mientras que el alargamiento de la estirpe de células PPSE cerca del centro quiescente, se ajustó mejor a un modelo exponencial, los tejidos testigo ($y = 7.1601e^{0.0152x}$; $R^2 = 0.40136$). En estas células la localización polarizada de PRL7 empezó a partir de un ancho de 24 μm y con un largo de 7 μm que corresponde a la célula 18 a partir del centro quiescente. Estos resultados indican que la insulina acelera también la localización polarizada de PRL7, ya que se observó en células más cercanas al centro quiescente. En células madre del floema de tejidos tratados con insulina, se midió una estirpe de 41 células en el ápice meristemático de la raíz (Figura 20; anexo 2). Estas células inician con un ancho de 15 μm y con un largo de 6.9 μm a partir de las células madre del floema cercanas al centro quiescente hasta llegar a la zona de alargamiento proximal con un ancho de 35 μm y un largo de 20 μm siguiendo un crecimiento que se ajustó en el mejor de los casos a un modelo lineal ($y = 0.269x + 17.77$; $R^2 = 0.64055$). El crecimiento longitudinal de la estirpe de células PPSE cerca del centro quiescente, se ajusta mejor a un modelo exponencial, los tejidos con tratamiento de insulina ($y = 7.9592e^{0.0208x}$; $R^2 = 0.60099$). En estas células PPSE la ubicación polarizada de PRL7 inicia a partir de un ancho de 21 μm y un largo de 9 μm correspondiente a la tercera célula a partir del centro quiescente, en tejidos tratados con insulina.

Figura 19. Morfometría de células de la protodermis ancho y largo. A, Ancho de la célula; B, Largo de la célula.

Testigo (cuadros rojos); Tratados con insulina (rombos azules); Célula donde inicia la ubicación de la proteína ribosomal L7 en un patrón polarizado (rombos y cuadrados negros).

La ecuación del ancho celular de tejidos testigo ($y = 1.1009x + 11.28$; $R^2=0.80149$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 5.6316x^{0.3796}$; $R^2 = 0.66202$).

La ecuación del ancho celular de tejidos tratados con insulina ($y = 1.1792x + 10.128$; $R^2=0.89551$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 3.4628x^{0.5688}$; $R^2 = 0.81165$).

En las células epidérmicas de los tejidos tratados con insulina y tejidos testigo el ancho celular es de $10 \mu\text{m}$ a partir del centro quiescente y va incrementando siguiendo un crecimiento lineal hasta llegar a la zona de alargamiento, donde su ancho celular llega a $33 \mu\text{m}$ para tejidos tratados con insulina y de $30 \mu\text{m}$ para los tejidos testigo. El crecimiento se ajustó mejor a un modelo lineal, en el caso de los tejidos tratados con insulina con la ecuación ($y = 1.1792x + 10.128$; $R^2=0.89551$) y en el caso de los tejidos testigo ($y = 1.1009x + 11.28$; $R^2=0.80149$).

En las células epidérmicas el crecimiento del largo celular inició siendo muy similar tanto en tejidos testigo como en los tratados con insulina. A partir de la

célula 15 los tejidos tratados con insulina con aproximadamente 15 μm de largo crecen más rápido en comparación a los testigo, el crecimiento se ajustó a un modelo potencial, en tejidos tratados con insulina ($y = 3.4628x^{0.5688}$; $R^2 = 0.81165$) y en tejidos testigo ($y = 5.6316x^{0.3796}$; $R^2 = 0.66202$).

Los estímulos con insulina incrementan el ajuste de R^2 del ancho y el largo celular, los efectos de la insulina promueven un crecimiento más sincronizado en comparación a las células madres del floema.

El patrón de polarización en tejidos tratados con insulina empieza en células más cercanas al centro quiescente con 13.66 μm de ancho y un largo de 9.8 μm que corresponde a la célula 8, en comparación con los tejidos testigo en los que la ubicación polarizada se empieza a observar con 25 μm de ancho y un largo de 18.7 μm que corresponde a la célula 13. Aquí también se ve el efecto de la insulina acelerando la ubicación polarizada de PRL7 en los tejidos tratados con este efector.

Figura 20. Morfometría de células de la cofia ancho y largo. A, Ancho de la célula; B, Largo de la célula.

Testigo (cuadros rojos); Tratados con insulina (rombos azules); Célula donde inicia la ubicación de la proteína ribosomal L7 en un patrón polarizado (rombos y cuadrados negros).

La ecuación del ancho celular de tejidos testigo ($y = 15.161e^{0.0168x}$; $R^2 = 0.30305$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 6.4406e^{0.0965x}$; $R^2 = 0.87025$).

La ecuación del ancho celular de tejidos tratados con insulina ($y = 12.561e^{0.047x}$; $R^2 = 0.85052$) y la ecuación del alargamiento celular ($y = 8.0404e^{0.0641x}$; $R^2 = 0.63539$).

En relación a las células de la cofia a las 24 horas de germinación, los tejidos con tratamiento de insulina inició con un ancho de 13 μm y los tejidos controles con 14 μm en células del caliptrógeno, terminando con un ancho de 21 y 18 μm respectivamente. El crecimiento hacia lo largo es similar a los testigo y no se observan diferencias en el número de célula del caliptrógeno a partir del cual se observa la localización polarizada de PRL7.

