

LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS (PARTE II): COMO ESTUDIARLA UTILIZANDO INHIBIDORES*

**María Fernanda Gómez-Méndez, Raúl Dávila-Delgado,
Rosana Sánchez-López, Rosario Vera-Estrella**

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Correo E: rosario@ibt.unam.mx

RESUMEN

La endocitosis es un mecanismo fundamental para la fisiología de las células eucariotes. En plantas, el estudio de la endocitosis se ha desarrollado a partir de la caracterización de mutantes, el uso de técnicas bioquímicas, microscópicas y por medio del uso de agentes químicos que actúan sobre la maquinaria endocítica, típicamente inhibidores del proceso endocítico. Utilizando estas metodologías ha sido posible explorar la endocitosis en plantas, y subsecuentemente ha permitido entender la importancia de este proceso y agilizar su caracterización a nivel molecular y celular. En esta revisión se resumen los agentes químicos más utilizados para el estudio de la endocitosis en plantas, y se explica su origen, su efecto y la importancia de su uso para continuar la investigación en esta área de la biología vegetal.

ABSTRACT

Endocytosis is a fundamental mechanism for the physiology of eukaryotic cells. In plants, the study of endocytosis has been developed from the characterization of mutants, the use of biochemical, microscopic techniques and using chemical agents that act on the endocytic machinery, typically inhibitors of the endocytic process. Using these methodologies, it has been possible to explore the endocytosis in plants, and subsequently it has allowed to understand the importance of this process and to speed up its characterization at the molecular and cellular level. This review summarizes the most commonly used chemical agents for the study of endocytosis in plants, and explains their origin, their effect and the importance of their use to continue research in this area of plant biology.

INTRODUCCIÓN

La endocitosis es el proceso por el cual las células eucariotes internalizan componentes de la membrana plasmática (MP) y/o material del espacio extracelular al citosol, a través de la invaginación de la bicapa lipídica, lo cual da lugar a una estructura tipo fosa, que posteriormente culmina en la formación de vesículas endocíticas. Estas vesículas, una vez liberadas, se fusionan con compartimentos intracelulares llamados endosomas, los cuales permiten dirigir las moléculas endocitadas o cargos hacia su degradación o reciclaje (1, 2). El proceso de endocitosis se observó por primera vez en el año

de 1866, por Metchnikoff, quien reportó la toma de material extracelular y su posterior degradación en diferentes especies de invertebrados infectados por hongos (1). A partir de este reporte y de la publicación de una gran cantidad de investigaciones, se ha logrado definir a la vía endocítica como un mecanismo molecular fundamental para mantener la homeostasis celular. Actualmente, se sabe que la endocitosis es un proceso que controla la composición de la MP, mantiene la polaridad celular, participa en la absorción de nutrientes, en la respuesta celular a toxinas y a patógenos y además funciona como una plataforma de señalización, debido a que regula la cantidad de receptores y

PALABRAS

CLAVE:

Células vegetales, endocitosis, inhibidores endocíticos.

KEY WORDS:

Plant cells, endocytosis, endocytic inhibitors.

ligandos presentes en la MP, los cuales una vez que se endocitan activan cascadas de señalización (2). Mucho del conocimiento sobre la endocitosis se ha desarrollado utilizando levaduras y células animales (3). En las células animales, por ejemplo, se han reportado diferentes vías endocíticas, como la fagocitosis o aquellas dependientes e independientes de clatrina, caveolina y/o balsas lipídicas, las cuales difieren en el tamaño del material que se endocita, la maquinaria molecular implicada y la regulación necesaria para que estas vías funcionen (1, 3). El estudio de la endocitosis en plantas en un inicio era cuestionable debido a la presencia de la pared celular y a la alta presión de turgencia que mantienen estas células, lo que sugería el impedimento de la invaginación de la MP. Sin embargo, Hilmer y cols, utilizando conjugados de lectina y oro demostraron que el proceso de endocitosis si ocurre en las células vegetales y paralelamente se demostró que la endocitosis en plantas es energéticamente posible, incluso en las células guarda que tienen altos índices de presión de turgencia (4). Durante los últimos años, se ha logrado identificar a la endocitosis en plantas como un proceso fundamental que depende del tipo celular y que responde a moléculas de señalización y a estímulos medioambientales tales como la luz, los nutrientes y el estrés biótico y abiótico (2, 5). Mucho de este conocimiento, se ha logrado gracias al uso de mutantes y compuestos químicos o agentes farmacológicos, que inciden en un punto específico durante el proceso de endocitosis (2, 5, 6). Además, la capacidad de marcar a proteínas implicadas en la endocitosis con moléculas fluorescentes ha sido importante para la visualización de la endocitosis por medio de microscopía confocal. Aunado a esto, la combinación de la microscopía confocal con los compuestos químicos que afectan el proceso endocítico, ha permitido mejorar el entendimiento de la endocitosis en plantas, en los últimos años. En esta revisión se resumen los últimos avances en el área y la importancia del uso de estos agentes para la caracterización de la endocitosis en plantas.