El crecimiento a lo ancho se ajustó a un modelo exponencial, en el caso de los tejidos tratados con insulina ($y = 12.561e^{0.047x}$; $R^2 = 0.85052$) y los tejidos testigo ($y = 15.161e^{0.0168x}$; $R^2 = 0.30305$). El crecimiento a lo largo se ajustó a un modelo exponencial, en los tejidos tratados con insulina ($y = 8.0404e^{0.0641x}$; $R^2 = 0.63539$) y en tejidos testigo ($y = 6.4406e^{0.0965x}$; $R^2 = 0.87025$). No se encontraron diferencias entre tratamientos, en la localización de la PRL7 polarizada ya que en ambos tratamientos se observó la polarización desde la primera célula a partir del centro quiescente.

En la medición de la longitud celular los tejidos tratados con insulina tienden a crecer más rápido (mayor longitud), que las células de los tejidos testigo.

10) Discusión

10.1) Localización de los intermediarios de la vía TOR-S6K.

La germinación en semillas de maíz inicia con la imbibición y culmina con la protrusión de la radícula (Bewley., 1997). En la imbibición de la semilla quiescente la reactivación del metabolismo es esencial para el crecimiento del embrión, entre los eventos más relevantes es la reactivación de la síntesis de proteínas (Nonogaki y col., 2010). En semillas de maíz se ha demostrado que la radícula inicia su crecimiento por expansión celular antes que el coleoptilo (Avila-Alejandre y col., 2013). Barrada y colaboradores (2015) proponen a las raíces como un órgano de elección para estudiar su patrón organizado de desarrollo y la regulación espacio-temporal de la proliferación y el crecimiento

en plantas, lo que permite utilizar a la raíz para analizar el efecto de inductores del crecimiento como la insulina.

Las funciones de ZmTORC1 son mediadas a través de la cinasa S6K, este complejo responde a glucosa, insulina, hormonas y factores de crecimiento para controlar la proliferación y el crecimiento celular, promoviendo procesos transcripción, traducción, y biogénesis de ribosomas (Peña–Uribe y Reyes de la Cruz, 2016). En este desarrollo se ha reportado que participan fitohormonas como auxinas y citocininas y recientemente se ha demostrado que la vía TOR integra señales hormonales y de disponibilidad de nutrientes para orquestar el crecimiento de la raíz.

Se ha reportado que los tejidos de la zona meristemática y la zona de transición de la radícula contienen medianas concentraciones de auxinas, la cual es movilizada a la caliptra y de ahí se distribuye rápidamente (Barrada y col., 2015); esta hormona promueven la activación de la vía TOR y de S6K (Buentello y col., 2011; Xiong y col, 2014).

Se ha reportado en semillas de maíz un factor de crecimiento semejante a la insulina denominado ZmIGF (Rodríguez-López y col., 2011). Dado que se ha demostrado que la insulina produce efectos similares al factor endógeno ZmIGF, estimulando el crecimiento de ejes embrionarios de maíz a través de la activación de la vía TOR-S6K participa induciendo la biogénesis de ribosomas, la traducción de ARN polimerasa I y III, responsables de la síntesis de ARNr y ARNt (Barrada y col., 2015), la síntesis de proteínas y aceleran la germinación (García-Flores y col., 2001), los resultados aquí presentados demuestran que la ubicación de proteínas ribosomales y de intermediarios de la vía TOR es diferente entre tejidos del eje embrionario como lo indica Ávila-Alejandre., (2013), donde la respuesta a insulina es diferencial en las partes del eje embrionario, siendo la radícula quien presenta una mayor respuesta en comparación al coleoptilo (Ávila-Alejandre y col., 2013).

En los resultados de inmunohistoquímica se ubicaron a TOR, P-TOR, RAPTOR, S6K y P-S6K en tejidos del ápice radicular como el parénquima cortical y la epidermis de la zona de alargamiento, la zona meristemática que rodea al centro quiescente, cofia y en menor medida el centro quiescente y el cilindro central a las 24 horas de imbibición, en el ápice caulinar los primeros

primordios foliares, el parénquima de corteza del mesocotilo y en menor medida en la zona central del mesocotilo.

En la inmunolocalización de la forma activa de P-TOR y P-S6K se ubicaron sobre los mismos tejidos del ápice caulinar y el ápice radicular antes mencionados, aportando conocimiento sobre la participación de esta vía en el crecimiento celular y alargamiento de la radícula durante la imbibición.

La localización de TOR en la zona de alargamiento de la radícula coincide con lo reportado por Barrada y colaboradores (2015), quienes usando un gen reportero GUS asociado al promotor de TOR en *Arabidopsis*, localizan su expresión principalmente en la zona de alargamiento de la radícula, que es una zona de mayor demanda energética donde se requiere la participación de la vía TOR-S6K para regular el incremento de proteínas, como en el caso de la zona de transición con células poliploides que requieren una gran maquinaria de replicación y la zona de alargamiento proximal donde ocurren procesos de ablandamiento de la pared celular y expansión celular e inician a comprometerse células protodérmicas a epidérmicas o tricomas.

La inmunolocalización de RAPTOR en tejidos de maíz comprueba la existencia y participación del complejo 1 - ZmTORC1 en la vía TOR y en la regulación de la biogénesis de ribosomas y crecimiento en respuesta a estímulos como la insulina.

La proteína RAPTOR tiene interacciones directas con S6K indicando una interacción física entre S6K y TORC1 (Mahfouz y col., 2006).

En estudios de transcriptómica en plantas de *Arabidopsis* se ha reportado que S6K1 y S6K2 se expresan predominantemente en la zona de alargamiento y zona de transición del ápice radicular (Henriques y col., 2010), estos resultados corroboran la presencia de S6K por inmunohistoquímica sobre la zona de alargamiento de la radícula.