METODOLOGÍAS PARA ESTUDIAR LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS

Para estudiar la regulación temporal y espacial de la endocitosis en plantas, se han utilizado plantas mutadas en alguno de los genes implicados en la endocitosis (2, 5). La mayoría de estos análisis utilizaron mutantes por inserción de T-DNA, por ejemplo, las mutantes *clc-2*, *chc1* y *chc2* utilizadas para caracterizar funcionalmente las cadenas ligeras (CLC) y pesadas (CHC) de clatrina (para

mayor detalle ver "Endocitosis en plantas inducida por factores bióticos, abióticos y hormonas"). Otros ejemplos de mutantes que fueron claves para elucidar la función de algunos genes en la endocitosis son *bak1*, *epsin1*, *snx2b* y *trs1*, o las mutantes de *gnomR5* y *bor1-1* generadas por medio de etil-metano-sulfonato (2). Si bien, el uso de mutantes ha permitido conocer más acerca de la maquinaria endocítica en plantas, se ha reportado que mutaciones en genes importantes para el tráfico celular, en ocasiones producen fenotipos letales ya sea en los embriones o en estados tempranos de la germinación. Por otro lado, debido a la alta redundancia genética en plantas, la pérdida de función por una mutación ocasionalmente no produce fenotipos claros y provoca la necesidad de crear dobles o triples mutantes para el análisis de un gen, lo cual requiere largos periodos de análisis (6).

Metodologías alternativas a la mutación de genes para el estudio de la endocitosis, se desarrollaron a partir de la caracterización y el aislamiento del gen de la proteína verde fluorescente (GFP), y su posterior expresión en *Arabidopsis thaliana* (6). Realizando fusiones traduccionales entre la GFP o sus variantes fluorescentes y las proteínas que participan en la endocitosis, es posible marcar *in vivo* y visualizar el proceso endocítico y el sistema endomembranal de las células vegetales. Utilizando esta tecnología ha sido posible seguir a las proteínas residentes VHA1, RabA2 y RabA3 en la red del *trans*-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés, Trans-Golgi Network) que en plantas también tiene la función de endosoma temprano (EE, por sus siglas en inglés, Early Endosome). Así mismo, el cuerpo multivesicular (MVB, por sus siglas en inglés, Multivesicular Body) que en plantas funciona como endosoma tardío (LE, por sus siglas en inglés, Late Endosome) se ha estudiado por medio de los marcadores RabF2a, RabF2b y ESCRT (2, 6). Aunado al uso de proteínas fluorescentes, se han utilizado ampliamente técnicas bioquímicas como el fraccionamiento subcelular, la inmunoprecipitación y el análisis proteómico para la identificación y caracterización de los componentes implicados en la endocitosis y sus efectos en las proteínas cargo, que regula esta vía celular (5).

La microscopía de fluorescencia es una de las técnicas más recurridas, ya que permite la visualización *in vivo* del proceso endocítico. Las técnicas microscópicas, como la microscopía confocal de barrido (LSCM, por sus siglas en inglés, Laser Scanning Confocal Microscopy) es una de las técnicas de microscopía de fluorescencia más utilizada, ya que permite visualizar y analizar la dinámica a nivel subcelular de la molécula marcada fluorescente-

mente, además, también permite hacer ensayos de co-localización entre dos o más moléculas marcadas (2). Para analizar la dinámica de las vesículas endocíticas y del sistema endosomal, la microscopía confocal de disco giratorio (SDCM, por sus siglas en inglés, Spinning-Disk Confocal Microscopy) ha ayudado a reducir el tiempo en la adquisición de datos y ha aumentado la resolución espacial, dos aspectos favorables en el estudio de la dinámica endocítica, sin causar daño foto-tóxico a la muestra (5). Metodologías complementarias a LSCM y SDCM se pueden encontrar en la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM, por sus siglas en inglés, Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) y su variante, la microscopía de epifluorescencia de ángulo variable (VAEM, por sus siglas en inglés, Variable Angle Epifluorescence Microscopy), las cuales permiten observar eventos moleculares únicos y muy cercanos a la superficie celular. Por ello, estas metodologías son ideales para la observación y estudio de la endocitosis. Otro tipo de técnica microscópica útil para el análisis molecular de la endocitosis es la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP, por sus siglas en inglés, Fluorescence Recovery After Photobleaching). El fotoblanqueo es la destrucción irreversible de un fluoróforo por una excesiva exposición a la luz. En FRAP, el fotoblanqueo se realiza en un punto muy específico de una célula en estudio dándole seguimiento a la recuperación de la fluorescencia en ese punto específico, generalmente por difusión del fluoróforo que se encuentra aledaño al punto de fotoblanqueo. Por lo tanto, FRAP permite determinar la dinámica y la difusión de proteínas (carga fluorescente) localizadas en la MP. (2). A la par de las técnicas microscópicas disponibles en la actualidad, se han desarrollado plataformas computacionales para el análisis cuantitativo de los datos obtenidos por estas tecnologías microscópicas (5).

BIOLOGÍA QUÍMICA Y SU USO EN EL ESTUDIO DE LA ENDOCITOSIS EN PLANTAS

Mucho del conocimiento que se tiene sobre la endocitosis (para más detalles ver la revisión "Endocitosis en plantas (parte i): inducida por factores abióticos, bióticos y hormonas"), se ha desarrollado gracias al uso de compuestos químicos que inciden en el proceso endocítico (6). Estos compuestos se pueden categorizar como (Fig. 1 y Tabla 1): a) marcadores fluorescentes, b) inhibidores del tráfico vesicular, c) inhibidores del citoesqueleto, y d) inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina o CME. A continuación, se explica el efecto de estos compuestos sobre la endocitosis en las células vegetales y las

aportaciones que se han logrado por medio de su uso.

La biología química describe el uso de compuestos químicos para evaluar fenómenos biológicos por diferentes técnicas de análisis, y representa una forma de análisis alternativa a las metodologías que utilizan la mutación de genes (6). En contraste a la bioquímica, que estudia la química de las biomoléculas y sus vías de regulación en las células, la biología química consiste en aplicar compuestos que permiten estudiar un proceso biológico. El uso de la biología química ha sido significativo para entender los mecanismos de transporte y de regulación a diferentes niveles del sistema endomembranal (2, 6). Por ejemplo, usando un compuesto que inhibe el proceso endocítico, se pueden realizar análisis rápidos, dosis-dependientes y reversibles, lo cual evita los problemas de letalidad y de redundancia genética. Además, combinando la biología química, con las técnicas microscópicas como LSCM y SDCM, ha sido posible observar y caracterizar *in vivo* los efectos de estos compuestos en las células vegetales y realizar el análisis de proteínas de interés (2). Muchos de estos compuestos se comenzaron a utilizar debido a que se conocía su efecto en células animales y levaduras. A continuación, se recapitulan los compuestos que han permitido el avance del estudio de la endocitosis en plantas.

a) Marcadores fluorescentes de la endocitosis.

Los marcadores recurrentemente utilizados para seguir el proceso de endocitosis son los colorantes fluorescentes anfipáticos y selectivos de membrana FM4-64 (N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-dietilamino fenil hexatrienil) dibromo piridinio) y FM1-43 (N-(3-trietilamoniopropil)-4-(4-dibutilamino estirenil) dibromo piridinio). Estos compuestos fueron desarrollados por Betz y col, a partir de DASPMI (siglas de Dimetilaminoesterilmetilpiridinoamido) quienes los nombraron FM por la derivación del nombre Fei Mao, uno de los científicos que trabajaron en su desarrollo (7). Estos compuestos lipofílicos están formados por una cabeza di-catiónica, dos colas lipofílicas y un núcleo aromático. Son moléculas no-fluorescentes en medio acuoso, pero al unirse a la cara externa de la MP a través sus colas lipofílicas, un medio hidrofóbico, se tornan fluorescentes. Una vez que se unen a la capa lipídica, estos colorantes se internalizan por la vía endocítica y se distribuyen por el sistema endosomal. Estas propiedades han sido cruciales para visualizar *in vivo* tanto la endocitosis como el tráfico vesicular asociado a FM1-43 y FM4-64 ya que difieren en su espectro de absorción y emisión, 502 nm y 625 nm para FM1-43; y 560 nm y 767 nm para FM4-64, lo cual está definido por las