Comparando los tejidos testigo con los tratados con insulina a 24 horas de imbibición, se observa que la insulina incrementa las marcas de tinción en el primer primordio foliar y mesocotilo cercano ápice caulinar y en la zona de alargamiento y cofia que cubre al ápice radicular. En el centro quiescente las marcas de inmunotinción para RAPTOR son muy tenues tanto en los tejidos testigo como los tratados con insulina, al igual que se observó para la inmunolocalización de TOR y S6K.

Los tratamientos con insulina aumentaron las marcas de inmunotinción para P-S6K y se pueden observar las marcas de P-S6K cercanas a la membrana plasmática de las células en un patrón polarizado que varía dependiendo del tipo celular. Estos resultados sugieren la existencia de un arreglo espacial determinado de los intermediarios al ser activada con insulina la vía TOR-S6K en tejidos de maíz durante la germinación, siendo el efecto de la insulina más notorio a las 24 horas de imbibición como se discutirá mas adelante.

10.2) Proteínas ribosomales.

Se ha demostrado en diversos reportes que los tratamientos con insulina estimulan la síntesis de proteínas ribosomales a través de la vía ZmTOR-S6K donde la proteína ribosomal S6 es activada por fosforilación por la cinasa S6K para reclutar en polisomas, ARNm involucrados en la síntesis de proteínas y así aumentar la biomasa y estimular la proliferación y el ciclo celular en estos tejidos (Barrada y col., 2015).

Otros reportes donde utilizan [³⁵S]- metionina durante la germinación, indican que en las primeras 12 horas de imbibición existe un aumento de proteínas ribosomales alcanzando una máxima inducción incrementándose 60 veces a las 24 horas en comparación a las 3 horas de imbibición, cuando se aplican tratamientos con insulina existe un incremento de proteínas ribosomales del 75% a las 24 horas de imbibición en todo el eje embrionario (Villa-Hernández y col., 2013).

En este trabajo se localizó en tejidos de la radícula de maíz a las 24 horas de imbibición proteínas ribosomales que incrementan bajo estímulos con insulina. Las proteínas ribosomales S6, L3 y L7 se localizaron en tejidos de la radícula como el parénquima cortical y la epidermis de la zona de alargamiento, cilindro central, el centro quiescente y la cofia analizando tejidos testigo.

En los tejidos de la raíz, la PRL3 se ubicó principalmente en tejidos con células maduras o ya diferenciadas como es el caso de células cercanas a la periferia de la cofia probablemente por ser un tejido muy activo metabólicamente y en constante reparación por el desgaste provocado durante la protrusión de la radícula (Sánchez-Linares y col., 2012). Comparando los tejidos de la radícula de maíz sin tratar con insulina (testigo) contra los que se les aplicó el tratamiento con insulina, no se observan grandes diferencias en las marcas de inmunotinción de PRL3 al analizar tejidos de la cofia, indicando que la insulina

cualitativamente no estimula la producción de esta proteína ribosomal. Estos resultados son similares a los reportados en estudios previos, en los que se demostró en ejes embrionarios completos de maíz a las 24 horas de imbibición que el contenido de la PRL3 no incrementaba en los tratamientos con insulina a pesar de que este tratamiento aumentaba los transcritos de esta proteína ribosomal, sugiriendo una regulación traduccional (Villa Hernández y col., 2013).

En tejidos tratados con insulina se observó un incremento en las marcas de tinción de las proteínas ribosomales S6 y L7 sobre tejidos de la radícula. En estudios previos se ha demostrado que la insulina puede incrementar la proteína PRS6 hasta 300% y la concentración de PRL7 hasta un 70% en ejes embrionarios de maíz a las 24 horas de imbibición (Villa Hernández y col., 2013). La proteína ribosomal L7 participa en procesos de regulación traduccional y en la estructuración de los ribosomas al igual que PRS6 (Hernández-Hermenegildo y col., 2018).

Los resultados de microscopía confocal (Figura 12 - 17) indican que hay un incremento en la cantidad de PRL7 conforme aumenta el tiempo de imbibición (de 18 a 36 h). Este incremento se puede explicar porque la radícula requiere de un incremento en la biomasa celular aumentando la actividad de la maquinaria traduccional para su crecimiento. Este contenido de PRL7 es mayor en las radículas tratadas con insulina en comparación con las no tratadas. En estudios previos se demostró que los estímulos con insulina incrementaban la síntesis de PRL7 a través de la activación de la cinasa ZmTOR, la cual regula la biogénesis de ribosomas y la síntesis de algunas proteínas ribosomales, tanto en animales como en plantas (Villa-Hernández y col., 2013).

El incremento de la proteína ribosomal L7 por estímulos con insulina se induce por la activación de la PRS6 al ser fosforilada por la S6K1 y S6K2; cuando se activa PRS6 se reclutan preferencialmente ARNm con secuencias 5'TOP dentro de las cuales esta PRL7 con 12 a 14 repeticiones de pirimidinas y PRS6 con 11 nucleótidos que conforman el extremo 5'TOP, la traducción de mensajeros con esta característica está en función al estatus de crecimiento (Meyuhas., 2000).

En las radículas tratadas con insulina se observó que la PRL7 presentaba una localización polarizada en distintos tipos de células y la polarización variaba

según el tipo celular. En el caso de los tejidos de la zona meristemática y de alargamiento de la raíz, la proteína PRL7 se ubica polarizada en la cara lateral dirigiéndose hacia el cilindro vascular. Esta ubicación polarizada se mantiene hasta llegar a las células madre del floema cercanas al periciclo. En las células de la cilindro central la PRL7 se ubica polarizada en la cara lateral superior de la célula, mientras que en células del parénquima y células de la cofia lateral se ubica polarizada en la parte basal de la célula y en las células del caliptrógeno se ubica polarizada en la cara superior de la célula.

Hay evidencia en células animales donde se ubica a PRL7 unido a la membrana del retículo endoplásmico rugoso a través de la interacción con aminoácidos del extremo carboxiterminal de la proteína nascente, esta interacción confirma que L7 regula el reclutamiento de ribosomas a la membrana retículo endoplásmico rugoso y regular otros procesos de traducción (Wu y col., 2007). En plantas se sabe que producen diferentes tipos de retículo endoplásmico en la que derivan vesículas involucradas en la acumulación de distintos tipos de proteínas y su distribución depende de señales hormonales como las de auxina (Gottéy col., 2016; Middleton y col., 2018).

El perfil de fitohormonas revela altos niveles de auxina en la estela y de citoquinina en el parénquima cortical (Saleem y col., 2017).

Una proteína bien estudiada en plantas son los PIN (PINFORMED) los cuales están involucrados en el influjo y eflujo de auxinas, estas proteínas tienen una localización polarizada en donde sus transportadores se ubican en distintas caras de la célula para regular el influjo y eflujo de auxinas en la raíz (Rosquete y col., 2012). Se ha observado que en la raíz existe una polarización a nivel celular que dan funcionalidad y direccionalidad a las señales, entre ellos los PIN que es el transportador de auxina que se encarga del flujo de IAA del córtex de la radícula hacia el cilindro vascular (Rosquete y col., 2012), en epidermis y parénquima cortical el patrón polarizado en las que PRL7 se ubica en las caras laterales tiene una similitud con la ubicación de PIN3.

En el cilindro central PRL7 se ubica polarizada en la parte superior de la célula, el flujo de auxina en esta zona de la raíz por los transportadores PIN 1 no coincide con la localización de PRL7 pero si con la supuesta localización de los canales de influjo de auxina AUX1/IAA, ésta pudiera estar asociada a otros

procesos relacionados con los gradientes hormonales y con ello el señalamiento para la diferenciación del sistema vascular como lo es la división del pre-pro-cambium y la generación de células madre del floema y xilema, en que participa la proteína OCTOPUS que censa señales longitudinales para la diferenciación del floema durante el crecimiento de la radícula de maíz (Truernit y col., 2012).

Otras posibles explicaciones para la ubicación polarizada de estas proteínas son la participación de TOR en el rearrreglo del citoesqueleto y polarización que se ha reportado a través del TORC2 en células animales (Xiong y Sheen., 2014). A pesar de que no se ha encontrado un complejo equivalente a TORC2 en plantas se tendría que analizar este posible mecanismo de rearrreglo de citoesqueleto en maíz.

Recientemente se reportó que TOR regula el aglutinamiento celular a través de la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas modificando las propiedades biofísicas del citoplasma en células de levadura y células HEK293 (Delarue y col., 2018), falta explorar si estas modificaciones ocurren en plantas y si contribuyen a la localización polarizada de las proteínas estudiadas.

Las mediciones del ancho y largo de diferentes estirpes celulares (epidermis, columela de la cofia y células madre del floema) de la zona meristemática y zona proximal de la zona de alargamiento muestran que los estímulos con insulina inducen el crecimiento preferencialmente en el largo celular comparándolo con tejidos testigo donde la estirpe de las células madre del floema el crecimiento longitudinal tiende a ser mayor con los tratamientos con insulina en el crecimiento longitudinal. Las células madre del floema son las que descargan hormonas, péptidos, ARN y nutrimentos en zonas de crecimiento en el meristemo radicular mandando señales que orquestan el crecimiento de tejidos de la radícula y son un regulador de las concentraciones oscilatorias de auxinas en microambientes como los de la región de expansión proximal (Ross-Elliott y col 2017).

11) Conclusiones

Los resultados de este trabajo corroboran que la insulina estimula el crecimiento promoviendo la activación de la vía TOR-S6K y demuestran que los tejidos responden de forma selectiva a este factor.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la ubicación diferencial en cuanto a intensidad de los componentes de la vía TOR-S6K y sus productos finales como las proteínas ribosomales que se localizaron en los tejidos del ápice caulinar como el primer primordio foliar, mesocotilo, y en el ápice radicular en la zona de alargamiento, cofia y en el centro quiescente tanto en los embriones testigo como en los tratados con insulina. La proteína ribosomal L7 se ubicó polarizada en tejidos de la raíz correlacionando su posición con componentes de señalamiento hormonal (auxina) y de compromiso y crecimiento.

El tratamiento con insulina provocó un incremento en el contenido de los intermediarios de la vía TOR-S6K estudiados. La estimulación se observa preferencialmente en la radícula, en el parénquima de los primeros primordios foliares y la corteza del mesocotilo.

Sin embargo, la activación de esta vía no induce por igual la síntesis de todas las proteínas ribosomales, algunas como PRS6 y PRL7 se estimulan mientras que otras como PRL3 no se afectan en la radícula de embriones de maíz.

Las proteínas intermediarias de la vía TOR-S6K así como la PRL7 presentan una localización celular polarizada que varía dependiendo del tipo celular sugiriendo que la polarización es parte del mecanismo de alargamiento en la que existe un rearreglo posicional de componentes de la membrana.

La insulina modifica la morfometría de crecimiento de las células estimulando preferencialmente el crecimiento a lo largo y haciendo que la ubicación polarizada de PRL7 se presente en células más cercanas al centro quiescente.