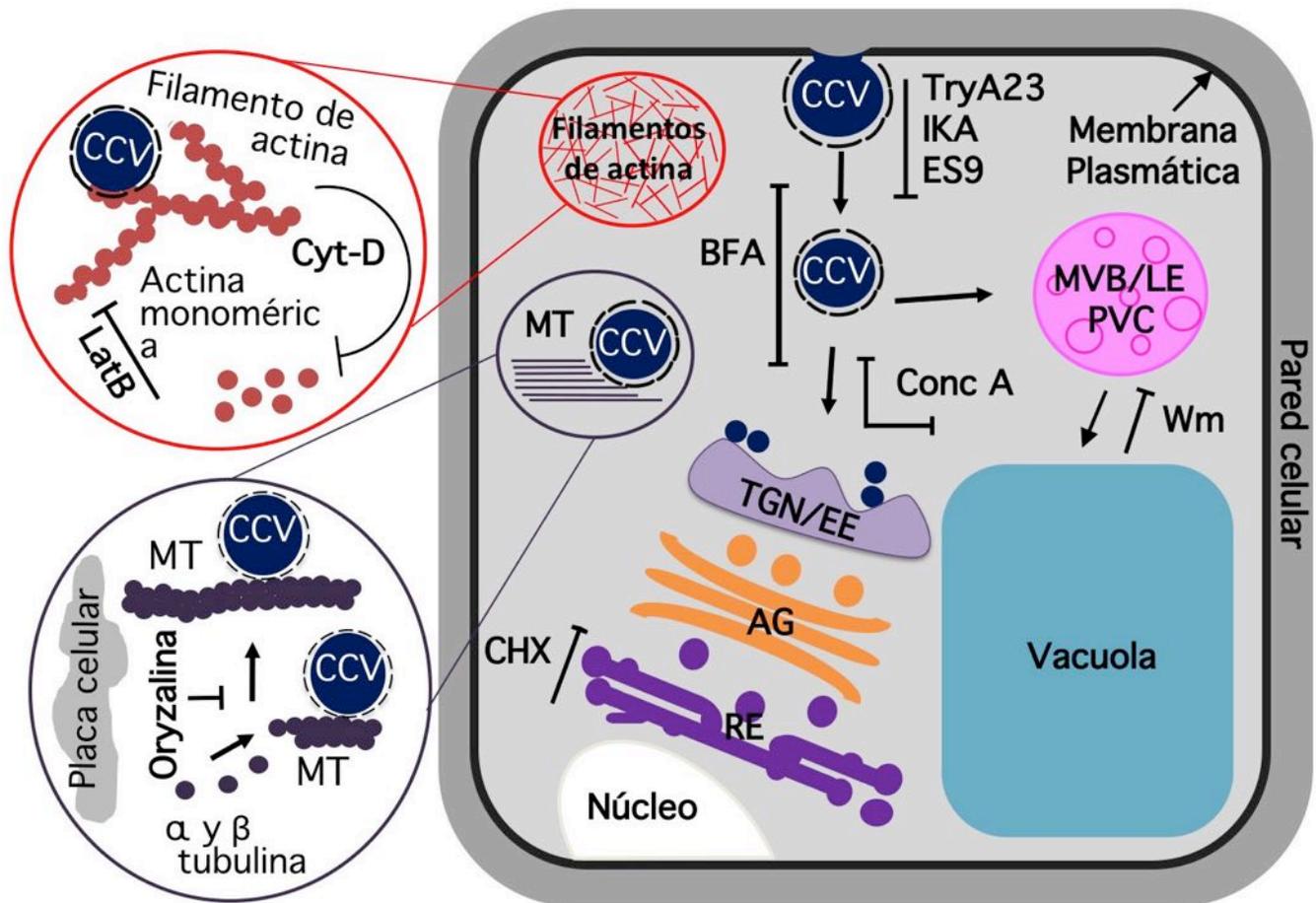


Figura 1. Descripción del efecto de los inhibidores de la endocitosis sobre el tráfico vesicular en las células vegetales. Se muestran los diferentes componentes celulares implicados en el tráfico vesicular, MP, membrana plasmática, MVB/LE/PVC, cuerpo multivesicular/endosoma tardío/cuerpo prevacuolar; TGN/EE, red trans Golgi/endosoma temprano; AG, aparato de Golgi; RE, retículo endoplasmático; CCV, vesícula con cubierta de clatrina; MT, microtúbulos. Los inhibidores se muestran en abreviaturas, Wm, wormanina; BFA, brefeldina A; Conc A, concanamicina A; IKA, Ikarugamicina; TryA23, tirfostina A23; ES9, endosidina 9; CHX, cicloheximida; LatB, latrunculina B; citocalasina D, Cyt-D. Las flechas (→) indican la direccionalidad del tráfico endocítico, y las barras tipo (⊥) indican el proceso de inhibición directa o indirecta sobre la endocitosis.

propiedades químicas del núcleo de la molécula. El uso de estos compuestos como marcadores endocíticos es dependiente de tiempo y temperatura, pero no de pH (8). La caracterización de estos compuestos, que originalmente fueron desarrollados como sensores del potencial de membrana, se inició en neuronas y en terminaciones presinápticas. Su uso fue fundamental para caracterizar el reciclaje de las vesículas presinápticas en cultivos de células del hipocampo y en terminaciones nerviosas de anfibios. El uso de los marcadores FM en células vegetales fue crucial para la descripción de la endocitosis en plantas, debido a que utilizando el FM4-64 se describió que la endocitosis dependiente de clatrina ocurre en plantas y que es fundamental para la internalización de los transportadores de auxinas PIN (8, 9). Ade-

más, utilizando este compuesto junto con ensayos de co-localización, fue posible identificar que el TGN funciona como el EE en células vegetales, ya que es el primer sitio celular que recibe el material endocitado desde la MP (6, 10).

b) Inhibidores para evaluar el tráfico vesicular en plantas:

Brefeldina A

Brefeldina A (BFA) es una toxina lipofílica de origen fúngico que tiene como estructura química una lactona macrocíclica. Fue aislada de manera independiente por diferentes grupos de investigación entre los años de 1958 a 1970. Su interés

TABLA 1

Inhibidores directos e indirectos y su efecto en el proceso endocítico en células vegetales.

Inhibidor	Blanco molecular	Efecto del inhibidor sobre el proceso endocítico	Referencia
BFA	GNOM	Indirecto. Produce un conglomerado intracelular, denominado cuerpo de BFA. Bloquea el tráfico vesicular tanto de secreción como endocítico.	2, 5, 6, 11, 12
Conc A	Subunidad c de la porción V ₀ de las V-ATPasas	Indirecto. Deforma el AG e induce la acumulación de material recién endocitado, también bloquea el transporte de cargos hacia el MVB/LE/PVC y la vacuola.	2, 13, 14, 15
Wm	Subunidad catalítica de PI3K*	Indirecto. Induce la fusión homotípica y el abultamiento de MVB/LE/PVC, y la agregación y la estabilización de las fosas de clatrina en la MP. Evita el transporte hacia la vacuola.	2, 9, 16, 17
Latrunculina B	Actina monomérica	Indirecto. Inhibe la polimerización de nuevos filamentos de actina.	2, 18
Citocalasina D	Extremo barbado y filamentos de actina en crecimiento	Indirecto. Inhibe la asociación y disociación de la actina monomérica y globular al filamento de actina.	2
Oryzalina	Tubulina	Indirecto. Se une y forma complejos con tubulina, evitando la polimerización de los microtúbulos. Afecta el movimiento lateral de las fosas de clatrina en la MP.	2, 11, 20
IKA	No se conoce	Directo. Evita la maduración de CCVs y altera la morfología del AG.	2, 21, 22
TryA23	Subunidad μ del AP2	Directo. Bloquea la interacción entre la subunidad μ del complejo AP2 y el motivo YXX \emptyset , presente en cargos internalizados por CME e interrumpe la asociación a la MP de la subunidad TCP del complejo TPLATE. También induce cambios en el pH intracelular.	2, 5, 23, 24
ES9	No se conoce	Directo. Actúa como un protonóforo y provoca la acidificación del citoplasma.	2, 5, 16, 25