12) Referencias

Aguilar, R., Montoya, L., and Sánchez de Jiménez, E. (1998) Plant Physiology. 116, 379-385.

Avila-Alejandre, A.X., Espejel, F., Paz-Lemus, E., Cortés-Barberena, E. Díaz de León-Sánchez, F., Dinkova, T.D., Sánchez de Jiménez, E. & Pérez-Flores, L.J. (2013) Effect of insulin on the cell cycle of germinating maize seeds (*Zea mays* L.). Seed Science Research, 23, 3-14.

Antipova, O. V., Bartova, L. M., Kalashnikova, T. S., Obroucheva, N. V., Voblikova, V. D., & Muromtsev, G. S. (2003). Fusicoccin-induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds. Plant Physiology and Biochemistry, 41(2), 157-164.

Bailey-Serres, J., and Freeling, M. (1990). Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. Plant Physiology, 94, 1237–1243. doi: 10.1104/pp.94.3.1237.

Ballesta, J. P., & Remacha, M. (1996). The large ribosomal subunit stalk as a regulatory element of the eukaryotic translational machinery. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Vol. 55, pp. 157-193). Academic Press.

Ballesta, J. P., Rodriguez-Gabriel, M. A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R., & Remacha, M. (1999). Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. FEMS Microbiology Reviews, 23(5), 537-550.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (1999). Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. Nature, 400(6747), 841.

Barakat, A., Müller, K. F., & Sáenz-de-Miera, L. E. (2007). Molecular evolutionary analyses of the Arabidopsis L7 ribosomal protein gene family. *Gene*, 403(1), 143-150.

Barrada, A., Montané, M. H., Robaglia, C., & Menand, B. (2015). Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19671-19697.

Beltrán-Peña E., Aguilar R., Ortiz-López A., Dinkova TD., y Sánchez de Jiménez E. (2002). Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein síntesis regulation. *Plant Physiology*, 115, 291-297.

Beltrán-Peña, E., Ortíz-López, A. and Sánchez de Jiménez, E. (1995) Synthesis of (r)-proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Molecular Biology*, 28, 327–336.

Bewley, D., and Black, M. (1997) *Seeds, Physiology of Development and Germination*, pp 104-107, Plenum Press, New York.

Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9 (7), 1055.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

Buentello Volante B. (2007). Efecto de las auxinas en la síntesis y fosforilación de proteínas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Doctorado. UAM.

Buentello Volante, B., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., Aguilar Caballero, R., Ponce-Valadez, M., Sánchez de Jiménez, E., & Pérez-Flores, L. J. (2010). Aparente entrecruzamiento de dos vías de señalización que regulan el crecimiento del coleoptilo en *Zea mays*. *Phyton*, 79 (1), 101-108.

Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Hueros, G., Thompson, R.D., and Cresti, M. (2002). Subcellular localisation of BETL-1, -2 and -4 in *Zea mays* L. endosperm. *Sexual Plant Reproduction*, 15:85–98.

Carroll, A. J., Heazlewood, J. L., Ito, J., and Millar, A. H. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Molecular Cell Proteomics*, 7, 347–369. doi: 10.1074/mcp.M700052-MCP200.

Chandler, J., Nardmann, J., and Werr, W. (2008). Plant development revolves around axes. *Trends Plant Science*, 13:78–84.

Chang, I. F., Szick-Miranda, K., Pan, S., and Bailey-Serres, J. (2005). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of *Arabidopsis* cytosolic ribosomes. *Plant Physiology*, 137, 848–862. doi: 10.1104/pp.104.053637.

Chiang, G. G., & Abraham, R. T. (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25485-25490.

Clemons, W. M., Jr., May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., and Ramakrishnan, V. (1999) *Nature* 400, 833-840.

Collier E., Watkinson A., Cleland CF., y Roth J. (1987). Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *Journal Biology Chemistry* 262, 6238-47.

Corona-Carrillo, J. I., Flores-Ponce, M., Chávez-Nájera, G., & Díaz-Pontones, D. M. (2014). Peroxidase activity in scutella of maize in association with anatomical changes during germination and grain storage. *SpringerPlus*, 3, 399. doi:10.1186/2193-1801-3-399

Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850.

Cosségal, M., Vernoud, V., Depège, N., and Rogowsky, P.M. (2007). The embryo surrounding region. In Endosperm, O.-A. Olsen, ed. (Berlin Heidelberg: Springer), pp. 57–71, *Plant Cell Monographs*.

Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1- PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, 450, 736–740.

Delarue, M., Brittingham, G. P., Pfeffer, S., Surovtsev, I. V., Pingley, S., Kennedy, K. J., Schaffer, M., Gutierrez, J. I., Sang, D., Poterewicz, G., Chung, J. K., Plitzko, J. M., Groves, J. T., Jacobs-Wagner, C., Engel, B. d. & Holt, L. J. (2018). mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding. *Cell*, 174(2), 338-349.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.042.

CIMMYT (2016). Maíz: De México para el mundo. Recuperado el 4 de Diciembre del 2018 de <https://www.cimmyt.org/es/category/opinion-es/>

Doll, N. M., Depège-Fargeix, N., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2017). Signaling in early maize kernel development. *Molecular Plant*, 10(3), 375-388.

Eastmond, P. J. (2006). SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 18(3), 665-675.

Eltschinger, S., & Loewith, R. (2016). TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 26(2), 148-159.

Enríquez-Arredondo C, Sánchez-Nieto S, Rendón Huerta E, González-Halphen D, Gavilanes-Ruiz M, Díaz-Pontones D. 2005. The plasma membrane H⁺-

ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Science* 169, 11–19.

[Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. \(2016\). Panorama agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. Recuperado el 3 de Noviembre del 2018 de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf.](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2016.pdf)

Fumagalli, S., and Thomas, G. (2000) in *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., Eds.) pp 671-693, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Furuta KM, Yadav SR, Lehesranta S, Belevich I, Miyashima S, Heo JO, Vate' n A, Lindgren O, De Rybel B, Van Isterdael G, Somervuo P, Lichtenberger R, Rocha R, Thitamadee S, Ta'htiharju S, Auvinen P, Beeckman T, Jokitalo E, Helariutta Y. 2014. Plant development. *Arabidopsis* NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science* 345:933–937. doi: 10.1126/science.1253736, PMID: 25081480.

Gagou, M. E., Rodríguez, G. M. A., Ballesta, J. P. G., and Kouyanou, S. (1999) *Gene* 226, 365-373. 33. Olson, P. F., Salo, T., Garrison, K., and Fessler, J. H. (1993) *Journal of Cell Biochemistry*, 51, 353-359.

García-Flores C., Aguilar R., Reyes de la Cruz H., Albores M., y Sánchez de Jiménez E. (2001). A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein síntesis in maize. *Biochemical Journal*, 358:95-100.

Garrocho-Villegas V, Aguilar CR, Sánchez de Jiménez E (2013) Insights into the TOR-S6K Signaling pathway in Maize (*Zea mays* L.). Pathway activation by

effector–receptor interaction. Biochem-US 52:9129–9140.
doi:10.1021/bi401474x.

Gilbert, W. (2011) Functional specialization of ribosomes?. Trends Biochemical Science. 36, 127–132.

Gotté, M., Bénard, M., Kiefer-Meyer, M. C., Jaber, R., Moore, J. P., Vicré Gibouin, M., & Driouich, A. (2016). Endoplasmic Reticulum Body–Related Gene Expression in Different Root Zones of Arabidopsis Isolated by Laser-Assisted Microdissection. *The plant genome*, 9(2).

Harrington LS., Findlay GM., Lamb RF. (2005). Restaining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. Trends Biochemical Science. 30, 35-41.

Hernández-Hermenegildo, R. A., Bernal, L., Jiménez-Pérez, L. V., Bernal-Lugo, I., & de Jiménez, E. S. (2018). Ribosomal Heterogeneity of Maize Tissues: Insights of Biological Relevance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-9.

Henriques, R; Magyar, Z.; Monardes, A.; Khan, S.; Zalejski, C.; Orellana, J.; Szabados, L.; de la Torre, C.; Koncz, C.; Bogre, L. (2010) Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO Journal*. 29, 2979-2993.

Herman, E.M., and Schmid, M. (2004). Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiology*. 136:3440–3446.

Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochemical Sciences*, 31, 553–562.

Hochholdinger, F., 2009. "The maize root system: Morphology, Anatomy, and genetics". J.L. Bennetzen and S.C. Hake (eds.), *Handbook of maize: Its Biology*. Springer Science, 145-160.

Hochholdinger, F., Marcon, C., Baldauf, J. A., Yu, P., & Frey, F. P. (2018). Proteomics of Maize Root Development. *Frontiers in Plant Science*, 9, 143. doi:10.3389/fpls.2018.00143.

Bewley, J.D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9, 1055-1066.

Jiménez-López, S., Mancera-Martínez, E., Donayre-Torres, A., Rangel, C., Uribe, L., March, S., Gjiménez-Sánchez, G., and Sánchez de Jiménez, E. (2011). Expression profile of maize (*Zea mays* L.) embryonic axes during germination: translational regulation of ribosomal protein mRNAs. *Plant and Cell Physiology*, 52(10), 1719-1733.

Weitbrecht, K, Muller, K. and Leubner-Metzger, G. (2011) First off the mark: early seed germination, *Journal Experimental Botany*. 62 3289–33

Hernández , T.D. Dinkova , R. Aguilar-Caballero , F. Rivera-Cabrera , E. Sánchez de Jiménez b L.J. Pérez-Flores- Regulation of ribosome biogenesis in maize embryonic axes during germination, *Biochimie* 95 (2013) 1871e1879.

Kutschera, U. (2004). The Biophysical Basis of Cell Elongation and Organ Maturation in Coleoptiles of Rye Seedlings: Implications for Shoot Development 1. *Plant Biology*, 6(2), 158-164.

Lázaro-Mixteco, P. E., and Dinkova, T. D. (2012). Identification of proteins from cap-binding complexes by mass spectrometry during maize (*Zea mays* L.) Germination. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 56, 36–54.

Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 307.

Ma, Z., Bykova, N. V., & Igamberdiev, A. U. (2017). Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. *The Crop Journal*. 5(6), 459-477.

Mahfouz, M.M.; Kim,; Delauney, A.J.; Verma, D.P. (2006) Arbidopsis target of rapamycin interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*, 18, 477-490.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., & Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6422-6427.

Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry*, 267(21), 6321-6330.

Middleton, A. M., Dal Bosco, C., Chlap, P., Bensch, R., Harz, H., Ren, F., ... & Zurbriggen, M. D. (2018). Data-Driven Modeling of Intracellular Auxin Fluxes Indicates a Dominant Role of the ER in Controlling Nuclear Auxin Uptake. *Cell reports*, 22(11), 3044-3057.

Meyuhas, O. (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6321–6330.