*PI3K, cinasa de fosfatidil-inositol 3-fosfato

inicio por su efecto como anti-fúngico, antibiótico y fitotóxico (2, 6). Posteriormente se observó que BFA es un inhibidor del transporte intracelular de proteínas entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (AG) (Fig. 1). La incubación de las células animales con BFA altera la morfología y función del AG, provocando la fusión del AG con el RE, lo que subsecuentemente conduce a un bloqueo en el transporte de proteínas entre estos dos compartimentos celulares (2). Desde esta observación, diversos estudios se realizaron para conocer el modo de acción de este compuesto sobre la síntesis y transporte de proteínas a lo largo del sistema endomembranal. El efecto bioactivo del BFA se debe a que se une al dominio Sec7 de un intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, por

sus siglas en inglés, Guanine-nucleotide Exchange Factor) específico de factores de ribosilación de ADP (ARF, por sus siglas en inglés, Adenosine diphosphate Ribosylation Factor), factor que cambia el GDP unido al ARF-GEF (forma inactiva y soluble) por GTP (forma activa y asociada a la membrana). La unión de BFA al dominio Sec7 del ARF-GEF provoca la inhibición del intercambio GDP-GTP y, por ende, inhibe la actividad de las GTPasas tipo ARF, las cuales participan en el tráfico intracelular de vesículas y en la señalización celular (11). En células animales y levaduras los ARF-GEF sensibles a BFA están localizados en el AG y funcionan en el tráfico vesicular entre el AG y el RE, además participan en la formación de las vesículas COP1 y CCV en la membrana del AG, por lo cual BFA se

ha utilizado por excelencia como el inhibidor del tráfico vesicular asociado al AG (2). En células vegetales, uno de los blancos moleculares de BFA es el ARF-GEF conocido como GNOM, el cual funciona en el tráfico de proteínas entre endosomas y MP, y también en el reciclaje de cargos endocíticos. GNOM posee un dominio homólogo a Sec7 de ARF1, blanco característico de BFA (6). El tratamiento con BFA en plantas produce un conglomerado intracelular de TGN/EE, denominado cuerpo de BFA, el cual contiene tanto el material recién sintetizado, como también el endocitado (12). Por medio de la inducción de la formación de los cuerpos de BFA en células vegetales fue posible determinar que los transportadores PIN se movilizan de manera constitutiva entre la MP y los compartimentos endosomales. De hecho, la estrategia de visualización de proteínas marcadas fluorescentemente y asociadas a los cuerpos de BFA en las células tratadas con el inhibidor de síntesis de proteínas, cicloheximida (CHX), ha sido ampliamente utilizada para analizar el proceso de endocitosis en plantas (5). También utilizando BFA se ha identificado que el complejo TPLATE es necesario para la CME (5). Sin embargo, la interpretación del efecto del BFA en células vegetales es controversial, lo cual se debe a que las células vegetales poseen diversos tipos de ARF-GEF que están implicados en diferentes rutas de tráfico endomembranal provocando entonces la inhibición paralela de la vía endocítica y de las vías de transporte proteico entre el RE y el AG, así como del TGN al MVB que puede dirigir cargos hacia la degradación o hacia la vía de reciclaje. Por lo tanto, el BFA posee un amplio espectro de blancos moleculares, además en plantas existen ARF-GEF insensibles al efecto de BFA (12). Estas características dificultan en ocasiones la caracterización específica de ciertos blancos de la maquinaria endocítica o cargos de esta vía celular. Por ello, el desarrollo y estudio de compuestos bioactivos más selectivos de la vía endocítica, constituyen una alternativa para el estudio de este proceso en células vegetales.

Concanamicina A

Concanamicina A (Conc A; Fig. 1) es un antibiótico utilizado como inhibidor del tráfico vesicular, su estructura química consta de un anillo macrocíclico de lactona de 18 residuos. Este antibiótico fue aislado de *Streptomyces diastatochromogenes* y nombrado por su actividad como inhibidor de la proliferación de células T estimuladas con la lectina concanavalina A (2, 13). Posteriormente se encontró que Conc A es un compuesto que inhibe la función de las H⁺-ATPasas vacuolares (V-ATPasas), las

cuales son transportadores primarios presentes en todos los eucariontes, importantes para energizar las membranas celulares y mantener el pH en el sistema endomembranal (14). Estos complejos multi-enzimáticos están conformados por la porción V₁ (subunidades A a H) catalizadora de ATP, y la porción V₀ (subunidades a, c, c', c'', d, e) unida a la membrana y translocadora de protones. Conc A se une a la subunidad c de la porción V₀ inhibiendo la rotación del complejo y por lo tanto la translocación de protones. El uso de Conc A como un inhibidor del tráfico vesicular en plantas, inició al analizar la localización subcelular de la subunidad a de la V-ATPasa (VHA-a1) (14). En este estudio, se identificó que la VHA-a1 se localiza tanto en la membrana de la vacuola, como en TGN. Por medio del uso de Conc A se demostró que en plantas TGN también funciona como el EE ya que es el sitio celular donde las vías endocíticas y de secreción convergen en las células vegetales (14). Conc A bloquea el transporte de protones en la porción V₀ de la V-ATPasa, produciendo la deformación del AG, también induce la acumulación de material recién endocitado y sintetizado en el TGN, lo cual bloquea su transporte hacia la vacuola o hacia la MP, respectivamente. Así mismo, utilizando Conc A fue posible determinar que el TGN madura para formar el MVB (15). Por lo tanto, el uso de este inhibidor permitió elucidar aspectos relevantes del funcionamiento del sistema endomembranal en las células vegetales y constituye, así como la BFA, una herramienta para inhibir de manera indirecta la vía endocítica.