Meyuhas, O., and Hornstein, E. (2000) in *Translational Control of Gene Expression* (Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B., Eds.) pp 671-693, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Montoya-García, L., Muñoz-Ocoter, V., Aguilar, R., & Sánchez de Jiménez, E. (2002). Regulation of acidic ribosomal protein expression and phosphorylation in maize. *Biochemistry*, 41(31), 10166-10172.

Muench D, Zhang C, Dahodwala M (2012) Control of cytoplasmic translation in plants. *RNA* 3, 178–194.

Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. 2010. Germination, Still a mystery. *Plant Science*. 179: 574-581.

Oliveira, A. A. E., Elenir, A. A. O., Machado, T. O. L., Gomes, M. V., Neto, X. J., Pereira, C. A., Vierira, H. J. G., Fernández, S. V. K. and Javier-Filho, J. (1999) Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. *Protein Peptide Lett.* 6, 15–21

Patrick, R. M., Lee, J. C., Teetsel, J. R., Yang, S. H., Choy, G. S., & Browning, K. S. (2018). Discovery and characterization of conserved binding of eIF4E 1 (CBE1), a eukaryotic translation initiation factor 4E-binding plant protein. *Journal of Biological Chemistry*, 293(44), 17240-17247.

Peña-Urbe, C. A., & Reyes de la Cruz, Homero. (2017) Insulin-induced changes in metabolism-related proteins during maize germination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(1), 77-84. doi:10.1007/s11240-016-1084-4.

Pu Y, Luo X, Bassham DC (2017) TOR-dependent and -independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*, *Front Plant Sci* 8: 1204.

Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Li, F., Selvaraj, G., & Datla, R. (2011). TOR Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, p.pp. 110.169045.

Rodriguez-Lopez CD, Rodriguez-Romero A, Aguilar R, de Jimenez ES (2011) Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays* L.) peptide growth factor. *Protein Peptide Letters* 18, 84–91.

Rosquete, M. R., Barbez, E., & Kleine-Vehn, J. (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5(4), 772-786.

Ross-Elliott, T. J., Jensen, K. H., Haaning, K. S., Wager, B. M., Knoblauch, J., Howell, A. H., & Otero, S. (2017). Phloem unloading in *Arabidopsis* roots is convective and regulated by the phloem-pole pericycle. *Elife*, 6, e24125.

Ruzin, S. E. (1999). *Plant microtechnique and microscopy* (Vol. 198). New York: Oxford University Press.

Saleem M., Lamkemeyer T., Schutzenmeister A., Madlung J., Sakai H., Piepho H.-P., et al. (2010). Specification of cortical parenchyma and stele of maize (*Zea mays* L.) primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin and cytokinin-regulated proteins. *Plant Physiology*, 152, 4–18. 10.1104/pp.109.150425.

Sánchez de Jiménez E (2001) A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal* 358, 95–100.

Sánchez de Jiménez E. (2000). Protein synthesis in seed germination: connecting external cell signals with the ribosome. In *Seed Biology: Advances and Applications*. Eds. M. Black, KJ Bradford y J. Vázquez- Ramos. CAB International. USA. *Plant Physiology*, 105, 148-155.

Sánchez de Jiménez E., Beltrán-Peña E., y Ortiz-López A. (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. *Plant Physiology* 105, 148-155.

Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruiz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada- Alejo, V., Zurita-Villegas, V., Luna-Loaiza, R., Moreno- Sánchez, Bernal-Lugo and Sánchez- Nieto, S. (2012). Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of experimental botany*, ers130.

Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA (2013) TOR and S6K1 promote translation re- initiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal* 32, 1087–1102.

Schepetilnikov M, Makarian J, Srour O, Geldreich A, Yang Z, Chicher J, Hammann P, Ryabova LA (2017) GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO Journal* 36, 886–903.

Schepetilnikov, M., & Ryabova, L. A. (2018). Recent discoveries on the role of TOR (Target of Rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant Physiology*, 176(2), 1095-1105.

Sheridan, W. F., & Clark, J. K. (2017). 7 Embryo Development. *Maize Kernel Development*, 81.

Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 155.

Son, O., Kim, S., Hur, Y., & Cheon, C. (2016). Identification of the raptor-binding motif on arabidopsis S6 kinase and its use as a TOR signaling suppressor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 472(1), 83-87. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.068.

Sondergaard, T. E., Schulz, A., & Palmgren, M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475-2482.

Srivastava, N., & Behl, H. M. (2002). Growth and nutrient use efficiency in *Terminalia arjuna* Bedd. seedlings grown in various potting mixtures. *Indian Forester*, 128(1), 45-53.

Stolovich M., Tang H., Hornstein E., Levy G., Cohen R., Bae SS., Birnbaum M., y Meyuhas O. (2002). Transduction of Growth or Mitogenic Signals into

Translational Activation of TOP mRNAs Is Fully Reliant on the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Pathway but Requires neither S6K1 nor rpS6 Phosphorylation. *Molecular Cell Biology*. 22: 8101-8113.

Szick, K., Springer, M., and Bailey-Serres, J. (1998) *Proceeding of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 95, 2378-2383.

Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y. and Nambara, E. (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 53, 42–52.

Tee AR. y Blenis J. (2005). mTOR translational control and human disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 16: 29-37.

Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 8023–8032.

Toribio, R., Muñoz, A., Castro-Sanz, A. B., Ferrando, A., Berrocal-Lobo, M., and Castellano, M. M. (2016). “Evolutionary aspects of translation regulation during abiotic stress and development in plants,” in *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, eds G. Hernández and R. Jagus (Berlin: Springer).

Truernit, E., Bauby, H., Belcram, K., Barthélémy, J., & Palauqui, J. C. (2012). OCTOPUS, a polarly localised membrane-associated protein, regulates phloem differentiation entry in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 139(7), 1306-1315.