Wortmanina

Wortmanina (Wm) es un metabolito esteroideo aislado de diferentes especies de hongos, entre ellos *Penicillium wortmanni*, *Talaromyces wortmannii*, *Myrothecium roridum* y *Fusarium oxysporum* (2, 16). Se identificó como un inhibidor específico que se une covalentemente a la subunidad catalítica de la cinasa de fosfatidil-inositol 3-fosfato, enzima que produce el fosfatidil-inositol 3-fosfato, a partir de fosfatidil-inositol 4, 5-bifosfato (2, 17). Debido a que el fosfatidil-inositol 3-fosfato es un lípido característico de las membranas endosomales, se analizó su efecto en la vía endocítica en mamíferos, donde se observó que inhibe la endocitosis. El uso de Wm para el estudio de la endocitosis en plantas inicio con el trabajo de Emans y col (9), quienes utilizaron este inhibidor para caracterizar los marcadores fluorescentes FM como indicadores de endocitosis en plantas y observaron que, al tratar a las células vegetales con este compuesto la toma de FM1-43 se inhibe (9). En la actualidad, se conoce

que el tratamiento con Wm en células vegetales induce la fusión homotípica y el abultamiento del compartimento prevacuolar (PVC, por siglas en inglés, Pre-Vacuolar Compartment). Además de funcionar como MVB o LE (Multivesicular bodies en plantas, PVC es el sitio celular donde las rutas de síntesis y de endocitosis convergen para dirigirse hacia la vacuola (2). A partir de estos datos, el uso de Wm para analizar la ruta endocítica ha permitido demostrar, que este inhibidor bloquea la CME por medio de la agregación y estabilización de las fosas de clatrina en la MP, lo que detiene la formación de CCV. Simultáneamente, debido a que el TGN madura a MVB/LE/PVC y este, a su vez, está implicado en el tráfico de proteínas hacia la vacuola, Wm interfiere de manera global en la ruta endosomal de muchas de las proteínas que son endocitadas (2, 15) (Fig. 1). Así mismo, Wm ha sido utilizada para caracterizar la endocitosis promovida por estrés salino en la raíz de *A. thaliana*, y para analizar la endocitosis dependiente de ligando del receptor de flagelina, FLS2 (2).

En resumen, BFA, Conc A y Wm inhiben de manera indirecta la endocitosis, ya que los tres compuestos detienen el tráfico subcelular entre los endosomas (TGN/EE y MVB/LE/PCV), debido a que el flujo normal de vesículas endocíticas se detiene. Este efecto resulta útil al momento de analizar proteínas de interés, ya sea para caracterizar su participación en la endocitosis o como cargo endocítico.

c) Inhibidores del citoesqueleto y su efecto en la endocitosis: latrunculina B, citocalasina D y oryzalina.

El proceso de endocitosis no solo depende de las señales y las proteínas implicadas en la formación de las vesículas endocíticas, sino que también requiere la movilización de las vesículas. Para ello, es necesaria la participación del citoesqueleto, el cual provee las vías moleculares por las cuales las vesículas endocíticas son guiadas a lo largo del sistema endomembranal (18). En las células eucariontes existen tres diferentes tipos de elementos del citoesqueleto, los filamentos de actina, los microtúbulos (MTs) y los filamentos intermedios. De estos, los filamentos de actina y los MTs se han identificado como elementos que participan en la endocitosis en mamíferos, levaduras y también en plantas (2, 18). En plantas, la función de los filamentos de actina en el proceso de la endocitosis se ha estudiado ampliamente por medio del uso de toxinas como latrunculina B y citocalasina D, ambos inhibidores de la polimerización de los filamentos de actina (2) (Fig. 1). Latrunculina B

es una toxina que fue aislada de la esponja roja de mar, *Latrunculia magnifica*, mientras que las citocalasinas son metabolitos aislados de hongos como: *Aspergillus*, *Phomopsis*, *Penicillium* y *Xylaria*, entre otros (2). Ambos compuestos inhiben la polimerización de los filamentos de actina, aunque su mecanismo de acción difiere. Citocalasina D se une al extremo barbado y de crecimiento rápido de los filamentos poliméricos de actina evitando la asociación o disociación de la actina monomérica y globular al filamento. En cambio, latrunculina B se asocia solo a la actina monomérica lo que provoca la inhibición de la polimerización de nuevos filamentos (19) (Fig. 1). Utilizando estos dos inhibidores fue posible determinar la importancia de los filamentos de actina en el proceso de endocitosis, por ejemplo, al agregar latrunculina B se inhibe la endocitosis del marcador Lucifer Yellow y de pectinas de la pared celular en el meristemo de la raíz en maíz. También se inhibe la endocitosis de proteínas de membrana del tubo polínico en *Nicotiana tabacum*. Por su parte, citocalasina D inhibe el transporte endocítico de esteroides en *A. thaliana* (2). Por lo tanto, el uso de estas toxinas permite estudiar la dependencia de la endocitosis a los filamentos de actina y como estos influyen en el tráfico de las proteínas endocitadas.

La función de los MTs dentro de la vía endocítica en las células vegetales, ha sido investigada utilizando el herbicida oryzalina, el cual se caracteriza por ser un agente despolimerizante de MTs, ya que se une y forma complejos con tubulina, evitando su polimerización (20). El efecto de este inhibidor sobre la endocitosis se ha analizado en células de la epidermis de *A. thaliana*, en donde se observó que oryzalina afecta el movimiento lateral de las fosas de clatrina en la MP. La oryzalina también inhibe la endocitosis del receptor FLS2 en respuesta a su ligando y al transportador PIN1 durante la formación de la placa celular (11, 2). Además, oryzalina inhibe la endocitosis dependiente de flotilina, ya que el tratamiento, restringe la movilidad de las vesículas de flotilina en la MP en células de la raíz de *A. thaliana*. Asimismo, como la endocitosis es un proceso que provee muchos de los componentes que se necesitan para la formación de la placa celular en células en división, ya que la función de los MTs junto con la actina cortical, indican el lugar donde se formará la placa celular (2, Fig. 1). Se ha utilizado, oryzalina para determinar que los MTs son las vías moleculares más importantes para dirigir el material endocitado al sitio de formación de la placa celular en las células en división, lo que difiere en las células en interfase, donde la vía más importante para la movilización de las vesículas endocíticas son los filamentos de actina (2).

d) Inhibidores de la endocitosis dependiente de clatrina.

Ikarugamicina

Ikarugamicina (IKA) es un antibiótico con actividad antiprotozoaria aislado de *Streptomyces phaeochromogenes* sp. *ikaruganensis*. El efecto de la IKA sobre la CME se descubrió al analizar la internalización de versiones oxidadas de lipoproteínas de baja densidad en macrófagos (2, 21). En un estudio posterior, se encontró que en células monocíticas el tratamiento con IKA inhibe la endocitosis de CD4 inducida por la fosfoproteína Nef del virus del VIH (22). El modo de acción de IKA sobre la CME no se tiene bien definido, pero se conoce que la presencia de IKA provoca la redistribución de la CHC y del complejo hetero-tetramérico adaptador de clatrina 2 (AP2), claves para la formación de las CCV, del citoplasma a la MP. El tratamiento con IKA conlleva a la agrupación proteica no funcional que evita la maduración a CCVs y altera la morfología del AG, el cual se observa más desorganizado y vesiculado (22). Su uso en plantas inició al estudiar la endocitosis en protoplastos de tabaco y en los tubos polínicos, lo cual permitió esclarecer que IKA es un compuesto que también inhibe la CME en plantas (Fig. 1), además de que permitió elucidar que en el tubo polínico existen dos zonas endocíticas activas, la zona apical y la zona lateral y la presencia de un mecanismo de endocitosis independiente de clatrina, el cual es insensible a IKA (2, 22). Debido a que no se conoce el blanco molecular de IKA, su uso para estudiar la CME en plantas, debe ser cuidadoso y utilizando los controles necesarios para permitir ver su efecto dentro del sistema con el que se está trabajando.

Tirfostina A23

Tirfostina A23 (TyrA23), un inhibidor de la CME, es un análogo estructural a la fosfotirosina (2) (Fig. 1). Este inhibidor fue inicialmente desarrollado como un sustrato competitivo de cinasas de tirosina. Posteriormente se observó que inhibe la endocitosis del receptor de transferrina en células de mamífero, ya que bloquea la interacción entre la subunidad μ del AP2 y el motivo citosólico YXX \emptyset (donde Y es tirosina, X cualquier aminoácido y \emptyset representa un aminoácido hidrofóbico), presente en muchos de los cargos internalizados por CME (23). La inhibición de esta interacción provoca que los cargos que contienen el motivo YXX \emptyset no puedan incorporarse a las CCVs, inhibiendo así su endocitosis. El uso del TyrA23 en células vegetales, inició al caracterizar la expresión heteróloga del receptor de transferrina de mamífero en protoplastos de *A. thaliana* tratados

con FM4-64 y TyrA23 donde se observó que TyrA23 inhibe la endocitosis de este receptor (24). A partir de este estudio muchos grupos de investigación han utilizado TyrA23 como un inhibidor de la CME, para analizar la regulación de la endocitosis de proteínas de membrana involucradas en procesos tales como: la absorción de nutrientes, la defensa a patógenos y en la respuesta a estrés abiótico. En plantas, se demostró que TyrA23 no solo inhibe la asociación de la subunidad μ a MP sino también de las subunidades α y σ del complejo AP2. Además, interrumpe la asociación a la MP de la subunidad TCP del complejo TPLATE, que participa en la formación de CCVs y en la CME (2). Recientemente se encontró que, además de los efectos ya descritos, TyrA23 produce la acidificación del citoplasma en células de *A. thaliana* y, al parecer, cambios en el pH intracelular conllevan a efectos negativos en la maquinaria implicada en la CME (5).