Uchiumi, T., and Kominami, R. (1992) *Journal of Biological Chemistry*. 267, 19179-19185.

Waterworth WM, West CE, Daws MI, Bray CM. 2000. The barley scutellar peptide transporter: Relationship to germination and loss of seed viability. In:

Black M, Bradford KJ, Vazquez-Ramos J, eds, Seed biology? advances and applications. Wallingford, UK: CABI, pp 297–307.

William G. Hopkins(1995), Introduction to plant physiology,Editorial-John Wiley & Sons, INC. Pág 17.

Williams, A. J., Werner-Fraczek, J., Chang, F., & Bailey-Serres, J. (2003). Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiology*, 132(4), 2086-2097.

Wu, W. C., Liu, H. W., & Lin, A. (2007). Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS letters*, 581(4), 651-657.

Xiong, F., Zhang, R., Meng, Z., Deng, K., Que, Y., Zhuo, F., . . . Ren, M. (2017). Brassinosteroid insensitive 2 (BIN2) acts as a downstream effector of the target of rapamycin (TOR) signaling pathway to regulate photoautotrophic growth in arabidopsis. *New Phytologist*, 213(1), 233-249. doi:10.1111/nph.14118.

Xiong, Y., & Sheen, J. (2014). The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology*, 164(2), 499-512.

Xiong, Y., & Sheen, J. (2015). Novel links in the plant TOR kinase signaling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 83-91. doi:10.1016/j.pbi.2015.09.006.

Yang, C., Zhang, C., Dittman, J. D., & Whitham, S. A. (2009). Differential requirement of ribosomal protein S6 by plant RNA viruses with different translation initiation strategies. *Virology*, 390(2), 163-173.

Yokawa, K., & Baluška, F. (2016). The TOR complex: An emergency switch for root behavior. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 14-18. doi:10.1093/pcp/pcv191.

Zambrano, R., Briones, E., Remacha, M., and Ballesta, J. P. G., (1997) Biochemistry 36, 14439-14446.

Zhu, C., Im, Y. J., & Cargill, E. J. (2017). DNA synthesis and cell division in haploid maize shoot apical meristem cells during seed germination. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 91.

Anexo 1

Características de los anticuerpos y diluciones.

Anticuerpos	Diluciones
Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb (IHC Specific) (#2976) Cell-signal	1:100 TBST-5% Suero normal de cabra (inmunolocalización) 1:1000 TBST-5% Suero normal de cabra (Western Blotting)
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb (#9234) Cell-signal	1:100 TBST-5% Suero normal de cabra (inmunolocalización) 1:1000 TBST-5% Suero normal de cabra (Western Blotting)
Ribosomal Protein L3 (k-12):sc – 86828 Sanata Cruz biotechnology	1:10 TBST-5% Suero normal de cabra (inmunolocalización) 1:1000 PBS 1X; Tween-20, 0.5%, Albúmina-1% (p/V)- (Western Blotting)
Ribosomal Protein L7 (F-18):sc – 103151 Sanata Cruz biotechnology	1:10 TBST-5% Suero normal de cabra (inmunolocalización) 1:2000 PBS 1X; Tween-20, 0.5%, Albúmina-1% (p/V)- (Western Blotting)
Ribosomal Protein S6 (N-12):sc – 130051 Sanata Cruz biotechnology	1:10 TBST-5% Suero normal de cabra (inmunolocalización) 1:2000 PBS 1X; Tween-20, 0.5%, Albúmina-1% (p/V)- (Western Blotting)

Características de la insulina (humulina).

La humulina regular, es una insulina producida por una cepa de *Escherichia coli* que ha sido alterada genéticamente para producir la insulina humana. La insulina regular está constituida por cristales de insulina-zinc disueltos en un fluido para inyección y es idéntica en todo a la insulina humana, sin ninguna modificación estructural ni añadidos

para modificar su acción. La insulina regular tiene un efecto rápido y una acción relativamente corta (4 a 12 horas) en comparación con otras insulinas.

Medio MS (Murashige y Skoog)

La mezcla de sal Murashige y Skoog (M5524) contiene los macronutrientes y micronutrientes de la formulación clásica original. Se puede combinar con vitaminas M & S o vitaminas Gamborg y complementado con sacarosa, agar, auxinas (IAA) y citoquininas (Kinetin) para generar un medio completo para el cultivo de tejido vegetal en crecimiento.

Medio MS-(M5524)	Componentes (mg/L)
Nitrato de amonio	1650.0
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio anhidro	332.2
Cloruro de cobalto . 6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico .5H ₂ O	0.025
Na ₂ - EDTA	37.26
Sulfato ferroso.7H ₂ O	27.8
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso. H ₂ O	16.9
Acido molíbdico.2H ₂ O	0.25
Ioduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900.0
Fosfato de potasio monobásico	170.0
Sulfato de Zinc. 7H ₂ O	8.6

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00202

Matrícula: 2163802026

Efecto de la insulina en la activación y localización de proteínas de la vía TOR-S6K en embriones de maíz (*Zea mays*) en germinación.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 14 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNANDEZ
DR. JOSE ISAAC CORONA CARRILLO

DAVID GONZALEZ GEDEON
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: DAVID GONZALEZ GEDEON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DRA. CLAUDIA BARBOSA MARTINEZ

VOCAL

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

VOCAL

DRA. HELIA REYNA OSUNA FERNANDEZ

SECRETARIO

DR. JOSE ISAAC CORONA CARRILLO