Endosidinas

Las endosidinas (ES) son un grupo de compuestos orgánicos que forman parte de grandes colecciones o librerías (aproximadamente 60,000) de compuestos bioactivos (interfieren con funciones biológicas) comercializados por Chembridge Corp. y MicroSource Discovery Systems Inc. Las ES fueron identificadas por tamizaje de estas librerías buscando moléculas que afectan la endocitosis y la función endosomal (25). El blanco funcional o molecular de algunas de las endosidinas ha sido caracterizado. Por ejemplo, la endosidina 5 (ES5), inhibe el reciclamiento de proteínas a MP (16). Las ES1, ES2 y ES16 afectan el tráfico *post*-Golgi y la función endosomal (2, 5). Particularmente, ES9 inhibe la CME del receptor de transferrina en células animales y de FM4-64 en células vegetales. Actualmente se conoce que el modo de acción de ES9 es parecido al efecto de TyrA23, ya que actúa como un protonóforo y provoca la acidificación del citoplasma (5) (Fig. 1).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El conocimiento sobre la vía endocítica en plantas ha permitido definirla como un proceso fundamental para el desarrollo, la respuesta a estímulos y la señalización vegetal. Hoy en día sabemos que la endocitosis de proteínas provoca una respuesta a nivel celular que impacta en la homeostasis general de toda la planta. Es por esto que resulta importante caracterizar la maquinaria molecular implicada en este proceso. En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para comprender, a nivel molecular, el funcionamiento de la endocitosis en plantas.

Esto se ha podido lograr, no solamente mediante el análisis de las proteínas que forman parte de la maquinaria y los cargo endocíticos, sino en buena parte gracias al uso de inhibidores de la endocitosis (Tabla 1). El uso de estos compuestos ha permitido elucidar la dinámica, eficiencia y selectividad del sistema endomembranal en las células vegetales. Además, la investigación acerca del efecto de es-

tos compuestos y su clasificación como moléculas que actúan de manera directa o indirecta sobre la endocitosis resulta importante para continuar con la investigación de este proceso. Así mismo, la identificación de más compuestos que inhiban de manera directa la endocitosis a diferentes niveles es una necesidad para continuar la investigación en esta área de la biología vegetal. 

REFERENCIAS

1. Doherty JG, McMahon TH (2009). Mechanism of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902.
2. Šamaj J (2012). *Endocytosis in plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, p 333.
3. Robinson GD, Jiang L, Schumacher K (2008). The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol* 147:1482-1492.
4. Hilmer S, Depta H, Robinson DG (1986). Confirmation of endocytosis in higher-plant protoplasts using lectin-gold conjugates. *Eur J Cell Biol* 41:142-149.
5. Reynolds G, Wang C, Pan J, Bednarek SY (2018). Inroads into internalization: Five years of endocytic exploration. *Plant Physiol* 176:208-218.
6. Norambuena L, Tejos R (2017). Chemical genetic dissection of membrane trafficking. *Annu Rev Plant Biol* 68:197-224.
7. Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeuemaitre B (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc* 214:159-173.
8. Dhonuskshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* 17:520-527.
9. Emans N, Zimmerman S, Fischer R (2002). Uptake of a florescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell* 14:71-86.
10. Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T (2008). Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *Plant J* 53:237-247.
11. Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker J, Cherflis J, Jackson CL (1999). Brefeldin A acts to stabilize and abortive ARF-GDP-Sec7 domain proteins complex: Involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 3:275-285.
12. Robinson DG, Langhans M, Saint-Jore-Dupas C, Hawes C (2008). BFA effects are tissue and not just plant specific. *Tr Plant Sci* 13: 405-408.
13. Dröse S, Altendorf K (1997). Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *J Exp Biol* 200:1-8.
14. Dettmer J, Hong-Germesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 18:715-730.
15. Scheuring D, Viotti C, Krüger F, Künzl F, Sturm S, Bubeck J, Hillmer S, Frigerio L, Robinson DG, Pimpl P, Schumacher K (2011). Multivesicular bodies mature from Trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 3463-3481.
16. Brian PW, Curtis PJ, Hemming HG, Norris GLF (1957). Wortmannin, and antibiotic produced by *Penicillium wortmannin*. *Trans Br Mycol Soc* 40: 365-368.
17. Arcaro A, Wymann MP (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296: 297-301.
18. Jeng RL, Welch MD (2001). Cytoskeleton: Actin and endocytosis- no longer the weakest link. *Curr Biol* 11: R691-R694.
19. Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y (1989). Latruncilins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13:127-144.
20. Morejohn LC, Bureau TE, Molè-Bajer J, Bajer AS, Fosket DE (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172:252-264.

21. Hasumi K, Shinohara C, Naganuma S, Endo A (1992). Inhibition of the uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophage J774 by the antibiotic ikaguramycin. *Eur J Biochem* 205: 841-846.
22. Moscatelli A, Ciampolini F, Rodighiero S, Onelli E, Cresti M, Santo N, Idilli A (2007). Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *J Cell Sci* 120:3804-3819.
23. Bandury DN, Oakley JD, Sessions RB, Banting G (2003). Tryphostin A23 inhibits internalization of the transferrin receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J Biol Chem* 278:12022-12028.
24. Ortiz-Zapater E, Soriano-Ortega E, Marcote MJ, Ortiz-Masia D, Aniento F (2006). Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tryphostin A23 and brefeldin A. *Plant J* 48:757-770.
25. Drakakaki G, Robert S, Szatmari AM, Brown MQ, Nagawa S, Van Damme D, Leonard M, Yang Z, Girke T, Schmid SL, Russinova E, Friml J, Raikhel NV, Hick GR (2011). Clusters of bioactive compounds target dynamic endomembrane networks in vivo. *Proc Nat Acad Sci, USA* 108:17850-17855.